



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Complejos del receptor sigma y de heterómeros de receptores acoplados a proteínas G en adicción y control de apetito

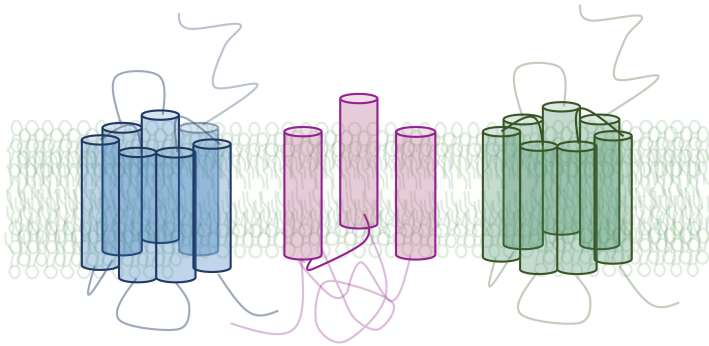
Mireia Casanovas Ferrero

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

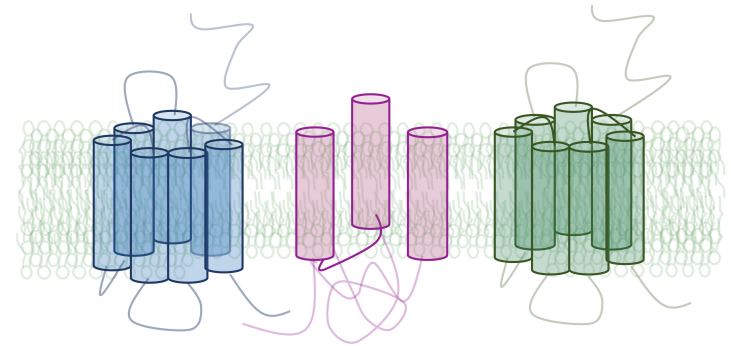
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Complejos del receptor sigma y de heterómeros de receptores acoplados a proteínas G en adicción y control del apetito



Complejos del receptor sigma y de heterómeros de receptores acoplados a proteínas G en adicción y control del apetito



Mireia Casanovas Ferrero



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOMEDICINA MOLECULAR

**Complejos del receptor sigma y de heterómeros de receptores acoplados a
proteínas G en adicción y control del apetito**

Memoria presentada por la graduada en Bioquímica

MIREIA CASANOVAS FERRERO

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita dentro del programa de doctorado de Biomedicina del
Departamento de Bioquímica y Biomedicina molecular de la Universidad de Barcelona

El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por
Mireia Casanovas Ferrero bajo la dirección de la Dra. Gemma Navarro Brugal y el Dr.
Rafael Franco Fernández y bajo la tutorización del Dr. Rafael Franco Fernández

Directores:

Dra. Gemma Navarro Brugal

FRANCO Firmado
FERNANDEZ digitalmente por
Z RAFAEL FRANCO
- FERNANDEZ RAFAEL
- 37678082B
Fecha: 2021.06.11
37678082B 13:11:37 +02'00'

Dr. Rafael Franco Fernández

Tutor:

FRANCO Firmado
FERNANDEZ digitalmente por
Z RAFAEL FRANCO
- FERNANDEZ RAFAEL
- 37678082B
Fecha: 2021.06.11
37678082B 13:12:32 +02'00'

Dr. Rafael Franco Fernández

Doctoranda:

Mireia Casanovas Ferrero

Barcelona, junio 2021

Dedicat a totes i tots que m'heu acompanyat
durant aquesta aventura, especialment a vosaltres
Patricia, Jordan i Pippen.

ABSTRACT

G protein-coupled receptors (GPCR), which comprise the largest superfamily of plasma membrane proteins in mammals, have had a strong interest in biomedical research. Indeed, between 30-40% of the current drugs marketed target a GPCR. In addition, these receptors are able to physically interact between them creating new functional units with significantly different pharmacological properties than those of their individual components. In this way, heteromerization among GPCR is a novel strategy to look for new therapeutic targets to combat a large variety of diseases, such as drug addiction. Even though millions of individuals suffer from addiction, currently there is no cure available. Among many effects, the use of psychostimulants causes euphoria due to an overstimulation of the reward system, inhibition of appetite, sensitivity to stress, and, in the long term, neurodegeneration. Research in this area revealed that some substances of abuse, including cocaine and amphetamines, are able to exert part of their effects through their interaction with sigma receptors (σ_1R and σ_2R). Several authors have published that sigma receptors are able to interact and modulate the signalling of other proteins, such as GPCR. Thus, the main objective of this Thesis has been to study the possible formation of complexes between GPCR and sigma receptors involved in psychostimulant addiction and appetite suppression. During the development of this Thesis, resonance energy transfer and bimolecular complementation techniques, and proximity ligation assays have been used to demonstrate the formation of GPCR and sigma receptors oligomers. Moreover, the fingerprint of these heteromers has been studied by analysing the signalling pathways through measurement of cAMP accumulation in the cytosol, calcium release from the endoplasmic reticulum, MAPK pathway activation, β -arrestin recruitment and dynamic mass redistribution. The results of this Thesis reveal a very important role of GPCR heteromerization in the molecular mechanisms that regulate both drug addiction and appetite suppression. Firstly, it has been proposed two molecular mechanisms by which cocaine, binding to σ_1R , may mediate its anorexigenic action. Deep inside, cocaine completely blocks the signalling induced by the orexigenic hormone ghrelin and affects functionality of the tetrameric complex consisting of one homodimer of dopamine D_1 receptor and one homodimer of ghrelin 1a receptor capable of signalling through a G_s and a G_q . Secondly, it has been observed that the orexin receptor type 1 and the corticotropin-releasing factor receptor type 2 are able to heteromerize and could play a key role in stress and relapse of amphetamine use. Finally, it has been shown that methamphetamine, via interacting with σ_1R , alters the correct functionality of the heteromer formed by the adenosine A_{2A} receptor and the cannabinoid CB_1 receptor, both of them targets for neuroprotection. Therefore, the $A_{2A}R$ - CB_1R complexes appear as new therapeutic target to combat neurodegeneration associated with chronic methamphetamine use.

RESUMEN

Actualmente, entre el 30-40% de los medicamentos comercializados tienen como diana a un receptor acoplado a proteína G (GPCR). Además, la capacidad que tienen estos receptores para interactuar físicamente entre ellos y formar nuevas unidades funcionales con propiedades farmacológicas distintas a las que tienen sus componentes individuales, permite generar nuevas dianas terapéuticas para combatir distintas enfermedades como la adicción a sustancias de abuso. Aunque millones de personas sufren de adicción en todo el mundo, actualmente no existe ninguna cura. Entre otros efectos adversos, el consumo de psicoestimulantes provoca un estado de euforia debido a una sobreestimulación del sistema de recompensa, inhibición del apetito, sensibilidad a situaciones de estrés y, a largo plazo, neurodegeneración. Se ha demostrado que determinadas sustancias de abuso, como la cocaína o las anfetaminas, son capaces de ejercer parte de sus efectos a través de su interacción con los receptores sigma (σ_1R y σ_2R), que, a su vez, son capaces de interactuar y modular la señalización de otras proteínas, como los GPCR. Así, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar la posible formación de complejos entre GPCR y receptores sigma implicados en la adicción a psicoestimulantes y en la inhibición del apetito. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se han usado técnicas de transferencia de energía y de complementación biomolecular, además del ensayo de ligación por proximidad, para demostrar la formación de oligómeros entre GPCR y receptores sigma. Además, se ha estudiado la huella de estos heterómeros analizando la acumulación de AMPc en el citosol, la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico, la activación de la vía de las MAPK, el reclutamiento de β -arrestinas y la redistribución dinámica de masas. Los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto un papel muy importante de la heteromerización de los GPCR en el mecanismo molecular que regulan los procesos de adicción a psicoestimulantes y la inhibición del apetito. En primer lugar, se han propuesto dos mecanismos moleculares mediante los cuales la cocaína, a través de su unión a σ_1R , puede mediar su acción anorexigénica. En concreto, la cocaína es capaz de bloquear completamente la señalización inducida por la hormona orexigénica grelina y de alterar la funcionalidad del complejo tetramérico formado por un homodímero de receptores de dopamina D_1 y un homodímero de receptores de grelina 1a capaz de señalizar a través de una G_s y una G_q . En segundo lugar, se ha demostrado que el receptor de orexina 1 y el receptor del factor liberador de corticotropina 2 son capaces de heteromerizar y podrían tener un papel muy importante en el estrés y la recaída en el consumo de anfetamina. Finalmente, se ha observado que la metanfetamina, a través de su unión a σ_1R , altera la funcionalidad del heterómero formado por el receptor de adenosina A_{2A} y el receptor cannabinoide CB_1 , siendo ambos receptores objeto de estudio en la neuroprotección. Así, el heterómero $A_{2A}R$ - CB_1R podría ser una buena diana terapéutica para combatir la neurodegeneración asociada a un consumo crónico de metanfetamina.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Receptores acoplados a proteína G	17
1.1.1. Características generales	17
1.1.2. Arquitectura y clasificación de los GPCR	18
1.1.3. Vías de señalización de los GPCR	20
1.1.4. Ligandos de GPCR y actividad constitutiva	23
1.1.5. Regulación de la actividad de los GPCR	25
1.2. Oligomerización de GPCR	26
1.2.1. Definiciones	26
1.2.2. Arquitectura	26
1.2.3. Relevancia funcional de la oligomerización de los GPCR	27
1.2.4. Técnicas para el estudio de la oligomerización de GPCR	29
1.2.5. Aplicaciones terapéuticas de los heterómeros de GPCR	34
1.3. Los ganglios basales	35
1.4. El sistema de recompensa	39
1.5. Tipos de GPCR	41
1.5.1. El sistema dopaminérgico y el receptor de dopamina D ₁	42
1.5.2. La grelina y el receptor de grelina GHS-R1a	44
1.5.3. La orexina y el receptor de orexina OX ₁	47
1.5.4. El factor liberador de corticotropina (CRF) y sus receptores	50
1.5.5. El receptor A _{2A} de adenosina	54
1.5.6. El receptor cannabinoide CB ₁	56
1.5.7. El heterómero A _{2A} R-CB ₁ R	60
1.6. El proceso de adicción	61
1.6.1. Los psicoestimulantes	62
1.6.1.1. La cocaína	63
1.6.1.2. La anfetamina y la metanfetamina	64
1.6.2. Mecanismo de acción de la cocaína y las anfetaminas	66
1.6.3. Receptores sigma	67
1.6.4. Tratamiento para la adicción a psicoestimulantes	71
1.6.4.1. Tratamientos para la adicción a la cocaína	71
1.6.4.2. Tratamientos para la adicción a las anfetaminas	75

2. OBJETIVOS	79
3. RESULTADOS	83
3.1. Informe de los directores de la Tesis Doctoral	85
3.2. Cocaine blocks effects of hunger hormone, ghrelin, via interaction with neuronal sigma-1 receptors	88
3.3. Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: structural and functional properties	107
3.4. Differential effect of amphetamine over the corticotropin-releasing factor CRF ₂ receptor, the orexin OX ₁ receptor and the CRF ₂ -OX ₁ heteroreceptor complex	126
3.5. Methamphetamine blocks adenosine A _{2A} receptor activation via sigma 1 and cannabinoid CB ₁ receptors	138
4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	161
5. CONCLUSIONES	183
6. BIBLIOGRAFÍA	187
7. ANEXOS	223
7.1. Adenosine A _{2A} receptor antagonist affects NMDA glutamate receptor function. Potential to address neurodegeneration in Alzheimer's disease	225
7.2. Pharmacological potential of varinic, minor-, and acidic phytocannabinoids	225
7.3. The sigma-1 receptor as key common factor in cocaine and food-seeking behaviors	225

ABREVIATURAS

A

aa	Aminoácido
AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN circular
AEA	Anandamina
AHD	Domino α -helicoidal
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
A _n R	Receptor de adenosina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNsi	ARN de interferencia
ATP	Adenosina trifosfato
ATV	Área tegmental ventral

B

BiFC	<i>Bimolecular fluorescence complementation</i>
BiLC	<i>Bimolecular luminescence complementation</i>
BiLFC	<i>Bimolecular luminescence and fluorescence complementation</i>
BiP/GPR-78	<i>Binding immunoglobulin protein/78 kDa glucose-regulated protein</i>
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>

C

CB _n R	Receptor cannabinoide
CBD	Cannabidiol
CRF	Factor liberador de corticotropina
CRF _n R	Receptor de CRF
CREB	<i>cAMP-responsive element-binding protein</i>
CTX	Toxina colérica
C-terminal	Carboxilo terminal

D

DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol

DAGLa	Lipasa de DAG
DAT	Transportador de dopamina
DARPK-32	<i>Dopamine-cAMP-regulated phosphoprotein</i>
DMR	Ensayo de redistribución dinámica de masas
DMT	N,N-dimetiltriptamina
DOR	receptor δ opioide
D _n R	Receptor de dopamina
E	
EL	Extracelular
ERK	<i>Extracellular regulated kinase</i>
F	
FAAH	Hidrolasa amina de ácidos grasos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
G	
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GDP	Guanosina difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótido de guanina
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>green fluorescence protein</i>)
GHSR	Receptor de grelina (<i>Growth Hormone Secretagogue Receptor</i>)
GIRK	<i>G Protein-coupled inwardly rectifying potassium channel</i>
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
Gpe	Globo pálido externo
Gpi	Globo pálido interno
GTP	Guanosina trifosfato
GRK	Quinasa de GPCR
H	
HEK-293T	Línea celular derivada de riñón de embrión humano (<i>Human Embryonic Kidney -293T cells</i>)
HPA	Vía hipotalámica-pituitaria-adrenal
HTRF	<i>Homogeneous Time Resolved Fluorescence</i>

I

IL Intracelular
IP₃ Inositol-1,4,5-trifosfato

K

KI *Knockin*
KO *Knockout*

L

LSD Ácido lisérgico

M

MAGL Lipasa de monoacilglicerol
MAM Membrana asociada a la mitocondria
MAPK *Mitogen activated protein kinase*
MC Manejo de contingencias
mTOR *mammalian Target of Rapamycin*

N

NAc Núcleo accumbens
NAPE N-acil fosfatidiletanolamina
NAPE-PLD Fosfolipasa D específica de NAPE
NECA N-metilcarboxamidoadenosina
NMDA Ácid N-metil-D-aspártico
NST Núcleo subtalámico
N-terminal Amino terminal

O

OMS Organización Mundial de la Salud
OX_nR Receptor de orexina

P

PGRMC-1 *Progesterone receptor membrane component-1*
PIP₂ Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA Proteína quinasa A
PKC Proteína quinasa C
PLA *Proximity ligation assay*
POMC Proopiomelanocortina
PTX Toxina *pertussis*

R

RET	Transferencia de energía por resonancia
RFP	Proteína fluorescente roja
RGS	Proteína reguladora de la señalización de la proteína G
Rluc	<i>Renilla</i> luciferasa

S

SAM	Vía simpático-adrenomedular
SEC	Sistema endocannabinoide
SN	Sustancia negra
SNC	Sistema nervioso central
SNc	SN <i>pars</i> compacta
SNr	SN <i>pars</i> reticulada
SNP	Sistema nervioso periférico
SRET	<i>Sequential Resonance Energy Transfer</i>

T

TAT	Transactivador de la transcripción
TCC	Terapia cognitivo-conductual
TDAH	Déficit de atención con hiperactividad
Δ^9 -THC	Δ^9 -tetrahidrocannabinol
TM	Dominio transmembrana
TMEM97	Proteína transmembrana 97
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1

U

UCN	Urocortina
-----	------------

V

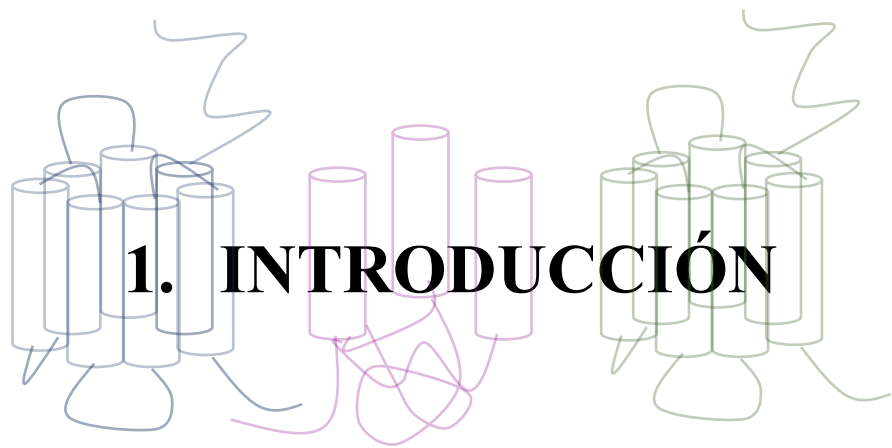
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VL	Núcleo ventrolateral del tálamo

Y

YFP	Proteína fluorescente amarilla (<i>yellow fluorescent protein</i>)
-----	--

Otros

2-AG	2-araquidonoil-glicerol
σ_n R	Receptor sigma



1. INTRODUCCIÓN



1.1. Receptores acoplados a proteína G

1.1.1. Características generales

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR), también conocidos con el nombre de receptores de 7 dominios transmembrana (7TM), constituyen la superfamilia de proteínas de membrana más versátil y más abundante en los organismos eucariotas (1). En humanos, estos receptores están codificados por más de 800 genes distintos, expresándose más del 90% en el sistema nervioso central (SNC) (2). La principal función de estos receptores es la transducción de señal, inducida por un estímulo extracelular, hacia el interior de la célula. Los GPCR pueden ser activados por una gran diversidad de ligandos con estructuras muy heterogéneas; desde moléculas muy pequeñas como iones, nucleótidos o aminoácidos, hasta moléculas más grandes como neurotransmisores, péptidos y proteínas, lípidos, aminas biógenas y hormonas (1,3,4). Una vez el receptor ha reconocido su señal, se inicia la transducción al interior de la célula a través de diferentes efectores como son el adenilato ciclasa (AC), distintas fosfolipasas o canales iónicos. De esta forma, los GPCR participan y regulan vías de señalización que están involucradas en una gran variedad de funciones fisiológicas tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP). Entre otros, pueden regular procesos sensoriales como el olfato, el gusto o la vista, pero también la presión sanguínea, el comportamiento, la proliferación, la supervivencia celular, la respuesta inmunitaria, los procesos inflamatorios o la neurotransmisión (5,6) (**Figura 1**).

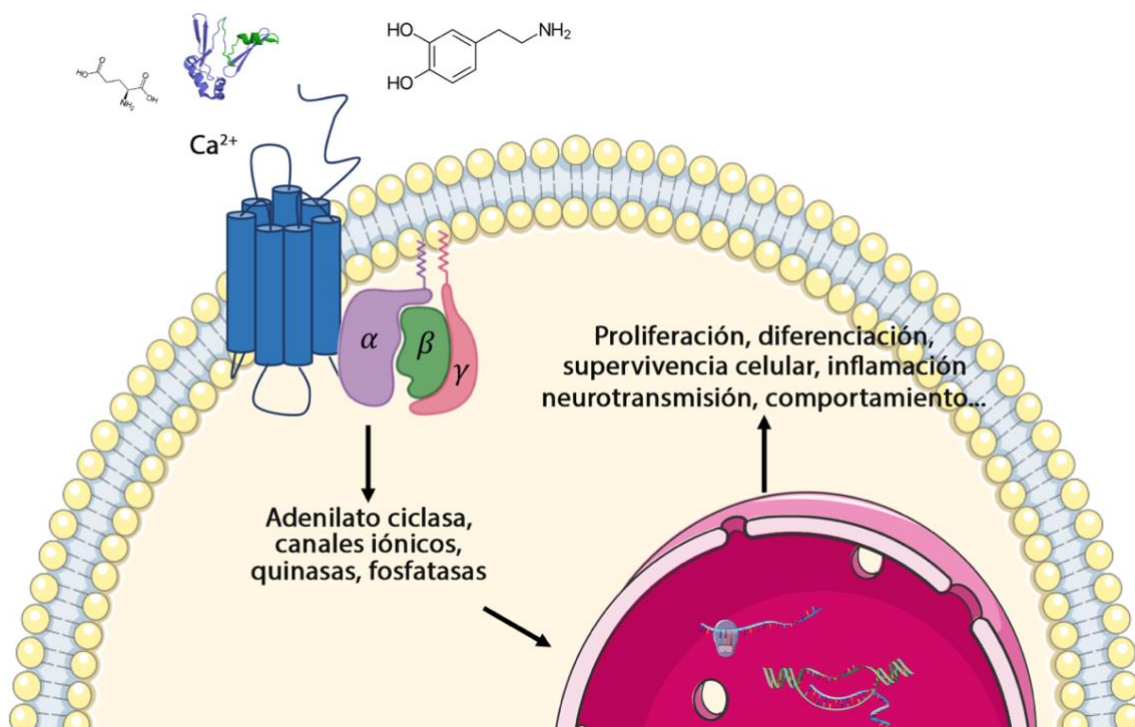


Figura 1 Transducción de la señal de los GPCR. Para la creación de esta figura se han usado elementos de Servier Medical Art, con licencia CC BY 3.0, y de BioRender.com.



No es de extrañar, pues, que alteraciones o mutaciones en estos receptores se encuentren presentes en enfermedades y patologías como el cáncer, la obesidad, la diabetes, la hipertensión, diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, o incluso en procesos de adicción a sustancias de abuso como la cocaína o la metanfetamina (1,5,7,8). De esta manera, los GPCR tienen un especial interés como diana terapéutica. Actualmente, alrededor del 30-40% de los medicamentos comercializados (incluido la mayoría de los más vendidos) tienen como diana un GPCR (8–12). Sin embargo, aunque hay más de 350 medicamentos que tienen como diana un GPCR, solo se está actuando sobre una pequeña parte de todos los GPCR que existen (103 de 403 posibles) (13,14), de manera que los GPCR aún tienen un enorme potencial que ofrecer. Todos estos datos, sumado a los continuos avances en farmacología y fisiología de nuevos receptores nos permite predecir, sin demasiado error, que el número de dianas de GPCR seguirá incrementando en los próximos años (14,15).

1.1.2. Arquitectura y clasificación de los GPCR

La gran diversidad en la función de los GPCR contrasta con la homología que presenta su arquitectura. La característica más conocida de todos los GPCR es su única cadena peptídica con 7 dominios de hélice alfa transmembrana (TM) (14,16). Estas hélices están formadas por entre 25 y 35 aminoácidos (aa) hidrofóbicos y están conectadas entre sí por tres bucles intracelulares (IL1, IL2 y IL3) y tres bucles extracelulares (EL1, EL2, EL3) (17,18). Además, todos presentan la misma orientación, con el extremo carboxilo terminal (C-terminal) hacia el espacio intracelular y el dominio amino terminal (N-terminal) hacia el medio extracelular (1) (**Figura 2**). La mayor homología entre los GPCR se encuentra en las regiones TM, mientras que los dominios más variables son los extremos C y N-terminal y el bucle IL3, ubicado entre los TM5 y TM6. Finalmente, otra característica común en los GPCR es la capacidad que tienen de interactuar y señalizar a través de una proteína G heterotrimérica (15), que es el origen de su nombre.

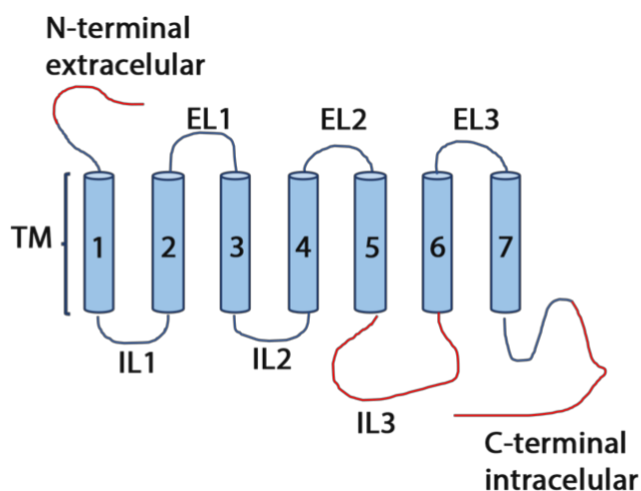


Figura 2 Representación esquemática de la estructura de un GPCR. En rojo se muestran las estructuras más variables.



En 1994 Kolakowski propuso uno de los primeros sistemas de clasificación de los GPCR, conocido con el nombre de sistema A-F (16). Este método divide a los GPCR en 7 grupos o familias diferentes en función de su homología de secuencia y su similitud funcional. Las tres familias principales son las A, B y C, cuyas estructuras se pueden ver en la **Figura 3**.

La familia A, también conocida como *rhodopsin-like receptors*, es la familia más grande y más estudiada hasta el momento. Está formada por 719 receptores en humanos (la mayoría sensoriales), lo que supone aproximadamente el 80% de todos los receptores humanos (14). Todos estos receptores presentan una estructura similar al receptor de rodopsina, primer GPCR del cual se pudo cristalizar su estructura (19). Presentan un motivo NSXXNPXXY en la hélice VII y un motivo DRY en la hélice III, que son importantes para la estabilización de la proteína y/o para su activación (20). Además, la gran mayoría de receptores de la familia A tienen un puente disulfuro que conecta el primer y el segundo bucle extracelulares (14). Finalmente, este grupo también se caracteriza por presentar unos dominios transmembrana inclinados y torcidos (2). El ligando se une a una cavidad formada por los dominios TM, aunque cuando el ligando es muy pequeño, se puede unir en los bucles extracelulares y en el dominio N-terminal (2,21). Algunos ejemplos de receptores que han sido objeto de estudio de esta tesis son el receptor de adenosina A_{2A}, el receptor cannabinoide CB₁, el receptor de dopamina D₁, el receptor de grelina GHS-R1a i el receptor de orexina OX₁.

La familia B, también conocida como *secretin receptor family*, está formada por 48 receptores en humanos. Estos receptores se caracterizan por tener un extremo N-terminal bastante largo (de unos 60-80 residuos) con diversas cisteínas. Estos residuos forman una red de puentes disulfuro que juegan un papel muy importante en la unión del ligando (normalmente de origen lipídico) a este receptor (14,17,20). Un ejemplo de receptor de esta familia es el receptor de la hormona liberadora de corticotropina CRF_{2R}.

La familia C, o *metabotropic glutamat receptors*, está formada por 22 receptores en humanos y se caracteriza por formar dímeros y por tener unos extremos N y C terminales muy largos, de unos 280-500 aa. Además, tienen un tercer bucle intracelular corto y altamente conservado (17). Estos receptores tienen el dominio de unión al ligando en forma de un dímero unido por un puente disulfuro que puede abrirse y cerrarse en el proceso de unión al ligando (*Venus flytrap*). Esta familia incluye receptores metabotrópicos de glutamato, receptores sensores de Ca²⁺, receptores del gusto, olfatorios y feromonas (21).

Las familias restantes son menos conocidas y numerosas, pero no significa que sean menos importantes. La familia D (*fungal mating pheromone receptors*) está constituida por receptores de feromonas de levadura y la familia E (*cyclic AMP receptors*) está presente en los mohos mucilaginosos (17), ambas no presentan ningún gen en humanos. La familia F (*Frizzled and smoothed receptors*) se compone de receptores de proteínas implicadas en el desarrollo y relacionadas con la proteína Wnt y está formada por 11 receptores en humanos. Recientemente, se



1. Introducción

ha separado una sexta familia (anteriormente perteneciente a la familia A) conocida como la familia T (*Taste2*). Esta familia, formada por 25 genes en humanos, se caracteriza porque los receptores que la forman tienen un dominio N-terminal muy corto (21). Finalmente, existen 6 receptores en humanos que no se pueden clasificar utilizando este sistema, de manera que se les agrupa en la Familia O (*other*, otros en inglés) (16).

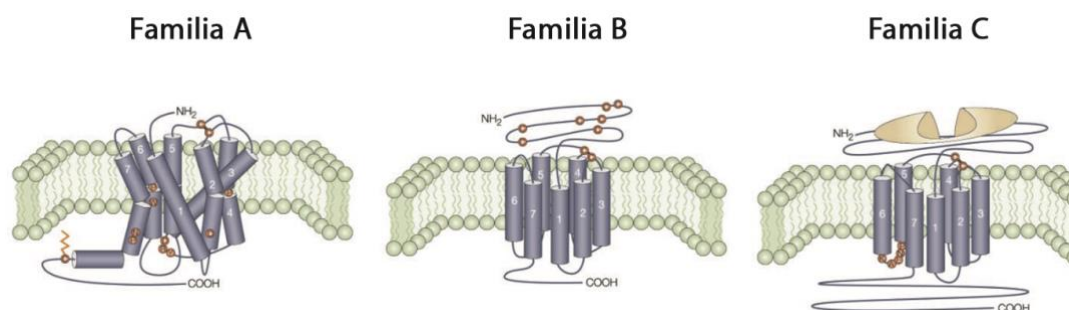


Figura 3 Representación esquemática de las tres familias principales de los GPCR. Los residuos altamente conservados se indican en círculos rojos. Modificado de (2).

Posteriormente, Fredriksson y colaboradores propusieron un sistema alternativo de clasificación establecido según el origen filogenético de cada receptor. Estos autores defienden que todos los GPCR surgieron a partir de un único antecesor común que ha ido evolucionando hasta generar todos los GPCR que se conocen actualmente. Así, agrupan a los GPCR en cinco familias de receptores conocidas con el nombre de GRAFS: Glutamato, Rodopsina, Adhesión, Frizzled/Taste2 y Secretina (17).

1.1.3. Vías de señalización de los GPCR

La señalización canónica de los GPCR se produce gracias a su habilidad para interactuar con una proteína G heterotrimérica, formada por las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$. La unión de un ligando a su receptor provocará cambios conformacionales tanto en el receptor como en la proteína G, que transducirá la señal hacia el interior de la célula (1,22,23).

La subunidad $G\alpha$ tiene un peso molecular de entre 39-46 KDa y se conocen 21 isoformas distintas (24). Todas las isoformas presentan una estructura con un dominio Ras GTPasa y un dominio α -helicoidal (AHD), entre los que se forma una cavidad donde siempre hay una molécula de GDP ($G\alpha$ inactiva) o de GTP ($G\alpha$ activa) (25). En base a su similitud funcional y de secuencia, se han identificado 4 familias de $G\alpha$ (26). En primer lugar, tenemos las $G\alpha_s$, divididas a su vez en $G\alpha_s$ (estimuladoras) y $G\alpha_{olf}$ (olfativas). En segundo, la subfamilia $G\alpha_i$ es la más diversa y abundante incluyendo diversos subgrupos: las proteínas $G\alpha_i$ (inhibición), las $G\alpha_o$ que presenta dos variantes de *splicing* $G\alpha_{oA}$ y $G\alpha_{oB}$, las $G\alpha_t$ (transducina), las $G\alpha_g$ (gustducina) y las $G\alpha_z$. La tercera subfamilia



es la $G\alpha_q$, formada por las proteínas $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ y $G\alpha_{16}$. La última subfamilia es la $G\alpha_{12}$, formada por las proteínas $G\alpha_{12}$ y $G\alpha_{13}$. Por el otro lado, la subunidad $G\beta$, con un peso molecular de 37 KDa, está codificada por cinco genes distintos en humanos. Las proteínas $G\beta_1$, $G\beta_2$, $G\beta_3$ y $G\beta_4$ presentan una homología muy grande y se expresan de forma ubicua, mientras que la $G\beta_5$ es la más distinta estructuralmente y se expresa principalmente en el cerebro. Finalmente, existen 12 genes que codifican por $G\gamma$ en humanos, con un peso molecular de 8 kDa. Las isoformas $G\gamma_2$, $G\gamma_5$, $G\gamma_7$, $G\gamma_{10}$, $G\gamma_{11}$, $G\gamma_{12}$ se expresan de forma ubicua, las $G\gamma_8$ y $G\gamma_9$ en el epitelio olfativo y las restantes, $G\gamma_1$, $G\gamma_3$, $G\gamma_4$ y $G\gamma_{13}$ en el cerebro (24,25).

Las funciones bioquímicas de las proteínas G heterotriméricas se pueden explicar según el ciclo de la GTPasa (**Figura 4**). Inicialmente, en un estado inactivo, la proteína $G\alpha$ se encuentra unida a GDP. Una vez el receptor se ha activado, el receptor puede actuar como un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF), promoviendo la liberación de la molécula de GDP de la subunidad $G\alpha$. Como la concentración de GTP es mucho mayor que la de GDP en el medio intracelular, la subunidad α se unirá a GTP, produciéndose la activación de la proteína G (24,25). Esta activación provoca cambios conformacionales en la proteína G que permiten tanto a la GTP- $G\alpha$ como al complejo $G\beta\gamma$ interactuar con distintos efectores, y, en consecuencia, activar distintas vías de señalización. La señalización de la $G\alpha$ se termina cuando a causa de la actividad GTP intrínseca de la subunidad $G\alpha$ se hidroliza el GTP a GDP. Este proceso se puede ver acelerado por proteínas que activan la GTPasa (GAP) como las proteínas reguladoras de la señalización de la proteína G (RGS). Por el otro lado, la señalización generada por el complejo $G\beta\gamma$ se termina cuando se vuelve a unir a la subunidad $G\alpha$ para formar la proteína G heterotrimérica inactiva de nuevo (6,25,27).

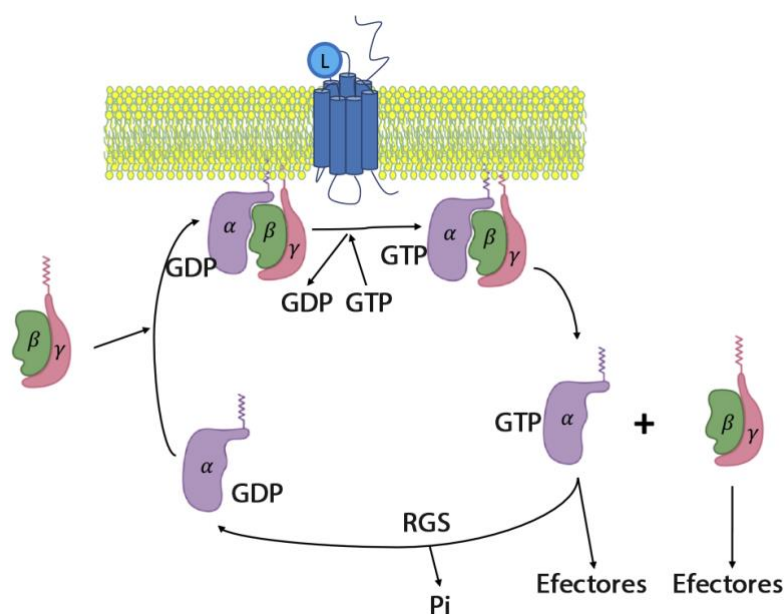


Figura 4 Ciclo de las proteínas G. L: ligando. Para la creación de esta figura se han usado elementos de BioRender.com.



1. Introducción

Según el tipo de $G\alpha$, se activará una vía de señalización u otra. Por ejemplo, tanto las $G\alpha_s$ como las $G\alpha_i$ tienen como principal efector la enzima adenilato ciclasa (AC), proteína que cataliza la conversión de ATP a AMPc. Mientras las $G\alpha_s$ activan la AC, produciendo un aumento de los niveles de AMPc intracelular, las $G\alpha_i$ la inactivan, disminuyendo los niveles de AMPc (28). Por otro lado, las $G\alpha_{q/11}$ son capaces de activar las fosfolipasas-C β . Estas enzimas hidrolizan el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) a inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El primero provocará la liberación de calcio intracelular del retículo endoplásmico, mientras que el segundo activará la proteína quinasa C (PKC) que seguirá la cascada intracelular (25). Finalmente, las proteínas $G\alpha_{12/13}$ activan la proteína Rho, que forma parte de la familia de proteínas Ras, y tiene implicaciones en la reorganización del citoesqueleto (6). Inicialmente, se pensaba que un receptor solo se podía acoplar a una determinada proteína G. Así, por ejemplo, se demostró en primer lugar que el receptor β -adrenérgico podía unirse a G_s , pero no a G_i ni G_q . Sin embargo, actualmente se empieza a aceptar que un mismo receptor se puede unir a distintas proteínas G, generando la activación de múltiples efectores a partir de la activación de un solo receptor (29). Este es el caso, por ejemplo, del receptor de grelina 1a, capaz de señalizar tanto por G_i como por G_q , según el tejido donde se exprese (30).

Una técnica para demostrar que un receptor señala a través de una determinada proteína G es la utilización de inhibidores específicos. Así, por ejemplo, células tratadas con la toxina colérica (CTX) no podrán señalizar a través de $G\alpha_s$ por que esta toxina reduce la actividad GTPasa de la subunidad $G\alpha$, provocando una estimulación continua de la proteína G. La señalización producida por la subunidad $G\alpha_i$ se puede inhibir utilizando la toxina *pertussis* (PTX), que altera una cisteína en el extremo terminal de la $G\alpha_i$ impidiendo que se pueda unir al receptor. Finalmente, el péptido YM-254890, obtenido de la bacteria *Chromobacterium* spp QS3666, es un inhibidor específico de $G\alpha_q$ (28).

A parte de la subunidad $G\alpha$, el dímero $G\beta\gamma$ también puede señalizar a través de un gran número de efectores incluyendo las fosfolipasas C- β , la AC, los canales de K^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje, las quinasas 3-fosfoinositidil y las quinasas de GPCR (GRK) (25), así como activar la vía de las MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (23). La vía de las MAPKs está formada por un conjunto de quinasas, entre ellas las ERK1 (MAPK3) y ERK2 (MAPK1), y constituye la pieza central de una cascada de señalización que regula una gran variedad de respuestas fisiológicas (31).

Anteriormente, se pensaba que los GPCR solo podían señalizar a través de proteínas G, sin embargo, actualmente se conoce que esta señalización es mucho más compleja, dado que los GPCR pueden señalizar de manera independiente de proteína G, a través de arrestinas, quinasas (transactivación), canales iónicos y varias proteínas *scaffold* (13). Además, también se ha demostrado que la señalización se puede producir no solo en la membrana plasmática, sino que los GPCR también



pueden señalar en membranas endosomales (13). Para aumentar la complejidad de la señalización de los GPCR, se ha demostrado que la mayoría de las respuestas biológicas reguladas por ellos no dependen de una sola ruta, sino de la integración de una complicada red de señales intracelulares (1,29) y que un mismo GPCR es capaz de activar distintas vías de señalización en función de dónde se exprese o del ligando que lo active (selectividad funcional) e incluso un mismo ligando puede activar con distintas potencias diferentes vías de un mismo receptor (*biased agonism*) (27,32).

1.1.4. Ligandos de GPCR y actividad constitutiva

La actividad constitutiva de un GPCR es la capacidad que tiene este receptor señalar en ausencia de ligando. Cada GPCR tendrá un nivel distinto de actividad basal, que podrá variar según el tejido donde se exprese (33). Además, ciertas mutaciones específicas pueden provocar cambios en la activación constitutiva del receptor, generando diferentes enfermedades (34,35).

A un receptor se le pueden unir distintos ligandos, provocándole diferentes efectos. Así, podemos clasificar los ligandos como agonistas, totales y parciales, antagonistas y agonistas inversos. En primer lugar, los agonistas se caracterizan por unirse al centro ortostérico del receptor, activándolo. Cuando la respuesta generada es máxima, hablaremos de agonista total, mientras que si la respuesta es menor el ligando se clasifica como agonista parcial (13). Por definición, los agonistas endógenos, sintetizados por el propio organismo, son agonistas totales de su receptor (36). Por otro lado, los antagonistas son compuestos que bloquean la activación del receptor. Al igual que los agonistas, también se unen al centro ortostérico del receptor, de manera que los antagonistas impiden la unión del agonista al receptor, sin modificar su actividad constitutiva. Finalmente, los agonistas inversos, son compuestos que además de bloquear la activación del receptor, son capaces de disminuir su actividad basal. Según el grado, también podemos diferenciar entre agonistas inversos totales (reducción máxima de la actividad basal) o parciales (reducción parcial de la actividad basal) (13).

Existen otras moléculas que son capaces de regular la señalización de un receptor sin unirse a su centro ortostérico. Estas moléculas se llaman moduladores alostéricos y pueden afectar la estructura, la dinámica y la función de los GPCR de diversas maneras, modulando la actividad tanto de agonistas como de antagonistas. Cuando hablamos de alosterismo positivo, nos referimos a compuestos que pueden aumentar la afinidad de un ligando para el centro ortostérico de un receptor. Mientras que el alosterismo negativo, la disminuye (27). Finalmente, existen moléculas que son capaces de unirse a la vez a los centros alostérico y ortostérico del receptor. Estos ligandos pueden actuar como agonistas o antagonistas y se llaman ligandos bitópicos (13,37).

El mecanismo de activación de los GPCR se puede explicar de forma simplificada con el modelo de dos estados de conformaciones del receptor. En este modelo, un receptor se puede encontrar en dos estados: en forma activa (R^*), cuando el receptor es capaz de interactuar con sus



1. Introducción

efectores, o en forma inactiva (R), cuando no puede interactuar (38), existiendo un equilibrio entre ambas conformaciones (38,39). En ausencia de ligando, la actividad basal de cada receptor vendrá dada por este equilibrio y la eficacia de cada ligando sobre el receptor vendrá dada por la capacidad del ligando de modificar dicho equilibrio. Por ejemplo, hablaremos de un agonista total cuando un ligando sea capaz de unir y estabilizar la forma activa del receptor, desplazando el equilibrio sobre R*. Por otro lado, un agonista inverso estabiliza la forma R del receptor, bloqueando su activación. Los agonistas parciales pueden unirse con distintas afinidades a las dos conformaciones del receptor, de manera que serán menos efectivos que los agonistas totales para desplazar el equilibrio hacia la forma R*. Finalmente, los antagonistas tienen una afinidad igual para cada conformación del receptor, por lo que no afectan al equilibrio, pero al unirse al centro ortostérico del receptor, impiden que se unan los agonistas, bloqueando la señalización de dicho receptor (13) (**Figura 5**).

Aunque este modelo permite explicar perfectamente estos conceptos, no es capaz de explicar cómo un mismo ligando produce distintos efectos en distintas vías de señalización inducidas por un mismo receptor, es decir, no se puede explicar la selectividad funcional con este modelo. Por eso, actualmente se considera que un mismo receptor puede adoptar múltiples estados/conformaciones (R*¹, R*², ..., R*ⁿ). Así, un ligando se uniría y estabilizaría una determinada conformación del receptor lo que se traduciría en la activación de una vía de señalización por encima de otras (27). De esta manera, una misma molécula podría ser considerada agonista total al estudiar una determinada vía de señalización, pero agonista parcial si consideramos una segunda vía.

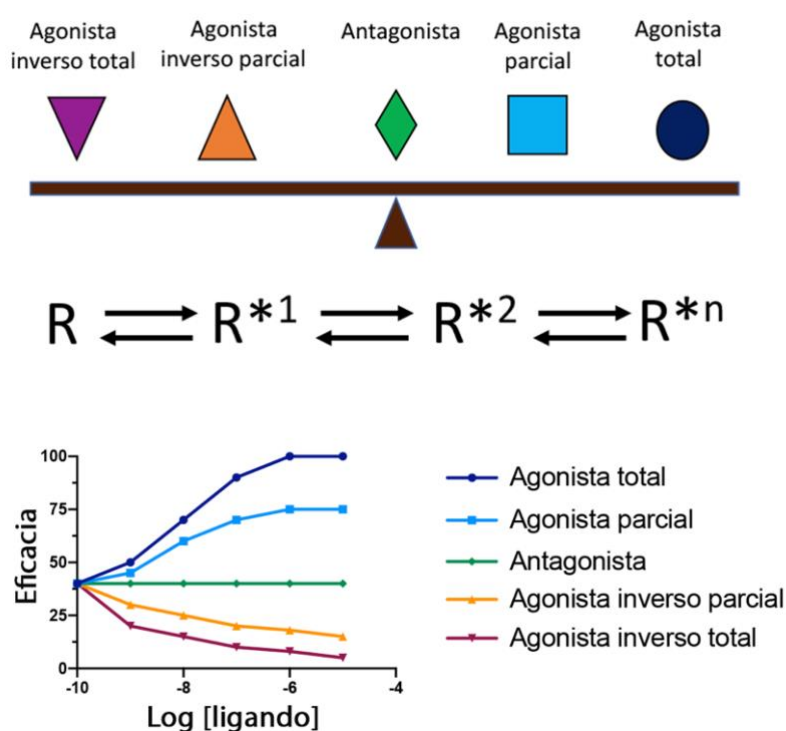


Figura 5 Acción de los diferentes tipos de ligandos sobre la actividad constitutiva de un receptor.



1.1.5. Regulación de la actividad de los GPCR

La unión de un agonista a su receptor producirá un pico de respuesta, que puede aparecer en milisegundos o en pocos minutos, dependiendo del receptor, para luego llegar a una *plateau* y, finalmente, disminuir rápidamente. Este fenómeno se conoce como desensibilización del receptor y se produce aunque sigamos estimulado el receptor con su propio agonista. De esta manera, se protege a las células de posibles efectos adversos provocados por una sobreestimulación celular (40). La desensibilización se puede clasificar según lo que tarde en producirse esta atenuación del receptor. En primer lugar, tenemos la desensibilización de corta duración (dura unos pocos segundos) y está provocada por un desacoplamiento de la proteína G al receptor. Por otro lado, la desensibilización de larga duración (*down-regulation*) provoca la internalización del receptor en vesículas (minutos) y una reducción de la cantidad de receptores, debido a una disminución de los niveles de mRNA y la degradación de los receptores preexistentes (horas) (40).

El proceso de desensibilización se inicia con varias fosforilaciones en el extremo C-terminal del receptor por distintas quinasas. En ausencia de ligando, el receptor será fosforilado por las proteína quinasa A (PKA) o la PKC (desensibilización heteróloga), mientras que en presencia de ligando, serán las GRK quien fosforilen al receptor (desensibilización homóloga) (40). Una vez fosforilado, el receptor es reconocido por β -arrestinas que se unen con afinidad variable. Por un lado, GPCR de la familia A se une con mayor afinidad a las β -arrestinas 2 que a las β -arrestinas 1, mientras que los GPCR de la familia B tienen una afinidad parecida a ambos tipos de β -arrestinas. La unión del receptor a las β -arrestinas provoca por un lado el desacoplamiento de la proteína G del receptor, ya que ambas compiten para unirse al receptor (desensibilización) y, por el otro, promueven la internalización del receptor permitiendo la interacción con proteínas de clatrina. De esta manera, el receptor deja de estar en la membrana y pasa a estar dentro de un endosoma donde podrá ser desfosforilado y reciclado de nuevo a la membrana, ser ubiquitinado y degradado en lisosomas (41,42) o incluso seguir señalizando (40).

Las β -arrestinas no solo participan en el secuestro de GPCR para la desensibilización e internalización, sino que también actúan como proteínas involucradas en la transducción de la señal, incluyendo la activación de las MAPK, la transactivación del receptor, el tráfico de receptores y las regulaciones transcripcionales (**Figura 6**).



Figura 6 Múltiples funciones de las β -arrestinas. L: ligando. Para la creación de esta figura se han usado elementos de Servier Medical Art, con licencia CC BY 3.0, y de BioRender.com.

1.2. Oligomerización de GPCR

1.2.1. Definiciones

Aunque inicialmente los GPCR se estudiaban de forma aislada, considerando que su única estructura era como entidades monoméricas, actualmente está ampliamente aceptado que pueden interactuar con otras proteínas, incluidos otros GPCR formando complejos de orden superior (43). Existen muchas evidencias científicas que demuestran la formación de dímeros entre receptores iguales (homodímeros) o distintos (heterodímeros), e incluso complejos de orden superior, como la formación de trímeros o tetrámeros. En la base de datos HetNET (<http://www.gpcr-hetnet.com>) hay descritas más de 500 interacciones entre GPCR (44).

Un heterómero de GPCR se define como un complejo macromolecular formado por al menos dos unidades de receptores funcionales (protómeros) con propiedades bioquímicas demostrablemente diferentes de las que tienen sus componentes individuales (45,46). Es importante no confundir este concepto con el de receptor heteromérico, en el que la unidad mínima funcional está formada por dos o más subunidades, pero que no son funcionales individualmente. Por ejemplo, los receptores ionotrópicos de NMDA son receptores heteroméricos, ya que para que sean funcionales se requieren cuatro subunidades (47).

1.2.2. Arquitectura

Actualmente, uno de los aspectos que genera más interés en el campo de los GPCR es conocer su estequiometría, es decir, saber con exactitud si los receptores se encuentran formando dímeros, trímeros, tetrámeros o incluso unidades de orden superior (48). La interacción entre dos GPCR se puede producir de manera directa a través de sus regiones TM o a través de los dominios N o C terminal o de manera indirecta, a través de proteínas *scaffold*. La interacción directa normalmente se produce *head to head* y puede implicar una gran variedad de combinaciones entre las distintas regiones TM de los GPCR, siendo algunas de las más habituales las interacciones entre los TM 1/6, 4/5 o 5/6 (48). La estequiometría entre GPCR y proteínas G más aceptada actualmente es la de dos



GPCR por cada proteína G. Debido a que existen problemas estéricos no es muy probable que quepan dos proteínas G debajo de un homodímero o heterodímero de GPCR (49). Dado un determinado heterómero, una posibilidad para que éste pudiese señalar a través de dos proteínas G sería formando un tetrámero (48) (**Figura 7**). Este es el caso reportado por el tetrámero formado por un homodímero del receptor de adenosina A_{2A} y un homodímero del receptor de dopamina D₂ con dos proteínas G, una G_i y una G_s (50).

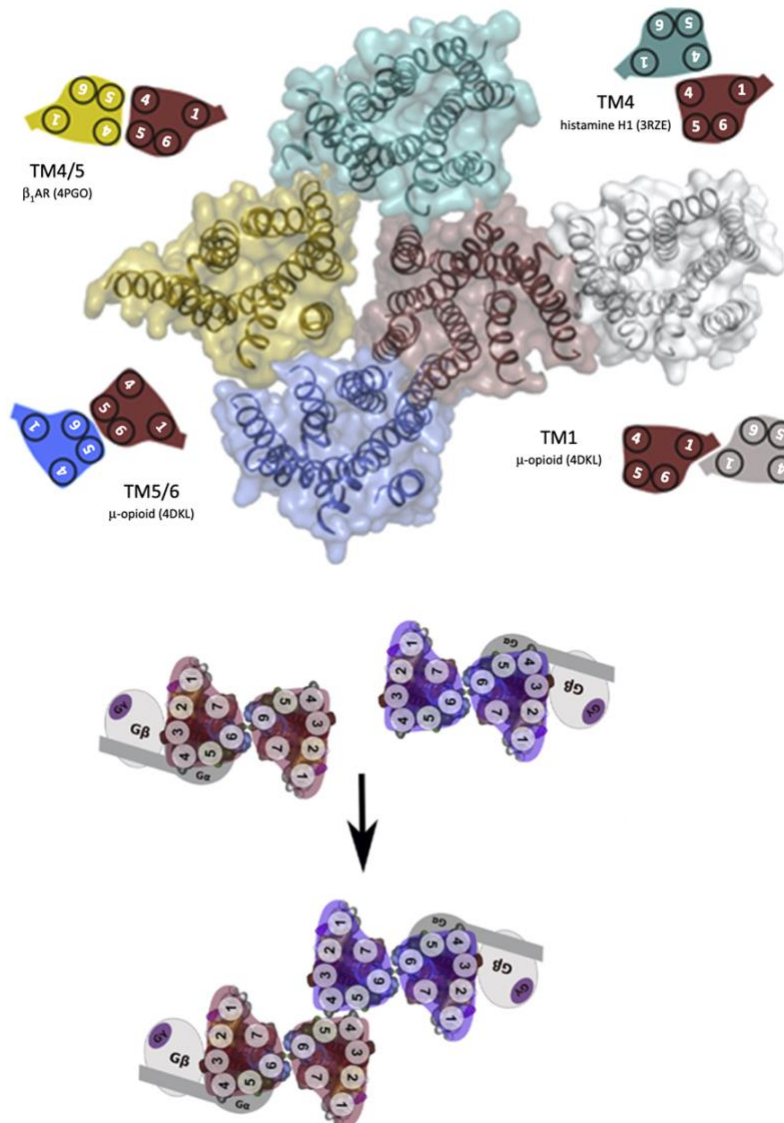


Figura 7 Ejemplos de interacciones entre oligómeros de GPCR. Modificado de (48,49).

1.2.3. Relevancia funcional de la oligomerización de los GPCR

La participación de un GPCR en un oligómero puede llegar a modificar prácticamente todo su ciclo vital, desde su ontogenia, biosíntesis, maduración y expresión, pasando por el transporte del retículo endoplásmico hasta la membrana plasmática, seguido de su farmacología, señalización, desensibilización e internalización/degradación (51,52) (**Figura 8**).



Si profundizamos, podemos decir que la heteromerización puede modular alostéricamente la función de un receptor, es decir, puede aumentar o disminuir la afinidad de un ligando por su receptor (53). Por ejemplo, la interacción del receptor de adenosina A_1 con el receptor también de adenosina A_{2A} , disminuye la afinidad del receptor A_1 para sus agonistas (54). Otro fenómeno que se puede producir es un cambio de acoplamiento a proteína G en el heterómero, siendo un ejemplo clásico el formado por el heterómero de receptores de dopamina D_1 - D_2 . Este heterómero señala a través de $G_{q/11}$, mientras que la señalización canónica del D_1R es a través de G_s y la del D_2R a través de G_i (55). Este cambio de proteína G también se ha observado en el heterómero CB_1R - D_2R que señala a través de G_s , aunque los dos receptores transducen la señal a través de G_i (56,57). Otros dos fenómenos muy frecuentes son i) la potenciación (*cross-talk* positivo) o inhibición (*cross-talk* negativo) que se produce al co-activar a los dos receptores que forman el heterómero simultáneamente y ii) la habilidad del antagonista de un protómero de bloquear la señalización inducida por la activación de la pareja del heterómero, lo que se conoce como *cross*-antagonismo (58). También se ha observado que un receptor puede cambiar su localización intracelular hacia la membrana plasmática cuando se encuentra heteromerizando. Finalmente, la heteromerización puede producir un aumento/disminución de la internalización inducida por la activación mediante ligando, e incluso que el agonista de un receptor provoque la internalización del otro receptor con el que forma el complejo (59). El conjunto de cambios que presenta un receptor cuando se encuentra formando un complejo heteromérico respecto a su comportamiento cuando actúa de manera aislada, se conocen como huella del heterómero y permite detectar estos complejos en entornos fisiológicos (45,46).

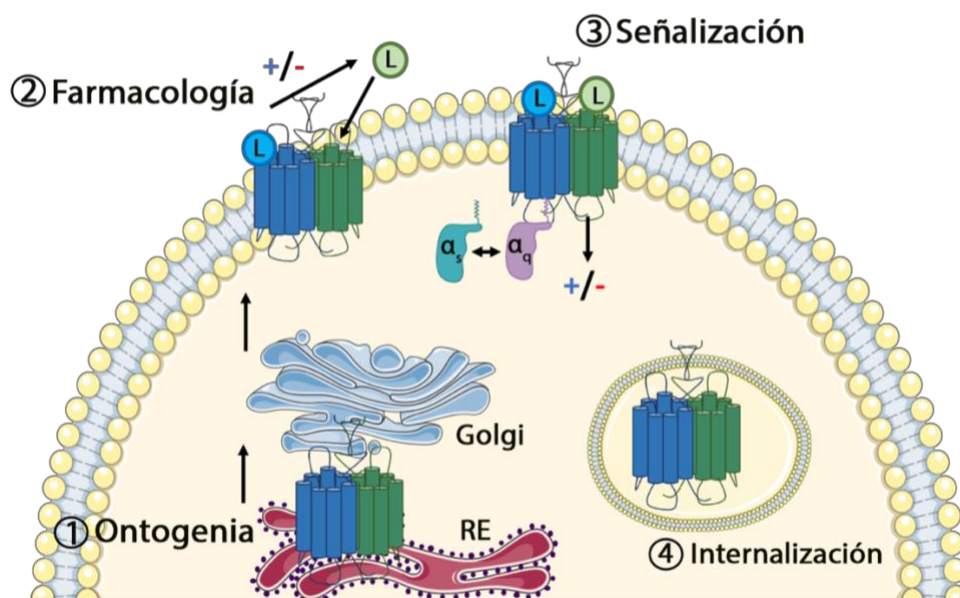


Figura 8 La heteromerización puede afectar todo el ciclo vital de un GPCR. ER: retículo endoplásmico, L: ligando. Para la creación de esta figura se han usado elementos de Servier Medical Art, con licencia CC BY 3.0, y de BioRender.com.

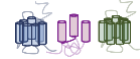


1.2.4. Técnicas para el estudio de la oligomerización de GPCR

Se han propuesto tres criterios para demostrar la existencia de un heterómero: 1) Los componentes que lo forman deben colocalizar en el mismo compartimiento celular e interactuar físicamente. 2) Debe existir la huella del heterómero. 3) La huella del heterómero debe desaparecer cuando se rompe la interacción entre los receptores que forman el heterómero (58).

Para demostrar una interacción física entre dos proteínas, inicialmente, se utilizó la técnica de la co-immunoprecipitación, donde el primer receptor se inmunoprecipita mediante el uso de un anticuerpo selectivo y su pareja co-immunoprecipita y se visualiza, posteriormente, por western blot. Utilizando esta técnica se demostró por primera vez la formación de heterodímeros como el GABA_{B1}-GABA_{B2} (60) o el A₁R-D₁R (61), entre muchos otros. Sin embargo, el principal inconveniente de esta técnica es la formación de agregados artificiales debido a la solubilización incompleta de los GPCR, lo que ha provocado que sea cada vez menos utilizada para la demostración de la formación de heterómeros (62). Técnicas de inmunocitoquímica sirven para demostrar que dos receptores están colocalizando, es decir, que se encuentran en un mismo compartimiento celular, pero la resolución de la imagen obtenida no permite demostrar que existe una interacción directa entre dichos receptores (62). Para poder demostrar esta interacción se pueden utilizar técnicas biofísicas de transferencia de energía por resonancia (RET). El principio básico de las técnicas de RET es la transferencia de energía entre una proteína dadora y una proteína aceptora. Para que esta transferencia sea eficaz se deben cumplir dos requisitos: 1) que el espectro de emisión de la proteína dadora se solape con el espectro de excitación de la proteína aceptora y 2) que las dos proteínas de estudio se encuentren a una distancia inferior a 10 nm. Según el origen de la proteína dadora, podemos tener una transferencia de energía por bioluminiscencia (BRET: *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*) o por fluorescencia (FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (63) (**Figura 9**). Para este tipo de experimentos es necesario el diseño de vectores de expresión que codifiquen por el ADNc del GPCR de interés fusionado a una proteína bioluminescente, como la *Renilla* luciferasa, o fluorescente, como la proteína fluorescente verde o sus derivados, en su extremo C-terminal.

Para la técnica de FRET se utiliza una combinación de dos proteínas fluorescentes que presenten distintos espectros de excitación y emisión. Por ejemplo, la proteína fluorescente amarilla (YFP) que se excita a 485 nm y emite a 530 y la proteína fluorescente roja (RFP), que se excita a 530 nm y emite a 590 nm. La transferencia de energía solo se producirá si los dos receptores están suficientemente cerca, de manera que cuando se excite a una longitud de onda de 485 nm la YFP, ésta emitirá y transferirá una señal fluorescente capaz de excitar a la RFP, obteniendo un pico de emisión a 590 nm (**Figura 9**). Esta transferencia de energía únicamente se producirá si las dos proteínas se encuentran a una distancia inferior a 10 nm, es decir, que se encuentren interactuando (64).



En el BRET la proteína dadora es la *Renilla* luciferasa (Rluc), una enzima capaz de emitir energía bioluminiscente a una determinada longitud de onda al oxidar un sustrato. Existen dos variantes de esta técnica: en el BRET¹ la enzima Rluc metaboliza el sustrato coelenterazine H generando luz con un pico de emisión a 480 nm. La proteína YFP se excita a esta longitud de onda y es capaz, entonces, de emitir a 530 nm. En el BRET² el sustrato es el DeepBlueC, que su oxidación producirá un pico de luz a 400 nm, lo que a su vez permitirá excitar la proteína fluorescente verde 2 (GFP²), quien emitirá a 510 nm (64,65) (**Figura 9**). Estas técnicas se han utilizado ampliamente para demostrar la existencia de muchos heterómeros de receptores de GPCR como entre los receptores D₁ de dopamina y H₃ de histamina (66), entre el receptor de angiotensina II de tipo 2 y el receptor D₂ de dopamina (67) o entre los receptores de adenosina A_{2A} y A₃ (68).

Un inconveniente de la utilización de las técnicas de RET es que se pueden producir falsos negativos, dado que la transferencia de energía depende de la correcta orientación de las proteínas de fusión de los receptores. De esta manera, es muy importante disponer de varias técnicas que nos permitan la detección de heterómeros para comprobar realmente si dos receptores no pueden interactuar físicamente entre ellos.

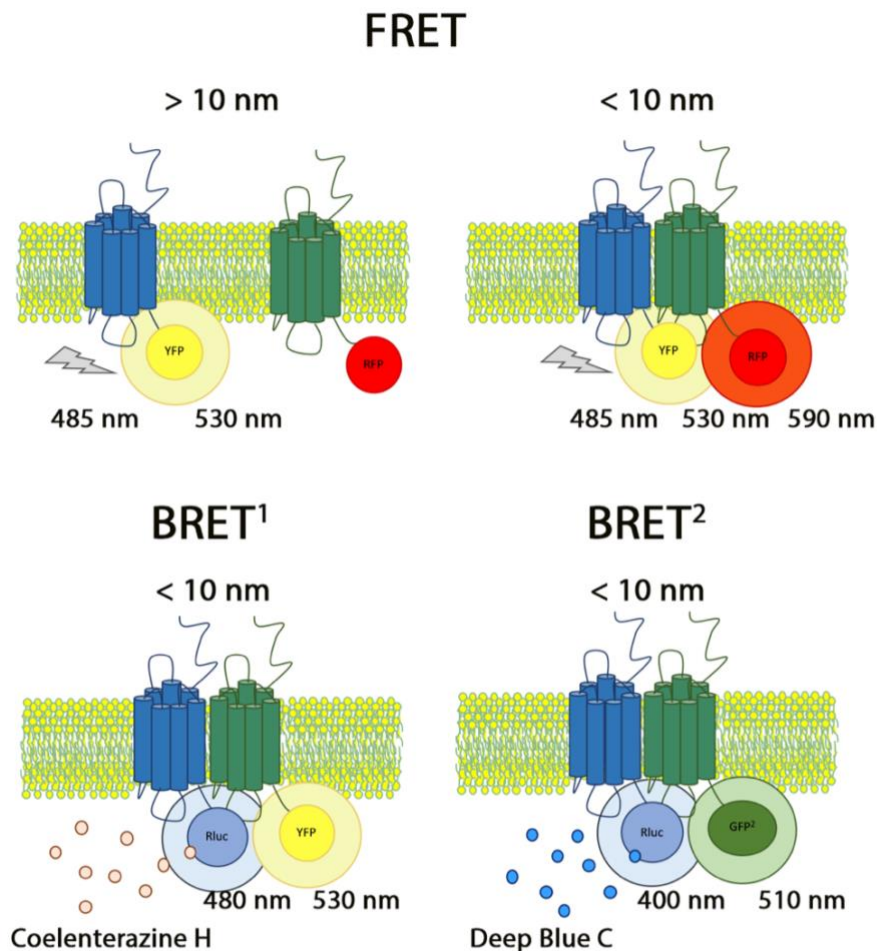


Figura 9 Representación esquemática de distintas técnicas de RET para demostrar la interacción entre dos GPCR.



Otras técnicas que permiten demostrar la formación de dímeros son la complementación bimolecular bioluminiscente (BiLC: *Bimolecular luminescence complementation*) y fluorescente (BiFC, *Bimolecular fluorescence complementation*) (69). Estas técnicas se basan en la utilización de dos fragmentos de la proteína venusYFP (BiFC), una proteína más eficiente que la YFP, o de la Rluc8 (BiLC), una proteína más eficiente que la Rluc, no fluorescentes ni bioluminiscentes, respectivamente. Sin embargo, cuando los dos fragmentos se encuentran a una distancia inferior a 6 nm la venusYFP o la Rluc8 se pueden reconstituir emitiendo fluorescencia o bioluminiscencia de nuevo (63) (Figura 10).

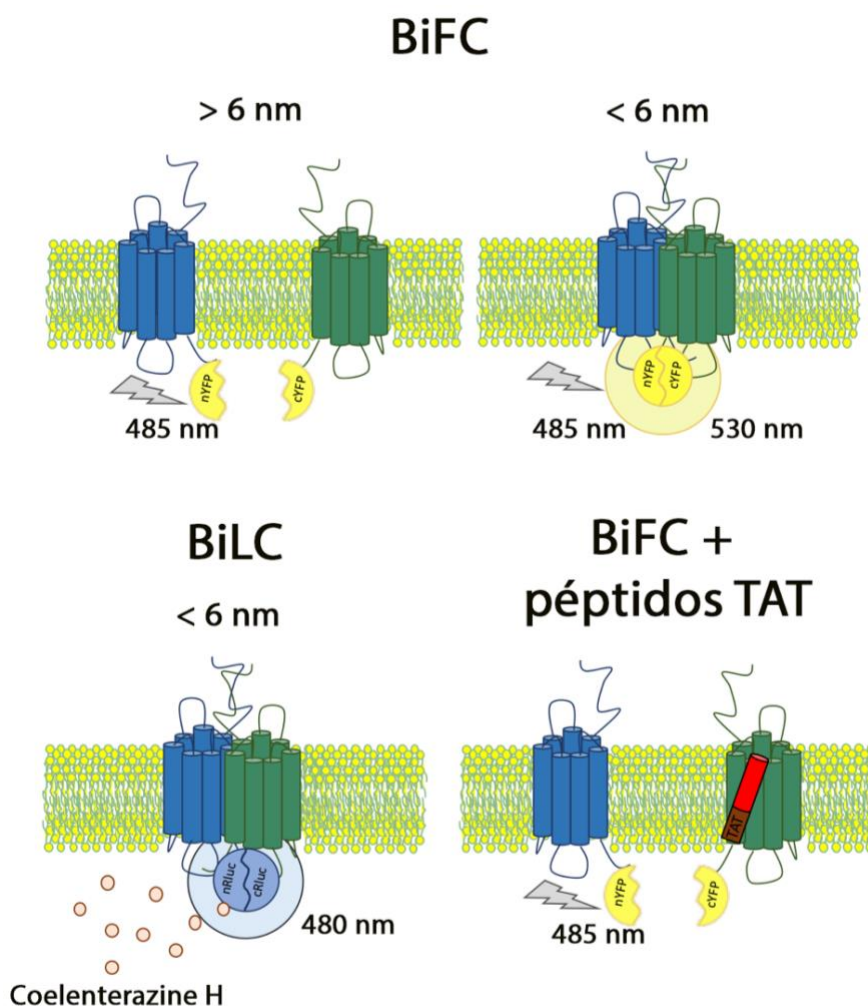


Figura 10 Representación esquemática de técnicas de complementación bimolecular para demostrar la interacción entre dos GPCR.

Para demostrar realmente que se está formando un heterómero, es importante conocer los dominios de interacción entre los receptores que constituyen dicho heterómero. Existen distintas estrategias para conseguirlo, un ejemplo resulta de utilizar receptores mutantes, y otro de utilizar péptidos que selectivamente impidan la interacción en una determinada región TM del receptor (46,70). Estos péptidos están fusionados al transactivador de la transcripción (TAT) que les permite



1. Introducción

su inserción en la membrana plasmática, determinando su correcta orientación. La combinación de la técnica de BiFC con el tratamiento con péptidos permite determinar las interfaces de interacción entre los distintos heterómeros. Por ejemplo, Guitart y colaboradores demostraron la formación de un tetrámero formado por los receptores D₁-D₁-D₃-D₃ de dopamina combinando el BRET con BiFC y BiLC, donde utilizando péptidos TAT se publicó que el D₁R homodimerizaba a través del TM5, mientras que utilizaba los TM5/6 para heteromerizar con el D₃R (71). Una aproximación similar también se usó para determinar que la homodimerización entre los receptores A_{2A}-A_{2A} y A_{2B}-A_{2B} es a través de los TM4/5, mientras que la heteromerización A_{2A}-A_{2B} es a través de TM5/6 (72). Con toda la información generada a nivel de señalización y estructura, se pueden generar modelos computacionales de las oligomerizaciones de los GPCR que ayuden a entender un poco más sus propias características en un entorno fisiológico (50).

Estas técnicas de RET y de complementación bimolecular solo permiten detectar interacciones entre dos proteínas, sin embargo, la combinación de estas técnicas permite detectar complejos de orden superior. Por ejemplo, la técnica del SRET (*Sequential Resonance Energy Transfer*) se obtiene al combinar de forma secuencial el BRET con el FRET y permite detectar complejos triméricos (73). Esta nueva técnica consiste en la utilización de la proteína Rluc como dadora del BRET, que excitará una primera proteína fluorescente (aceptora del BRET y dadora del FRET), que finalmente transferirá la energía y excitará a una segunda proteína fluorescente (aceptora del FRET). Este fenómeno de SRET solo se producirá en el caso que las tres proteínas estén interaccionando. Al igual que en el caso del BRET, existen dos variaciones de esta técnica en función del sustrato que oxide la Rluc: en el SRET¹ la oxidación de la Coelenterazine H por la enzima Rluc excitará a la YFP quien, a su vez, transferirá la energía y excitará a la RFP; en el SRET² la Rluc oxidará el sustrato DeepBlue C que emitirá una energía capaz de excitar a la GFP², que a su vez podrá excitar a la YFP (73) (**Figura 11**). En los últimos años se ha utilizado esta técnica para detectar distintos complejos como el trímero A_{2A}-CB₁-D₂ (74), el complejo formado por los receptores sigma 1, sigma 2 y D₁R (75) o el trímero formado por los receptores de leptina, de grelina 1a y de orexina 1 (76). La detección de trímeros también se puede conseguir combinando el BRET con técnicas de complementación bimolecular (BRET-BiFC). En este caso tendríamos un receptor fusionado a la Rluc y los otros dos a las dos mitades de la proteína fluorescente venusYFP (n-YFP y c-YFP). Así, al tratar las células con Coelenterazine H, la proteína Rluc emitirá energía bioluminescente que será capaz de excitar a la proteína venusYFP, quien, una vez reconstruida, será capaz de emitir fluorescencia a 485 nm (63,74,77).

Finalmente, existen varias estrategias para detectar la formación de tetrámeros, como por ejemplo la combinación del SRET con la BiFC (78) o el BRET con doble complementación (BRET-BiLFC) (64,79,80). En la técnica del BRET-BiLFC un receptor está fusionado a las dos mitades de la proteína Rluc8 (n-Rluc y c-Rluc) y un segundo receptor está fusionado a las dos mitades de la



proteína venusYFP (n-YFP y c-YFP). De esta manera, solo se podrían reconstituir las dos proteínas, Rluc8 y venusYFP, cuando los dos receptores formasen homodímeros y, solo en caso de que fueran capaces de formar un tetrámero se produciría el fenómeno de BRET, es decir, que la Rluc8 al oxidar la Coelenterazine H fuera capaz de excitar y transferir la energía a la YFP quien a su vez podrá emitir energía a 530 nm (**Figura 11**). Esta estrategia se utilizó para detectar el tetrámero formado por dos receptores de adenosina A₁ y dos receptores también de adenosina A_{2A} (81).

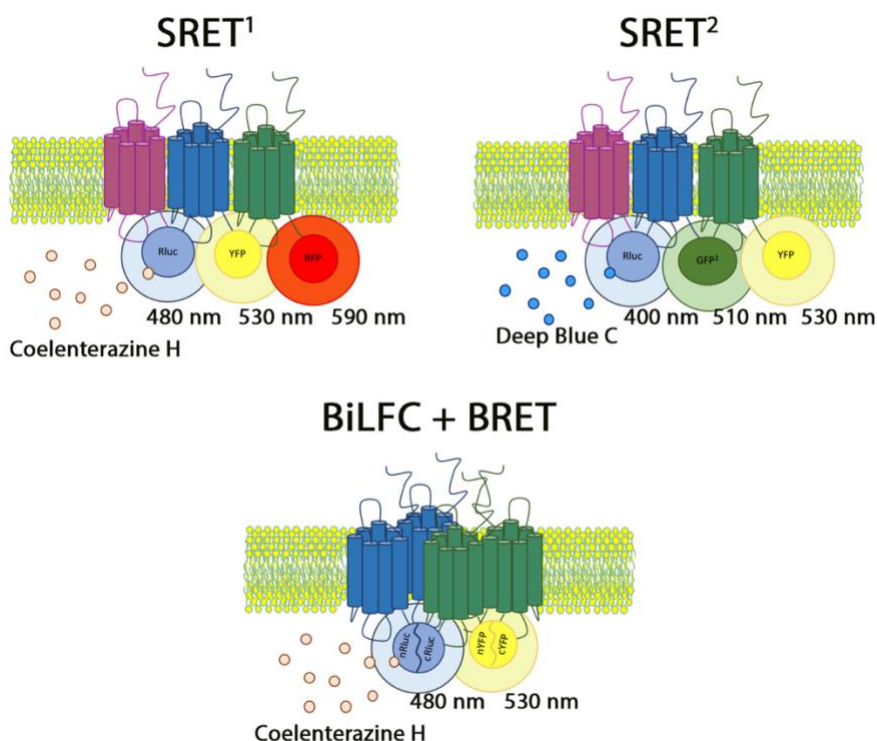


Figura 11 Representación esquemática de técnicas que permiten detectar trímeros y tetrámeros.

Las técnicas descritas hasta el momento solo permiten estudiar la formación de heteromerizaciones en sistemas heterólogos, pero no se pueden utilizar para detectar estos complejos en su entorno más fisiológico. Una forma indirecta de detectar estos complejos en tejido o cultivo primario se basa en detectar la huella del heterómero, descrita previamente en un sistema heterólogo. Además, se pueden usar los péptidos TAT para romper la interacción, se puede silenciar la expresión de un receptor con ARNsi, se pueden usar modelos que no expresen el receptor (KO) o que expresen un receptor mutante que impida la interacción (KI) y, así demostrar mediante la pérdida de la huella del heterómero la especificidad de la señal y la existencia del complejo (82). Otra técnica que permite determinar la existencia de *clusters* de receptores en cultivos primarios o tejido nativo son los experimentos de ligación por proximidad (PLA) (70,83) (**Figura 12**). En esta técnica, en primer lugar, se debe marcar cada receptor con un anticuerpo específico hecho de distintas especies. Seguidamente, la muestra es incubada con las denominadas sondas de PLA (dos cadenas de



1. Introducción

oligonucleótidos complementarias) fusionadas a dos anticuerpos secundarios específicos contra los anticuerpos primarios. Únicamente en el caso que estas dos sondas estén a una distancia inferior a 30 nm, los oligonucleótidos se podrán religar y amplificar para posteriormente ser observados como puntos rojos en un microscopio confocal (65). Esta técnica se puede combinar con marcadores de distintos compartimentos intracelulares para demostrar la localización de un determinado heterómero (70).

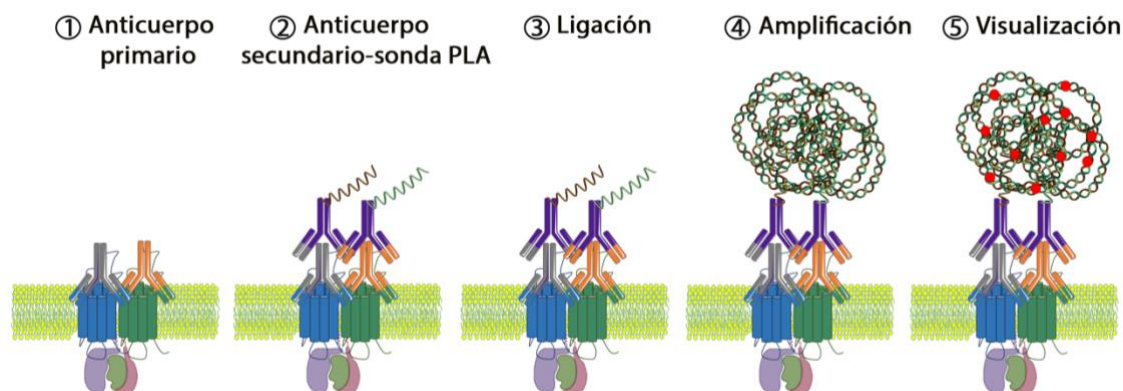


Figura 12 Representación esquemática del ensayo de ligación por proximidad. Para la creación de esta figura se han usado elementos de Servier Medical Art, con licencia CC BY 3.0, y de BioRender.com.

1.2.5. Aplicaciones terapéuticas de los heterómeros de GPCR

La formación de complejos heteroméricos de GPCR genera un incremento en el número de dianas terapéuticas, adquiriendo una gran relevancia en neuropsicofarmacología (58). Conocer la distribución subcelular de un determinado heterómero, así como su importancia fisiológica y/o patológica, como por ejemplo los niveles de expresión o la funcionalidad, es importante para poder diseñar fármacos que, por un lado, aumenten la eficacia del tratamiento, y, por el otro, disminuyan los efectos secundarios no deseados frecuentemente observados cuando se actúa sobre un solo GPCR (51,84). Distintos heterómeros han sido dianas para tratar un gran número de enfermedades como la depresión y la esquizofrenia (85), la enfermedad de Párkinson (86), la adicción (87), el dolor neuropático (88) o diversos trastornos en la alimentación (89). Por ejemplo, el antagonista del receptor de adenosina A_{2A} , KW-6002, se usa, en combinación al tratamiento con levodopa, para tratar pacientes con la enfermedad de Párkinson, basándose en la evidencia de las interacciones alostéricas entre el heterómero de receptores A_{2A} - D_2 en el estriado (45,51,90). Por otro lado, en una situación de adicción a cocaína son muy importantes los neurotransmisores como la dopamina y la adenosina, de manera que heterómeros formados por sus receptores, como los descritos A_1R - D_1R , $A_{2A}R$ - D_2R o $A_{2A}R$ - D_2R - CB_1R juegan un papel muy importante en esta enfermedad (91). En una situación de consumo crónica de cocaína la expresión del heterómero $A_{2A}R$ - D_2R se encuentra incrementada en el



estriado ventral y la estimulación del A_{2A}R con su agonista CGS 21680 disminuye tanto el comportamiento de búsqueda como los efectos adictivos de la cocaína, al reducir la afinidad del agonista del D₂R quinpirol por su receptor (92).

En los últimos años se ha avanzado mucho en el desarrollo de nuevas estrategias para diseñar fármacos que actúen sobre un determinado heterómero. Entre ellas, se encuentra el diseño de ligandos bivalentes, capaces de unirse a la vez a los dos protómeros de un dímero (93). Un ejemplo de esta estrategia es el ligando bivalente formado por un antagonista del D₂R y un agonista del A_{2A}R, propuesto para tratar la adicción a cocaína (91). Otras estrategias son la utilización de anticuerpos que detectan con una alta afinidad un determinado heterómero, o el uso de la terapia combinada, es decir, utilizar a la vez dos fármacos dirigidos a los distintos receptores que forman el oligómero (91). Por ejemplo, Sierra y colaboradores demostraron que el tratamiento combinado con el agonista del CB₁R Hu-210 y el agonista del receptor delta opioide (DOR) SNC80 reduce de forma significativa la alodinia (percepción anormal del dolor) en ratones, mientras que la administración individual de estos agonistas no era capaz de producir estos efectos. Además, esta mejora era bloqueada cuando se trataban los ratones con el anticuerpo que detecta el heterómero CB₁R-DOR (94).

1.3. Los ganglios basales

Los ganglios o núcleos basales están formados por una amplia variedad de somas de neuronas subcorticales presentes en el SNC de todos los vertebrados (95). Técnicamente, el término ganglio debe utilizarse solamente para referirse a grupos de somas de neuronas en el SNP, mientras que para referirse a este grupo de neuronas en el SNC se debe usar la palabra núcleo. Sin embargo, en la literatura actual se siguen encontrando ambas nomenclaturas; el término ganglio que se ha usado históricamente y el término núcleo, el cual es el técnicamente más correcto.

Estrictamente hablando, los ganglios basales están formados por el núcleo caudado, el núcleo putamen y el globo pálido, mientras que el núcleo subtalámico (NST) y la sustancia negra (SN) se consideran estructuras asociadas a estos ganglios basales (95,96) (**Figura 13**). Todos estos núcleos y estructuras asociadas están anatómicamente y funcionalmente separados en el SNC y su principal función en mamíferos consiste en la regulación del control y el aprendizaje motor. Además, en los últimos 40 años se ha descubierto que los ganglios basales también ejercen importantes roles en la regulación de las emociones, la motivación, la cognición y la recompensa (95,97,98).

El cuerpo estriado es la principal estructura de recepción de información en los ganglios basales y se divide en dos partes. El estriado dorsal está formado por el núcleo caudado, el núcleo putamen y el globo pálido externo (GPe) e interno (GPi) y su función principal es la de controlar los movimientos motores voluntarios y las funciones ejecutivas. Por el otro lado, el núcleo accumbens (NAc) y el tubérculo olfatorio forman parte del estriado ventral, que es el principal responsable de las funciones límbicas de recompensa, la motivación y la aversión. El NST es un grupo de células



1. Introducción

con forma de lente que constituye la mayor parte del subtálamo, situado en la zona ventral del tálamo. Finalmente, la SN está formada por dos núcleos distintos, la SN *pars* reticulada (SNr) y la SN *pars* compacta (SNc), ambos localizados en el mesencéfalo dorsal (95).

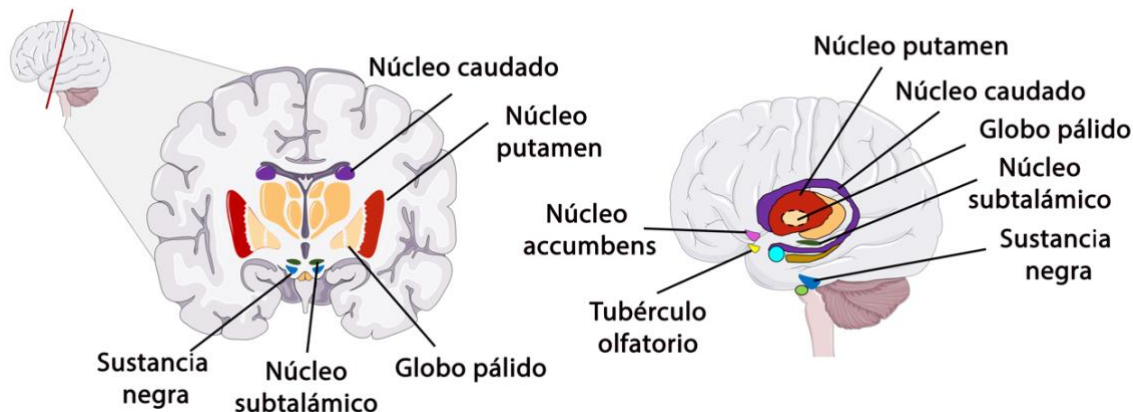


Figura 13 Ganglios basales y estructuras relacionadas. Para la creación de esta figura se han usado elementos de Servier Medical Art, con licencia CC BY 3.0.

Los ganglios basales consiguen el control motor voluntario a través del equilibrio entre dos circuitos conocidos con el nombre de vía directa y vía indirecta del movimiento (**Figura 14**). El control de la actividad motora se inicia con la llegada de información procedente de las neuronas glutamatérgicas de la corteza cerebral que inervan distintas neuronas GABAérgicas del estriado. Estas neuronas GABAérgicas, que representan el 90% del total de células estriales (99), reciben el nombre de neuronas espinosas mediadas porque tienen un soma de un tamaño pequeño/mediano (de unos 20 μm de diámetro) y presentan especializaciones postsinápticas denominadas espinas dendríticas (95). Entre todas estas neuronas es posible diferenciar neuroanatómicamente dos tipos distintos: las neuronas estriatonigroentopedunculares y las neuronas estriatopalidales. Por un lado, las neuronas estriatonigroentopedunculares expresan dinorfina y sustancia P, además de tener una expresión predominantemente del receptor de dopamina D_1 y del receptor de adenosina A_1 . Por el otro lado, las neuronas estriatopalidales producen encefalina y tienen una expresión predominantemente del receptor de dopamina D_2 , además de expresar principalmente el receptor de adenosina A_{2A} , aunque también expresan el receptor de adenosina A_1 (86,95,99,100).

La vía directa e indirecta ejercen efectos opuestos sobre el control de la actividad motora; mientras la vía directa promueve la actividad motora, la vía indirecta, la suprime (97). La vía directa se inicia una vez las neuronas GABAérgicas estriatonigroentopedunculares reciben proyecciones estimuladoras de la corteza cerebral. Estas neuronas establecen sinapsis inhibitorias sobre las neuronas del GPi y de la SNr. En un estado basal, las neuronas del GPi/SNr están inhibiendo de forma tónica a las neuronas del núcleo ventrolateral del tálamo (VL). De esta manera, la inhibición de las neuronas del GPi/SNr provocará un aumento de la actividad de las neuronas del VL del tálamo



con la consecuente excitación de la corteza cerebral, lo que favorecerá la iniciación del movimiento voluntario (95). Por el otro lado, la vía indirecta se inicia cuando las neuronas glutamatérgicas de la corteza cerebral estimulan a las neuronas GABAérgicas estriatopalidales. Estas neuronas proyectan conexiones inhibitorias hacia el GPe, quien a su vez establecerá conexiones inhibitorias con el NST. En una situación basal, el GPe inhibe de forma tónica a las neuronas del NST. En consecuencia, la inhibición de las neuronas del GPe permitirán a las neuronas del NST mandar proyecciones excitatorias al GPi/SNr, estimulando la inhibición que ejercen estas neuronas sobre el núcleo VL del tálamo (95). De esta manera, el efecto neto de la vía indirecta es la reducción de la actividad del tálamo, con la consecuente disminución de la actividad de la corteza cerebral y la inhibición del movimiento voluntario. Para que se produzca un correcto control motor es necesario que actúen de forma coordinada tanto las neuronas espinosas mediadas del estriado que forman la vía directa como las que actúan en la indirecta, así, por un lado, podremos promover el movimiento deseado y, por el otro, suprimir las acciones no deseadas (101–103).

Este modelo de la regulación motora fue propuesto en 1980 (104–106), y aunque lo que se descubrió es cierto, investigaciones posteriores han demostrado que en realidad se trata de un circuito más complejo. Por ejemplo, las neuronas del NST también pueden ser estimuladas directamente a través de proyecciones excitatorias procedentes de la corteza cerebral, circuito que recibe el nombre de vía hiperdirecta (107–109). Además, en el GPe coexisten dos tipos de neuronas GABAérgicas (110): las neuronas prototípicas, que representan el 70% y proyectan hacia el NST y el GPi/SNr (104,111) y las neuronas *arkypallidales* que establecen sinapsis inhibitorias con las neuronas estriatopalidales, las neuronas estriatonigroentopeduculares y las interneuronas del estriado (110,112). Muy recientemente, Aristieta y colaboradores descubrieron como se regulaba la actividad neuronal de las neuronas *arkypallidales*. Estos investigadores demostraron mediante técnicas de optogenética y de electrofisiología que las neuronas prototípicas del GPe son capaces de inhibir fuertemente a las neuronas *arkypallidales*, mientras que las innervaciones en sentido contrario son prácticamente inexistentes (113).

Finalmente, el estriado, a parte de la información que recibe desde la corteza cerebral, también recibe proyecciones que proceden de las neuronas dopaminérgicas de la SNc y del área tegmental ventral (ATV). De esta manera, la dopamina estimulará la vía directa del movimiento uniéndose a los receptores de dopamina D₁ presentes en las neuronas estriatonigroentependuculares e inhibirá la vía indirecta del movimiento a través de su unión a los receptores de dopamina D₂ en las neuronas estriatopalidales. Así, la dopamina promueve la actividad motora mediante dos mecanismos: estimulando directamente la vía directa del movimiento e indirectamente, inhibiendo la vía indirecta del movimiento (95,96,99).

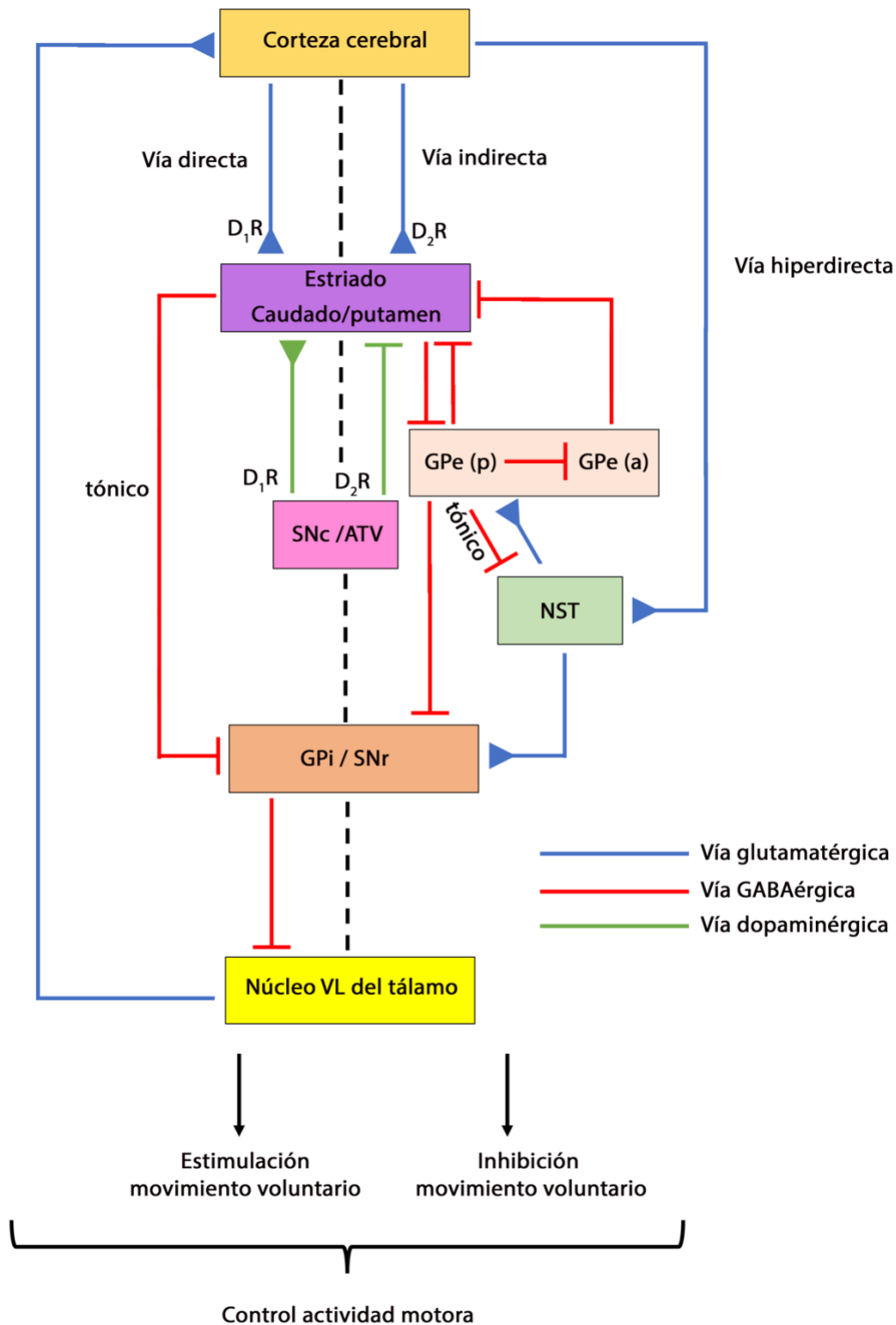
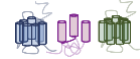


Figura 14 Representación esquemática del circuito que regula la acción motora. ATV: área tegmental ventral, D₁R: receptor de dopamina D₁, D₂R: receptor de dopamina D₂, GPe: globo pálido externo (a) neuronas arkipallidales, (p) neuronas prototípicas, GPI: globo pálido interno, NST: núcleo subtalámico, SNc: sustancia negra pars compacta, SNr: sustancia negra pars reticulada, VL: Ventrolateral



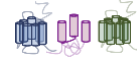
1.4. El sistema de recompensa

El sistema de recompensa está formado por un gran número de estructuras del cerebro con funciones muy específicas, que regulan y controlan nuestra habilidad para sentir placer (114). Esta sensación de placer es la forma que tiene un cerebro sano para identificar y reforzar conductas beneficiosas y cruciales para la supervivencia del organismo como comer, beber o interactuar con otras personas (114). Estos sentimientos placenteros reforzaran nuestro comportamiento para repetir dichas acciones, y así, asegurar la supervivencia del individuo. De esta manera, el sistema de recompensa te asegura la búsqueda de comida cuando tienes hambre o beber agua cuando tengas sed porque al hacerlo, te sentirás bien (115).

Las estructuras principales que forman parte de este sistema son el ATV, el NAc, el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal y el principal neurotransmisor que actúa en este sistema es la dopamina, aunque otros neurotransmisores como la serotonina, el GABA o el glutamato también ejercen efectos moduladores (98,115) (**Figura 15**).

Una de las principales áreas del cerebro que participan en la vía de la recompensa es el ATV, una región heterogénea del mesencéfalo formada principalmente por neuronas dopaminérgicas (60-65%) y GABAérgicas (30-35%), con una proporción menor de neuronas glutamatérgicas (2-3%) (116). En el ATV se originan dos vías dopaminérgicas con un papel clave. Por un lado, las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica que proyectarán hacia el NAc, la amígdala y el hipocampo y, por el otro, las neuronas dopaminérgicas de la vía mesocortical que inervarán a las neuronas del córtex prefrontal (117). Estos dos sistemas se solapan en gran parte, así, a menudo se usa el término sistema mesocorticolímbico para referirse a ambas vías (118). Finalmente, el ATV recibe proyecciones glutamatérgicas desde la corteza prefrontal y GABAérgicas desde el NAc (119). Estas últimas establecen una inhibición en sentido inverso que impedirá que las neuronas sigan liberando dopamina. Otra vía dopaminérgica que participa en el circuito de la recompensa es la vía nigroestriatal. Esta vía se origina en las neuronas dopaminérgicas de la SN que proyectan hacia el estriado dorsal y, será importante en la regulación de la función del control motor, que ya hemos comentado anteriormente, pero también en la regulación de las recompensas dirigidas a objetivos y basadas en hábitos (120).

Un cerebro sano contiene niveles moderados (del rango nanomolar) de dopamina (DA) en la sinapsis, incluso en ausencia de señal. Cuando nos encontramos delante de una recompensa, se activarán las neuronas dopaminérgicas presinápticas del ATV, liberando una gran cantidad de dopamina (121). Esta DA se unirá a los receptores dopaminérgicos en la neurona postsináptica, desencadenando una cascada intracelular que resultará en la sensación de placer. Una vez finalizada la señal, la DA es recaptada de la sinapsis y transportada a la neurona presináptica a través del transportador de dopamina DAT, pudiendo ser liberada de nuevo. De esta manera, recuperaremos los niveles basales de DA y la sensación de placer desaparecerá (122,123).



1. Introducción

El NAc es un ganglio basal que forma parte del estriado ventral y se encuentra situado entre los núcleos putamen y caudado. Su nombre procede del latín y significa “núcleo que yace sobre el septum”. Anatómicamente se puede dividir en dos partes: una zona central, implicada principalmente en la regulación de la actividad motora, y la corteza que la envuelve, implicada principalmente en el sistema límbico (124). En roedores se pueden diferenciar anatómicamente estas dos partes con relativa facilidad, siendo la calbindina (una proteína cuya función es el transporte intracelular de calcio) el principal marcador de la corteza del NAc. Sin embargo, en humanos estas dos regiones no son tan fáciles de diferenciar (98). El NAc se ha considerado el punto de unión entre el sistema límbico y el sistema motor, jugando un papel clave en la regulación del sistema de recompensa, que incluye la modulación de la motivación y el aprendizaje incentivado (124). Aunque inicialmente se había asociado al NAc solo con las emociones positivas que generan una determinada recompensa, actualmente se ha demostrado que también participa en la regulación de las sensaciones de aversión (125). El NAc, a parte de las innervaciones dopaminérgicas procedentes del ATV, también recibe proyecciones glutamatérgicas desde la corteza prefrontal, la amígdala y el hipocampo (126). Por este motivo se considera al NAc como el centro integrador del sistema de recompensa, donde se procesará toda la información sobre un determinado estímulo para decidir si repetir una determinada acción o no en otro momento.

La amígdala está formada por un conjunto de núcleos de neuronas localizados en la porción anteromedial de los lóbulos temporales. Su nombre proviene de la palabra griega “αμυγδαλή” que significa almendra debido al parecido de su núcleo principal con este fruto seco (127). La amígdala es una estructura muy importante en el sistema límbico, cuya principal función es la regulación de las emociones. En concreto, se ha asociado a la amígdala con el procesamiento de las emociones relacionadas con el miedo y la ansiedad que desencadenarán el inicio de las respuestas lucha-huida. Además, también se ha descrito que la amígdala participa en la asignación de un valor positivo o negativo a un determinado estímulo y en la consolidación de recuerdos con un fuerte componente emocional (128). La amígdala recibe proyecciones dopaminérgicas procedentes del ATV y envía proyecciones glutamatérgicas hacia el NAc (98). De esta manera, en la amígdala se procesarán las emociones que determinarán si una recompensa es o no gratificante.

El hipocampo es una región alargada situada en las profundidades del lóbulo temporal medial de la corteza cerebral. Su nombre procede de la palabra griega “ιππόκαμπος” que significa “caballito de mar”, a causa del parecido que tiene el hipocampo con este animal si se realiza un corte coronal del cerebro (129). El principal rol del hipocampo es la regulación de los procesos de aprendizaje y memoria. En concreto, está involucrado en la memoria a largo plazo, la memoria episódica y la memoria espacial (128). El hipocampo recibe información procedente de las neuronas dopaminérgicas del ATV y envía proyecciones glutamatérgicas hacia el NAc (98). En el contexto



del circuito de recompensa, el hipocampo nos permitirá recordar todos los detalles (lugar, hora, ...) para poder repetir una determinada experiencia gratificante una y otra vez.

Finalmente, el córtex o corteza prefrontal se localiza en la parte anterior de los lóbulos frontales, justo delante de la corteza motora. Anatómicamente se puede subdividir en varias regiones: dorsolateral, dorsomedial, ventrolateral, ventromedial y orbitofrontal (130). A causa de su gran extensión (ocupa aproximadamente el 10% del cerebro), la corteza prefrontal participa en una gran cantidad de funciones. La más estudiada es la función ejecutiva, que se centra en controlar los comportamientos reflexivos, participando en la toma de decisiones, la resolución de problemas, la planificación y el autocontrol (131). El córtex prefrontal, a través de la vía mesocortical recibe inervaciones dopaminérgicas procedentes del ATV y envía proyecciones glutamatérgicas hacia el NAc y también de vuelta hacia el ATV (98). De esta manera, en el córtex cerebral se integrará toda la información sobre un determinado estímulo.

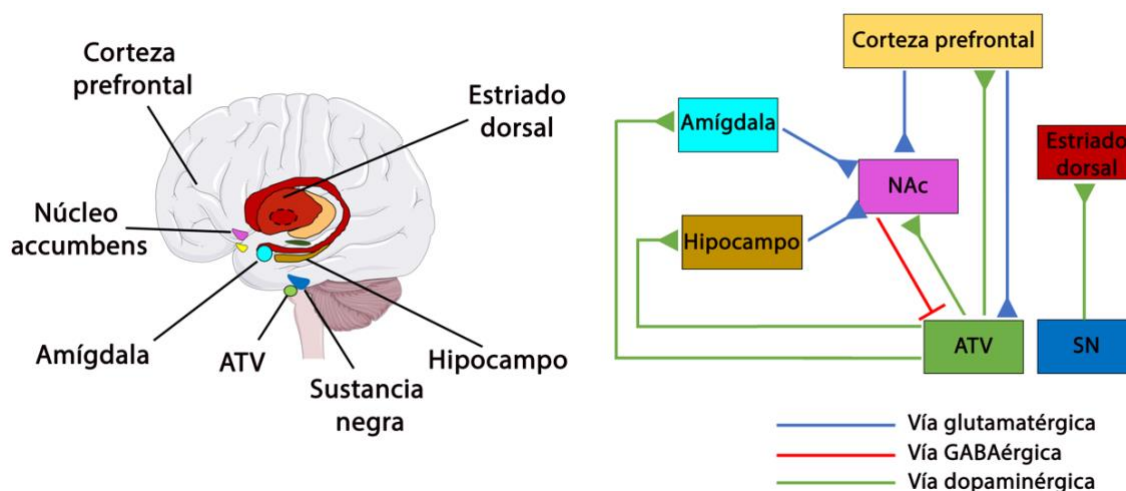
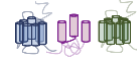


Figura 15 Visión general de las estructuras más importantes que participan en la vía de la recompensa en el cerebro humano. ATV: Área tegmental ventral, NAc: núcleo accumbens, SN: sustancia negra. Para la creación de esta figura se han usado elementos de Servier Medical Art, con licencia CC BY 3.0.

1.5. Tipos de GPCR

Los receptores acoplados a proteína G se encuentran distribuidos por todo nuestro cuerpo, sobretodo a nivel del SNC, mostrando un patrón de expresión característico. De la misma manera, cada tejido expresa un determinado número y cantidad de receptores distintos. Conocer esta distribución es clave para entender la regulación de todo proceso neurofisiológico. A continuación, se detallarán la estructura y la función de los GPCR que han sido objeto de estudio de esta tesis, así como su implicación en los procesos de adicción a sustancias de abuso como la cocaína, la amfetamina y la metanfetamina.



1.5.1. El sistema dopaminérgico y el receptor de dopamina D₁

La dopamina (DA) es una catecolamina capaz de actuar tanto como neurotransmisor en el SNC y como hormona circulante en el SNP (121). Esta molécula no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, pero se puede sintetizar en el citosol de los terminales nerviosos a partir del aminoácido tirosina. Cuando las neuronas dopaminérgicas son activadas, se abren canales de calcio dependientes de voltaje que promueven la fusión de vesículas llenas de DA con la membrana plasmática, lo que iniciará la señal dopaminérgica. Esta señal finaliza con la eliminación de la DA en el espacio intersináptico, donde será degradada mediante enzimas o recaptada a través del transportador de dopamina DAT.

La DA ejerce todas sus funciones a través de los receptores de dopamina, GPCR de la familia A que se dividen en dos subfamilias según su secuencia de ADN y sus distintas propiedades bioquímicas y farmacológicas. Los receptores de tipo *D₁-like* contienen los receptores D₁ y D₅ que se acoplan a proteína G_{s/olf}, y los receptores de tipo *D₂-like* contienen los receptores D₂, D₃ y D₄ y señalizan a través de G_i (132). La afinidad que presenta la DA para sus receptores es muy distinta, siendo de entre 10 y 100 veces mayor para los receptores de tipo *D₂-like* que para los de tipo *D₁-like* (133). El gen que codifica para el D₁R no presenta intrones, de manera que no puede generar variantes obtenidas por *splicing* alternativo, característica que sí presentan los receptores de dopamina de tipo *D₂-like*. Estructuralmente, el D₁R presenta dos sitios variables de N-glicosilación en el extremo N-terminal, un extremo C-terminal 7 veces más largo y un tercer bucle intracelular más corto que los receptores de tipo *D₂-like* (134).

El D₁R es el subtipo de receptor de dopamina más abundante y con una expresión más ubicua en el cerebro humano. Este receptor está muy expresado en las áreas nigroestriatales, mesolímbicas y mesocorticales (121), como en el estriado, el NAc, la SN, el bulbo olfatorio, la amígdala y el córtex frontal, además de tener una expresión menor en el hipocampo, el cerebelo, el tálamo y el hipotálamo (132,135). En la periferia, este receptor se expresa en la retina, el corazón, el riñón y la glándula adrenal (122) (**Figura 16**). La activación del D₁R mediante el acoplamiento a proteína G_{s/olf} produce un aumento en los niveles de AMPc intracelular y la activación de PKA y PKC, que a su vez activarán distintos efectores como CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*), receptores de glutamato o de GABA, canales iónicos de calcio y potasio, la fosforilación de DARPK-32 (*Dopamine-cAMP-regulated phosphoprotein*) y la modulación de la expresión génica de determinadas proteínas. Además, este receptor es capaz de activar la vía de las MAPK a través de varios mecanismos (122).

En el SNC de los mamíferos, la DA y sus receptores regulan una gran variedad de funciones fisiológicas a través de cuatro vías principales: la vía nigroestriatal que regula la actividad motora, la vía mesolímbica cuya principal función es la regulación del mecanismo que regula la recompensa, la vía mesocortical que está involucrada en las emociones y la vía tuberoinfundibular que regula la



secreción de hormonas hipofisarias como la prolactina (**Tabla 1**) (**Figura 16**) (121,122). En el SNP la dopamina ejerce funciones renales y modula la función cardiovascular, la liberación de catecolaminas, la secreción hormonal, el tono vascular y la motilidad gastrointestinal (134,136,137). De esta manera, no es sorprendente que múltiples enfermedades del SNC estén relacionadas con disfunciones en el sistema dopaminérgico. Los ejemplos más conocidos son la enfermedad de Parkinson o la esquizofrenia, pero también los desórdenes bipolares y de hiperactividad, la enfermedad de Huntington, el déficit de atención, la depresión, el síndrome de *Tourette* (136,138). Además, el D₁R, junto con el D₂R y el D₃R, tiene un papel muy importante en el sistema de recompensa y en procesos de adicción a sustancias de abuso como la cocaína (139). Finalmente, la capacidad que tienen estos receptores para interactuar entre ellos, como por ejemplo los heterómeros D₁R-D₂R (140,141) o D₁R-D₃R (138,142), y entre otros GPCR, como por ejemplo los heterómeros formados por el D₁R con el receptor de corticotropina 2 (143), con el receptor de adenosina A₁ (61) o el receptor H₃ de histamina (144) hace aumentar su importancia en la adicción a sustancias de abuso.

Vía	Origen y proyecciones	Función	Enfermedades
Nigroestriatal	Las fibras se originan en la SNc y proyectan hasta los ganglios basales.	Control del movimiento, estímulos sensoriales, aprendizaje.	Enfermedad de Párkinson (145), enfermedad de Huntington (146)
Mesolímbica	Se origina en las neuronas dopaminérgicas del ATV y proyecta hasta la amígdala, el hipocampo y NAc	Placer, comportamiento de la búsqueda de recompensa, emoción, adicción, percepción.	Todo tipo de adicciones, incluyendo adicción a drogas de abuso como la cocaína (147), depresión y esquizofrenia
Mesocortical	Formado por las neuronas del ATV que proyectan al córtex frontal y regiones septohipocampales.	Funciones cognitivas y de comportamiento emocional, atención, memoria de trabajo y aprendizaje.	Esquizofrenia
Tuberoinfundibular	Se origina en el núcleo arcuato del hipotálamo y proyecta hacia la glándula pituitaria.	Inhibición de la secreción de prolactina, control del sistema endocrino-hipofisario-hipotalámico.	Hiperprolactinemia, irregularidades del ciclo menstrual

Tabla 1 Vías dopaminérgicas principales en el cerebro humano.

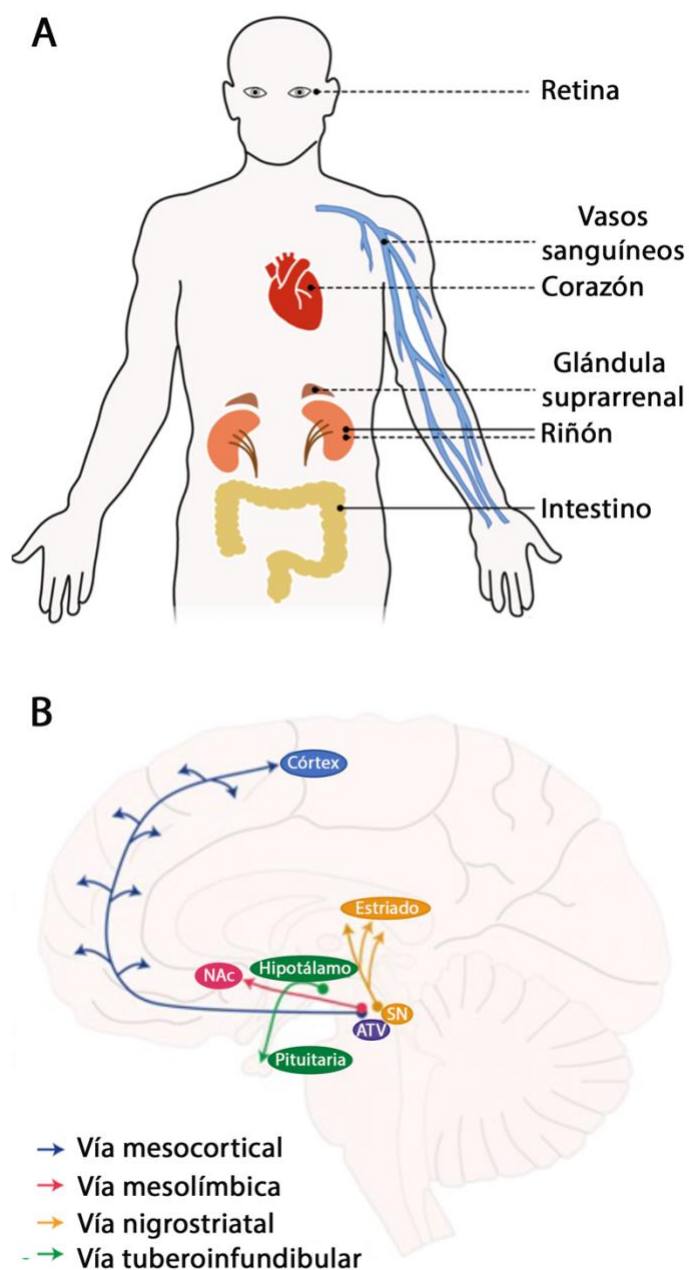
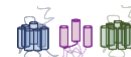


Figura 16 Distribución de la dopamina (línea continua) y los receptores de dopamina (línea discontinua) en la periferia (A). Principales vías dopaminérgicas en el sistema nervioso central (B). Modificado de (122).

1.5.2. La grelina y el receptor de grelina GHS-R1a

La grelina es un péptido formado por 28 aa que se sintetiza a partir de un pre-pro-péptido de 117 aa (148). El ARNm que codifica para la grelina sufre una primera proteólisis a 24 residuos del extremo N-terminal que da lugar a la pro-grelina. Esta pro-grelina sufrirá una acetilación en el retículo endoplásmico en la Serina3, para desplazarse posteriormente en el Golgi donde una proteólisis final generará dos nuevos péptidos: por un lado, la grelina de 28 aa, y por el otro la



obestatina de 23 aa (149). La grelina es sintetizada predominantemente por las células oxínticas, células endocrinas especializadas del estómago y tiene una expresión menor en otros tejidos como el tracto intestinal, el páncreas, los pulmones, el corazón, la vesícula biliar, el hígado y los testículos (150). Además, diversos autores defienden que la grelina también puede ser sintetizada en el núcleo arcuato del hipotálamo, implicado en la regulación del apetito (151). Una vez sintetizada, esta hormona es liberada al torrente sanguíneo en dos estados biológicos: en forma de acil-grelina y en forma de desacil-grelina. La acilación de la grelina es necesaria para la mayoría de sus efectos fisiológicos, ya que este grupo acil es esencial para la unión de la grelina a su receptor. Recientemente, algunos estudios sugieren un papel metabólico para la desacil-grelina a través de un mecanismo independiente del receptor de grelina (148). Aunque la acil-grelina es la forma de la hormona con mayor actividad biológica, alrededor del 70-90% de la grelina detectada en el plasma presenta la forma no acilada. Este hecho se puede explicar por la corta vida media de la forma acilada, de unos 10-30 minutos (152).

La grelina es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica por un mecanismo aun incierto, aunque parece ser independiente del receptor de grelina (153), y llegar a sus receptores cerebrales para modular el metabolismo celular activando circuitos neuronales orexigénicos. Este péptido realiza sus funciones a través de la unión al receptor de grelina, un GPCR de la familia A conocido con el nombre de *growth hormone secretagogue receptor* (GHS-R). El gen que codifica para este receptor, el GHS-R, contiene dos exones y un intrón, lo que le permite producir dos variedades por *splicing*: el receptor GHS-R1a, que es un GPCR completamente funcional, y el GHS-R1b, un GPCR truncado al cual le faltan las dos últimas regiones transmembrana (TM6 y TM7) (154). Al solo presentar cinco TM, el GHS-R1b no puede unir ligando ni interactuar con ninguna proteína G, y, en consecuencia, la grelina no puede señalizar a través de GHS-R1b (155). Este hecho no significa que el GHS-R1b no desempeñe ninguna función biológica, ya que se ha demostrado que es capaz de modular tanto el tráfico del GHS-R1a hacia la membrana plasmática, como su señalización (155,156).

Actualmente se dispone de la estructura cristalina del receptor GHS-R1a unido a su antagonista Compuesto 21 (**Figura 17**) (157). El GHS-R1a está formado por 366 aa, presentando en los bucles extracelulares 2 y 3 dos residuos de cisteína (Cys116 y Cys198) altamente conservados que permiten la formación de un puente disulfuro muy importante para la iniciación de los procesos fisiológicos regulados a través de este receptor. Otra característica a destacar del GHS-R1a es una inusual actividad constitutiva muy elevada en ausencia de ligando (158). El GHS-R1a se encuentra expresado mayoritariamente en el cerebro, en concreto en la glándula pituitaria anterior, el hipotálamo, el hipocampo, la SNc, la amígdala, el ATV y regiones dopaminérgicas del mesencéfalo y del estriado (150,159). Además, también se ha detectado este receptor en el tracto gastrointestinal, en los islotes pancreáticos, en la melsa, en la glándula adrenal, en el miocardio y en el hígado (160).

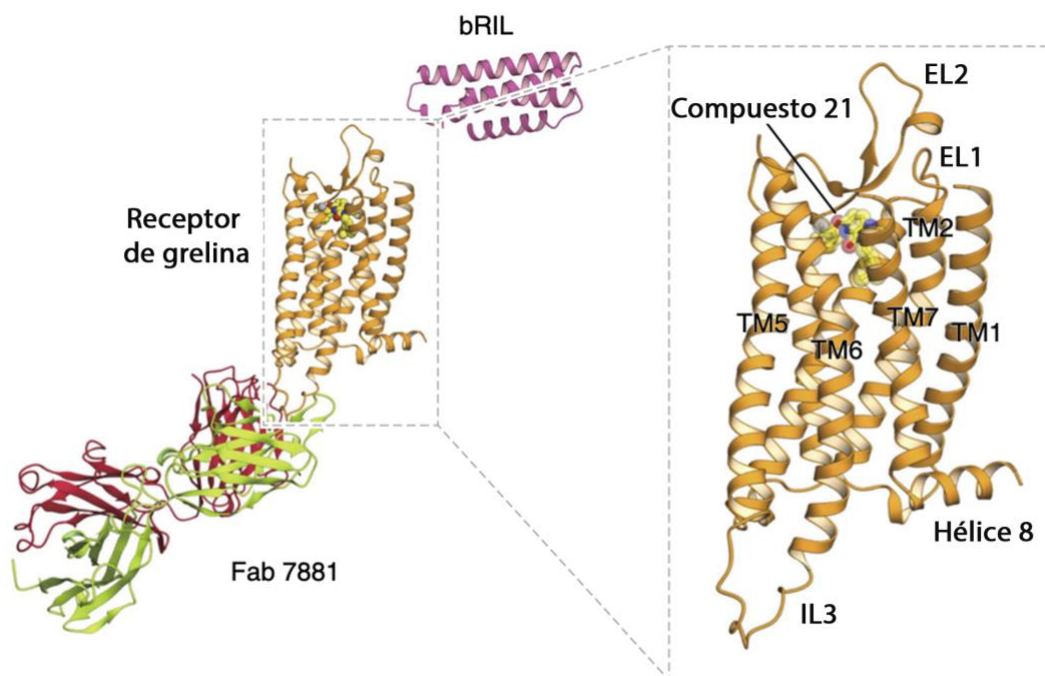


Figura 17 Estructura cristalina del receptor de grelina GHS-R1a unido a su antagonista *Compuesto 21*. Modificado de (157).

El GHS-R1a puede señalizar a través de G_q , activando la fosfolipasa C promoviendo la liberación de calcio a nivel del retículo endoplásmico y la posterior activación de la PKC para finalmente producir la inhibición de canales de potasio y la despolarización celular (30). Además, también es capaz de señalizar a través de $G_{i/o}$, inhibiendo la AC y disminuyendo los niveles de AMPc intracelular en el citosol. El GHS-R1a señalizará a través de una vía o de otra en función de su localización subcelular. Por el otro lado, la activación de este receptor también activa la fosforilación de las Akt y las MAPK, además de promover la señalización a través de mTOR y el reclutamiento de β -arrestinas (158). Las funciones fisiológicas del GHS-R1a y de la grelina incluyen un gran número de acciones tanto a nivel del SNC como del SNP (**Figura 18**) (150,158). Su principal función consiste en aumentar la sensación de apetito. Por este motivo, los niveles de grelina en plasma dependen del estado metabólico, viéndose incrementados justo antes de la comida y disminuidos después de ésta (161). Además, se asocian inversamente al aumento de peso, la adiposidad y la resistencia a la insulina, y se correlacionan positivamente con la pérdida de peso inducida por el ejercicio, la dieta baja en calorías, la anorexia nerviosa, la caquexia y la insuficiencia cardíaca crónica (150). De esta manera, los pacientes con obesidad presentan niveles menores de grelina, mientras que los pacientes con anorexia, caquexia y bulimia tienen niveles más altos que los pacientes sanos (162). Este rol del receptor de grelina en el metabolismo y en la ingesta de alimentos lo sugirió como diana para el tratamiento de enfermedades como la obesidad o la diabetes. A parte de esta función metabólica, actualmente, se considera la grelina como una hormona pleiotrópica con diferentes roles en procesos fisiológicos del SNC como la neuroprotección o la neurogénesis. También muestra



efectos anti-depresivos y anti-ansiedad, y de regulación de la memoria y la cognición (160). Además, como ya hemos explicado, los receptores de grelina están muy expresados tanto en el ATV como en la SN, donde interactúan con la vía mesolímbica dopaminérgica para activar los circuitos de recompensa que nos motivan a ingerir alimentos (163). De esta manera, es importante estudiar el posible papel de la grelina y de su receptor en un contexto de adicción a sustancias de abuso como la cocaína, así como su interacción molecular con los receptores de dopamina, lo que nos permitiría diseñar nuevos fármacos para tratar tanto desórdenes alimentarios como la adicción a la cocaína.

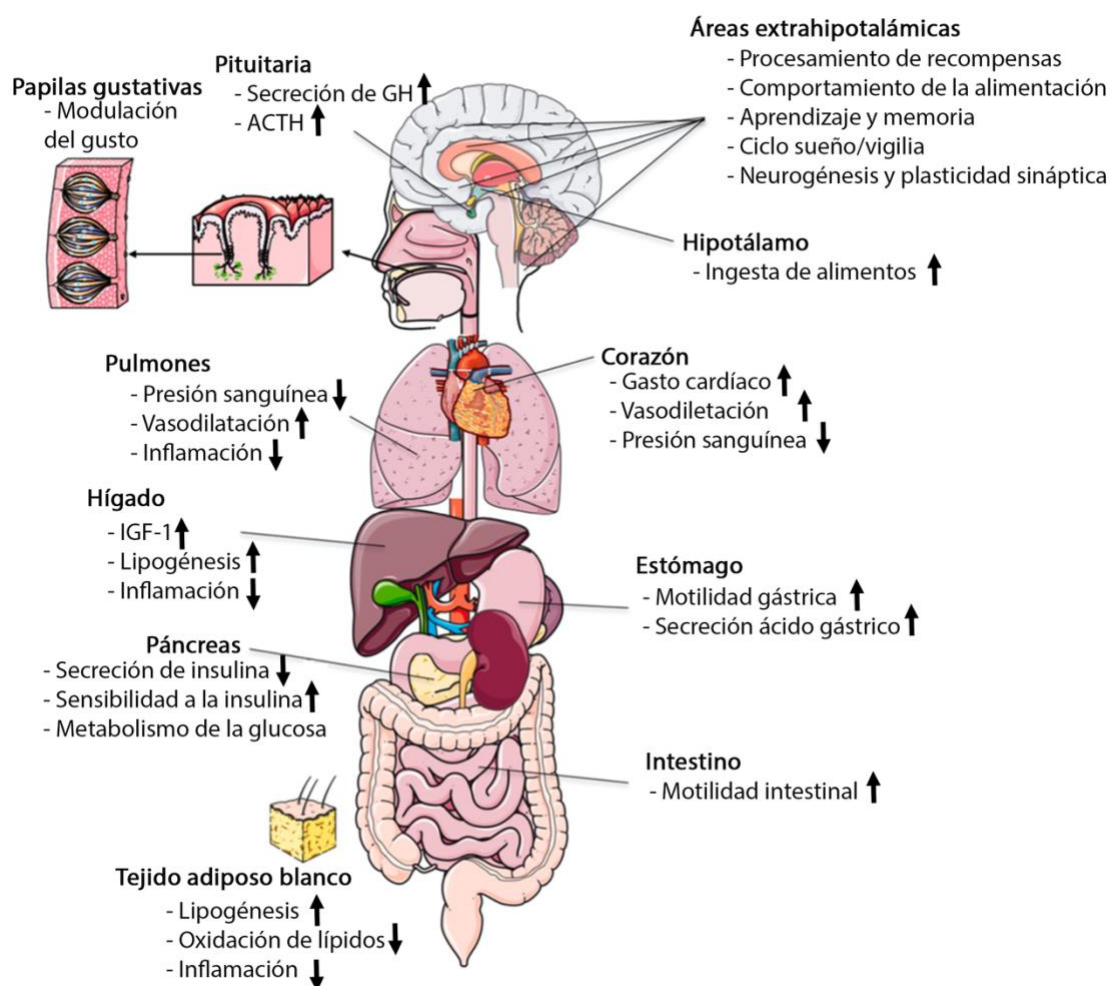


Figura 18 Representación esquemática de los efectos fisiológicos de la grelina. ACTH: hormona adrenocorticotrópica, GH: hormona del crecimiento, IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1 Modificado de (148).

1.5.3. La orexina y el receptor de orexina OX₁

En 1998, en apenas un mes de diferencia, dos grupos distintos identificaron de forma independiente dos nuevos neuropéptidos. Por un lado, De Lecea y colaboradores llamaron a estas nuevas moléculas hipocretina-1 y hipocretina-2 porque se expresaban específicamente en el



1. Introducción

hipotálamo posterior y tenían una estructura similar a la hormona secretina (164). Por el otro lado, Sakurai y colaboradores, las nombraron orexina-A y orexina-B. Este nombre deriva de la palabra griega “*orexis*” que significa apetito, ya que la función principal de este neuropéptido es precisamente estimular la sensación del apetito (165). Más tarde, se descubrió que las orexinas y las hipocretinas eran las mismas moléculas, aunque hoy en día se siguen usando las dos nomenclaturas. La estructura del gen que codifica para las orexinas está formada por dos exones y por un intrón, de manera que se generan a partir de un pre-pro-péptido inicial que contiene 131 aa a partir del cual se obtendrá por un lado la orexina-A de 33 aa y, por el otro, la orexina-B de 28 aa (166).

Las orexinas realizan sus funciones mediante la unión a dos receptores: el receptor de orexina 1 (OX₁R) y el receptor de orexina 2 (OX₂R) (167), de los cuales se ha publicado la estructura cristalina (168,169) (**Figura 19**). Estos receptores son GPCR de la familia A y se diferencian entre sí por sus diferentes propiedades farmacológicas y por su distinto patrón de expresión a nivel de SNC. El OX₁R señala a través de G_{q/11}, mientras que el OX₂R puede acoplar tanto G_{q/11} como G_{i/o} (170,171). La activación de los receptores de orexina promueve la movilización de calcio intracelular, además de activar las fosfolipasas A y D, diversos canales iónicos y la vía de las MAPK (170,171). Estos receptores presentan afinidades distintas para los dos tipos de orexina, por un lado, el OX₁R tiene una afinidad de entre 5-100 veces mayor por la orexina-A que por la orexina-B (según el estado fisiológico del organismo), mientras que el OX₂R tiene una afinidad similar para las dos moléculas (165). La diferente afinidad por sus ligandos endógenos, así como el diferente patrón de expresión de los receptores de orexina, permitirían explicar los distintos efectos fisiológicos del sistema orexinérgico (**Figura 20**).

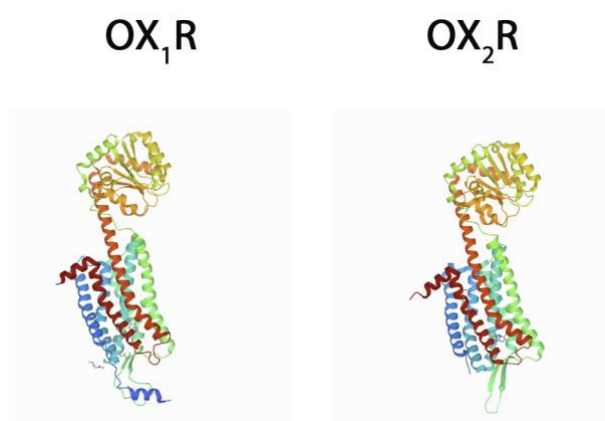


Figura 19 Estructura cristalina de los receptores de orexina OX₁ y OX₂. Extraído de (168,169).

Aunque las aproximadamente 70,000 neuronas orexinérgicas del cerebro humano están localizadas exclusivamente en el hipotálamo, todas ellas son capaces de mandar proyecciones a varias regiones del cerebro (**Figura 20**) (172). El hipotálamo es una región crítica en la conducta alimentaria y en la regulación del metabolismo energético. Además, los niveles de las orexinas varían



según el estado energético del organismo, con una mayor expresión en situaciones de ayuno. Estos datos permitieron descubrir en un primer lugar que las orexinas tenían un papel muy importante en la regulación del apetito (165). De hecho, Cole y colaboradores demostraron que la administración de orexina en el hipotálamo era capaz de estimular la ingesta de alimentos, mientras que el tratamiento con antagonistas de los receptores de orexina disminuía la sensación de apetito (173). Posteriormente, se descubrió que este sistema también era muy importante en la regulación del ciclo sueño/vigilia (174), especialmente en el mantenimiento de una vigilia prolongada (172). Los niveles de orexina oscilan circadianamente, obteniéndose los niveles máximos durante la vigilia (175), además, la administración de orexina prolonga el período de vigilia y reduce el tiempo de sueño (176). De esta manera, el sistema orexinérgico actúa oponiéndose a la sensación de sueño. No es de extrañar pues, que alteraciones en este sistema provoquen enfermedades como la narcolepsia, trastorno crónico del sueño que se caracteriza por una somnolencia extrema durante el día y ataques repentinos de sueño (177,178), o el insomnio (179).

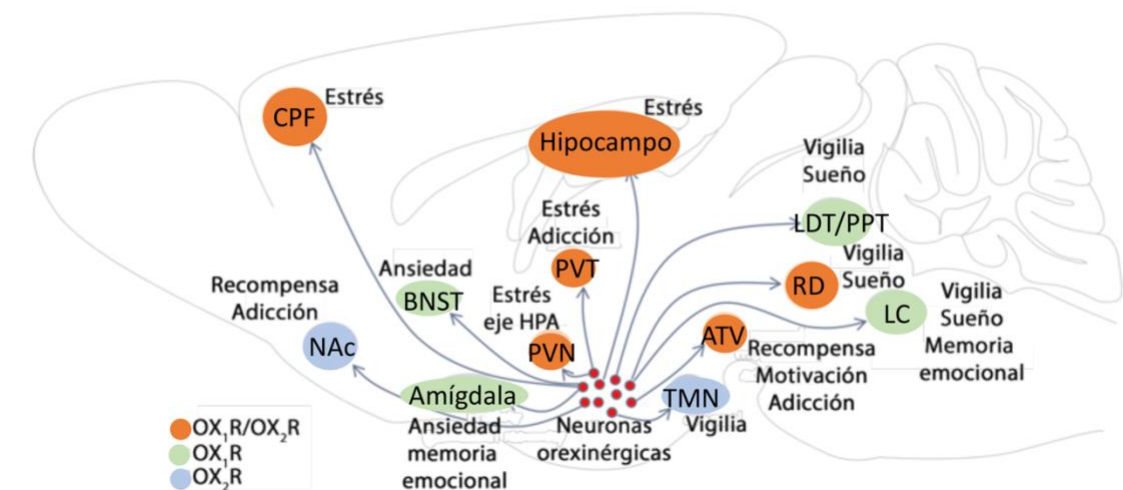
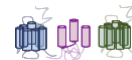


Figura 20 A) Representación esquemática de la expresión de los receptores de orexina OX_1 y OX_2 en el cerebro de ratona. Modificado de (180). ATV: Área tegmental ventral, BNST: núcleos del lecho de la estria terminal; CPF: córtex prefrontal, LC: Locus coeruleus, LDT/PPT: núcleo tegmental laterodorsal/ núcleo tegmental pedúnculopontico; NAc: núcleo accumbens; RD: rafe dorsal; TMN: núcleo tuberomamilar; PVN: núcleo hipotalámico paraventricular; PVT: núcleo paraventricular del tálamo.

A causa de las proyecciones de las neuronas orexinérgicas hacia regiones del cerebro asociadas con la recompensa como el ATV, la amígdala, el NAc y el córtex prefrontal (181), varios laboratorios han reportado evidencias de la implicación del sistema orexinérgico en la adicción a sustancias de abuso (167). Más concretamente, las funciones relacionadas con la adicción se han relacionado principalmente por las acciones del OX_1R . Por ejemplo, se ha demostrado que la activación de este receptor en el ATV promueve la búsqueda de sustancias de abuso, además de promover la recaída de su consumo (182), mientras que el bloqueo con el antagonista selectivo de



1. Introducción

OX₁R SB 334867 disminuye la adicción a cocaína, morfina, nicotina y alcohol (167,183,184). Finalmente, las proyecciones de las neuronas orexinérgicas hacia la amígdala, el núcleo de la estria terminal y el núcleo paraventricular del hipotálamo (185) hacen que este sistema también tenga un papel muy importante en la regulación de las respuestas al estrés, incluyendo las respuestas asociadas a la recaída del consumo de sustancias de abuso (182). Varios estudios han reportado evidencias que la activación de las neuronas orexinérgicas potencia los comportamientos relacionados con el estrés (186). Bonaventure y colaboradores demostraron que la administración de un antagonista selectivo y con una alta afinidad para OX₁R (Compuesto 56) reducía el estrés en dos modelos distintos de estrés de rata, de manera que propusieron el antagonismo de OX₁R como diana terapéutica para tratar varias enfermedades psiquiátricas relacionadas con el estrés (187). Aunque existan todas estas evidencias sobre la relación entre el sistema orexinérgico y la adicción a sustancias de abuso, el mecanismo molecular exacto mediante el cual interaccionan estos dos sistemas permanece desconocido y, por tanto, su estudio permitirá añadir una pieza más en el puzle para entender la compleja neurobiología de la adicción.

1.5.4. El factor liberador de corticotropina (CRF) y sus receptores

El factor liberador de corticotropina (CRF) es un neuropéptido de 41 aa muy conservado a través de las diferentes especies y se sintetiza a partir de un pre-pro-péptido de 196 aa (188). Este neuropéptido está altamente expresado en varias zonas del cerebro como el córtex, el hipotálamo, el tálamo, el hipocampo, el mesencéfalo y el locus coeruleus (189). El mayor número de neuronas que expresan CRF se encuentran en el núcleo paraventricular del hipotálamo, en la amígdala y en la estria terminal del tálamo, en el SNC, y en el intestino, la piel y las glándulas adrenales en el SNP (189,190).

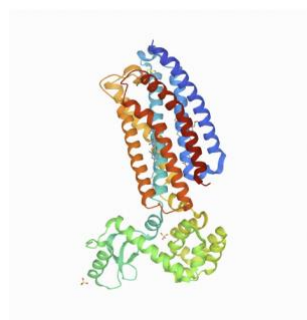
El CRF media todas sus acciones por su unión a dos receptores: los receptores de CRF 1 (CRF₁R) y 2 (CRF₂R). Se conocen otros ligandos endógenos de estos receptores, como las urocortinas (UCN1-UCN3), con afinidades muy distintas para los dos receptores. Mientras que la UCN1 presenta afinidades parecidas para ambos receptores, la UCN2 y la UCN3 son ligandos selectivos para CRF₂R (191). Contrariamente, el CRF presenta una afinidad unas 10 veces mayor para CRF₁R que para CRF₂R. Todas estas hormonas y los receptores de CRF, además de la proteína de unión al factor liberador de corticotropina forman el sistema CRF (192). Los receptores de CRF son GPCRs de la familia B, de los cuales se conoce su estructura cristalina (**Figura 21**) (191). Tanto el CRF₁R como el CRF₂R son capaces de generar variantes de *splicing* alternativo (193). Se han descubierto 8 isoformas del CRF₁R en humanos, aunque solo se conoce la función biológica de la isoforma alfa (194). Por otro lado, en mamíferos se conocen tres isoformas del receptor de CRF₂: α , β y γ , que difieren entre sí en la extensión de su extremo N-terminal y en su distribución en el organismo (195,196). Entre ellas, la isoforma alfa es la que está más expresada en el cerebro, mientras que la beta se encuentra principalmente en tejidos periféricos como la retina, los ovarios, el



corazón, el tracto digestivo, la piel y el músculo esquelético. Finalmente, la isoforma gamma se encuentra en algunas zonas del cerebro (septum, hipocampo, amígdala, mesencéfalo, córtex y regiones límbicas), aunque su función biológica permanece aún desconocida (194,197).

Los receptores de CRF presentan distintos patrones de expresión tanto en el SNC como en el SNP (198). En general, el CRF₁R está más expresado en el cerebro, el córtex, el cerebelo, el bulbo olfativo, el septum medial, el hipocampo, la amígdala, la glándula pituitaria y tejidos periféricos (40), mientras que CRF₂R está más expresado en la periferia, principalmente en el corazón (199). También se ha descrito la expresión de CRF₂R en varias zonas del SNC, como el septum lateral, la estria terminal del tálamo, el hipotálamo, el bulbo olfatorio y el núcleo de rafe (200).

CRF₁R



CRF₂R

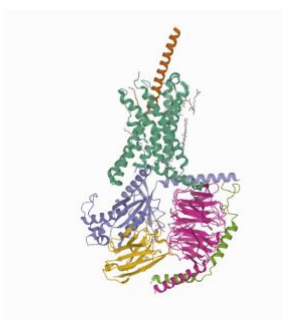
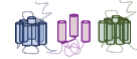


Figura 21 Estructura cristalina de CRF₁R unido a su antagonista CP-376395 (izquierda) (505) y de CRF₂R formando complejo con la proteína G_s (191).

Los receptores CRF₁ y CRF₂ se acoplan mayoritariamente a la proteína G_s, produciendo una activación de la enzima AC, aumentando la acumulación de AMPc intracelular en el citosol (201) y mediando la activación de PKA y CREB, así como del factor de transcripción Nur77 y Nurr1, que, a su vez, promoverán la transcripción de POMC (202). Además, estos receptores son capaces de activar otras vías independientes de proteína G_s, como la vía de las MAPK. También se ha descrito que estos receptores, según en el contexto celular en el que se encuentran, pueden señalizar a través de otras proteínas G (203,204). Esta promiscuidad que presentan estos receptores les permite activar un gran número de vías de señalización como la activación de la PKC, la fosforilación de Akt, la movilización de Ca²⁺, el óxido nítrico sintasa, la guanilato ciclasa, la RhoA y la GSK-3b/Wnt (192,194).

En mamíferos, las proyecciones hipotalámicas de las neuronas que expresan CRF y sus receptores modulan principalmente la respuesta al estrés. El estrés es un mecanismo que se pone en marcha cuando una persona se encuentra con un estado de amenaza real o de percepción de amenaza que altera la homeostasis del organismo. La respuesta al estrés incluye adaptaciones fisiológicas como la inhibición del apetito, así como un aumento en el estado de alerta y la sensación de euforia (205). Esta respuesta se caracteriza por una primera fase inicial rápida que estimula la vía simpático-adrenomedular (SAM) para preparar al organismo para la respuesta “lucha o huida”. La segunda fase



1. Introducción

de la respuesta al estrés implica la activación de la vía hipotalámica-pituitaria-adrenal (HPA) y es un proceso gradual de adaptación y de recuperación que se encarga de disminuir la activación producida en la primera fase (192). En esta segunda fase, las neuronas CRFérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo liberarán CRF a través de sus proyecciones a la glándula pituitaria anterior, estimulando la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la sangre. La ACTH actúa sobre el córtex adrenal para aumentar la producción de glucocorticoides lo que, por un lado, supone el inicio de la respuesta endocrina al estrés y, por el otro, producirá un *feedback* negativo para disminuir la síntesis de CRF (206) (**Figura 22**).

De esta manera, el CRF juega un papel muy importante en la integración de las respuestas neuroendocrina, autonómica y de comportamiento al estrés (207). La diferente distribución junto a la distinta afinidad de estos receptores por sus ligandos endógenos nos indican que cada receptor regula distintas fases del estrés, siendo el CRF₁R más importante en una fase inicial, desencadenando comportamientos de ansiedad, y el CRF₂R en una fase tardía y en el retorno a la homeostasis, oponiéndose a la activación de CRF₁R, y, por lo tanto, produciendo una respuesta de atenuación al estrés (192,208). El CRF liberado en respuesta al estrés agudo es esencial para la supervivencia del organismo, sin embargo, el CRF liberado como resultado de una situación de estrés crónica termina ejerciendo efectos negativos en la homeostasis del organismo, pudiendo llegar a producir depresión, ansiedad o enfermedades cardíacas (191,192,206,209). También ha sido descrito el papel de CRF en la regulación de la ingesta y la saciedad (210), la motilidad del tracto gastrointestinal (211), el desarrollo, la audición y la función cardíaca (212,213). Además, también se ha observado que el estrés afecta en todas las fases de la adicción. El estrés y el sistema de recompensa están íntimamente relacionados: la activación de la vía HPA promueve la liberación de dopamina (214) y la necesidad de buscar una recompensa puede llegar a producir estrés (215). Se ha demostrado que una situación de estrés agudo altera las distintas formas de toma de decisiones de riesgo/recompensa, sobretodo aquellas que están guiadas por señales externas (216), actuando sobre la neurotransmisión dopaminérgica (217). De hecho, se ha demostrado la habilidad de CRF₂R de interactuar físicamente con el receptor de dopamina D₁R, lo que refuerza la hipótesis de las interacciones moleculares entre el neuropéptido CRF y las neuronas dopaminérgicas (143,218). Por el otro lado, algunos estudios han demostrado que el consumo crónico de sustancias de abuso altera los sistemas que regulan una respuesta al estrés, siendo muy importante en el proceso de recaída al consumo de psicoestimulantes. Por ejemplo, se ha demostrado que ratas con altos niveles de CRF tienen más probabilidad de auto-administrarse cocaína, heroína y anfetamina (219,220). Además, en una situación de abstinencia de metanfetamina, los sistemas de CRF se encuentran sobreactivados (221) y pacientes que llevan seis meses sin tomar anfetamina presentan niveles de cortisol menores que los pacientes controles delante de una situación de estrés (222).



Hasta el momento, a pesar de que tanto el péptido CRF como la orexina-A se encuentran involucrados en la recaída del consumo de sustancias de abuso inducida por estrés, sus mecanismos siempre se han estudiado de forma independiente. En esta Tesis Doctoral es de nuestro interés estudiar la relación que se establece entre ellos para tener más conocimiento sobre el mecanismo de recaída de las sustancias de abuso, en concreto la amfetamina, relacionándolo con la respuesta al estrés.

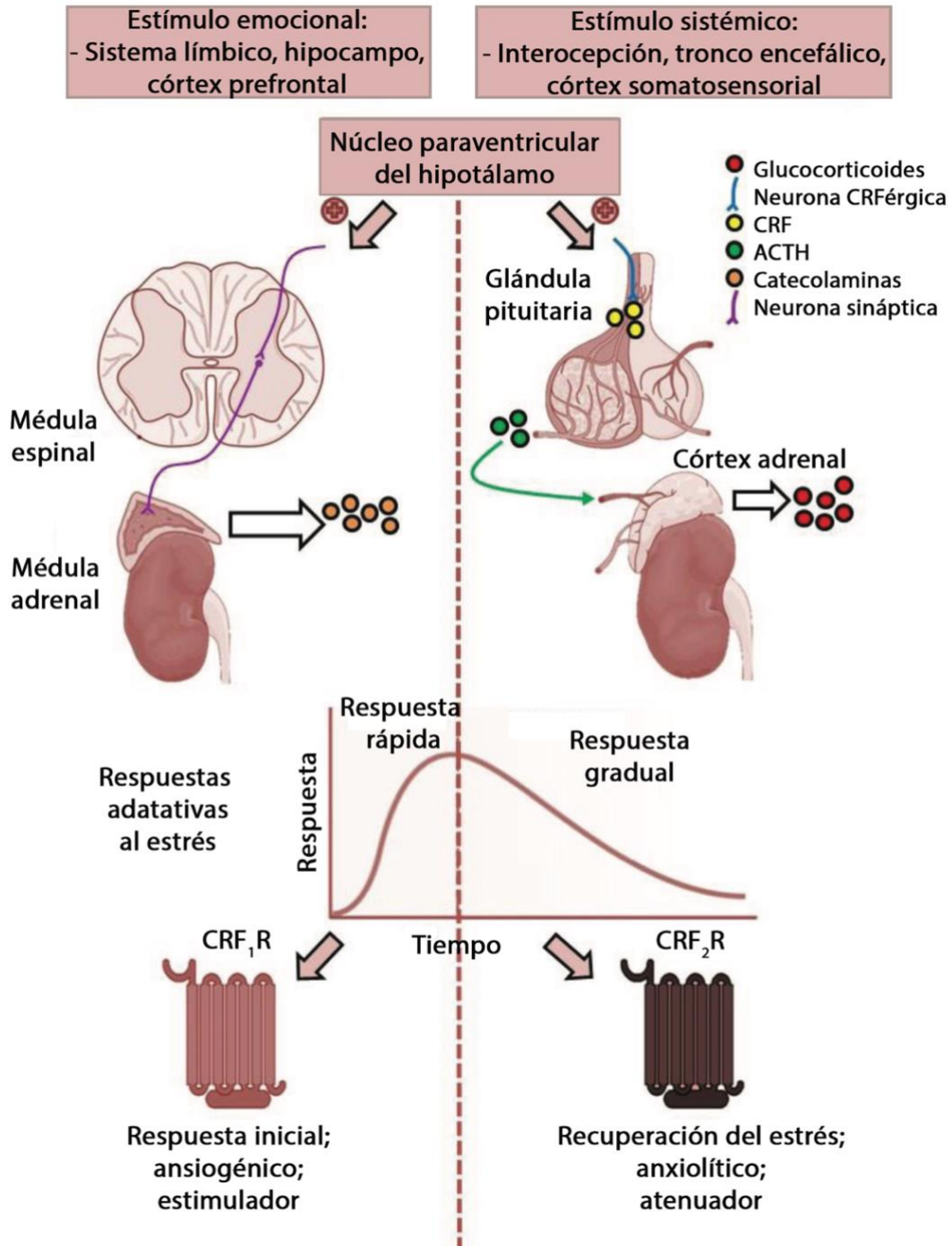
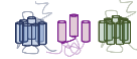


Figura 22 Representación esquemática de la respuesta fisiológica al estrés. Modificado de (192).



1.5.5. El receptor A_{2A} de adenosina

La adenosina es una purina muy importante en el metabolismo de los ácidos nucleicos y del ATP (25). Esta molécula tiene una expresión ubicua y participa en casi todos los aspectos de la fisiología celular, incluyendo la actividad neuronal. La adenosina tiene un papel modulador en la mayoría de las situaciones fisiológicas, es decir, no se libera como un transmisor o una hormona, sino que es sintetizada por distintos grupos de células en respuesta a un estímulo. En condiciones normales, los niveles de adenosina extracelulares varían entre 20-300 nM, pudiendo llegar al rango de micromolar en situaciones extremas, como en el ejercicio intenso o en condiciones de hipoxia, llegando a concentraciones de 30 μM en procesos de isquemia (223).

La familia de receptores de adenosina se divide según la capacidad de estos receptores para unir adenosina en los receptores de alta afinidad: A₁, A_{2A} y de baja afinidad: A_{2B} y A₃ (223). En concreto, el receptor A_{2A} ha sido ampliamente estudiado, y se conoce muy bien tanto su estructura como su farmacología (**Figura 23**). Se trata de un GPCR de la familia A formado por 412 aa en humanos con un extremo N-terminal muy importante para la unión a ligando (224). Además, tiene un dominio C-terminal más largo que los otros receptores de adenosina, con 122 aa (225).

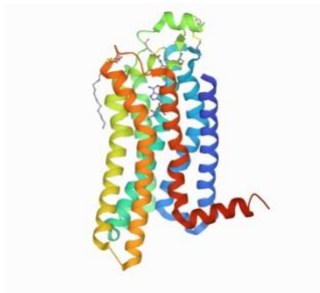


Figura 23 Estructura cristalina del receptor de adenosina A_{2A} unida a su agonista CGS 21680. Extraído de (506).

Combinando distintas técnicas de inmunocitoquímica y microscopía electrónica se ha podido mapear la distribución de los receptores de A_{2A}R en el organismo. Este receptor tiene una distribución muy ubicua y sus niveles de expresión dependen del tejido donde se localiza. El A_{2A}R tiene una elevada expresión en zonas del cerebro con una alta concentración de dopamina como los ganglios basales, el NAc y el tubérculo olfatorio. El A_{2A}R tiene una menor expresión en el córtex, el hipocampo, el corazón, los pulmones, el hígado, el riñón, el timo, el bazo, la piel y los vasos sanguíneos. Su expresión es tanto a nivel pre como post sináptico en neuronas, en astrocitos, microglía y oligodendrocitos (223). A nivel del sistema inmunitario se expresa ampliamente en macrófagos, linfocitos T, neutrófilos, plaquetas y leucocitos (223) (**Figura 24**).

El A_{2A}R se acopla a G_{s/olf}, de manera que su activación produce un aumento en los niveles de AMPc intracelulares y promueve la activación de las quinasas PKA y PKC (224), que a su vez fosforilaran y activaran un gran número de proteínas como receptores, fosfodiesterasas, y DARPP-32 (223). Además, también activa la vía de las MAPK (225).



La adenosina controla la regulación del flujo cardíaco, la movilización plaquetaria y la inhibición de las células inflamatorias a través de su unión a $A_{2A}R$ (226). De esta manera, la activación mediante sus agonistas selectivos tiene un efecto anti-inflamatorio. Por este motivo, la activación de este receptor se ha propuesto como diana terapéutica para tratar enfermedades inflamatorias como el asma, enfermedad que se caracteriza por una inflamación crónica y una obstrucción reversible de las vías respiratorias (224). En este sentido, se diseñó el fármaco regadenoson, el cual ha resultado ser seguro y capaz de disminuir moderadamente los síntomas de pacientes asmáticos (227).

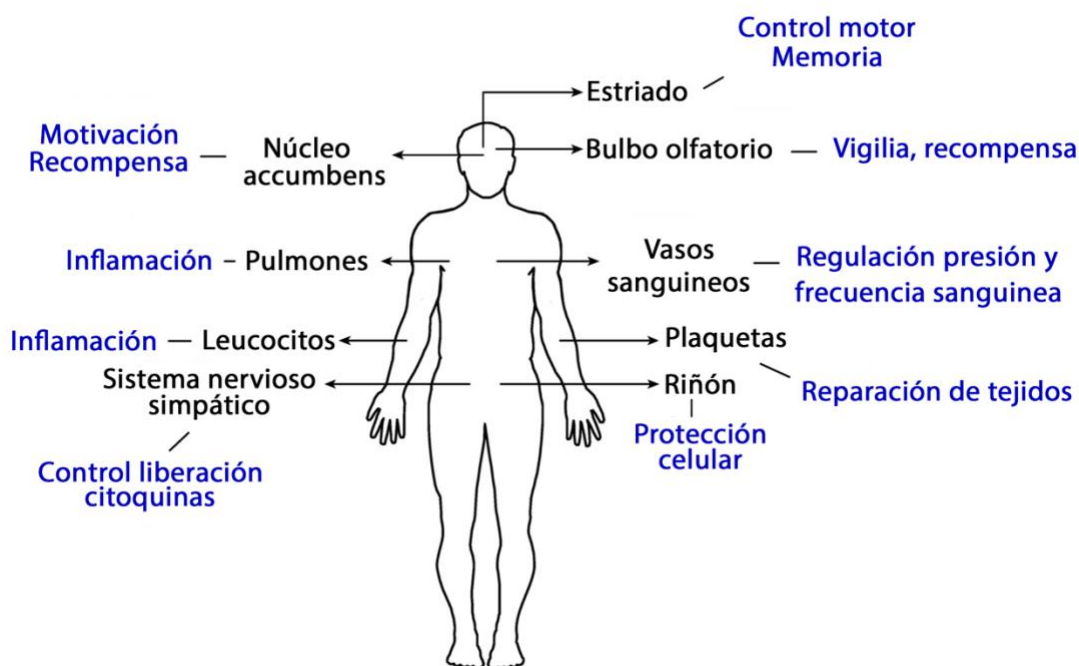
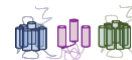


Figura 24 Localización (negro) y funcionalidad (azul) del receptor de adenosina A_{2A} . Modificado de (228).

Por el otro lado, la activación de este receptor en el SNC se ha asociado a la neurodegeneración (226). Por este motivo, el bloqueo de este receptor ha sido propuesto para tratar varias enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la esquizofrenia o la depresión (224,228). Además, un importante descubrimiento sobre la funcionalidad del $A_{2A}R$ fue la demostración que este receptor podía interaccionar con el receptor de dopamina D_2R en los ganglios basales y bloquear directamente su funcionalidad (223). La activación del D_2R en esta región del cerebro inhibe el movimiento (vía indirecta), por lo que el bloqueo del $A_{2A}R$ permitiría de manera indirecta potenciar la función motora a causa del bloqueo de esta inhibición, además de prevenir potencialmente la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (224,229). En base a estos descubrimientos se han diseñado varios medicamentos que son antagonistas del $A_{2A}R$ para tratar la enfermedad de Párkinson. De hecho, en Japón se ha aprobado el



1. Introducción

Istradefylle, antagonista selectivo del $A_{2A}R$, en combinación con la *levo*-DOPA como tratamiento para la enfermedad de Párkinson (228). La inhibición del $A_{2A}R$ sobre la funcionalidad del D_2R también puede tener un papel importante en un contexto de adicción a sustancias de abuso (230). Los altos niveles de $A_{2A}R$ en el estriado, juntamente con la capacidad que tiene la adenosina para modular la señalización dopaminérgica y glutamatérgica a través de su unión con $A_{2A}R$ son particularmente importantes en el campo de las enfermedades psiquiátricas, ya que tanto la dopamina como el glutamato juegan papeles muy importantes en el procesamiento de los estados de ánimo y en los procesos de adicción (231). Así, se ha publicado que los agonistas NECA y CGS 21680 de $A_{2A}R$ inhiben la búsqueda de la toma de cocaína en ratas (232) y que la delección genética del $A_{2A}R$ supone una disminución de las respuestas locomotoras inducidas por el consumo de cocaína y de anfetamina (233). Además, Kavanagh y colaboradores publicaron que en ratas tratadas de forma crónica con metanfetamina la expresión del $A_{2A}R$ se encontraba alterada, demostrando la importancia del sistema de la adenosina en la adicción a la metanfetamina y que los cambios de expresión de este receptor podrían ser importantes en la transición desde una fase aguda a una fase crónica de la enfermedad (234). Estas evidencias proponen al $A_{2A}R$ como una buena diana terapéutica para tratar la adicción a sustancias de abuso como la metanfetamina (226,230).

1.5.6. El receptor cannabinoide CB_1

La planta *Cannabis sativa* se ha usado desde hace miles de años con fines culturales y curativos. De hecho, el primer uso documentado de esta planta tiene más de 5000 años, cuando en China se utilizaron extractos de *Cannabis sativa* para calmar el dolor y los calambres (235). Esta planta produce metabolitos secundarios, unos terpenos formados por 21 átomos de carbono, que se conocen con el nombre de fitocannabinoides (236). Los primeros compuestos que se pudieron aislar fueron el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y el cannabidiol (CBD) (237), aunque actualmente se han aislado y descrito más de 100 diferentes tipos de fitocannabinoides, la mayoría de ellos sin efectos psicotrópicos (238). De hecho, se ha demostrado que estos efectos psicotrópicos son debidos principalmente a la acción del Δ^9 -THC. Todos los fitocannabinoides tienen la característica común de actuar como ligandos de los receptores de cannabinoides: CB_1 y CB_2 , los cuales fueron clonados a finales del siglo XX (239,240). La identificación de estos receptores permitió descubrir sus ligandos endógenos, los cuales recibieron el nombre de endocannabinoides (237). Los primeros endocannabinoides que se descubrieron fueron los lípidos anandamina (AEA) y el 2-arachidonoilglicerol (2-AG). La AEA tiene una afinidad muy elevada para el CB_1R y actúa como agonista parcial, mientras que el 2-AG es un agonista total tanto del CB_1R como del CB_2R (235). Hasta la fecha se han clasificado como endocannabinoides tres compuestos más: noladin éter (241), virodhamina (242) y N-araquidonil dopamina (243). El conjunto formado por los receptores cannabinoides (CB_1R y CB_2R), sus ligandos endógenos (endocannabinoides), así como todas las



enzimas que participan en la síntesis y la degradación de estos compuestos forman lo que se conoce como el sistema endocannabinóide (SEC) (236,237).

La principal característica del SEC es que tiene una señalización retrógrada. Esta señal se inicia con la llegada de un estímulo determinado que produzca un aumento en los niveles de calcio intracelular, lo que inducirá la producción de ligandos endocannabinoides en la membrana citoplasmática de la neurona postsináptica. El 2-AG se sintetiza a partir del DAG por acción de la enzima diacilglicerol lipasa- α (DAGL α), mientras que la AEA se sintetiza a partir de la N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) por acción de la fosfolipasa D específica de NAPE (NAPE-PLD). Los endocannabinoides serán liberados en la sinapsis para más tarde unirse y activar a los receptores de cannabinoides de tipo 1 de la neurona presináptica (235). Esta activación provocará la inhibición de la liberación de diversos neurotransmisores como glutamato, acetilcolina o GABA mediante varios mecanismos, principalmente a través de la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que reducirá el flujo de calcio a nivel presináptico. Finalmente, la terminación de la señal se producirá cuando el 2-AG o a la AEA, que habían iniciado la respuesta, sean degradados por sus enzimas específicas; el 2-AG será degradado a ácido araquidónico (AA) y glicerol por la monoacilglicerol lipasa (MAGL), mientras que la hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH) será la encargada de hidrolizar la AEA a AA y etanolamina (EtNH₂) (235) (**Figura 25**).

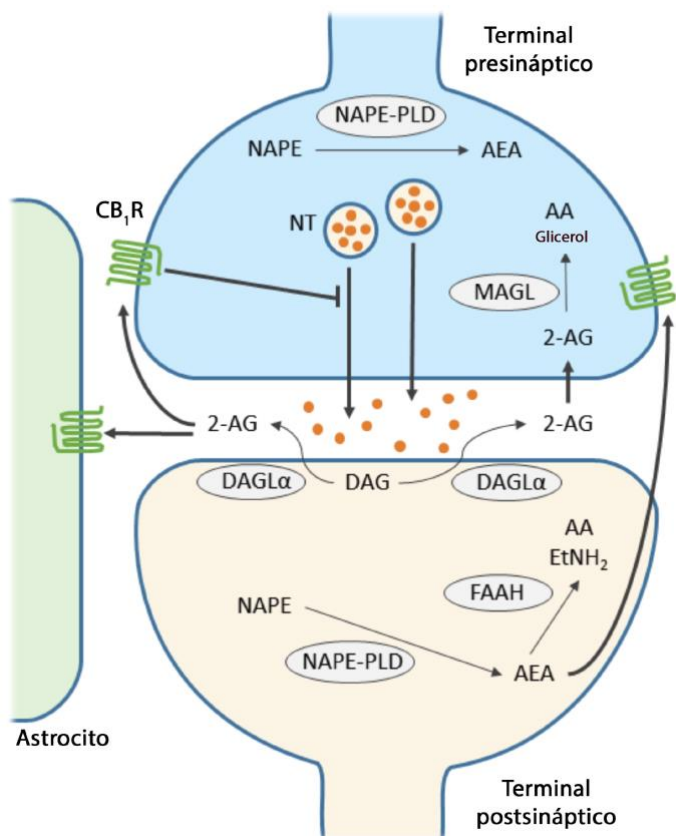


Figura 25 Representación esquemática del sistema de señalización retrógrada de los endocannabinoides. Modificado de (235). NT: Neurotransmisor.

1. Introducción



Los receptores de cannabinoides están formados por los GPCR de la familia A CB₁R y CB₂R. Estudios recientes sugieren que existen otros receptores capaces de unir compuestos cannabinoides, como el receptor GPR55 o el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1), aunque no han sido aceptados a fecha de hoy. El CB₁R, que es codificado por el gen CNR1 y recientemente se ha obtenido su estructura cristalina (244,245), está constituido por 472 aa en humanos con una cola N-terminal bastante larga (**Figura 26**). Se conocen dos variantes de *splicing* de este receptor, con el extremo N-terminal más corto, CB_{1(a)} y CB_{1(b)} (246).

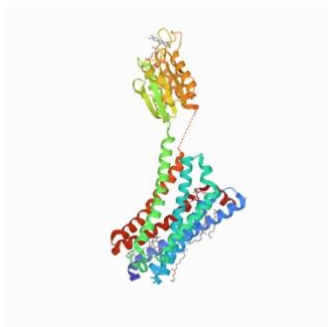


Figura 26 Estructura cristalina del receptor CB₁ unido a su agonista AM11542. Extraído de (244).

El CB₁R es el GPCR más abundante en el SNC de los mamíferos, aunque también se expresa en otros órganos del SNP. En el SNC, la localización del CB₁R es mayoritariamente a nivel presináptico, tanto en neuronas excitatorias como inhibitoras, aunque también se puede encontrar a nivel postsináptico. Las principales regiones que expresan niveles más elevados de este receptor son el bulbo olfatorio, el hipocampo, los ganglios basales y el cerebelo, mientras que hay una expresión moderada en el córtex, el septum, la amígdala, el hipotálamo y partes del bulbo raquídeo, además de una menor expresión en el tálamo y en la médula espinal (235,247). Por otro lado, el CB₁R también se expresa en astrocitos, oligodendrocitos, microglía, y en células inflamatorias (237). En el SNP está muy expresado en los terminales nerviosos simpáticos y en el tracto intestinal. También tiene una expresión menor en el hígado y en el sistema cardiovascular, viéndose incrementada en situaciones patológicas, y en el tejido adiposo, los pulmones, la próstata, la melsa, los huesos, la piel, la retina, el músculo esquelético y el sistema reproductivo (235,246) (**Figura 27**).

El CB₁R realiza sus respuestas fisiológicas mediante el acoplamiento a proteína G_{i/o}, como consecuencia, su activación produce una inhibición de la AC y una bajada en la producción de AMPc intracelular. Sin embargo, se ha reportado que en algunos casos, este receptor puede activar tanto G_s como G_q en determinadas circunstancias y tipos celulares (235). Por ejemplo, el acoplamiento a proteína G_s se ha sugerido cuando se tratan las células con la toxina *pertussis*, lo que inhibe la proteína G_i, o en presencia del receptor de dopamina D₂R (248,249), o que algunos agonistas como el WIN 55,212-2 permiten al CB₁R promover la liberación intracelular de calcio a través del acoplamiento a G_q (250). Además, la activación de este receptor puede modular la actividad de distintos canales



iónicos como los GIRK (*G Protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*) o canales de calcio, reclutar β -arrestinas y activar la vía de las MAPK y la vía de Pi3K/Akt a través de distintos mecanismos (235,246).

El CB₁R desempeña un papel muy importante en la fisiología del dolor, del comportamiento, la ansiedad, la depresión, las náuseas, la regulación del apetito, el aprendizaje y la memoria (235). Una de las primeras aplicaciones médicas de los cannabinoides fue la de usar sus efectos analgésicos para tratar distintos tipos de dolores (251). En el 2010 se aprobó el uso del medicamento Sativex® (nabiximol) formado por una mezcla de Δ^9 -THC y CBD en una proporción 1 a 1, que se usa únicamente para aliviar los síntomas de dolor y de espasticidad en pacientes que sufren de esclerosis múltiple (252). Actualmente, está aceptado que el CB₁R tiene un papel neuroprotector contra la neurotoxicidad inducida por varios estímulos, de manera que se ha propuesto como diana para tratar varias enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Párkinson o la enfermedad de Huntington (253). En un ensayo clínico, se demostró que el tratamiento con 300 mg de CBD diarios en pacientes con la enfermedad de Párkinson mejoraba la calidad de vida de estos (254), y, en otro, se demostró que el Δ^9 -THC y un análogo sintético, el nabilone, eran capaces de reducir la disquinesia que sufrían estos enfermos (255).

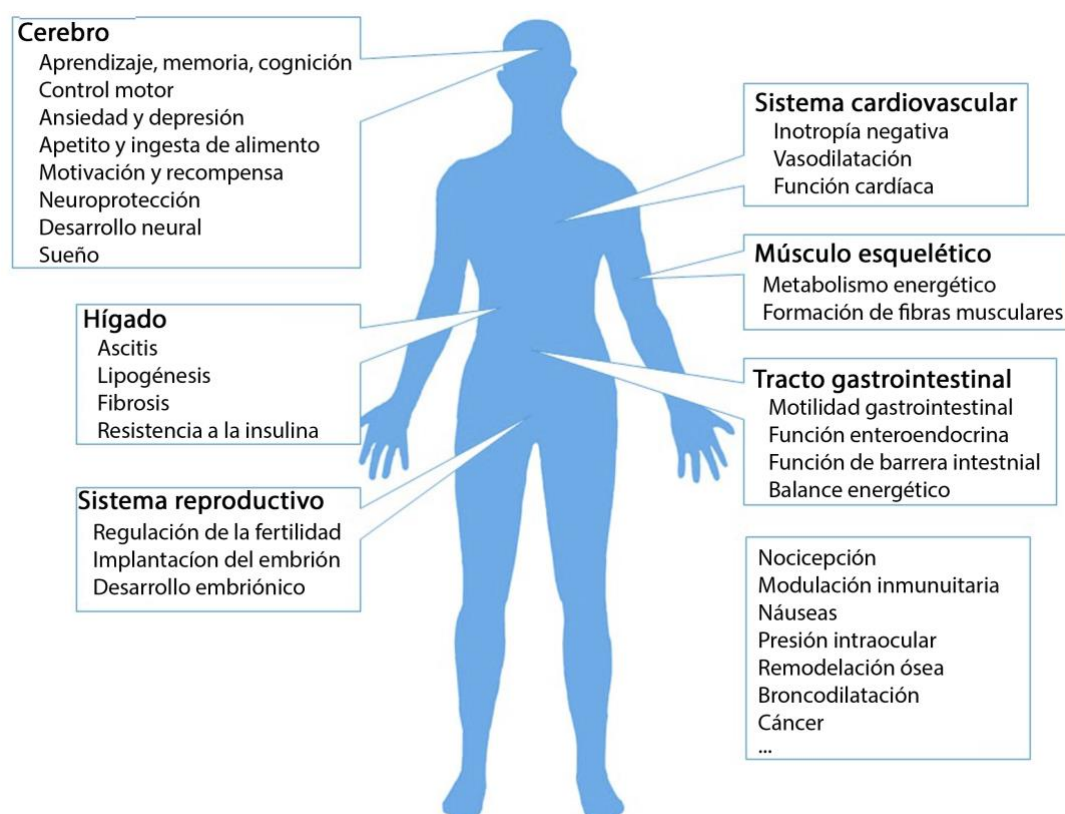


Figura 27 Principales localizaciones y funciones del CB₁R en humanos. Modificado de (235).



Finalmente, el CB₁R regula las propiedades gratificantes de las sustancias de abuso modulando la liberación de dopamina en el sistema mesocorticolimíbico. De esta manera, se ha propuesto que disminuir la función del CB₁R podría consistir una estrategia potencial para el tratamiento de la adicción a sustancias de abuso (256,257). De hecho, Hay y colaboradores demostraron que una dosis de 80 mg/kg de CBD reducía la motivación para auto-administrarse metanfetamina y disminuía la recaída a esta sustancia en ratas, proponiendo a este fitocannabinoide para el tratamiento para la adicción a la metanfetamina (258).

1.5.7. El heterómero A_{2A}R-CB₁R

La adenosina y los endocannabinoides son neuromoduladores con una expresión muy ubicua en el organismo. En el estriado se encuentra una elevada expresión del receptor de adenosina A_{2A}R y del receptor cannabinoide CB₁R (259,260). Por un lado, la adenosina regula la transmisión dopaminérgica a través de interacciones antagónicas entre receptores A₁R-D₁R y A_{2A}R-D₂R (61,261). Los cannabinoides, a través de la unión a CB₁R, también regulan la vía de la recompensa mediante interacciones con el receptor D₂R (56). De esta manera, ambos receptores pueden tener un papel relevante en fenómenos de adicción a sustancias de abuso. Por otro lado, existen muchas evidencias experimentales que demuestran que la activación del A_{2A}R modula algunos de los efectos farmacológicos de los cannabinoides, en particular, aquellos que dependen de la función estriatal (259,262). La habilidad de formar heterómeros entre los receptores de A_{2A} y CB₁ (A_{2A}R-CB₁R) se demostró en primer lugar en un sistema heterólogo usando la técnica de BRET (263). En este mismo estudio se observó que la activación del CB₁R era capaz de disminuir la estimulación de AMPc inducida por agonistas del A_{2A}R, además que el tratamiento con antagonistas del A_{2A}R bloqueaba completamente la activación producida por agonistas de CB₁R en el estriado (263). Este bloqueo de la señalización mediada por CB₁R mediante antagonistas del A_{2A}R también ha sido reportado por otros autores (264,265). Por ejemplo, se ha demostrado en ratones que el bloqueo del A_{2A}R reduce los efectos catalépticos inducidos por la administración sistémica del agonista del CB₁R CP55,940 (266) y que ratones KO de A_{2A}R muestran una disminución en la adicción a Δ⁹-THC (267). Recientemente, se ha publicado la estructura cuaternaria de este heterómero, un heterotetrámero formado por dos receptores de A_{2A}R y dos receptores de CB₁R capaces de señalizar tanto a través de una G_s como de una G_i (268). Además, se ha demostrado que el heterotetrámero A_{2A}R-A_{2A}R-CB₁R-CB₁R se encuentra a nivel presináptico en los terminales nerviosos del estriado (262).

Finalmente, hay que mencionar que este heterómero también muestra un rol importante en procesos de adicción. Así, se ha descrito que el pretratamiento con el antagonista del A_{2A}R ZM241385 mejora los efectos sinápticos y motores inducidos por el consumo de cocaína a través de la interacción con CB₁R (269).



1.6. El proceso de adicción

El proceso de adicción implica una serie de etapas a través de las cuales un acto esporádico se convierte en una necesidad incontrolable (270–272). Este proceso empieza con una primera experiencia agradable que nos hace sentir placer y euforia. En esta primera fase, el individuo se cree capaz de controlar el consumo, además de tener una alta motivación y un fuerte refuerzo positivo por tomar una determinada sustancia (273). Nuestro cerebro aprende rápidamente que esta acción es gratificante, reforzando esta conducta para querer repetirla. Al cabo de un tiempo, el individuo deja de tener el control de la situación y no puede parar de consumir la sustancia de abuso, llegando al punto que dicho consumo pasa a ser una necesidad, convirtiéndose, finalmente, en una adicción (273,274).

El consumo de sustancias de abuso genera una sensación de placer mayor que el que se obtiene mediante recompensas naturales (como comer o beber), por lo que nuestro cerebro tiene que producir adaptaciones para contrarrestar estos efectos, como disminuir la actividad de la vía mesocorticolímbica (275). Estos cambios provocan que el adicto necesite tomar cantidades mayores y/o más frecuentes de la sustancia de abuso para lograr la misma sensación de euforia que la que obtuvo por primera vez, es decir, termina desarrollando tolerancia para la sustancia de abuso en cuestión (272,273). Por el otro lado, la retirada de la sustancia de abuso provoca ansiedad, irritabilidad e inquietud en el adicto, lo que se conoce como los síntomas de abstinencia. Llegado a este punto, el adicto consume la sustancia de abuso para aliviar temporalmente estos síntomas negativos, en vez de para obtener la sensación de euforia (274). En esta última etapa, el adicto ha perdido totalmente el control de sus acciones y del consumo, llegando a producir conductas compulsivas para consumir nuevas dosis de la sustancia de abuso. Llegado a esta fase, aunque el adicto deje de consumir la sustancia de abuso, todos los cambios cerebrales que se han producido en las fases anteriores serán muy difíciles de revertir, provocando que el individuo sea mucho más susceptible para volver a recaer en su adicción (272).

De esta manera, la adicción a las sustancias de abuso se define como una enfermedad crónica que provoca cambios en determinadas vías de nuestro cerebro, como las que regulan la recompensa, el estrés, el autocontrol, la motivación y la memoria, y está caracterizada por la necesidad de tomar una o más sustancias de abuso y la incapacidad para controlar su ingesta aun conociendo los aspectos negativos que este acto conlleva (117,272,276). La *American Psychiatry Association* ha publicado en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los trastornos mentales los criterios/síntomas que hay que tener en cuenta para poder diagnosticar esta enfermedad en humanos (DMS-5 2013). Los criterios más importantes que allí se describen son la toma y la búsqueda compulsiva de aquello que nos genera la adicción a pesar de conocer las consecuencias negativas de esta acción y el ansia que aparece cuando se retira dicha sustancia (277).



1. Introducción

Las adicciones a las sustancias de abuso suponen año tras año un enorme gasto público, no solo para pagar el tratamiento de los enfermos, sino también para pagar campañas de prevención, además de todos los gastos policiales asociados para solventar toda la violencia y la corrupción que se genera en el entorno del mundo de las sustancias de abuso (277,278). De esta manera, la adicción no solo afecta al enfermo que padece esta enfermedad, sino que también afecta a todo su entorno, tanto a familiares como a amigos. Según el reporte mundial sobre drogas del 2020 publicado por la *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, 17,9 millones de adultos entre 15 y 64 años han consumido cocaína a lo largo de su vida, lo que supone el 5,4% de la población mundial, mientras que 12,3 millones (el 3,7% de la población mundial) han tomado anfetaminas. Además, el consumo de estos psicoestimulantes se ha visto incrementado en los últimos años, llegando a máximos históricos de incautaciones de ambas drogas, lo que pone de manifiesto que la drogadicción es una enfermedad que supone un problema creciente a nivel mundial (279). En España, el tráfico y consumo de sustancias estimulantes del SNC es ilegal, salvo que se disponga de prescripción médica. Sin embargo, según el informe realizado en el 2020 por el Ministerio de Sanidad sobre alcohol, tabaco y drogas ilegales en España, alrededor del 3% de la población española ha consumido cocaína y el 1% anfetaminas en el año 2019 (278). Uno de los principales problemas del consumo de estas sustancias de abuso son las muertes por sobredosis y la elevada prevalencia de enfermedades como la hepatitis C o el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) entre consumidores de sustancias de abuso por vía parental, lo que ha provocado una tasa de mortalidad en España de 16 muertes por cada millón de habitantes en 2018 (278,280). Finalmente, aunque el consumo y la adicción a las sustancias de abuso afecta a personas de todas las edades, lo hacen especialmente sobre los adolescentes, dado que su cerebro, en especial el córtex prefrontal, no está completamente desarrollado, por lo que puede provocar cambios cerebrales duraderos y aumentar el riesgo de dependencia (281). De esta manera, investigar en este campo es fundamental para poder reducir los costes tanto económicos como sociales provocados por la adicción a las sustancias de abuso.

A parte de la adicción a sustancias de abuso, existen muchos otros tipos de adicciones a otras sustancias (282), siendo las más destacadas la adicción a la cafeína (283), a la nicotina (284) o a la comida (285). Además, también existen adicciones a comportamientos que son cada vez más habituales en nuestra sociedad moderna, siendo la adicción al juego (286), a la tecnología e internet (287), al trabajo (288) o al sexo (289) las más habituales.

1.6.1. Los psicoestimulantes

Según la Organización mundial de la salud (OMS), una sustancia de abuso o sustancia psicoactiva es cualquier compuesto, natural o sintético, que introducido en el organismo por cualquier vía de administración altera el correcto funcionamiento del SNC del individuo (290). Cada sustancia de abuso tiene efectos característicos, siendo los más comunes los efectos depresores,



perturbadores y estimulantes del SNC (291). Los compuestos depresores son moléculas que deprimen o reducen el funcionamiento del SNC. El alcohol y los opiáceos como la heroína son ejemplos de este grupo, además de medicamentos como las benzodiazepinas, que se usan actualmente para tratar la ansiedad (292). Las sustancias perturbadoras son capaces de modificar en diferentes grados las percepciones y las sensaciones de los diversos estímulos. Así, por ejemplo, uno de los efectos del consumo de cannabis es una distorsión leve de la realidad, como tener la sensación de que el tiempo se alarga. Por el otro lado, el consumo de dietilamida de ácido lisérgico (LSD) o la mescalina producen auténticas alucinaciones en el consumidor (291,292). Finalmente, los psicoestimulantes o estimulantes del SNC son un grupo de sustancias que incrementan el funcionamiento SNC, provocando cambios temporales en el consumidor como una sensación de euforia, un aumento en la actividad física, en el estado de alerta y en la atención, así como una reducción de la fatiga y de la sensación del apetito del consumidor. Un consumo crónico también puede provocar cambios en el humor, volviendo al consumidor más hostil y agresivo. Dentro de este grupo hay sustancias como las xantinas (cafeína, teofilina y teobromina) y la nicotina, que estimulan ligeramente el SNC, o la cocaína y las anfetaminas que son estimuladores mucho más potentes (293,294).

1.6.1.1. La cocaína

Durante miles de años la población de América del Sud ha masticado las hojas de la planta de la coca (*Erythroxylum coca*) con fines culturales o medicinales debido a sus propiedades estimulantes, euforizantes y de disminución del apetito, de la sed, del dolor o del cansancio (295) (**Figura 28**). Actualmente, en culturas andinas aún es común masticar estas hojas, aprovechando sus múltiples efectos para sobrevivir durante las largas travesías que realizan (295). En 1860, Albert Neimann aisló la molécula de la cocaína de la planta *Erythroxylum coca*. A partir de ese momento, su utilización se extendió rápidamente por todo el mundo, siendo el principal ingrediente de muchos elixires creados para tratar una gran variedad de enfermedades. También se utilizó para paliar el dolor de las cirugías antes del desarrollo de los anestésicos locales (296), además de ser uno de los ingredientes de las primeras fórmulas de la famosa bebida refrescante Coca-Cola. Unos años más tardes, se demostró que el consumo de cocaína provocaba graves consecuencias negativas, como una fuerte adicción, y, en consecuencia se dejó de usar esa sustancia con fines terapéuticos (295).

Actualmente, en España es ilegal el cultivo, la posesión y la distribución de cocaína, excepto bajo preinscripción médica, aunque es poco habitual. Los primeros efectos inducidos por el consumo de la cocaína aparecen prácticamente justo después de la toma de la primera dosis y desaparecen entre pocos minutos y una hora después, según su ruta de administración, ya que nuestro cuerpo es capaz de metabolizar la cocaína rápidamente. Ingerir pocas cantidades de esta sustancia de abuso nos hace sentir eufóricos, enérgicos, en estado de alerta y con hipersensibilidad sensorial, además de

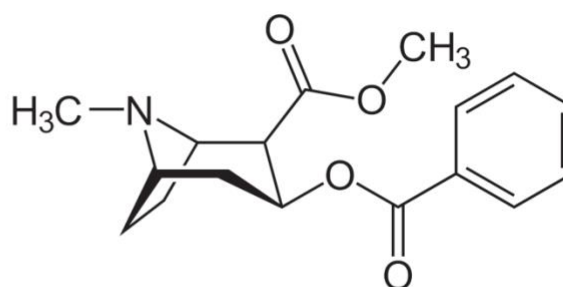


1. Introducción

disminuir temporalmente la sensación del apetito y del sueño (297). Concentraciones más altas de cocaína pueden inducir comportamientos violentos, pánico, ansiedad y paranoia (295), además de poder provocar convulsiones y ataques al corazón que podrían terminar con la muerte del consumidor (298). Un consumo crónico provoca una fuerte adicción, tolerancia, bronquitis crónica si se fuma, malnutrición y pérdida de peso, desorientación, confusión, cansancio crónico a causa de la falta de sueño y psicosis paranoica (299).



Erythroxylum coca



Cocaína

Figura 28 Hojas de la planta de la coca (*Erythroxylum coca*) (izquierda) y estructura química de la cocaína (derecha).

1.6.1.2. La anfetamina y la metanfetamina

Las anfetaminas están formadas por la anfetamina y derivados sintéticos en base a la estructura de esta molécula como son la metanfetamina y el éxtasis (**Figura 29**) (299). La anfetamina es un derivado sintético de la efedrina, un componente natural de la planta *Ephedra sínica*, que se utilizaba en la medicina china para el tratamiento del asma y de las infecciones respiratorias (300). La anfetamina está formada por una mezcla de dos esteroisómeros; dextro y levo anfetamina, teniendo la dextroanfetamina efectos psicoactivos más potentes que la levoanfetamina. La anfetamina fue sintetizada por primera vez en 1887 por el químico rumano Lazăr Edeleanu, aunque no fue hasta 1930 que se descubrieron sus propiedades psicoestimulantes y se empezó a prescribir como inhalador para la congestión nasal (Bencedrina©), para tratar el déficit de atención con hiperactividad (TDAH) (Adderall®) y a recomendar su uso en narcolepsia, depresión, obesidad, hiperactividad infantil y como antiemético durante el embarazo. Su uso se extendió rápidamente por todo el mundo debido a su económico precio, a la sencillez de su síntesis y a la variedad de precursores y métodos que se pueden usar para su manufacturación, llegando en la década de los setenta a su mayor consumo (301).

Seis años después de la síntesis de la anfetamina, el químico japonés Nagai Nagayoshi sintetizó un derivado de esta molécula, la metanfetamina. Al igual que la anfetamina, la



metanfetamina se usó inicialmente como descongestionante nasal y como inhalador bronquial. Actualmente, la metanfetamina es una de las sustancias de abuso más consumida mundialmente, en parte, debido a que tiene un poder de adicción mayor que la anfetamina (302). El uso y comercio de esta sustancia de abuso es ilegal en prácticamente todo el mundo, pero su consumo a dosis bajas puede ser indicado para el TDAH (Desoxyn®) y a corto plazo como un componente del tratamiento para la pérdida de peso, aunque es raramente prescrito (303,304).

Tanto la anfetamina como la metanfetamina son moléculas con un peso molecular pequeño, lo que les permite travesar la barrera hematoencefálica y llegar al SNC con relativa facilidad. Por este motivo, ambas empiezan a producir sus efectos muy rápidamente, entre 2 y 5 minutos si se inhalan y entre 15 y 20 minutos si se toman de forma oral (305). Aunque ambas moléculas presentan propiedades farmacológicas parecidas, para una misma dosis, la metanfetamina es mucho más adictiva a causa de su mayor capacidad para llegar al cerebro y sus efectos más duraderos. Estas diferencias son debidas en parte porque su metabolismo es diferente: la degradación de la metanfetamina es mucho más lenta que la de la anfetamina o la cocaína, eliminándose el 50% de la metanfetamina a las 12 horas de su consumo (306).

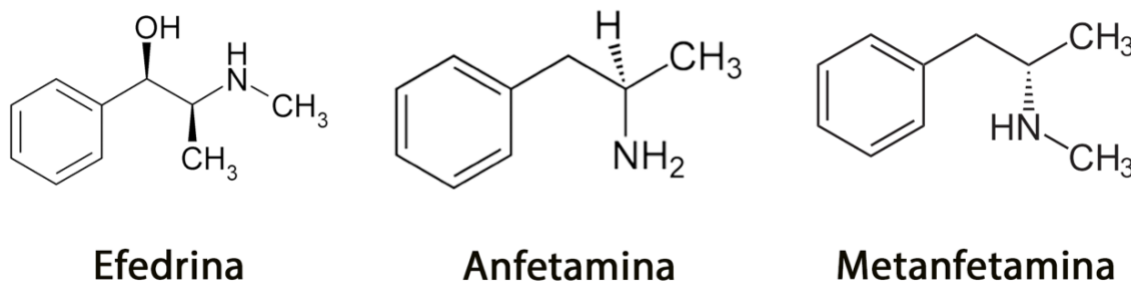


Figura 29 Estructura química de la efedrina, anfetamina y metanfetamina.

Los efectos observados a corto plazo y a dosis bajas del consumo de anfetaminas inducen un aumento del estado de alerta y vigilia, de la concentración y de la sensación de euforia. A dosis más elevadas, se pueden provocar alteraciones cardiovasculares, un aumento de la frecuencia respiratoria, hipertermia (elevación de la temperatura corporal), alteraciones de las funciones cognitivas, episodios psicóticos, disminución del apetito e insomnio (301,307). Por otro lado, a largo plazo, su consumo puede generar paranoia, alteraciones del estado de ánimo, malnutrición, pérdida de peso, agitación, psicosis, deterioro cognitivo, un comportamiento agresivo, problemas dentales, pérdida de peso y convulsiones que pueden llegar a provocar la muerte del consumidor (308,309). En último lugar, la retirada de este tipo de sustancias de abuso puede inducir depresión, ansiedad, fatiga y ansia por seguir tomando esta sustancia (310), efectos que pueden durar meses e incluso años y que pueden empeorar por un proceso de estrés (308).



1.6.2. Mecanismo de acción de la cocaína y las anfetaminas

El consumo de sustancias de abuso afecta, principalmente, al circuito de recompensa a nivel del SNC, aunque a largo plazo, también puede producir cambios en otras vías, afectando las funciones de aprendizaje, toma de decisiones, estrés, memoria y comportamiento (273). Una consecuencia común del consumo de las sustancias de abuso, independientemente del mecanismo de acción específico, es la sobre-activación de la vía de recompensa, lo que genera un aumento de los niveles extracelulares de dopamina en el estriado (277). Las sensaciones gratificantes obtenidas al consumir una determinada sustancia de abuso provocan que el organismo quiera seguir tomando dicha sustancia, de manera que el patrón es reforzado de la misma manera que un comportamiento es aprendido, convirtiéndose en un hábito para el consumidor (271,273). Esta es la causa del elevado potencial adictivo de las sustancias de abuso, donde el sujeto después del consumo de estas sustancias quiere repetir esta conducta para volver a alcanzar la misma sensación de placer (117). Además, los cambios en los circuitos neuronales producidos a causa de un consumo crónico de una determinada sustancia de abuso provocan que la vía de la recompensa sea menos sensible a las recompensas naturales (311), más susceptible a situaciones de estrés y se acabe desarrollando tolerancia (277,311). De esta manera, el individuo se encuentra en un estado de discordia que solo puede ser interrumpido por potentes activadores del sistema de recompensa, como el uso continuo de las sustancias de abuso (271,272,312).

Las diferentes sustancias de abuso tienen distintos mecanismos moleculares para producir un aumento en la concentración de dopamina en la sinapsis (**Figura 30**). La cocaína, por ejemplo, provoca este efecto debido a la unión y al bloqueo del transportador DAT, impidiendo que este pueda ejercer su función correctamente (313). De esta manera, la dopamina no es recaptada del espacio sináptico, produciendo una sensación de euforia sostenida. Por su parte, las anfetaminas son capaces de aumentar los niveles de dopamina a través de varios mecanismos, provocando un aumento de los niveles extracelulares de dopamina más duradero que el que se obtiene con el consumo de la cocaína (303). A dosis bajas, las anfetaminas, al igual que la cocaína, son capaces de bloquear DAT, mientras que, a dosis más altas, provocan la liberación de dopamina de las vesículas de la neurona presináptica y promueven el transporte reverso de dopamina a través de DAT hacia la sinapsis (272,314).

Por otro lado, varios grupos de investigación han demostrado que las sustancias de abuso producen efectos en modelos no neuronales (48,49). De esta manera, debe existir al menos otro mecanismo alternativo que no dependa de DAT ni de la formación de la sinapsis mediante el cual las sustancias de abuso afecten los circuitos neuronales que forman la vía de recompensa. Actualmente, se conoce que muchas sustancias de abuso, como es el caso de la cocaína y la metanfetamina, son capaces de interactuar con los receptores sigma a concentraciones fisiológicas (141,315), que, a su vez, también son capaces de interactuar con el sistema dopaminérgico (75,316,317).

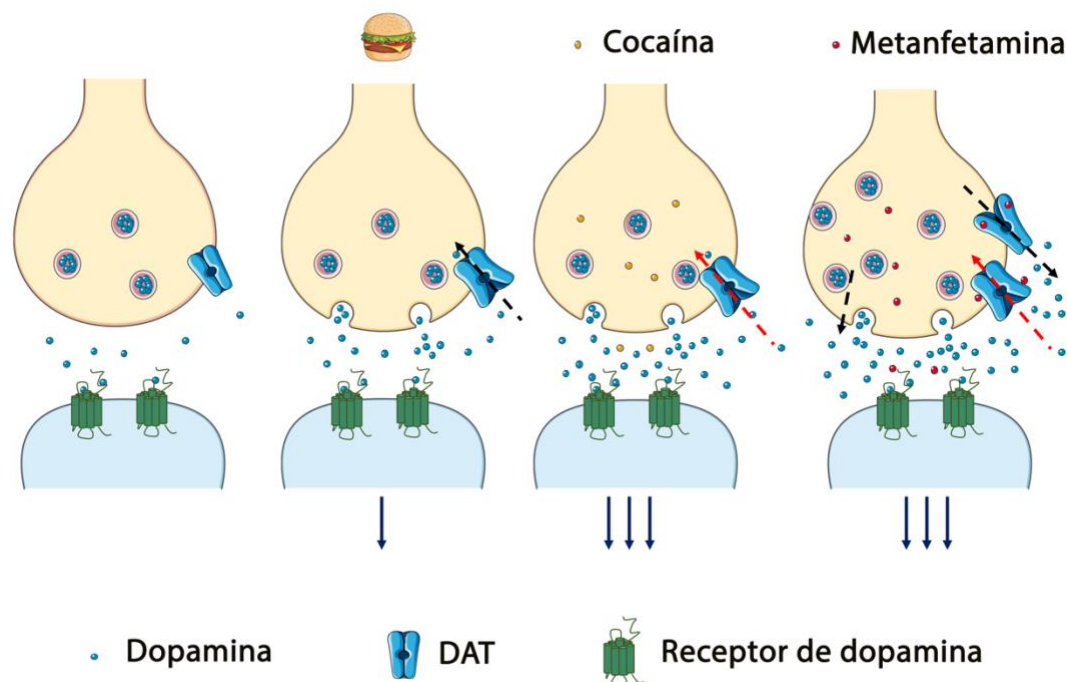


Figura 30 Representación esquemática de las distintas respuestas de la vía de recompensa que tienen la cocaína y la metanfetamina. La línea roja indica inhibición. Para la creación de esta figura se han usado elementos de Servier Medical Art, con licencia CC BY 3.0.

1.6.3. Receptores sigma

En 1976, estudios farmacológicos de los compuestos opioides permitieron diferenciar tres tipos de receptores opioides: mu (μ), kappa (κ) y sigma (σ) (318). Sin embargo, experimentos de unión de radioligando posteriores demostraron que los receptores sigma tenían un perfil de unión a ligando diferente a los otros dos tipos de receptores opioides, de manera que se les propuso como un nuevo tipo de receptores (319). A principios de la década de los 90 se distinguieron dos tipos de receptores sigma con propiedades farmacológicas distintas que se nombraron sigma 1 (σ_1R) y sigma 2 (σ_2R) (Figura 31) (320). Actualmente no se conoce ningún ligando endógeno para ninguno de los receptores sigma (321), aunque existe algunas moléculas, con estructuras muy diversas, que son capaces de unirse a estos receptores con una alta afinidad (322). Así, por ejemplo, en un primer momento se propuso la progesterona como ligando del receptor sigma 1, ya que este receptor presentaba una buena afinidad para este esteroide. Sin embargo, la concentración fisiológica de la progesterona es mucho menor que la K_d que tiene por σ_1R , de manera que no es probable que la progesterona sea su ligando endógeno (323). También se ha propuesto el alucinógeno N,N-dimetiltriptamina (DMT) (324), pero este compuesto presenta una afinidad de 14,75 μM por sigma 1, cuando sus concentraciones en plasma no son superiores a 500 nM en condiciones fisiológicas, lo que también lo descarta como su ligando endógeno (325). Finalmente, Brailoiu y colaboradores en 2019 propusieron la colina como ligando endógeno para sigma 1 ya que su tratamiento activaba estos



1. Introducción

receptores y potenciaba la señal de calcio intracelular, aunque aun no ha sido aceptado oficialmente (326).

Históricamente ha sido complicado determinar si un ligando de los receptores sigma actúa como un agonista o como un antagonista. Esto es debido en gran parte a que esta clasificación se basa en modelos de GPCR, y que los receptores sigma ni son GPCR ni pueden señalizar por si solos (322). Aun así, como regla general, se ha aceptado que los ligandos que son capaces de imitar el fenotipo que presentan modelos KO por σ_1R son considerados antagonistas, mientras que los ligandos que ejercen algún efecto dependiente de σ_1R se consideran agonistas (327). El compuesto sintético PRE-084 está considerado como un agonista selectivo de σ_1R por su capacidad para disociar de manera dosis-dependiente el receptor sigma-1 de la *binding immunoglobulin protein/78 kDa glucose-regulated protein* (BiP/GPR-78) (328–330), mientras que el ligando PD 144418 ha sido clasificado como antagonista de los receptores sigma, teniendo una afinidad 17,000 veces mayor para sigma 1 que para sigma 2 (331,332).

El σ_1R , clonado en el 1996, es una proteína formada por un único dominio transmembrana con 223 aa y 25 KDa, que no presenta homología con ninguna proteína humana conocida hasta el momento (333). Hace cinco años se resolvió su estructura cristalina, donde se demostró que este receptor forma complejos homotrimericos (322,334) (**Figura 31**). El σ_1R se expresa abundantemente en el cerebro, sobretodo en áreas implicadas en la memoria, las emociones y la función motora y sensorial, además de en otros tejidos periféricos como el hígado, los pulmones, el corazón y las gónadas (335). En el cerebro, este receptor se encuentra en el hipocampo (especialmente en el giro dentado), el hipotálamo, el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, el septum, el locus *coeruleus*, el rafe dorsal, la SNc y el núcleo rojo (336).

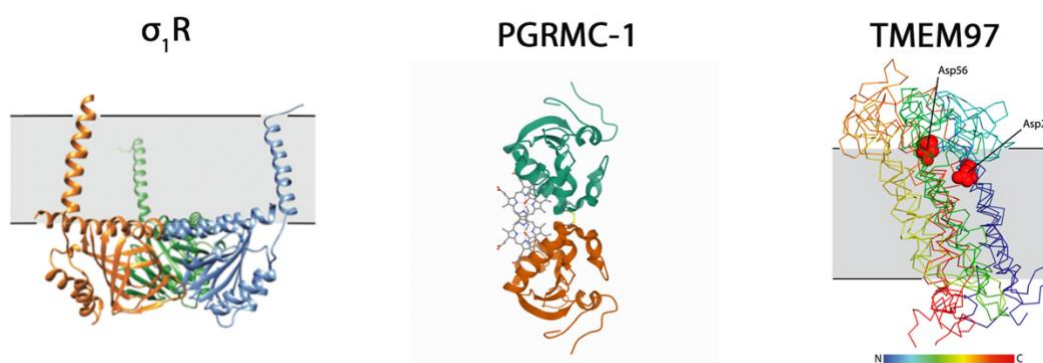


Figura 31 Estructura cristalina del receptor sigma 1, del receptor PGRMC-1 y modelo molecular del receptor TMEM97. Estos dos últimos receptores se han propuesto como candidatos a ser el receptor sigma 2. Modificado de (334,341) y Protein Data Bank.

Aunque hace más de 40 años que se está estudiando a σ_1R , todavía queda mucho por aprender sobre su función biológica. Un modelo ampliamente aceptado expone su capacidad para modular distintas vías de señalización, actuando como una chaperona situada principalmente en las



membranas asociadas a las mitocondrias (MAM) en el retículo endoplásmico (321,328). En el MAM, σ_1R forma complejos con la chaperona BiP, que tiene un papel muy importante en el plegamiento y en el control de calidad de las proteínas (337). La activación de σ_1R provoca su separación de la proteína BiP y su translocación desde el retículo endoplásmico hacia otras partes de la célula, incluyendo la membrana plasmática (338), donde es capaz de regular e interactuar con otras proteínas como proteínas transportadoras (314), canales iónicos (339) y GPCR (141,316,317). Además, también es capaz de estabilizar a los receptores IP_3 , promoviendo la entrada de cationes calcio en las mitocondrias (314) (**Figura 32**). De esta manera, sigma 1 es capaz de modular varias actividades celulares incluyendo la plasticidad sináptica, la modulación de canales iónicos y la activación de la microglía (340).

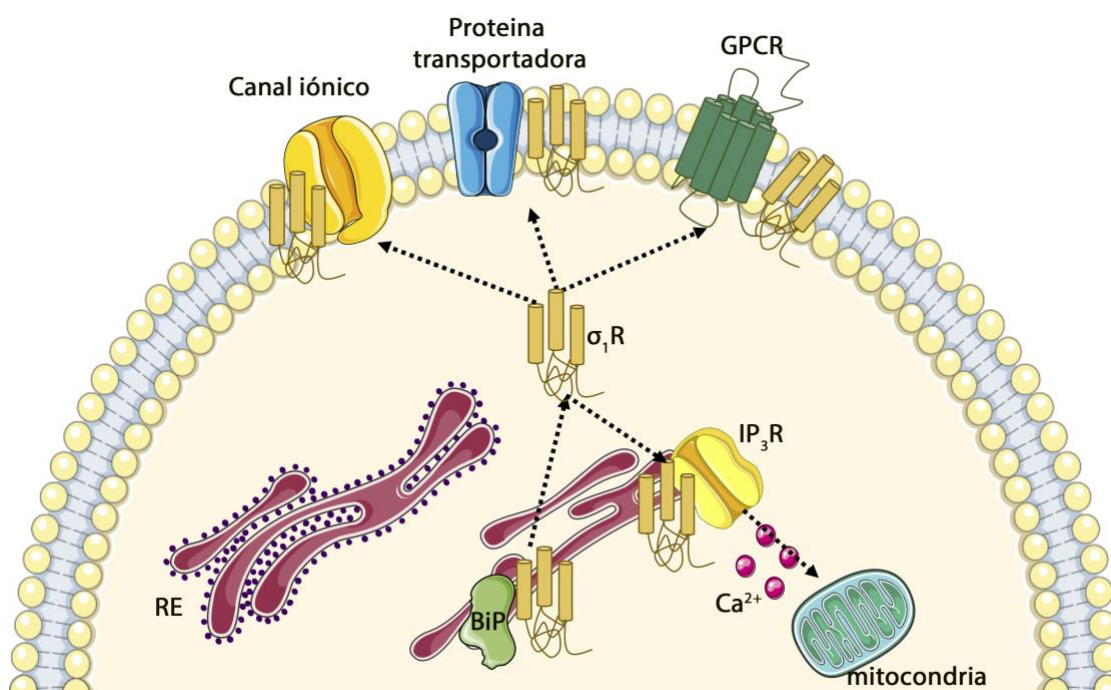


Figura 32 Representación esquemática de la actividad celular del receptor sigma 1. IP_3R : Receptor de inositol trifosfato, RE: Retículo endoplásmico. Para la creación de esta figura se han usado elementos de Servier Medical Art, con licencia CC BY 3.0.

Por el otro lado, hay mucha menos información sobre σ_2R . Experimentos farmacológicos han demostrado que σ_2R es un receptor con un peso molecular de entre 18 y 22 kDa (321,342). Aun no se conoce el gen que codifica para este receptor (343), pero se sabe que es un gen distinto al que codifica para σ_1R (321). Este hecho, ha sido el mayor impedimento para estudiar con profundidad la función biológica de sigma 2. En un primer lugar, se propuso que sigma 2 era el receptor PGRMC-1 (*progesterone receptor membrane component-1*) (344), pero actualmente se ha demostrado que σ_2R y PGRMC-1 son receptores distintos (345,346). En 2017, Alon y colaboradores propusieron que el receptor sigma 2 es la proteína transmembrana 97 (TMEM97) (341) (**Figura 31**). Este



1. Introducción

descubrimiento se determinó usando una cromatografía de alta afinidad en la que se fijó el ligando específico de sigma 2 JVW-1625, lo que permitió aislar posibles proteínas candidatas a ser el receptor sigma 2 en una muestra de hígado de ternera (341). De todas las proteínas que se obtuvieron se seleccionaron por SDS/PAGE y espectrometría de masas aquellas que tenían un peso molecular dentro del rango esperado (18-22 KDa). Posteriormente, se analizó el perfil farmacológico de estas proteínas candidatas, y se demostró que únicamente la proteína TMEM97 tenía un perfil parecido al que se conocía ya para σ_2R , llegando a la conclusión de que estos dos receptores eran el mismo (341). El receptor σ_2 se expresa en hígado, pulmones y cerebro, y a nivel subcelular se ha detectado su expresión en mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico y membrana plasmática (347).

Actualmente, se conoce que σ_1R está implicado en varias enfermedades neurológicas como el cáncer (348), la apoplejía (349), el dolor neuropático (350), la epilepsia (351), la depresión (352) y enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis amiotrófica lateral juvenil (353), la enfermedad de Alzheimer (129), la enfermedad de Párkinson (354) y la enfermedad de Huntington (355). Por el otro lado, existen numerosas evidencias *in vitro* que σ_2R es un biomarcador muy importante de la proliferación de células cancerosas (356). De esta manera, se han propuesto agonistas de σ_2R como posible tratamiento para combatir el cáncer, como por ejemplo, el agonista PB221 para el tratamiento de tumores cerebrales (357). También se ha demostrado la implicación de σ_2R en la proliferación/muerte celular (94), en la enfermedad de Alzheimer (343) y en esquizofrenia (358). Finalmente, tanto σ_1R (359,360) como σ_2R (75,361,362) han sido relacionados con procesos de adicción a sustancias de abuso, siendo la unión de la cocaína a σ_1R la más estudiada hasta el momento. Se ha descrito que el silenciamiento de σ_1R disminuye las acciones convulsivas y locomotoras de la cocaína (363), a la vez que el antagonista sintético YZ-069 disminuye las acciones de la cocaína, así como sus efectos letales en diferentes modelos animales, mientras que agonistas de σ_1R potencian las acciones tóxicas de la cocaína (364). También se ha demostrado que la cocaína produce parte de sus efectos a través de su unión con σ_2R (365,366). Por ejemplo, el tratamiento con el agonista de σ_2R Siramesine disminuye los efectos locomotores producidos por un consumo agudo de cocaína, disminuyendo la liberación de dopamina en el estriado de ratones (361). En la misma línea de investigación, Lever y colaboradores han publicado que el tratamiento con tetrahydroisoquinolinil benzamidas, agonistas selectivos de σ_2R , disminuyen la hiperlocomoción provocada por el consumo de cocaína en ratones (367). A parte de la cocaína, también se ha descrito que los receptores sigma pueden unir otras sustancias de abuso como la metanfetamina, siendo mucho más afina para σ_1R que σ_2R (315). De hecho, σ_1R une metanfetamina a concentraciones fisiológicamente relevantes (368) y el bloqueo de σ_1R disminuye los efectos neurotóxicos del consumo de metanfetamina en ratones (369). Puntualizar que el tratamiento crónico con metanfetamina regula positivamente la expresión del mRNA para σ_1R en diversas regiones cerebrales, entre ellas la SN, el cerebelo, el hipocampo y la corteza frontal (369). Además, se han



reportado evidencias que la activación de la microglía inducida por el tratamiento con metanfetamina es debido a su interacción con σ_1 R (370).

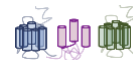
Aunque aun queda mucho por investigar, toda esta información sugiere a los receptores sigma, especialmente σ_1 R, como nuevas dianas terapéutica para tratar la adicción a sustancias de abuso, ofreciendo la posibilidad de establecer nuevas e innovadoras aproximaciones para combatir los efectos de varias sustancias de abuso. Además, actuar sobre los receptores sigma presenta ventajas respecto otras dianas terapéuticas, ya que estos receptores son importantes principalmente en situaciones patológicas y no presentan activación basal, lo que disminuye muchos la aparición de efectos secundarios (314,327,360,371,372).

1.6.4. Tratamientos para la adicción a psicoestimulantes

Aunque se han realizado muchos esfuerzos, actualmente no existe ninguna cura para la adicción a ningún psicoestimulante, siendo la recaída un desafío clínico especialmente importante (373). La complejidad de la neurobiología de la adicción, sumado a que cada sustancia de abuso tiene su mecanismo de acción particular, podría explicar el porqué aun no hay un medicamento eficaz para tratar esta enfermedad (374). Por este motivo, se deberían buscar estrategias farmacológicas distintas para combatir cada tipo de adicción individualmente (314). Además, aunque las intervenciones farmacológicas son las principales terapias usadas parar tratar enfermedades en humanos, dado que la adicción es una enfermedad mental donde están afectados procesos emocionales y cognitivos, las intervenciones conductuales y el apoyo psicológico profesional también se deberían tener en cuenta para encontrar una cura (373,375).

1.6.4.1. Tratamientos para la adicción a la cocaína

El principal tratamiento para la adicción a cocaína que se emplea actualmente se basa en intervenciones conductuales y psicológicas (270), ya que ningún fármaco probado hasta la fecha para curar esta enfermedad ha demostrado tener una eficacia terapéutica suficiente (376,377). Entre este tipo de estrategias, las más prometedoras han sido el tratamiento de manejo de contingencias (MC), especialmente eficaz en las primeras etapas del a adicción (378,379), y la terapia cognitivo-conductual (TCC), usada principalmente para evitar la recaída (270). La base del tratamiento por MC es la de premiar, y por lo tanto reforzar positivamente, la abstinencia al consumo de cocaína. De esta manera, los pacientes reciben incentivos, como pueden ser vales para comida o entradas para el teatro, a cambio de que presenten una prueba de orina negativa en cocaína. En un ensayo clínico realizado con 515 enfermos adictos a cocaína, aquellos que eran tratados con recompensas con mayor valor presentaban períodos de abstinencia más prolongados que los pacientes que eran tratados con una recompensa de menor valor o los que no recibían ningún tipo de incentivo, demostrando que la MC puede ser un buen tratamiento para la adicción a cocaína (380). Sin embargo, para que esta terapia sea eficaz se requiere de un elevado coste económico, lo que supone una gran desventaja.



1. Introducción

Otro inconveniente, es que los efectos beneficiosos del tratamiento con MC se pierden al poco tiempo de dejar la terapia, además de una elevada tasa de abandono durante tratamiento (381,382). Por el otro lado, el principio básico de la terapia por TCC es enseñar al paciente a evitar las situaciones que han asociado al consumo de cocaína. Además, también se les enseña una variedad de recursos a los que pueden recurrir cuando tengan ansias de consumir cocaína, como el recuerdo de las consecuencias negativas y la sustitución de las ansias por consumir por otros pensamientos positivos (383). Se han realizado algunos ensayos clínicos demostrando que la TCC disminuye el consumo de cocaína y prolonga el período de abstinencia (270,384). Además, a diferencia del MC, estudios de seguimiento de estos ensayos clínicos han demostrado que los pacientes siguen mejorando después de dejar el tratamiento (382,385).

Los tratamientos conductuales para tratar la adicción a cocaína presentan varios inconvenientes como son una baja eficiencia, una alta tasa de abandono del tratamiento por parte de los enfermos y el requerimiento de grandes infraestructuras que obliga a los pacientes a desplazarse (270). Estas limitaciones han estimulado la búsqueda de estrategias farmacológicas para encontrar una cura para esta enfermedad. Estos tratamientos farmacológicos se pueden agrupar en cuatro categorías: agonistas, antagonistas o bloqueadores, mecanismos novedosos y farmacoterapias combinadas (377).

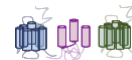
El grupo de fármacos que se consideran agonistas está formado por compuestos que tienen un mecanismo de acción similar a la cocaína, pero con propiedades farmacológicas totalmente distintas, de manera que no se produzcan los efectos reforzantes ni psicotrópicos que sí se producen con el consumo de cocaína (386–388). Así, se busca sustituir una sustancia con un alto poder adictivo, como es la cocaína, por otras que sean menos adictivas y más seguras, con el objetivo final de atenuar los síntomas de abstinencia y reducir la probabilidad de recaída (389,390). Este tipo de tratamiento ha resultado exitoso para tratar la dependencia a los opiáceos (metadona) y para dejar de fumar (parches de nicotina), aunque aún no se ha podido demostrar que sean eficaces para tratar la adicción a cocaína (376). Este grupo de medicamentos incluye estimuladores de la liberación de dopamina como la dextroanfetamina y bloqueadores de DAT como el modafinil (391). Grabowski y colaboradores realizaron un ensayo clínico en el que el tratamiento con 60 mg/día de dextroanfetamina durante 14 semanas disminuía el consumo de cocaína en pacientes adictos a cocaína (392,393). Sin embargo, no se han realizado ensayos longitudinales adecuados para evaluar las limitaciones de este tratamiento (377), que sumado a que la anfetamina también es un potente psicoestimulante, es difícil pensar que se pueda llegar a aprobar este medicamento con este fin (376). Por el otro lado, se han propuesto varios inhibidores del transportador de dopamina DAT, como el modafinil, para el tratamiento a la adicción a cocaína. El modafinil es un fármaco aprobado para tratar varios trastornos del sueño, como la narcolepsia, y actúa como inhibidor parcial de los transportadores de dopamina y de norepinefrina (390). Los ensayos clínicos realizados con modafinil



solo han podido demostrar su eficacia en pacientes que no habían padecido adicción al alcohol previamente (394–396). Zhan y colaboradores observaron que el tratamiento con JJC8-016, un análogo sintético del modanifil, inhibía de manera dosis dependiente los efectos locomotores del consumo de cocaína en ratas, por lo que propusieron a este nuevo compuesto como medicamento para tratar la adicción a cocaína, aunque aun no se ha realizado ningún ensayo clínico en humanos con este compuesto (397,398).

Otra estrategia es la de buscar fármacos que bloqueen la sensación de euforia que provoca el consumo de cocaína (377). Dentro de este grupo, la utilización de una vacuna que provoque la creación de anticuerpos contra la molécula de la cocaína es la que ha obtenido resultados más prometedores. Una vez se han generado los anticuerpos, estos se podrán unir a las moléculas de cocaína presentes en la sangre, formándose un complejo anticuerpo-cocaína que resultará demasiado grande como para travesar la barrera hematoencefálica, además de promover la degradación de la sustancia de abuso. Todo esto, impedirá que la cocaína ejerza sus efectos en el SNC (399). En 2013, Kosten y Domingo diseñaron una vacuna segura contra la cocaína, aunque los resultados obtenidos eran muy mejorables, ya que solo el 38% de los pacientes presentaban anticuerpos, y solo durante aproximadamente dos meses (400). Mucho queda por hacer en esta estrategia, pero se está investigando en este campo para mejorar el sistema de vacunas, mejorando la fuerza de unión a cocaína y su capacidad para generar anticuerpos (401).

El consumo de cocaína, también provoca cambios en los niveles de otros neurotransmisores como el GABA y el glutamato (402,403). Por este motivo, se propuso a la N-acetilcisteína, un compuesto que permite restaurar los niveles extrasinápticos de glutamato, como posible tratamiento a la adicción a cocaína (272). En una revisión reciente sobre la eficacia del tratamiento con N-acetilcisteína en la adicción a cocaína, Echevarria y colaboradores llegaron a la conclusión que este compuesto tiene potencial para prevenir una recaída, aunque se requieren de más ensayos clínicos para evaluar su eficacia terapéutica (398). Por el otro lado, se ha reportado que la activación de las neuronas GABAérgicas en el SNC disminuye la actividad del sistema mesocorticolímbico, (270,377) y que la transmisión glutamatérgica en el NAc es muy importante en las adaptaciones que se producen en el cerebro a causa de la adicción a cocaína (404,405). En base a estos precedentes, se ha propuesto el medicamento topiramate, que tiene un efecto dual actuando como agonista GABAérgico y como antagonista glutamatérgico, como tratamiento para la recaída en la adicción a cocaína. Kampan y colaboradores han realizado tres ensayos clínicos para evaluar el potencial terapéutico del topiramate en humanos, en los que se observaron periodos de abstinencia más largos en pacientes tratados con el medicamento respecto a los controles (406–408). Sin embargo, se han publicado otros tres ensayos clínicos demostrando la falta de eficacia de este medicamento (409–411), por lo que son necesarios más ensayos clínicos para evaluar las opciones/limitaciones del topiramate. Finalmente, el disulfiram, un medicamento aprobado para tratar la adicción al alcohol,



1. Introducción

también se ha testado para tratar la adicción a la cocaína (401,412). El mecanismo de acción mediante el cual el disulfiram mejora los síntomas de la adicción a cocaína no se conoce con exactitud, lo que sumado a los efectos secundarios que produce como la hepatotoxicidad que se han reportado en algunos casos (413), limitan su uso potencial como cura para la adicción a la cocaína (377).

Dentro del grupo de compuestos con mecanismos novedosos el tratamiento con ketamina, un potente antagonista del receptor de NMDA que ya es efectivo para tratar la depresión (414), es el que ha permitido obtener resultados más prometedores. Dakwar y colaboradores realizaron un ensayo clínico en el que demostraron que una sola dosis de ketamina (0.5 mg/kg) era capaz de aumentar los períodos de abstinencia respecto al grupo control, sugiriendo a este compuesto como un medicamento potencial para el tratamiento a la adicción a cocaína (415). Aun así, se requieren de ensayos longitudinales con una muestra más grande para establecer el real potencial y las limitaciones de este fármaco (377).

Finalmente, la estrategia de usar farmacoterapia combinada permite, por un lado, utilizar dosis más bajas (y por lo tanto disminuir los efectos secundarios) y, por el otro, la posibilidad de obtener efectos sinérgicos que aumenten la eficacia del medicamento (416). Este tipo de estrategia aún está en las fases iniciales de investigación, habiendo muy pocos ensayos clínicos que se hayan realizado hasta la fecha de hoy. La principal limitación que presenta la terapia combinada es que existen muy pocos compuestos que sean beneficiosos para la adicción a la cocaína, y dentro de ellos, en muchos se desconoce exactamente el mecanismo de acción (377). Algunas de las combinaciones más prometedoras que se están probando son metyrapone/oxazepam (417), disulfiram/naltrexona (418) y topiramate/dextroanfetamina (419). A parte de combinar dos medicamentos, otra estrategia con muchas posibilidades es la de combinar fármacos con terapias conductuales (377). Por ejemplo, Kosten y colaboradores demostraron en un ensayo clínico que la combinación de 150 mg/día del medicamento desipramine (un antidepresivo usado para tratar la depresión) combinado con el tratamiento de MC generaba efectos aditivos en el período de abstinencia respecto a los obtenidos en los adictos tratados con solo uno de los tratamientos (420).

La principal limitación de las estrategias farmacológicas para tratar la adicción es la poca cantidad de ensayos clínicos que se han realizado. Además, muchos de los estudios realizados tienen altas tasas de abandono, poco seguimiento del tratamiento por parte de los pacientes y carecen de una cantidad de muestra suficientemente representativa (377,420). Además, las evidencias obtenidas a través de todos los ensayos clínicos realizados para tratar la adicción a cocaína sugieren que la eficacia de un determinado medicamento puede variar dependiendo de muchos factores, como la edad, el sexo o la historia clínica del paciente. De esta manera, las investigaciones futuras deberían tener en cuenta todos estos factores, no solo para optimizar la dosis idónea, sino también para estudiar la tolerabilidad y la correcta frecuencia del uso del medicamento (377).



1.6.4.2. Tratamientos para la adicción a las anfetaminas

De la misma manera que sucede en la adicción a la cocaína, ningún medicamento testado hasta el momento ha demostrado tener una eficacia terapéutica suficiente para disminuir el consumo de las anfetaminas o de reducir la probabilidad de su recaída (374,421). De esta manera, los tratamientos más usados para tratar esta enfermedad son conductuales (374), siendo especialmente eficaz el MC (revisado en (422)). Sin embargo, al igual que en el caso del tratamiento de la adicción a cocaína, los efectos beneficiosos de las estrategias conductuales no se mantienen después de la finalización del tratamiento (374,390,421,423), por lo que también se han buscado estrategias farmacológicas.

A nivel farmacológico las principales estrategias son i) intentar contrarrestar los efectos producidos por un consumo crónico de anfetaminas y ii) testar medicamentos que ya hayan sido aprobados para el tratamiento de otras enfermedades. Entre estos se encuentran agonistas del sistema dopaminérgico (dextroanfetamina, metilfenidato), antipsicóticos (aripripazol), antidepresivos (bupropión, mirtazapine), moduladores de GABA y glutamato (topiramate, N-acetilcisteína) y antagonistas opioides (naltrexona).

Una de las consecuencias del consumo crónico de anfetaminas es una hipofunción en el sistema dopaminérgico, por ese motivo, se han propuesto agonistas dopaminérgicos que contrarresten este efecto, pero sin que produzcan el mismo poder adictivo que tiene el consumo de anfetaminas (390). Ling y colaboradores realizaron un ensayo clínico en el que observaron que un tratamiento de 54 mg de metilfenidato/día durante 10 días, juntamente con tratamientos de TCC, reducían el consumo y el ansia del consumo de metanfetamina, sobretodo en adictos que consumían cantidades más elevadas de esta sustancia de abuso (424). Además, Tiihonen y colaboradores obtuvieron un consumo menor de anfetamina en un ensayo clínico realizado durante 20 semanas en adictos severos a esta sustancia tratados con 54 mg/día de metilfenilato (425). Aunque estos resultados son muy prometedores se deberían realizar más ensayos clínicos con metilfenilato, incrementando la dosis para explorar el potencial terapéutico de este fármaco (421). En otro ensayo clínico usando agonistas dopaminérgicos, Galloway y colaboradores testaron el potencial de la dextroanfetamina, que ejerce efectos beneficiosos en la adicción a otras sustancias de abuso, para tratar la adicción a metanfetamina. Los resultados que obtuvieron en pacientes tratados con 60 mg/día de dextroanfetamina durante 8 semanas demostraron que este compuesto mejoraba los síntomas de abstinencia en estos pacientes, aunque no disminuía el consumo de metanfetamina respecto al grupo placebo (426). Más tarde se propuso la lisdexanfetamina, un medicamento que se usa actualmente para tratar el TDAH. Se trata de una pro-droga, que una vez ingerida es proteolizada por enzimas presentes en las células sanguíneas liberando dextroanfetamina. De esta manera, la lisdexanfetamina es un medicamento mucho más seguro que la dextroanfetamina, con un riesgo de adicción menor y



1. Introducción

un efecto más duradero (390). Actualmente, hay un ensayo clínico en marcha para evaluar la eficacia terapéutica de este compuesto en adicción a metanfetamina (núm NCT2034201).

Otro medicamento que ha resultado beneficioso en las fases iniciales de la adicción a las anfetaminas cuando aun no existe una adicción extrema a estas sustancias de abuso, es el bupropión (421). Este medicamento, un antidepresivo que se usa para tratar la depresión y para ayudar a dejar de fumar, actúa inhibiendo la recaptación de dopamina y de noradrenalina (390). Aunque se han realizado varios estudios clínicos en humanos demostrando la eficacia de este medicamento en el tratamiento para la adicción a las anfetaminas, la mayoría de estos tienen un poder estadístico insuficiente. Además, el tratamiento con bupropión provoca hepatotoxicidad y un abuso de su consumo por parte de los pacientes.

Otra clase de medicamentos para tratar la adicción a anfetaminas es la utilización de compuestos que contrarresten los niveles de los neurotransmisores que se ven alterados con un consumo de estas sustancias de abuso. En base a esta estrategia, la N-acetilcisteína ha sido propuesta para tratar la adicción a las anfetaminas por su capacidad de restaurar los niveles de glutamato en el SNC. En un ensayo clínico realizado por Mousavi y colaboradores se demostró que el tratamiento durante 4 semanas con 1200g/día de N-acetilcisteína disminuía las ansias por consumir metanfetamina en humanos (427). En otro ensayo clínico, se demostró que 200 mg/día del medicamento topiramate reducían la cantidad de metanfetamina consumida, además de disminuir la tasa de recaída, aunque no promovía la abstinencia entre los usuarios de metanfetamina (428). Finalmente, la naltrexona, un antagonista opioide aprobado para tratar la adicción al alcohol y a los opioides, también ha sido propuesto como tratamiento para la adicción a las anfetaminas. Se han realizado varios ensayos clínicos usando distintas dosis de naltrexona que han demostrado una disminución del consumo y del ansia por tomar anfetaminas, además de una mayor adherencia del tratamiento por parte de los pacientes (374,421).

Estrategias más novedosas se basan en mejorar las funciones cognitivas, disminuir la neuroinflamación y el uso de vacunas (390). Es bien conocido que el consumo crónico de anfetaminas disminuye las funciones cognitivas. Por ese motivo, se ha propuesto el medicamento modafinil para tratar esta enfermedad. Sin embargo, los ensayos clínicos realizados con modafinil han reportado resultados contradictorios: algunos no han podido demostrar que sea suficientemente eficaz para el tratamiento a la adicción a las anfetaminas (429,430), mientras que en otros casos sí se ha obtenido una reducción del consumo de estas sustancias de abuso (431). La estrategia de la vacunación también se ha probado para tratar la adicción a la metanfetamina (432). Collins y colaboradores optimizaron una vacuna con una sólida respuesta inmune anti-metanfetamina en ratones que disminuyó la actividad locomotora inducida por esta sustancia de abuso (433). Sin embargo, al igual que en el caso de la adicción a cocaína, aunque se han obtenido resultados parcialmente eficaces en experimentos preclínicos, no se han podido trasladar en ensayos clínicos en



humanos. Una estrategia para aumentar la eficacia de la vacunación, que se ha empezado a implementar recientemente, es la de combinar el antígeno con distintos adyuvantes para potenciar y dirigir la respuesta inmunológica. De esta manera, Arora y colaboradores diseñaron la vacuna TT-SMA, en la que conjugaron el adyuvante E6020 con la succinil-metanfetamina, obteniendo una eficacia de la vacunación mucho mayor que la vacuna sin el adyuvante E6020 (434). Las vacunas contra la metanfetamina están a aun en una etapa preclínica, por lo que es necesario invertir muchos recursos para poder trasladarlas en una fase clínica (432). De hecho, actualmente solo existe un tipo de vacuna que está siendo testada en un ensayo clínico y de la cual aun no se han publicado resultados (NCT01603147).

Cada vez existen más evidencias científicas que el consumo crónico de anfetaminas termina provocando neuroinflamación, por lo que en los últimos años se ha propuesto como estrategia farmacológica contrarrestar este efecto (revisado en (435)). En un estudio preclínico realizado por Thomas y colaboradores se demostró que el tratamiento con metanfetamina en el estriado de ratones activaba la microglía, sugiriendo que esta activación podría explicar parte de los efectos tóxicos del consumo de esta sustancia de abuso (436). Sin embargo, existe mucha controversia sobre el potencial terapéutico de suprimir la activación de la microglía para tratar la adicción a la metanfetamina, principalmente por tres motivos i) la mayoría de artículos publicados demuestran que el tratamiento con metanfetamina solo provoca una activación moderada de la microglía, ii) se desconoce el mecanismo mediante el cual provoca esta activación y iii) los estudios realizados en humanos son muy limitados (revisado en (437,438)). Aunque existan pocas evidencias, los ensayos con el medicamento ibudilast, una fosfodiesterasa que reduce la activación de la microglía y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, han sido muy prometedores para tratar la adicción a la metanfetamina. En un ensayo clínico realizado por Worley y colaboradores se demostró que el tratamiento oral de 100 mg de ibudilast dos veces al día disminuía los efectos producidos por un consumo agudo de metanfetamina (euforia, ansia por tomar la sustancia...) (439). En otro ensayo clínico, Li y colaboradores también demostraron que el tratamiento con 50 mg/día de ibudilast durante 7 días atenuaba los efectos pro-inflamatorios de la administración aguda de metanfetamina (440). Aunque estos resultados son muy prometedores, es necesaria la realización de más ensayos clínicos para evaluar la eficacia clínica y la seguridad de este fármaco. Actualmente, hay tres ensayos clínicos en marcha con este propósito (NCT01217970, NCT03341078 y NCT01860807). De forma interesante, Tahvilian y colaboradores publicaron recientemente que el tratamiento con ibudilast reducía la muerte celular inducida por el uso de metanfetamina a través de la inactivación de los receptores sigma en la línea celular PC12 (441). En un contexto de adicción a la metanfetamina, la expresión de σ_1R se encuentra incrementada (442), por lo que investigaciones futuras deberían investigar el posible potencial de los receptores sigma para tratar esta enfermedad.



1. Introducción

Finalmente, solo existe un ensayo clínico (actualmente en marcha, NCT03078075) que use terapia combinada para tratar la adicción a la metanfetamina. En este ensayo, se evalúa la eficacia terapéutica de un tratamiento combinado con 380 mg de naltrexona cada tres semanas y 450 mg/día de bupropión. Los resultados preliminares publicados de este estudio demuestran el tratamiento combinado bupropión/naltrexona resulta eficaz para el tratamiento para la adicción a metanfetamina (443).

En resumen, existen muy pocos ensayos clínicos realizados en humanos para tratar la adicción a las anfetaminas, y los que se han realizado presentan limitaciones importantes como un tamaño de muestra insuficiente o una baja tasa de finalización del tratamiento (alrededor del 40-50%), lo que provocan que no tengan el suficiente poder estadístico (423). Además, la mayoría de los adictos a las anfetaminas también presentan otros síntomas como adicciones a otras sustancias, ansiedad, depresión, psicosis y alteraciones del humor, que también deben ser tenidos en cuenta a la hora de tratar y curar esta enfermedad. Por este motivo, las investigaciones futuras deben tener en cuenta todos estos factores e intentar conseguir mayores tasas de seguimiento para conseguir que la farmacoterapia sea efectiva en la adicción a las anfetaminas (374,390).



2. OBJETIVOS



2. Objetivos

La formación de heterómeros de GPCR genera nuevas dianas terapéuticas que no habían sido consideradas con anterioridad, ya que se forman nuevas unidades funcionales con características bioquímicas diferentes a las que tenían sus componentes individuales. Estas características permiten diseñar nuevos fármacos, disminuyendo los efectos secundarios y aumentando la eficacia terapéutica de los medicamentos que hay actualmente en el mercado.

La adicción a las sustancias de abuso es una enfermedad que afecta de manera crónica a millones de personas en todo el mundo. Una consecuencia común de su consumo es la acumulación de dopamina en la sinapsis, lo que genera una mayor sensación de euforia. Cada sustancia de abuso tiene su mecanismo de acción propio, en concreto, algunas sustancias estimuladoras del SNC como la cocaína, bloquean el transportador de dopamina DAT, impidiendo de esta manera la recaptación de dopamina de la sinapsis. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que existe otro mecanismo de acción que implica a los receptores de tipo sigma. En el grupo de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral, se ha investigado más profundamente el mecanismo que implica la interacción de las sustancias de abuso con los receptores sigma, que se ha observado que son capaces de interactuar con otras proteínas, incluidos diversos GPCR.

Aparte de la sensación de euforia que se produce por el consumo de psicoestimulantes, otra consecuencia de su uso es la disminución del apetito. Sin embargo, aunque este conocimiento se tiene desde hace miles de años, el mecanismo molecular mediante el cual las sustancias de abuso suprimen las ganas de comer no se conoce en profundidad. La grelina es una hormona orexigénica que tiene un rol muy importante en la regulación de la sensación de hambre. Asimismo, comer también activa la vía de la recompensa, lo que demuestra aun más la conexión entre la adicción a las sustancias de abuso y la regulación del apetito. Con todos estos antecedentes nos planteamos estudiar el papel de la heteromerización de los GPCR en la patología de la adicción y en su relación con la regulación del apetito en el estriado, región del cerebro muy importante en la vía de recompensa. De esta manera, el primer objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido:

Objetivo 1. Investigar si los receptores sigma 1 median los efectos anorexigénicos de la cocaína.

Existe una gran cantidad de literatura que demuestra una relación recíproca entre las conductas relacionadas con la adicción y la respuesta al estrés. De hecho, el estrés puede empeorar los síntomas de abstinencia y inducir a la recaída del consumo de sustancias de abuso. Por este motivo, se ha sugerido que el sistema que regula el estrés, principalmente mediado por el receptor CRF₂, podría jugar un papel modulador en el proceso de recaída al consumo de psicoestimulantes, en concreto de la anfetamina. Además, estos dos sistemas (estrés y adicción) pueden inhibir la sensación de hambre. La orexina es una hormona orexigénica que induce sus acciones fisiológicas a través de dos GPCR: los receptores de orexina 1 y 2 (OX₁R y OX₂R). Entre ellos, el OX₁R tiene un papel muy importante en los procesos de recompensa, dado que se ha observado que su activación



2. Objetivos

promueve la búsqueda y la recaída de determinadas sustancias de abuso. Con toda esta información el segundo objetivo de esta tesis ha sido:

Objetivo 2. Estudiar el papel potencial del receptor de orexina 1 (OX₁R) y del factor liberador de corticotropina 2 (CRF₂R) como mediadores de los efectos de la amfetamina.

El consumo crónico de sustancias de abuso como la metanfetamina produce neurodegeneración, lo que provoca una disminución de la esperanza de vida. Varios autores han reportado que el receptor de adenosina A_{2A} tiene un papel neuroprotector, de manera que se han propuesto este receptor como diana terapéutica para tratar la adicción a sustancias de abuso. Por otro lado, otros autores han reportado evidencias de que el bloqueo del receptor cannabinoide CB₁ reduce la liberación de dopamina potenciada por el consumo de psicoestimulantes como la metanfetamina. Además, los receptores A_{2A} y CB₁, están altamente expresados en el estriado, donde se ha demostrado que se encuentran interaccionando. Así, el tercer objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido:

Objetivo 3. Establecer si la metanfetamina afecta la funcionalidad del receptor CB₁ de cannabinoides, del receptor A_{2A} de adenosina y del heterómero formado por ambos GPCR (A_{2A}R-CB₁R).



3. RESULTADOS



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular
Facultad de Biología, Av. Diagonal, 643, 08028 Barcelona
Edificio Prevosti, Planta -2

3.1. Informe de los directores de la Tesis Doctoral

La Dra. Gemma Navarro Brugal del grupo de Neurofarmacología Molecular del departamento de Bioquímica y Fisiología de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona (Avinguda Joan XXIII, Edificio B, planta 1, 27-31, 08028, Barcelona) y el Dr. Rafael Franco Fernández del grupo de Neurobiología Molecular del departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular de la Universidad de Barcelona (Avinguda Diagonal, 643, Edificio Prevosti, planta -2, 08028, Barcelona), directores de la Tesis Doctoral de la doctoranda Mireia Casanovas Ferrero titulada “Complejos del receptor sigma y de heterómeros de receptores acoplados a proteínas G en adicción y control del apetito” que se presenta como un compendio de publicaciones exponen que:

El manuscrito “**Cocaine blocks ghrelin effects via interaction with sigma-1 receptors**” ha sido publicado en la revista *Molecular Neurobiology* con un factor de impacto de 4,500. El manuscrito “**Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: Structural and functional properties**” ha sido publicado en la revista *Addiction Biology* con un factor de impacto de 4,121. El manuscrito “**Differential effect of amphetamine over the corticotropin-releasing factor CRF₂ receptor, the orexin OX₁ receptor and the CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex**” ha sido publicado en la revista *Neuropharmacology* con un factor de impacto de 4,431. Finalmente, el manuscrito “**Methamphetamine blocks adenosine A_{2A} receptor activation via sigma 1 and cannabinoid CB₁ receptors**” ha sido publicado en la revista *International Journal of Molecular Sciences* con un factor de impacto de 4,556.

En el trabajo “**Cocaine blocks ghrelin effects via interaction with sigma-1 receptors**”, la doctoranda Mireia Casanovas Ferrero ha colaborado en la producción de células, en su transfección, en experimentos de señalización y en ensayos de inmunocitoquímica. El Dr. David Aguinaga Andrés ha utilizado resultados contenidos en esta publicación para la elaboración de su Tesis Doctoral con anterioridad a la publicación de ésta.

En el trabajo **“Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: Structural and functional properties”** la doctoranda Mireia Casanovas Ferrero ha llevado a cabo la totalidad del trabajo experimental exceptuando la obtención de células de cultivo primario, la preparación del modelo animal y su tratamiento con cocaína y el modelado molecular efectuado *in silico*.

En el trabajo **“Differential effect of amphetamine over the corticotropin-releasing factor CRF₂ receptor, the orexin OX₁ receptor and the CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex”** la doctoranda Mireia Casanovas Ferrero ha colaborado en la producción de células, en su transfección, en experimentos de señalización y en ensayos de inmunocitoquímica. Para la elaboración de su Tesis Doctoral, la Dra. Mireia Medrano Moya ha utilizado algunos resultados contenidos en este trabajo antes de la publicación del citado artículo.

En el trabajo **“Methamphetamine blocks adenosine A_{2A} receptor activation via sigma 1 and cannabinoid CB₁ receptors”** la doctoranda Mireia Casanovas Ferrero ha llevado a cabo la totalidad del trabajo experimental exceptuando la obtención de células de cultivo primario, los ensayos de inmunocitoquímica y parte de los experimentos de señalización que se solicitaron por parte de los revisores del manuscrito.

Barcelona, junio de 2021



Dra. Gemma Navarro Brugal

FRANCO
FERNANDEZ
Z RAFAEL -
37678082B

Firmado
digitalmente por
FRANCO
FERNANDEZ
RAFAEL -
37678082B
Fecha: 2021.06.11
09:39:26 +02'00'

Dr. Rafael Franco Fernández



Los resultados de la presente Tesis Doctoral están reflejados en los siguientes manuscritos:

- 3.2. Aguinaga D, Medrano M, Cordoní A, Jiménez-Rosés M, Angelats E, **Casanovas M**, Vega-Quiroga I, Canela EI, Petrovic M, Gysling K, Pardo L, Franco R, Navarro G. **Cocaine Blocks Effects of Hunger Hormone, Ghrelin, Via Interaction with Neuronal Sigma-1 Receptors**. Mol Neurobiol. 2019 Feb;56(2):1196-1210. doi: 10.1007/s12035-018-1140-7. Epub 2018 Jun 7. PMID: 29876881.
- 3.3. **Casanovas M**, Jiménez-Rosés M, Cordoní A, Lillo A, Vega-Quiroga I, Izquierdo J, Medrano M, Gysling K, Pardo L, Navarro G, Franco R. **Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: Structural and functional properties**. Addict Biol. 2021 Feb 8:e13017. doi: 10.1111/adb.13017. Epub ahead of print. PMID: 33559278.
- 3.4. Navarro G, Medrano M, Aguinaga D, Vega-Quiroga I, Lillo A, Jiménez J, **Casanovas M**, Canela EI, Mallol J, Gysling K, Franco R. **Differential effect of amphetamine over the corticotropin-releasing factor CRF₂ receptor, the orexin OX₁ receptor and the CRF₂-OX₁heteroreceptor complex**. Neuropharmacology. 2019 Jul 1;152:102-111. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.11.014. Epub 2018 Nov 19. PMID: 30465812.
- 3.5. **Casanovas M**, Reyes-Resina I, Lillo A, Lillo J, López-Arnau R, Camarasa J, Escubedo E, Navarro G, Franco R. **Methamphetamine Blocks Adenosine A_{2A} Receptor Activation via Sigma 1 and Cannabinoid CB₁ Receptors**. Int J Mol Sci. 2021 Mar 9;22(5):2743. doi: 10.3390/ijms22052743. PMID: 33803075; PMCID: PMC7963146.



3. Resultados

3.2. Cocaine blocks effects of hunger hormone, ghrelin, via interaction with neuronal sigma-1 receptors

David Aguinaga^{1,2}, Mireia Medrano^{1,2}, Arnau Cordero³, Mireia Jiménez-Rosés³, Edgard Angelats^{1,2}, **Mireia Casanovas**^{1,2}, Ignacio Vega-Quiroga⁴, Enric I. Canela^{1,2}, Milos Petrovic⁵, Katia Gysling⁴, Leonardo Pardo³, Rafael Franco^{1,2,7} y Gemma Navarro^{1,6,7}

¹Centro de Investigación en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

²Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, School of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³Laboratori de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Barcelona

⁴Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago Chile

⁵School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire, Preston PR1 2HE, UK

⁶Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁷School of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Manuscrito publicado en la revista *Molecular Neurobiology* (2019) 56:1196-1210. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1140-7>

RESUMEN

A pesar de los conocimientos ancestrales que indican que el consumo de cocaína disminuye la sensación de apetito, las bases moleculares mediante las cuales es capaz de producir estos efectos siguen siendo desconocidas. Tanto la adicción a las sustancias de abuso como los desórdenes alimentarios (entre ellos, comer en exceso, la anorexia o la bulimia) comparten un control central que involucra los circuitos de la vía de recompensa. En este trabajo hemos observado que el receptor sigma 1 (σ_1R) regula los efectos anorexigénicos de la cocaína mediante su interacción con los receptores de grelina (GHS-R) en neuronas. También se ha observado que el tratamiento con cocaína aumenta la colocalización de σ_1R y GHS-R1a en la superficie celular. Además, en células HEK-293T transfectadas y en cultivos primarios de neuronas estriatales el pretratamiento con cocaína o con el agonista de σ_1R PRE-084 inhibe la señalización mediada por grelina, de una manera similar al efecto producido por el antagonista de GHS-R1a YIL 781. Estos resultados han sido similares en




3. Resultados

los ensayos dependientes de proteína G (acumulación de AMPc en el citosol y liberación de calcio desde el retículo endoplásmico) y en los ensayos parcialmente dependientes o independiente de proteína G (fosforilación de ERK 1/2 y redistribución dinámica de masas). En conclusión, en este trabajo se han aportado evidencias sólidas de la directa interacción entre los receptores σ_1 R y GHS-R1a y las consecuencias funcionales de este nuevo complejo, así como un modelo estructural fiable del complejo macromolecular formado por σ_1 R-GHS-R1a, que aparecen como una pieza clave en el rompecabezas de los eventos que relacionan el consumo de cocaína con los comportamientos relacionados con la ingesta de alimentos.



Cocaine Blocks Effects of Hunger Hormone, Ghrelin, Via Interaction with Neuronal Sigma-1 Receptors

David Aguinaga^{1,2} · Mireia Medrano^{1,2} · Arnau Corderi³ · Mireia Jiménez-Rosés³ · Edgar Angelats^{1,2} · Mireia Casanovas^{1,2} · Ignacio Vega-Quiroga⁴ · Enric I. Canela^{1,2} · Milos Petrovic⁵ · Katia Gysling⁴ · Leonardo Pardo³ · Rafael Franco^{1,2,7}  · Gemma Navarro^{1,6,7}

Received: 1 December 2017 / Accepted: 21 May 2018 / Published online: 7 June 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Despite ancient knowledge on cocaine appetite-suppressant action, the molecular basis of such fact remains unknown. Addiction/eating disorders (e.g., binge eating, anorexia, bulimia) share a central control involving reward circuits. However, we here show that the sigma-1 receptor (σ_1R) mediates cocaine anorectic effects by interacting in neurons with growth/hormone/secretagogue (ghrelin) receptors. Cocaine increases colocalization of σ_1R and GHS-R1a at the cell surface. Moreover, in transfected HEK-293T and neuroblastoma SH-SY5Y cells, and in primary neuronal cultures, pretreatment with cocaine or a σ_1R agonist inhibited ghrelin-mediated signaling, in a similar manner as the GHS-R1a antagonist YIL-781. Results were similar in G protein-dependent (cAMP accumulation and calcium release) and in partly dependent or independent (ERK1/2 phosphorylation and label-free) assays. We provide solid evidence for direct interaction between receptors and the functional consequences, as well as a reliable structural model of the macromolecular σ_1R -GHS-R1a complex, which arises as a key piece in the puzzle of the events linking cocaine consumption and appetitive/consummatory behaviors.

Keywords Neuroendocrine · Drug addiction · Receptor heteromer · G protein-coupled heteroreceptor complex · Functional selectivity · Cross-regulation

Introduction

Used today as a recreational drug, cocaine was first consumed by humans in the form of coca leaves. Indigenous peoples of

South America, especially those living at higher altitude, were aware that chewing coca leaves helped to keep their life style. For example, *Erythroxylum coca* was used to facilitate traversing long distances across the Andes with reduced weight and

Rafael Franco and Gemma Navarro contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1140-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rafael Franco
rfranco123@gmail.com; rfranco@ub.edu

✉ Gemma Navarro
dimartts@hotmail.com

¹ Centro de Investigación en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

² Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, School of Biology, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Laboratori de Medicina Computacional, Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

⁴ Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

⁵ School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire, Preston PR1 2HE, UK

⁶ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

⁷ School of Biology, Universitat de Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

little food. Despite such ancient knowledge, i.e., the appetite suppressant action of cocaine, the molecular basis of hunger prevention remains unknown. This report was undertaken to test the hypothesis of whether the well-known anorexigenic effect of cocaine is mediated by growth hormone secretagogue (GHS) receptors, also known as ghrelin receptors, which are key players in the central control of food/energy intake [1].

Ghrelin, the “hunger” endocrine hormone, is involved in the control of food intake and energy homeostasis [2]. Its action is mediated by, up-to-date, only one specific ghrelin receptor that belongs to the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCRs). In humans, alternative splicing leads to: isoform 1a that contains seven transmembrane (TM) helices (GHS-R1a, 366 amino acids) and isoform 1b that lacks 6 and 7 TM helices (GHS-R1b, 289 amino acids) [3–5]. These TM domains are required for ligand binding and coupling to heterotrimeric G proteins and, therefore, ghrelin cannot signal via the GHS-R1b isoform [6]. GHS-R1b seems to serve as a modulator of GHS-R1a surface expression and signaling [7]. In fact, GHS-R1b is expressed in the same cells as GHS-R1a, and both isoforms interact to form heteromer receptor signaling units [6]. We have previously shown that GHS-R1b guides surface expression of functional GHS-R1a, acting as a dual modulator: low relative GHS-R1b expression potentiates GHS-R1a function, while high relative GHS-R1b expression inhibits GHS-R1a function [7]. GHS-R1b negatively influences ghrelin action by allosteric interactions within the GHS-R1a-GHS-R1b heteromer that reduce the efficacy of the hormone [6, 8]. Although the purified GHS-R1a, assembled into lipid discs is reportedly coupled to $G_{q/11}$ [9], the receptor may also couple to non- $G_{q/11}$ heterotrimeric G proteins (www.guidetopharmacology.org). Indeed, we previously found preferential $G_{i/o}$ coupling of the GHS-R1a-GHS-R1b complex in HEK-293T cells and preferential $G_{s/olf}$ coupling in both striatal and hippocampal neurons in culture [7]. Heteromerization of GHS-R1a and GHS-R1b in heterologous expression systems is often needed for proper ghrelin-induced signaling. It should be noted that ghrelin receptors may form direct protein-protein interactions with a variety of GPCRs, inter alia with dopamine, melanocortin, prostanoid, serotonin, somatostatin, neurotensin, and GPR83 receptors [10]; see www.gpcr-hetnet.com and references therein.

The sigma-1 receptor (σ_1R) is an atypical membrane protein, whose exact function remains unknown. It has been proposed that it functions as a pluripotent cell function modulator in living cells [11] and is attracting a lot of interest due to its potential as a target against neuropathic pain [12–14]. While its physiological function remains elusive and the endogenous ligand is yet to be discovered, σ_1R is a protein target for cocaine [15–17]. Drugs blocking the interaction of cocaine with σ_1R have been proposed to reduce drug-seeking behavior [18]. σ_1R -mediated cocaine actions in the central nervous system are dependent on its interactions with GPCRs. For

instance, we have identified that cocaine binding to σ_1R potentiates dopamine D_1R -mediated adenylate cyclase signaling [19, 20] and inhibits D_2R -mediated signaling in striatal neurons [20]. These actions disrupt the delicate balance between inputs of reward seeking controlled by D_1R -containing neurons and inputs of aversion coming from D_2R -containing neurons. In addition, cocaine binding to σ_1R also induces disruption of the orexin and corticotropin-releasing factor receptor negative cross-talk, playing an important role in the stress-induced cocaine-seeking behavior [21].

We show in this manuscript that σ_1R interacts with and modulates the activity of GHS-R1a, indicating a non-previously suspected receptor interplay. Moreover, because structural information on GPCR homomeric complexes already exist [22] and the crystal structure of σ_1R has been recently elucidated [23], we have devised a molecular arrangement consisting of the GHS-R1a-GHS-R1b heteromer in complex with σ_1R . We have taken advantage of the recent knowledge showing that σ_1R arranges as a homotrimer (each protomer with a single TM). We used synthetic peptides with the amino acid sequences from the TM helices of GHS-R1a, together with bimolecular fluorescence complementation assays and computer modeling, to find the oligomerization interfaces between GHS-R1a, GHS-R1b, and σ_1R , and to propose a structural model of the macromolecular complex.

Materials and Methods

Reagents

Cocaine-chlorhydrate was provided by the Spanish *Agencia del Medicamento* (ref no.: 2003C00220). σ_1R (PRE-084), GHS-R1a (ghrelin and YIL-781), and A_1 adenosine receptor (L-phenylisopropyl adenosine, R-PIA, and 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine, DPCPX) ligands were purchased from Tocris, Bristol, UK. Cocaine-chlorhydrate used for the acute and chronic administration was donated by the National Institute of Drug Abuse, USA, to K. Gysling, Chile.

Fusion Proteins and Expression Vectors

Sequences encoding amino acid residues 1–155 and 155–238 of the Venus variant of yellow fluorescence protein (Venus) were subcloned in the pcDNA3.1 vector to obtain complementary Venus N- and C-hemiproteins. Human cDNAs for GHS-R1a, GHS-R1b, or σ_1R were amplified without their stop codons using sense and antisense primers harboring: EcoRI and KpnI sites to be subcloned in pcDNA3.1RLuc vector (pRLuc-N1 PerkinElmer, Wellesley, MA) or in a GFP²-containing vector (p-GFP², Packard BioScience, Meriden, CT) to provide σ_1R -Rluc, GHS-R1a-Rluc, GHS-R1a-YFP, σ_1R -YFP, or GHS-R1a-GFP² plasmids. Human

cDNA for A_{2A}R was subcloned into p-GFP² vector harboring HindIII and BamHI sites to provide the encoding A_{2A}-GFP² plasmid. For bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments, cDNA for GHS-R1b, GHS-R1a, and σ_1 R were subcloned into pcDNA3.1-nVenus and pcDNA3.1-cVenus harboring EcoRI and KpnI sites to provide plasmids encoding GHS-R1b-nYFP, GHS-R1b-cYFP, GHS-R1a-nYFP, and σ_1 R-cYFP.

Cell Lines, Neuronal Primary Cultures, and Transient Transfection

HEK-293T human embryonic kidney cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μ g/ml sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin/streptomycin, MEM Non-Essential Amino Acid Solution (1/100) and 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (all supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK). Primary cultures of striatal neurons were obtained from fetal Sprague Dawley rats of 19 days. Cells were isolated as described in Hradsky et al. [24] and plated at a confluence of 40,000 cells/0.32 cm². Cells were maintained for 12 days in Neurobasal medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin, and 2% (v/v) B27 supplement (GIBCO) in 6-well microplates. Cells were transiently transfected with the corresponding cDNAs using the PEI (PolyEthylenImine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) method or, in the case of the anti- σ_1 R siRNA, with Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). After transfection, cells were incubated in serum-free medium which was replaced by complete medium after 4 h. Experiments were carried out 48 h later (unless otherwise indicated).

Immunocytochemistry

HEK-293T cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed with PBS containing 20 mM glycine to quench free aldehyde groups. After permeabilization with PBS-glycine buffer containing 0.2% Triton X-100 for 5 min, cells were blocked with PBS containing 1% bovine serum albumin (1 h at room temperature). σ_1 R-YFP was detected by its own fluorescence (wavelength 530 nm), and Rluc-containing proteins were stained using a mouse monoclonal anti-Rluc antibody (1/200, 1 h, room temperature, Millipore, CA, USA) and a Cyn3-conjugated donkey anti-mouse antibody (1/200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Nuclei were stained with Hoechst (1/100, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and samples were mounted with Mowiol 30% (Calbiochem) and observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

Resonance Energy Transfer

For bioluminescence energy transfer (BRET) assays, HEK-293T cells were transiently transfected with a constant amount of cDNA for σ_1 R-Rluc and increasing amounts of cDNAs for GHS-R1a-GFP² or A_{2A}-GFP². To normalize the number of cells, protein concentration was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) using bovine serum albumin dilutions as standards. To quantify fluorescence, cell suspensions were distributed in 96-well microplates (black with transparent bottom), and fluorescence was read in a Fluostar Optima Fluorimeter (BMG Labtech, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10 nm bandwidth excitation filter (400 nm). For BRET measurements, cell suspensions (20 μ g protein) were distributed in 96-well white microplates (Corning 3600, Corning, NY), and 5 μ M DeepBlueC (Molecular Probes, Eugene, OR) was added right before BRET signal acquisition using a Mithras LB 940 reader (Berthold Technologies, DLReady, Germany). To quantify receptor-Rluc expression, luminescence readings were performed after 10 min of adding 5 μ M coelenterazine H. Net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] - C_f, where C_f corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the Rluc protein when expressed individually. For bimolecular complementation (BiFC) assays, HEK-293T cells were transiently transfected with a constant amount of cDNA encoding for proteins fused to nVenus or cVenus and incubated for 4 h in complete DMEM containing the interfering TAT peptides (with similar sequences to those in TM1 to TM7 of GHS-R1a; see supplementary Table 1 for sequences). YFP resulting from complementation was detected by placing cells (20 μ g protein) in 96-well microplates (black plates with a transparent bottom) and reading the fluorescence in a Fluostar Optima Fluorimeter (BMG Labtech, Offenburg, Germany) using a 30-nm bandwidth excitation filter (485 nm).

Cytosolic cAMP Determination

Forskolin dose-response curves in different density of cells were performed to select the most appropriate conditions of the assay, which resulted in 5000 HEK-293T cells, 7500 neurons, and 0.5 μ M forskolin. Subsequently, assays were performed in medium containing 50 μ M zardaverine, placing cells in 384-well microplates. This was done by the preincubation with reagents (the σ_1 R agonist, PRE-084, the GHS-R1a antagonist, YIL-781, or cocaine) for 15 min, followed by ghrelin addition (100-nM final concentration), and after 15 min incubation period, 50 μ M forskolin was added. Readings were performed 15 min later using a homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer (HTRF) method requiring the Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer)

and fluorescence readings (at 665 nm) in a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with an HTRF optical module (BMG Labtech).

MAPK Activation

To determine ERK1/2 phosphorylation, 40,000 HEK-293 cells/well or 50,000 neurons/well were plated in transparent Deltalab 96-well microplates and kept in the incubator for 48 h. The medium was substituted by serum-free DMEM medium 2 to 4 h before starting the experiment. Before the addition of 100 nM, ghrelin cells were pretreated (10 min at 25 °C) in serum-free medium with different reagents (the σ_1 R agonist, PRE-084, the GHS-R1a antagonist, YIL-781, or cocaine). After 7 min of ghrelin-induced activation, cells were washed twice with cold PBS before the addition of 30 μ L of lysis buffer (20 min). Supernatants (10 μ L) were placed in white ProxiPlate 384-well microplates, and ERK1/2 phosphorylation was determined using the AlphaScreen@SureFire@ kit (Perkin Elmer) and the EnSpire@ Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Intracellular Calcium Mobilization

HEK-293T cells were co-transfected with cDNA(s) for receptor(s) and 1 μ g cDNA for the calmodulin-based calcium sensor, GCaMP6 [25]. Forty-eight hours after transfection, cells were detached using Mg²⁺-free Locke's buffer pH 7.4 (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, and 5 mM HEPES) supplemented with 10 μ M glycine. One hundred fifty thousand cells per well were plated in 96-well black, clear bottom, microtiter plates. Then, cells were incubated with the σ_1 R agonist, PRE-084, the GHS-R1a antagonist, YIL-781, or cocaine for 10 min before ghrelin 100-nM addition. Upon excitation at 488 nm, real-time 515-nm fluorescence emission due to calcium-ion-complexed GCaMP6 was recorded on the EnSpire@ Multimode Plate Reader (every 5 s, 100 flashes per well).

Label-Free Dynamic Mass Redistribution Assays

HEK-293T cells and neuronal primary cultures were seeded in 384-well sensor microplates to obtain 70–80% confluent monolayers constituted by 10,000 HEK-293T cells or 14,000 neurons per well. Before the assay, cells were washed twice with assay buffer (HBSS with 20 mM HEPES and 0.1% DMSO, pH 7.15) and incubated for 2 h in 40 μ L/well of assay-buffer in the reader at 24 °C. Hereafter, the sensor plate was scanned, and a baseline optical signature was recorded before adding 10 μ L of cocaine (30 μ M), PRE-084 (100 nM), or YIL-781 (2 μ M) for 30 min followed by ghrelin addition. All compounds were dissolved in assay buffer. Then, dynamic

mass redistribution (DMR) responses were monitored for at least 3600 s using an EnSpire@ Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Sensitive measurements of changes in local optical density mimicking cellular mass movements induced upon receptor activation were detected using EnSpire Workstation Software v 4.10.

Proximity Ligation Assay

For proximity ligation assays (PLAs), primary cultures of striatal neurons were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min and permeabilized in PBS containing 0.05% Triton X-100 (15 min). After 1 h incubation at 37 °C with the blocking solution, primary cultures were incubated overnight with anti- σ_1 R (1/100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), and anti-GHS-R1a antibody (1/100, AbCam, Cambridge, UK) in the presence of Hoechst (1/100, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to stain nuclei. Cells were processed using the PLA probes that bind to the primary antibodies (Duolink II PLA probe anti-Mouse plus and Duolink II PLA probe anti-Goat minus) and heteroreceptor complex formation was detected using the Duolink II in situ PLA detection Kit (OLink; Bioscience, Uppsala, Sweden). Images were taken in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). For each field of view, a stack of two channels (one per staining), and four to six Z stacks with a step size of 1 μ m were acquired. Quantification of the number of cells containing one or more red dots versus total cells (blue nuclei) and of the number of red dots/cell-containing dots:ratio was conducted using a dedicated software known as Duolink ImageTool (ref: DUO90806, Sigma-OLink). This software has been developed for PLA signals and cell nuclei quantification in images generated from fluorescence microscopy.

Cocaine Treatment and Fixation Procedure

Male Sprague-Dawley rats weighing 200–220 g were selected for the experiments. Rats were kept in controlled environment with 12-h light-dark cycle at 21 °C room temperature. Food and water were provided ad libitum. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Biological Sciences of “Pontificia Universidad Católica de Chile” and followed the international guidelines (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Rats were divided in two groups of experimental series, chronic cocaine-treated rats with respective control (saline) and acute cocaine rats. The chronic cocaine-administration protocol consisted of 15 mg/Kg, i.p. cocaine injections twice per day for 14 days as described by [26], whereas the acute cocaine treatment protocol consisted of two injections of 15 mg/kg, i.p. cocaine, one in the morning and one in the afternoon. Daily administration of cocaine and saline solution was performed in both

experimental series at the same time in the morning and afternoon (beginning at 11:00 A.M. and 5:00 P.M.). The day after last cocaine injection, rats were deeply anesthetized with ketamine-xylazine (50–5 mg/kg, respectively) and intracardially perfused with 50 ml of saline, followed by 500 ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer. Then, the animals were guillotined, and the brain was post-fixed with 4% PFA for 2 h and left in 20% sucrose during 2 days.

Computational Model of the GHS-R1a- σ_1 R Heteromer

The structure of σ_1 R was modeled based on the recently released crystal structure (PDB id 5HK1) [27]. The inactive conformation of human GHS-R1a (UniProt: Q92847) was built using crystal structures of the neurotensin 1 receptor (PDB id 4XES for all parts of the receptor, and PDB id 3ZEV for the C-terminal part of TM7 and helix 8) [28, 29]. The human neurotensin 1 receptor and GHS-R1a share 33% of sequence identity and 51% of sequence similarity. The “active-like” form of GHS-R1a was modeled by incorporating the active features present in the crystal structure of the β_2 -adrenergic receptor in complex with G_s (PDB id 3SN6), namely the internal halves of TMs 5 and 6 [30]. The “active-like” model of GHS-R1a contains G_i (PDB id 1AGR) [31]. The GHS-R1a homodimer was constructed based on the symmetric TM5/6 protein-protein interface observed in the crystal structure of the μ OR (PDB id 4DKL) [32]. The GHS-R1a- σ_1 R complex was constructed using protein-protein docking with HADDOCK [33], under the imposed experimental restraints that TMs 1 and 2 of GHS-R1a contact the single TM of σ_1 R.

Results

GHS-R1a Forms Heteromeric Complexes with σ_1 R

Immunocytochemical assays were performed to detect whether colocalization between GHS-R1a and σ_1 R occurred in transfected HEK-293T cells. Cells were transfected with cDNAs for σ_1 R fused to YFP (0.75 μ g cDNA) and for GHS-R1a fused to Renilla luciferase (Rluc) (1.66 μ g cDNA). In cells expressing only σ_1 R-YFP, the receptor was detected by YFP fluorescence, identifying σ_1 R-YFP mainly in intracellular structures. In HEK-293T cells expressing GHS-R1a-Rluc, the GHS-R1a was detected by a specific primary anti-Rluc and secondary Cy3 antibodies, the receptor was detected in intracellular structures and at the plasma membrane level. Interestingly, in HEK-293T cells co-expressing σ_1 R-YFP (0.75 μ g cDNA) and GHS-R1a-Rluc (1.66 μ g cDNA), colocalization of both receptors was observed (Fig. 1a).

To identify a potential direct interaction between σ_1 R and GHS-R1a, we developed BRET experiments, transfecting a

constant amount of cDNA for σ_1 R-Rluc (0.075 μ g cDNA) and increasing amounts of cDNA for GHS-R1a-GFP² (0.5 to 3 μ g cDNA). A saturation BRET curve was obtained, thus indicating a specific interaction between σ_1 R and GHS-R1a (BRET_{max} 371 \pm 38 mBU, BRET₅₀ 68 \pm 23) (Fig. 1b, c). In contrast, when adenosine A_{2A}R-GFP² (0.5 to 2.5 μ g cDNA) was used as negative control instead of GHS-R1a receptor, a linear plot with low BRET values was obtained.

Quaternary Structure of the Heteromeric Complex Between σ_1 R and GHS-R1a

We next addressed the quaternary structure of σ_1 R-GHS-R1a complexes taking advantage of the recent publication of the crystal structure of σ_1 R in a trimeric arrangement. The macromolecular complex cannot be understood without taking into account that the GHS-R1a receptor can form homomeric interactions with GHS-R1a and/or heteromeric interactions with GHS-R1b [6–8]. Thus, to identify the TM interfaces involved in GHS-R1a-GHS-R1a homodimerization, GHS-R1a-GHS-R1b heterodimerization and their TM-interacting interfaces with σ_1 R, we used synthetic peptides with the amino acid sequence of individual 1–7 TM helices of GHS-R1a fused to the transactivator of transcription (TAT) peptide (exact sequences are provided in supplementary Table 1). These cell-penetrating peptides interact with the TM domain of membrane proteins and can selectively disrupt interactions between proteins, i.e., GPCR protomers [34, 35]. These peptides were first tested in HEK-293T cells expressing GHS-R1a-nYFP (0.75 μ g cDNA) and GHS-R1a-cYFP (0.5 μ g cDNA) to explore whether bimolecular fluorescence complementation (BiFC) occurs (approximately 4,000 units of fluorescence indicative of the formation of GHS-R1a-homodimer complexes). Notably, in the presence of interference peptides, we observed that the fluorescence decreased by twofold only with TM5 and TM6 peptides (Fig. 2a). These results pointed to the TM 5/6 interface for GHS-R1a-GHS-R1a homodimerization. Similar results were obtained for GHS-R1a-GHS-R1b heterodimerization (TM 5/6 interface, Fig. 2b), despite the fact that GHS-R1b isoform lacks TMs 6 and 7. Interestingly, when cells were transfected with cDNAs for GHS-R1a-nYFP, GHS-R1b-cYFP, and non-fused GHS-R1a, fluorescence was reduced in the presence of TM4, TM5, and TM6 peptides (Fig. 2c). These results suggest an arrangement of protomers in which homodimerization of GHS-R1a occurs via the TM 5/6 interface, whereas heterodimerization of GHS-R1a and GHS-R1b occurs via the TM 4/5 interface (Fig. 2d). The fluorescence decrease induced by the TM6 peptide of GHS-R1a (in addition to TM4 and TM5, Fig. 2c) could indicate that this peptide also restricts the interactions with the TM 4 of GHS-R1b (Fig. 2d).

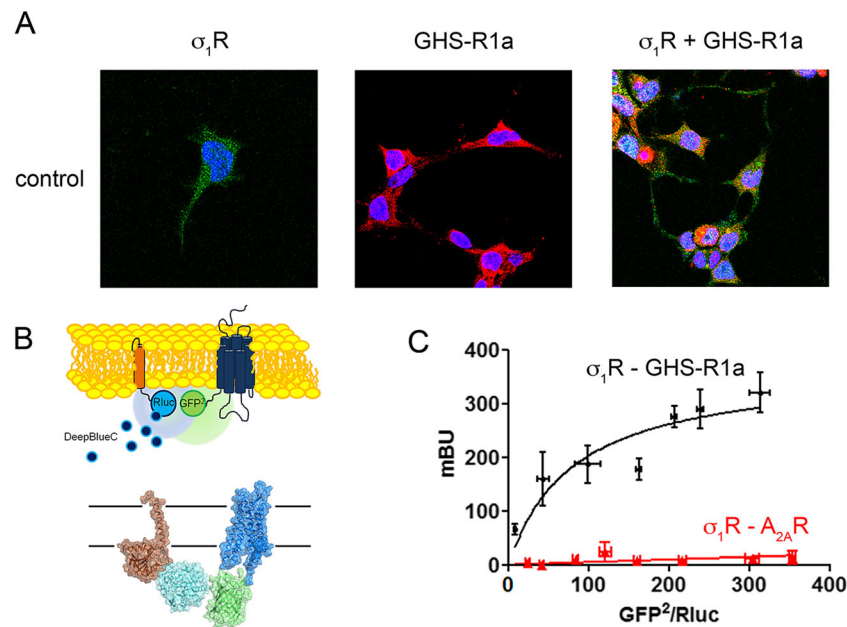


Fig. 1 GHS-R1a interacts with σ_1 R to form σ_1 R-GHS-R1a heteroreceptor complexes. **a** HEK-293T cells expressing σ_1 R-YFP, GHS-R1a-Rluc, or both were monitored by the YFP fluorescence (green) or using a monoclonal anti-Rluc primary antibody and a cyanine-3-conjugated secondary antibody (red). Colocalization is shown in yellow. Nuclei were stained in blue with Hoechst (1/100). Scale bar

10 μ m. **b** Scheme of the BRET² assay using σ_1 Rluc and GHS-R1a-GFP². **c** BRET occurs in HEK-293T cells transfected with a constant amount of cDNA (0.075 μ g) for σ_1 Rluc and increasing amounts of GHS-R1a-GFP² (from 0.5 to 3 μ g cDNA) or A_{2A}R-GFP² (from 0.5 to 2.5 μ g cDNA) as negative control. Values are the mean (in milliBRET units: mBU) \pm S.E.M. from six to eight different experiments

Next, we investigated the GHS-R1a TM domains involved in the interaction with σ_1 R. Remarkably, in HEK-293T cells co-expressing GHS-R1a-nYFP (0.75 μ g cDNA) and σ_1 R-cYFP (0.5 μ g cDNA), fluorescence complementation (4,000 units, which confirms the formation of GHS-R1a- σ_1 R complexes as shown in confocal images (Supplementary Fig. 1A)) was significantly reduced in the presence of TM1, TM2, or TM5 peptides; a marked tendency without statistical significance in the case of TM6 peptide was also found (Fig. 2e). This clearly indicates the existence of two different interacting interfaces between GHS-R1a and σ_1 R, involving either TM 1/2 or TM 5/6 interfaces of GHS-R1a and the single TM helix of σ_1 R. When similar experiments were performed with σ_1 R-cYFP (0.5 μ g cDNA) and GHS-R1b-nYFP (0.5 μ g cDNA), the fluorescent signal (3,500 units) decreased in the presence of TM1 and TM2 but not TM5 or TM6 peptides (Fig. 2f); it should be noted again that GHS-R1b lacks TMs 6 and 7. All members of the GPCR family retain analogous tertiary structures at the seven-helical-bundle domain; thus, we hypothesized that TM 1/2 or TM 5/6 interfaces could be involved in the interaction between the GPCRs and σ_1 R. In addition, GPCR homo/heteromerization must be taken into account to accommodate the σ_1 receptor in the trimeric structure elucidated from structural studies. To obtain data in a more physiological set-up, HEK-293T cells were transfected with cDNAs for GHS-R1a-nYFP and σ_1 R-cYFP in the presence of non-fused GHS-R1b. As fluorescence complementation (5,000 fluorescence units) was reduced only by

TM1 and TM2 (Fig. 2g); our interpretation was that the formation of the GHS-R1a-GHS-R1b heterotetramer via TM 4/5 and TM 5/6 interfaces (Fig. 2d) only permits σ_1 R to interact with GHS-R1a via the free TM 1/2 interface. Proper interference action of TM-TAT peptides was tested by PLA (Supplementary Fig. 1B). In fact, TM1 and TM2 TAT peptides blocked the expression of GHS-R1a- σ_1 R heteromers while treatment with the TM7 TAT did not affect the PLA signal.

Using structural details on TM interfaces of GPCR oligomers [22] and the crystal structure of human σ_1 R [23], together with the results from BiFC experiments performed in the absence and presence of disrupting TM peptides, we constructed a computational molecular model (see “Methods”) of the GHS-R1a homodimer in complex with G_i and σ_1 R (Fig. 2h). The model of the GHS-R1a homodimer contains two free TM 4/5 interfaces that would allow binding of two GHS-R1b protomers (Fig. 2d). The crystal structure of σ_1 R, in which the protein arranges as a homotrimer, suggests that the homotrimer may represent the functional unit [23]. Accordingly, we constructed a computational model consisting of the GHS-R1 dimer, a σ_1 R trimer, and a G protein that fits with the requirements of the biochemical data and takes into account all available structural constraints (Fig. 2g; see “Methods”). According to the experiments with GHS-R1a-derived peptides (see above), σ_1 R can bind GHS-R1b through the TM1/2 interface and GHS-R1a through either the TM1/2 or the TM5/6 interfaces. Because GHS-R1a and GHS-R1b also employ the TM5/6 interface for

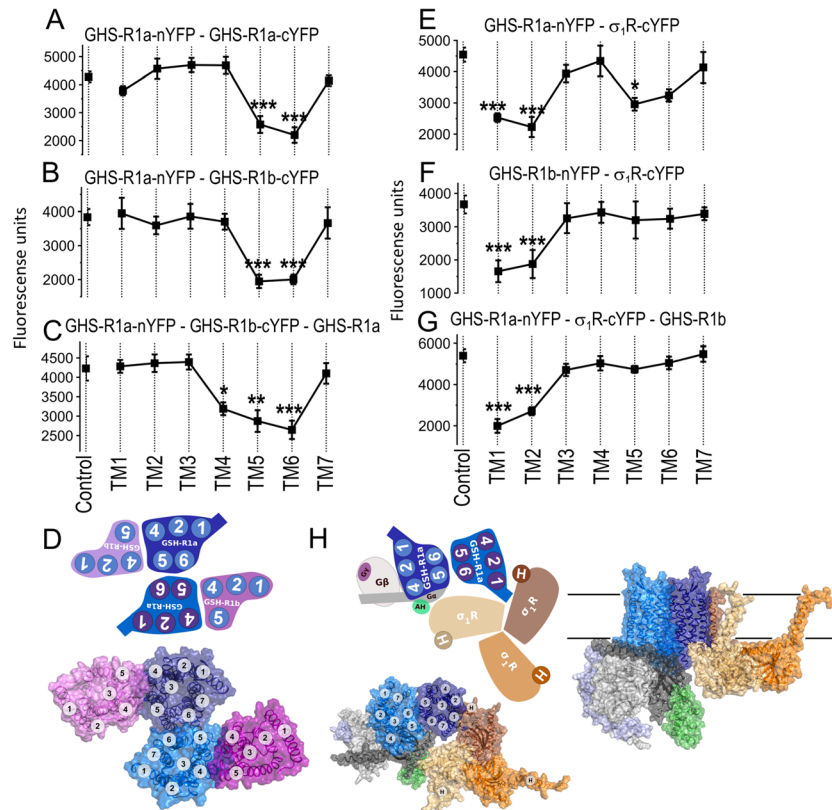


Fig. 2 Effect of interfering peptides on the σ_1R -GHS-R1a interaction. **a–c, e–g** BiFC complementation experiments were performed in HEK-293T cells transfected with 0.75 μ g cDNA for GHS-R1a-nYFP and 0.75 μ g cDNA for GHS-R1a-cYFP (**a**), with 0.75 μ g cDNA for GHS-R1a-nYFP and 0.75 μ g cDNA for GHS-R1b-cYFP (**b**), with 0.75 μ g cDNA for GHS-R1a-nYFP and 0.75 μ g cDNA for GHS-R1b-cYFP in the presence of 1.5 μ g cDNA for GHS-R1a-nYFP (**c**), with 0.75 μ g cDNA for GHS-R1a-nYFP and 0.75 μ g cDNA for σ_1R -cYFP (**e**), with 0.5 μ g cDNA for GHS-R1b-nYFP and 0.5 μ g cDNA for σ_1R -cYFP (**f**), or with 0.75 μ g cDNA for GHS-R1a-nYFP and 0.75 μ g cDNA for GHS-R1b-cYFP (**g**) in the presence of 1.5 μ g cDNA of GHS-R1a not fused. Prior to fluorescence determination, cells were treated with each of the interfering peptides (TM1 to TM7, 4 μ M) during 4 h. Values are the mean \pm S.E.M. from eight to 10 different experiments. One-way ANOVA followed by

Dunnett's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus control conditions. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. **d** Structural model for the GHS-R1a-GHS-R1b heterotetramer (GHS-R1a protomers: blue, GHS-R1b protomers: purple) viewed from the extracellular side (scheme of the arrangement—top—and three-dimensional model (—bottom—)). **h** (left) Structural model consisting of a GHS-R1a homodimer (GHS-R1a G_{α} -bound: light blue, GHS-R1a G_{α} -unbound: dark blue) in complex with a σ_1R homotrimer (in red, orange, and yellow) coupled to G_i (G_{α} Ras-like domain: light gray, G_{α} alpha helical domain: green, G_{β} : dark gray, and G_{γ} : purple) viewed from the extracellular side. **h** (right) Same model as in panel **h** (left) but viewed across the plane of the membrane. Proteins are displayed with a transparent surface and a cartoon. TM helices are indicated by circles (1–7 in GHS-R1a, 1–5 in GHS-R1b and H in σ_1R)

homo-/heterodimerization, we assumed that at normal expression levels, TM1/2 is the most likely interface for the GHS-R1- σ_1R complex, as TM5/6 is occupied by the GHS-R1 homodimer/heterodimer. This model indicates that a single GPCR protomer of GHS-R1a cannot simultaneously bind σ_1R via the TM 1/2 interface and a G protein due to a steric clash between the $\beta\gamma$ subunits of G_i and the intracellular voluminous C-terminal domain of σ_1R , containing a rigid cupin-like β -barrel fold that forms the buried ligand-binding site and the $\beta\gamma$ subunits of G_i (Supplementary Fig. S1). Thus, the minimal functional unit requires a GHS-R1a homodimer in which one protomer binds the G protein, and the second protomer is responsible for the binding of the σ_1R TM helix (Fig. 2h). Interestingly, this model predicts that the cytoplasmic domain of one protomer of the σ_1R trimeric structure interacts with the α -subunit of G_i .

Cocaine Increases Colocalization of σ_1R and GHS-R1a at the Cell Surface

As cocaine binds σ_1R [36], which establishes direct interactions with ghrelin receptors as shown above, we hypothesized that cocaine affects ghrelin-mediated signals. First, we investigated the effect of cocaine in GHS-R1a expression. Immunocytochemical assays were performed in cells expressing σ_1R and GHS-R1a after addition of cocaine (30 μ M, 30 min). Figure 3a shows that plasma membrane expression of σ_1R increased when these cells were treated with a physiologically relevant dose of cocaine [37]. A similar increase was observed when cells were incubated with the σ_1R agonist PRE-084 (100 nM, 30 min). The expression of GHS-R1a was not modified upon treatment with cocaine or PRE-084 but, interestingly, colocalization of σ_1R and GHS-R1a at the cell

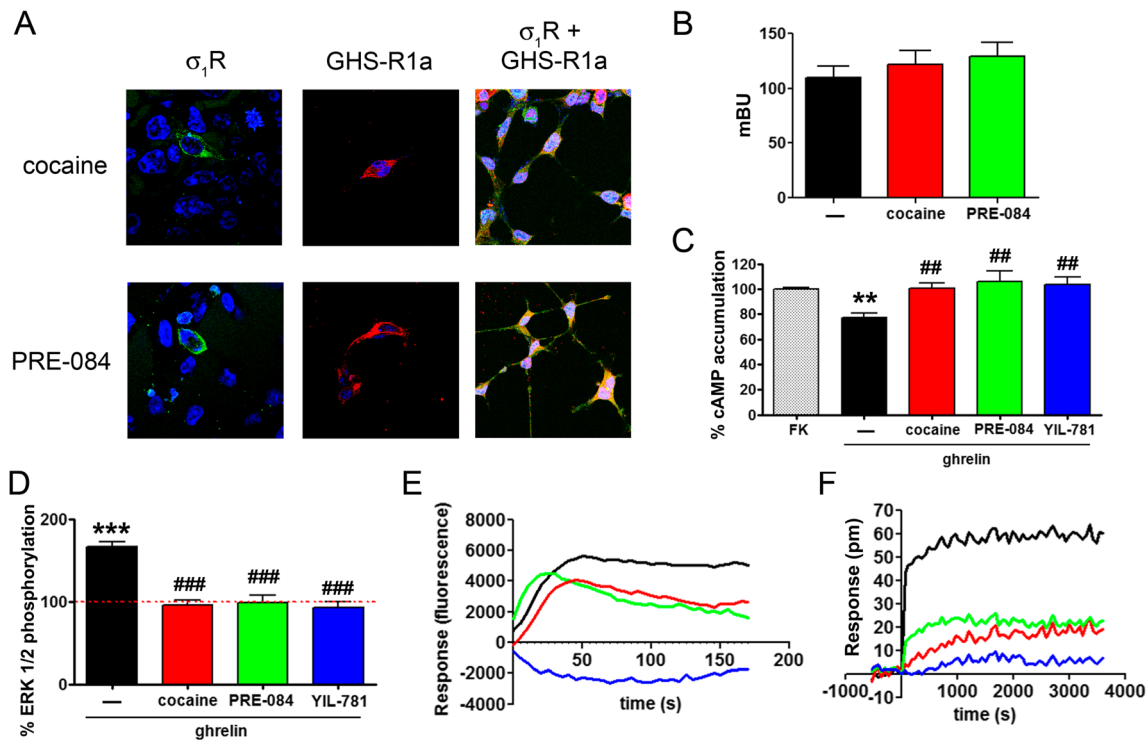


Fig. 3 Effects of cocaine on ghrelin-mediated signaling. **a** HEK-293T cells transfected with 0.75 μ g cDNA for σ_1 R-YFP, 1.66 μ g cDNA for GHS-R1a-Rluc, or both were treated with 30 μ M cocaine or 100 nM PRE-084, then were monitored by the YFP fluorescence (green) or using a monoclonal anti-Rluc primary antibody and a cyanine-3-conjugated secondary antibody (red). Colocalization is shown in yellow. Nuclei were stained with Hoechst (blue). Scale bar 10 μ m. **b** BRET in HEK-293T cells transfected with 0.075 μ g cDNA for σ_1 R-Rluc and 1.5 μ g cDNA for GHS-R1a-GFP² and treated with 30 μ M cocaine, 100 nM PRE-084, or vehicle for 30 min. Afterwards, the energy transfer signal was measured. Values are the mean \pm S.E.M. of seven different experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test did not show any significant effect of treatments versus control. **c–f** HEK-293T cells were transfected with 1.66 μ g GHS-R1a cDNA and 0.25 μ g GHS-R1b cDNA and treated with 30 μ M of cocaine (red), 100 nM of the σ_1 R agonist, PRE-084

(green), 2 μ M of the GHS-R1a antagonist, YIL-781 (blue), or vehicle (black). Cells were then treated with ghrelin 100 nM (in **e**), cells were treated with 0.5 μ M forskolin (FK). ERK1/2 phosphorylation (**d**) was analyzed using an AlphaScreen@SureFire® kit (Perkin Elmer). Fluorescence of the GCaMP6 sensor was used to monitor cytosolic calcium mobilization (**e**), and real-time label-free DMR tracings (**f**) representing the picometer shifts of reflected light wavelength were recorded in an EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Values are the mean \pm S.E.M. from eight to 11 different experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus forskolin (cAMP assays, **c**) or control (pERK1/2 assays, **d**), and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus ghrelin, ## p < 0.01 and ### p < 0.001

surface increased. Thus, cocaine and the σ_1 R-specific ligand PRE-084 are able to concomitantly affect co-expression of both receptors at the cell surface. Second, we evaluated the effect of cocaine and PRE-084 on the heteromerization of σ_1 R and GHS-R1a. A tendency to increased energy transfer (without reaching statistical significance) was observed in the presence of cocaine (30 μ M) or PRE-084 (100 nM) in HEK-293T cells transfected with 0.075 μ g cDNA for σ_1 R-Rluc and 1.5 μ g cDNA for GHS-R1a-GFP² (Fig. 3b).

Cocaine Inhibits GHS-R1a Signaling

We first evaluated the effect of cocaine and PRE-084 on GHS-R1a-mediated signaling by measuring cAMP levels. HEK-293T cells endogenously express σ_1 R, but do not express ghrelin receptors [37]. Moreover, it is known that low concentrations of GHS-R1b expression significantly

increase GHS-R1a signaling [21]. Thus, to analyze GHS-R1a signaling pathways in HEK-293T cells, we co-expressed GHS-R1a (1.66 μ g cDNA) with low amounts of GHS-R1b (0.25 μ g cDNA). Stimulation of these cells with ghrelin (100 nM) in the presence of forskolin (0.5 μ M) significantly decreased cAMP levels (Fig. 3c). This agrees with the previously reported coupling of ghrelin receptors with G_i (www.guidetopharmacology.org) [7]. The effect of ghrelin on forskolin-induced cAMP levels was completely blocked by pretreatment with the GHS-R1a selective antagonist YIL-781 (2 μ M) (Fig. 3c). Interestingly, when cells were treated with cocaine (30 μ M, 15 min) or the σ_1 R agonist (PRE-084, 100 nM, 15 min) prior to ghrelin stimulation, the decrease in cAMP levels was prevented to the extent similar to the one occurring with the GHS-R1a selective antagonist YIL-781 (Fig. 3c). This suggests that cocaine behaves as agonist of σ_1 R and inhibits GHS-R1a

signaling as efficiently as the GHS-R1a selective antagonist YIL-781 bound to the orthosteric binding site. Similar experiments were carried out in HEK-293T transfected with another class A GPCR. When the adenosine A₁R receptors were used instead of GHS-R1a, neither ghrelin, nor cocaine induced any effect (Supplementary Fig. 2A–B). Moreover, A₁ adenosine receptor expressing HEK-293T cells treated with a selective agonist (R-PIA, 100 nM) showed a significant decrease in cAMP and increase in MAPK phosphorylation that was abolished by the A₁ receptor antagonist (1 μM, DPCPX) but not by cocaine or PRE-084 (Supplementary Fig. 2C–D).

Measurement of ERK1/2 phosphorylation in HEK-293T cells transfected with GHS-R1a and GHS-R1b after stimulation with ghrelin shows an increase of 80% (Fig. 3d). Similarly to measurements of cAMP levels (Fig. 3c), the GHS-R1a selective antagonist YIL-781 and the σ₁R agonists cocaine and PRE-084 inhibited ghrelin effects (Fig. 3d). This indicates that cocaine and PRE-084 not only affect the α_i-dependent pathway, but also the βγ-dependent signaling. Moreover, a characteristic trace of intracellular calcium transient levels was obtained in HEK-293T cells expressing GHS-R1a, GHS-R1b, and σ₁R after activation with ghrelin (Fig. 3e). The calcium signal was abrogated by the selective ghrelin receptor antagonist and was reduced by cocaine and by PRE-084. To further test the inhibitory effect of agonist binding to σ₁R in GHS-R1a, we performed dynamic mass redistribution (DMR) recordings that measure the changes in the wavelength of light passing through cell monolayer [38]. Once again, the magnitude of the signaling by ghrelin significantly decreased in the presence of YIL-781, cocaine and PRE-084 (Fig. 3f). We can, thus, conclude that the GHS-R1a selective antagonist YIL-781, cocaine, and PRE-084 inhibited ghrelin effects, as measured by cAMP levels, ERK1/2 phosphorylation, and DMR signal.

Cocaine Inhibition of GHS-R1a Signaling Is Mediated by σ₁R

To check whether cocaine inhibition of ghrelin-induced signaling was due to its interaction with σ₁R, HEK-293T cells expressing GHS-R1a (1.66 μg cDNA) and GHS-R1b (0.25 μg cDNA) were transfected with a siRNA designed to knock down expression of σ₁R (3 μg siRNA). Cells incorporating siRNA responded to 100 nM of ghrelin in both forskolin-induced cAMP determination and ERK1/2 phosphorylation, with similar results to those in cells without siRNA (Fig. 4a, b). However, in the presence of siRNA, cocaine or PRE-084 had no effect on ghrelin-induced signals while pretreatment with YIL-781 blocked ghrelin-induced GHS-1a activation. Also, when HEK-293T cells expressing GHS-R1a were transfected with siRNA against

σ₁R, ghrelin induced a characteristic signal on calcium mobilization or on DMR recordings. Similarly, these stimulations were not affected by cocaine or PRE-084 pretreatment, while they were completely blocked by the ghrelin antagonist YIL-781 (Fig. 4c, d). These results show that cocaine effects on GHS-R1a receptor are mediated by σ₁R.

Disruption of the Heteromeric Complex Between σ₁R and GHS-R1a by the TM1 Interference Peptide Blocks the Effect of Cocaine on GHS-R1a Function

As proposed above from data using TAT-fused synthetic peptides, the single TM helix of σ₁R likely interacts with TMs 1 and 2 of GHS-R1a. Accordingly, we can hypothesize that addition of the TM1 interference peptide would abolish the effect of cocaine on GHS-R1a function. Thus, HEK-293T cells expressing GHS-R1a (1.66 μg cDNA) were treated during 4 h with 4 μM of TAT-TM1 (or TAT-TM7 as negative control). In agreement with our hypothesis, disruption of σ₁R-GHS-R1a heteromeric complex was achieved by TM1, but not by TM7 TAT peptides; in these experimental conditions in which TM1 peptide was present, only the GHS-R1a selective antagonist YIL-781 (1 μM) blocked ghrelin (100 nM) stimulation, whereas cocaine (30 μM) or PRE-084 (100 nM) did not display any effect on either cAMP levels (Fig. 4e, g) or DMR signals (Fig. 4f, h). These results demonstrate that disruption of the GHS-R1a-σ₁R interaction using TM1 alters the cocaine effect on ghrelin receptors, thus reinforcing the idea that cocaine modulates GHS-R1a receptor function via σ₁R.

Next, we attempted to provide insight into the mechanism by which cocaine binds to σ₁R and blocks GHS-R1a function. Our structural model predicts that a single protomer of GHS-R1a cannot simultaneously bind σ₁R (via the TM 1/2 interface) and G_i (supplementary Fig. S1); accordingly, σ₁R may impede G_i binding and, in consequence, GHS-R1a function. However, this does not seem reasonable due to the possible formation of a GHS-R1a homodimer in which one protomer binds G_i and the second protomer binds σ₁R (Fig. 2h). Notably, this model positions the cytoplasmic domain of one protomer of the σ₁R trimeric structure near the α-helical domain (αAH) of the G protein α-subunit (Fig. 2h). It has been shown that the mechanism for receptor-catalyzed nucleotide exchange in G proteins involves a large-scale opening of αAH, from the Ras domain, allowing GDP to freely dissociate [39]. This opening of αAH is not feasible in the presence of the σ₁R trimeric structure bound to TMs 1 and 2 of GHS-R1a. Modification of the GHS-R1a-σ₁R interaction, by inserting the TAT-fused TM1 peptide, would increase the distance between cytoplasmic domain of σ₁R and αAH, facilitating G_i function, and these were the results found in our assays.

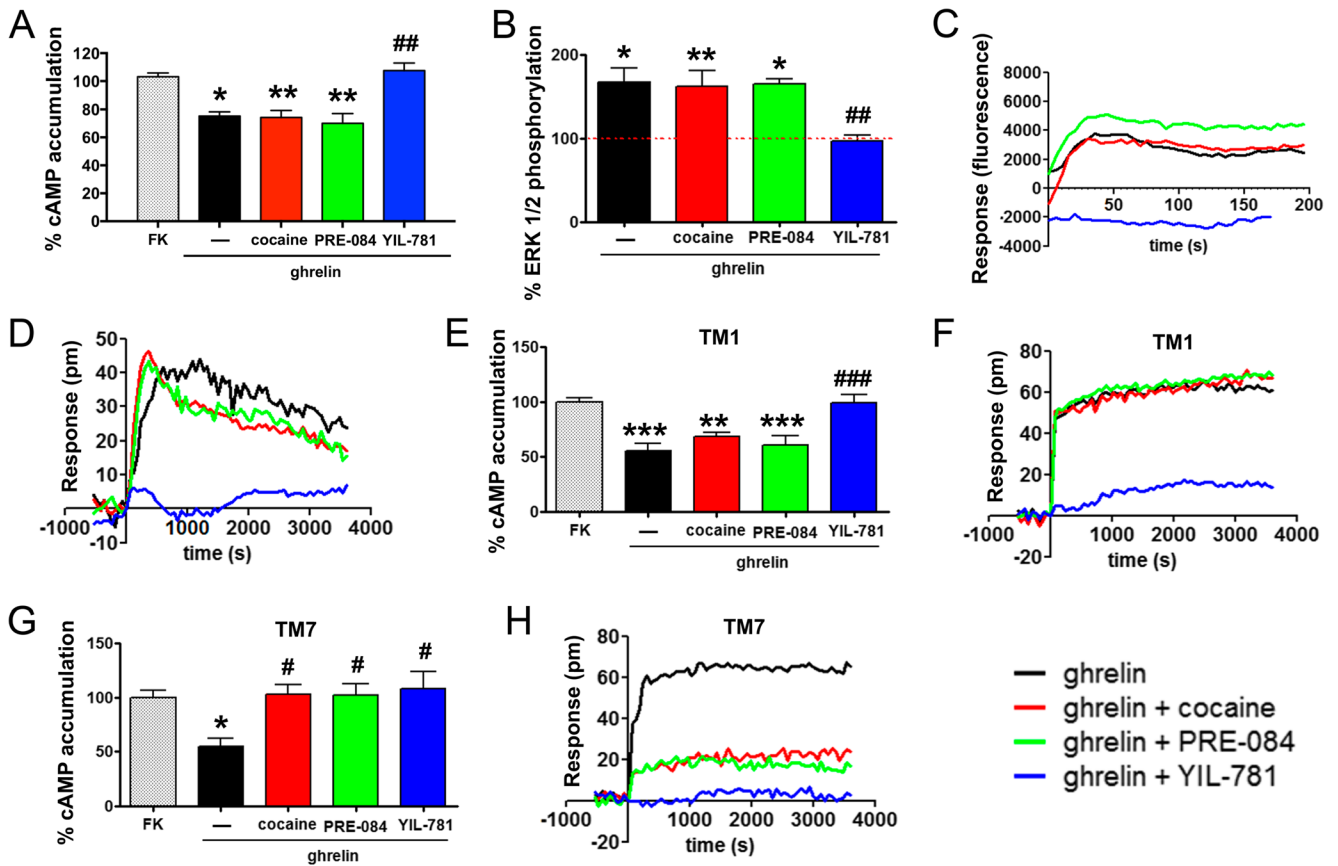


Fig. 4 Effects of cocaine on GHS-R1a signaling are dependent on σ_1 R expression. **a–d** HEK-293T cells were transfected with 1.66 μ g GHS-R1a cDNA, 0.25 μ g GHS-R1b cDNA, and 3 μ g siRNA for σ_1 R. These cells were treated with 30 μ M of cocaine (red), 100 nM of the σ_1 R agonist, PRE-084 (green), 2 μ M of the GHS-R1a antagonist, YIL-781 (blue), or vehicle (black) followed by 100 nM of ghrelin stimulation (in **a**), cells were treated with 0.5 μ M forskolin. cAMP levels (**a**), pERK1/2 (**b**), calcium ion (**c**), and DMR (**d**) signals were recorded. Values are the mean \pm S.E.M. from eight to 11 different experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus forskolin (cAMP assays, **a**) or control (pERK1/2 assays, **b**), * p < 0.05, ** p < 0.01, and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus

ghrelin, ### p < 0.01. **e–f** HEK-293T cells expressing GHS-R1a (0.5 μ g cDNA) were treated for 4 h with TM1 (**e, f**) or TM7 (**g, h**) TAT-peptides. Cells were subsequently treated with 30 μ M cocaine (red), 100 nM PRE-084 (green), 1 μ M YIL-781 (blue), or vehicle (black). Cells were then treated with 100 nM ghrelin (in **e** and **g**), cells were treated with 0.5 μ M forskolin. Traces representing DMR signal variation over time are represented in **f** and **h**. Values are the mean \pm S.E.M. of six different experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus forskolin, * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001, and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus ghrelin, # p < 0.05 and ### p < 0.001

Effect of Cocaine Treatment on a Cell Line and on Primary Cultures of Striatal Neurons

Most of the cocaine effects in the central nervous system (CNS) occur in the striatum [40, 41]. Consequently, we analyzed cocaine effects on GHS-R1a expressed in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line. Cells were transfected with cDNAs for GHS-R1a (1.66 μ g), GHS-R1b (0.25 μ g), and σ_1 R (0.75 μ g). The results were similar to those obtained in HEK-293T cells, i.e., cocaine and PRE-084 specifically blocked ghrelin action on cAMP levels and ERK1/2 phosphorylation (Fig. 5a, b). Pretreatment with the ghrelin receptor antagonist, YIL-781, also blocked ghrelin effects in neuroblastoma cells. Then, we moved to primary cultures of striatal neurons to

analyze in a more physiological environment the cocaine effects over GHS-R1a receptors. The in situ proximity ligation assay (PLA), which allows the identification of interactions between two proteins in close proximity (< 17 nm) [10, 42, 43] was used to identify GHS-R1a- σ_1 R complexes, detected as punctate red marks surrounding Hoechst-stained nuclei (Fig. 5a). In striatal primary cultures, 43% of cells presented red dots with two dots/cell-containing dots. However, when these cells were treated with 30 μ M cocaine for 30 min, the number of cells containing red dots and the ratio of dots/cell-containing dots increased significantly (54% of cells presented red dots with 3.2 dots/cell-containing dots). These results indicate that cocaine pretreatment increases GHS-R1a- σ_1 R complex formation in striatal primary cultures (Fig. 5a, b).

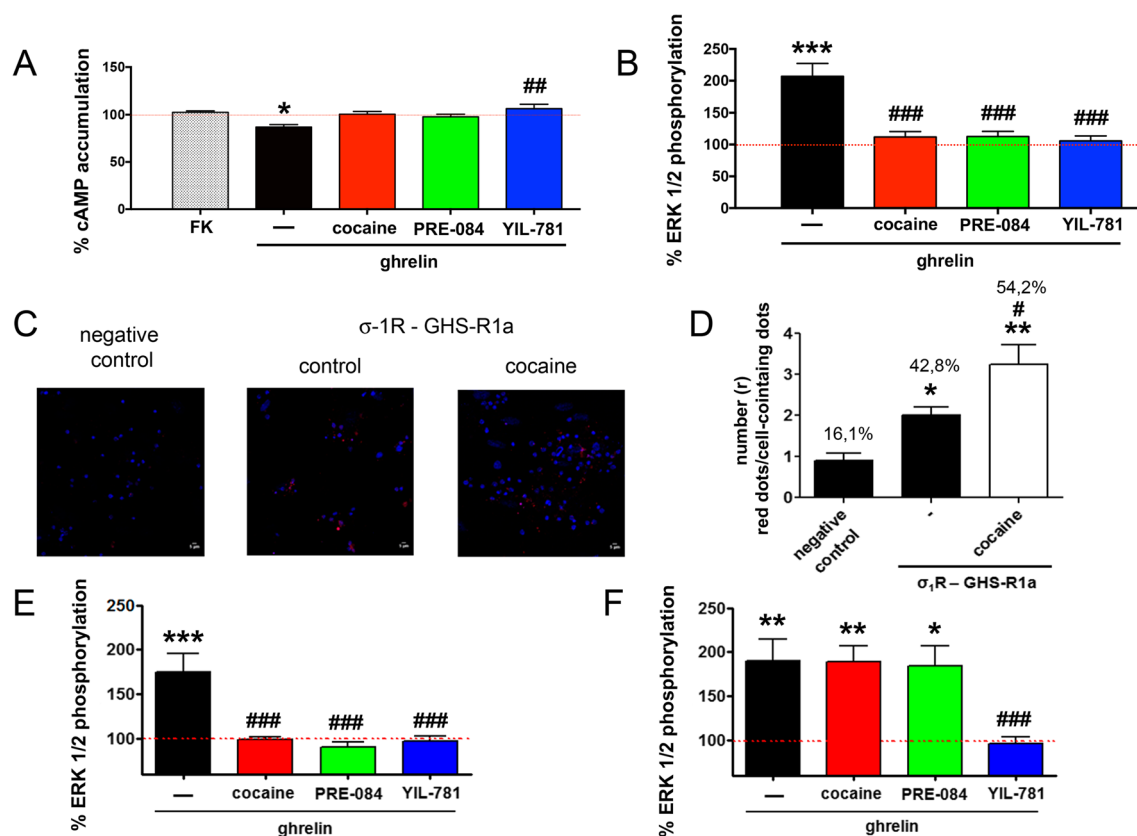


Fig. 5 Cocaine treatment inhibited GHS-R1a signaling in primary cultures of striatal neurons. **a, b** SH-SY5Y cells were transfected with cDNAs for GHS-R1a (1.66 μ g), GHS-R1b (0.25 μ g), and σ_1 R (0.75 μ g). Assays were performed in transfected cells treated with 30 μ M cocaine (red) cocaine, 100 nM of the σ_1 R agonist, PRE-084 (green), 2 μ M of the GHS-R1a antagonist, YIL-781 (blue), or vehicle (black) prior to 100 nM ghrelin addition. cAMP levels were determined after 15 min of 0.5 μ M forskolin treatment (**a**). ERK1/2 phosphorylation (**b**) was determined using an AlphaScreen@SureFire@ kit (Perkin Elmer). Values are \pm S.E.M. from five to six different experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus forskolin (cAMP assay) or versus control (ERK phosphorylation assay), * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001, and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus ghrelin, ## p < 0.01 and ### p < 0.001. In **c, d**, GHS-R1a- σ_1 R heteroreceptor complexes were identified in striatal primary cultures treated with 30 μ M cocaine, 100 nM PRE-084, or vehicle and detected by PLA (see "Methods") using a polyclonal anti- σ_1 R primary antibody (1/100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, US) and a polyclonal anti-ghrelin primary antibody (1/100, AbCam, Cambridge,

UK). Nuclei were labeled using Hoechst (1/100). **c** Representative confocal images showing GHS-R1a- σ_1 R complexes as red dots surrounding Hoechst-stained nuclei. Scale bar, 5 μ m. **d** Percentage of positive cells (containing one or more red dots in cells in five–six different fields), and number (r) of red dots/cell-containing dots in primary cultures of striatal neurons. One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus the negative control, * p < 0.05, ** p < 0.01, and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus the untreated cells, # p < 0.05. **e, f** Striatal primary cultures transfected (**f**) or not (**e**) with 3 μ g siRNA for σ_1 R were treated with 30 μ M cocaine (red), 100 nM of the σ_1 R agonist, PRE-084 (green), 2 μ M of the GHS-R1a antagonist, YIL-781 (blue), or vehicle (black) prior to 100 nM ghrelin addition. ERK1/2 phosphorylation (**e, f**) was analyzed using an AlphaScreen@SureFire@ kit (Perkin Elmer). Values are \pm S.E.M. from six to eight different experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus control, * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001, and one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus ghrelin, ### p < 0.001

Cocaine effects on GHS-R1a signaling were further analyzed in primary cultures of striatal neurons, both in cAMP level determination and in ERK1/2 phosphorylation assays. Cocaine and PRE-084 counteracted the ghrelin-induced GHS-R1a signaling in a similar way as the GHS-R1a-specific antagonist YIL-781 (Fig. 5c, d). Such effect of cocaine was related to σ_1 R modulation of GHS-R1a, as in striatal primary cultures treated with siRNA for σ_1 R, neither cocaine nor PRE-084 achieved any significant effect (Fig. 5e, f).

Effect of Cocaine Administration on GHS-R1a- σ_1 R Heteromer Expression in Striatal Sections from Naïve and Cocaine-Treated Animals

Following i.p. administration of 15 mg/kg cocaine for 1 (acute) or 14 (chronic) days, rats were sacrificed, and 30 μ m thick striatal sections were obtained from each group of animals and from vehicle-treated animals. The in situ proximity ligation assay (PLA) was used to identify GHS-R1a- σ_1 R heteroreceptor complexes (Fig. 6a). When striatal sections of

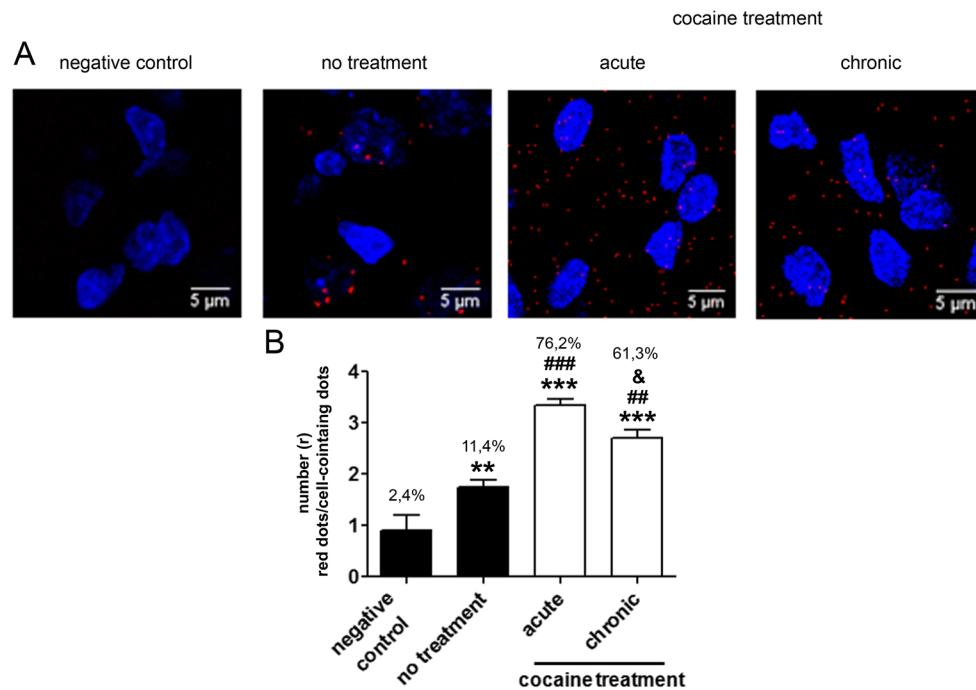


Fig. 6 Acute and chronic cocaine treatment increase the GHS-R1a- σ_1 R heteromer expression in the rat striatum. Male Sprague-Dawley rats were i.p. administrated with vehicle (control) or 15 mg/kg cocaine for 1 (acute) or 14 (chronic) days. To identify σ_1 -GHS-R1a complexes from each condition, rats were sacrificed and 30 μ m thick striatal sections were obtained and treated with a polyclonal anti- σ_1 R primary antibody (1/100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, US) and a polyclonal antighrelin primary antibody (1/100, AbCam, Cambridge, UK) in the presence of Hoechst (1/100) and then treated with the PLA probes (see “Methods”). Representative PLA confocal images showing GHS-R1a- σ_1 R complexes as red dots surrounding Hoechst-stained nuclei are shown

for each condition (Fig. 6a). Scale bar, 5 μ m. **b** Percentage of positive cells (containing one or more red dots; from cells in four–six different fields) and number (r) of red dots/cell-containing dots in rat striatal sections. One-way ANOVA followed by Dunnett’s *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus the negative control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, one-way ANOVA followed by Bonferroni’s *post hoc* test showed a significant effect of treatments versus the untreated cells, ### $p < 0.001$, and one-way ANOVA followed by Bonferroni’s *post hoc* test showed a significant effect of chronic treatment versus acutely treated sections, & $p < 0.05$

vehicle-treated animals were analyzed, it was observed that 11% of cells showed red dots with 1.6 dots/cell-containing dots (Fig. 6b), indicating that around 10% of striatal cells expressed GHS-R1a- σ_1 R complexes. Interestingly, in the case of the chronic treatment, the number of cells containing dots strongly increased to 61%, and also, the number of dots/cell-containing dots (2.7) was significantly higher compared to control cells. Remarkably, the cocaine acute treatment leads to values that were even higher than in the chronic condition (76% of cells containing dots and 3.2 dots/cell-containing dots). These results indicate that cocaine treatment modulated GHS-R1a- σ_1 R complex formation in striatal rat sections with a maximum increase in heteromer formation found in acute conditions (Fig. 6b).

Discussion

The endogenous ligand of σ_1 R remains unknown; however, synthetic agonists and antagonists are available. PRE-084 is a selective agonist due to its ability to dose-dependently dissociate σ_1 R from a binding immunoglobulin protein/78 kDa

glucose-regulated protein (BiP/GPR-78) [44]. Despite not being associated with a specific signaling machinery, σ_1 R operates via translocation to the plasma membrane and via protein-protein-mediated modulation of cell responses upon agonist activation [11]. The mechanism involves calcium signaling and ion channel activation [45] and, in addition, the regulation of GPCR function [11]. For instance, it has been shown that σ_1 R is involved in the negative control that glutamate N-methyl-D-aspartate acid receptors (NMDARs) exert on opioid antinociception [46]. Thus, σ_1 R antagonists would enhance antinociception and reduce neuropathic pain induced by μ -opioid receptors. Another remarkable example is the control of σ_1 R in the interaction between cannabinoid CB1 and NMDA receptors, whose functional unbalance constitutes a vulnerability factor for cannabis abuse, potentially precipitating schizophrenia [47]. Upon demonstrating that cocaine binds to σ_1 R even at doses attained at recreational use, σ_1 R is proposed to mediate locomotor activation [48, 49], seizures [18], drug sensitization [50], and reward actions [51, 52]. Reduction of σ_1 R levels by injection of antisense nucleotides results in attenuating the convulsive effects of the drug [53], whereas the action of σ_1 R agonists or antagonists exacerbates

or minimizes, respectively, cocaine effects [53–55]. Although activation of σ_1 R by agonists is also involved in the appetitive properties of cocaine [52], the underlying mechanism remains unknown. In this manuscript, we reveal for the first time that σ_1 Rs mediate the *hunger-suppressive* action of cocaine by interacting with orexigenic ghrelin receptors.

The nucleus accumbens, one of the structures that form the striatum, is part of the reward system. Activation of this system in response to food intake produces a pleasant sensation and other primordial needs for mammalian survival [56]. It should be noted that in these mesolimbic regions, GHS-R1a is co-expressed in neurons with cocaine-sensitive σ_1 R. From both mechanistic and molecular point of views, this report highlights an interaction between σ_1 R and GHS-R1a that is translated into a strong inhibition of ghrelin-induced GHS-R1a signaling, as measured by G protein-dependent (cAMP accumulation and calcium release assays) and partly/fully G protein-independent (MAPK phosphorylation and dynamic mass redistribution assays) signaling pathways. We have shown in transfected HEK-293T cells and in striatal primary cultures of neurons that pretreatment with the σ_1 R agonists cocaine or PRE-084 inhibits ghrelin-mediated signaling in a similar manner as the GHS-R1a antagonist YIL-781. This effect is mediated by σ_1 R, because, in σ_1 R-siRNA-treated cells, cocaine or PRE-084 had no effect on ghrelin-induced signals while the ghrelin receptor antagonist, YIL-781, maintained its effect.

Kotagale and collaborators [57] have described the potent orexigenic effects of neuropeptide Y (NPY), which was described in autoradiographic studies [58] as a possible endogenous ligand for a subpopulation of sigma receptors, thus linking the stimulation of sigma receptors with hunger. It turned out that the action of NPY on sigma receptors could not be reproduced, i.e., no high affinity binding of NPY to brain sigma receptors can be measured [59]. Our results show that cocaine binding to σ_1 R could counteract the feeling of hunger by a mechanism that excludes a direct competition between cocaine and NPY to interact with σ_1 R. The proposed formation of the σ_1 R-GHS-R1a interaction becomes even more important by the finding that heteromer expression is increased in both acute and chronic cocaine administration. However, the effect was more marked in acute conditions. In fact, striatal sections of Sprague-Dawley rats injected for 1 day with 15 mg/kg cocaine displayed threefold higher expression of σ_1 R-GHS-R1a heteromers than the control animals.

The structure of σ_1 R has traditionally considered to be formed by two TM helices. However, the recently released crystal structure of σ_1 R has shown homotrimers whose protomers contain a single TM domain and a C-terminal domain having a buried ligand-binding site [27]. We have proposed, from data using TAT-fused synthetic peptides together with BiFC assays, that this single TM helix of one σ_1 R molecule can be recognized by two different interacting interfaces

of the 7TM bundle of GHS-R1a, either by interfaces formed by TMs 1 and 2 or TMs 5 and 6. Oligomerization of GPCRs via a particular interface likely guides the interacting interface in the σ_1 R. The same TM helices may be involved in interactions of σ_1 R with other GPCRs. In the particular case of σ_1 R-GHS-R1a, due to the formation of the GHS-R1a-GHS-R1b heterotetramer via TM 4/5 and TM 5/6 interfaces, σ_1 R can interact with GHS-R1a via the free TM 1/2 interface. We would like to speculate that, because σ_1 R is a homotrimer, the two additional TM helices can bind two additional GHS-R1a-GHS-R1b heterotetramers, suggesting the possible occurrence of higher order complexes formed by GHS-R1a and σ_1 R, produced by successive combination of these units. These clusters may form specialized machineries of σ_1 R-mediated signaling.

Funding Information This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Innovation and Competitiveness (MINECO Ref. No. BFU2015-664405-R, SAF2015-74627-JIN and SAF2016-77830-R; they may include FEDER European Union funds).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interests.

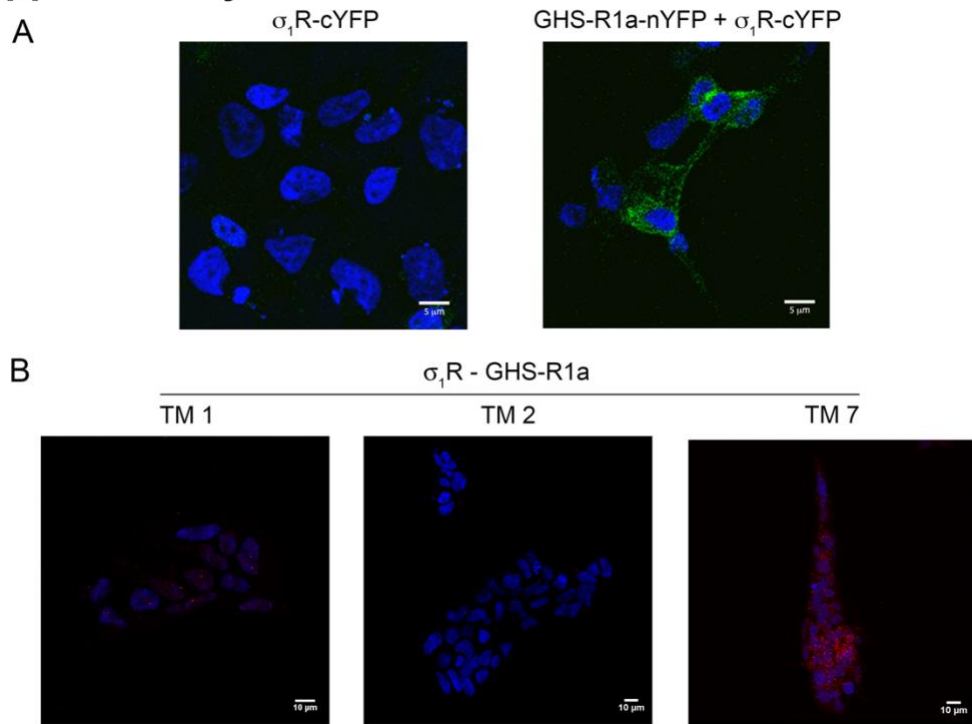
References

- Howick K, Griffin B, Cryan J, Schellekens H (2017) From belly to brain: targeting the ghrelin receptor in appetite and food intake regulation. *Int J Mol Sci* 18:273. <https://doi.org/10.3390/ijms18020273>
- Cassidy RM, Tong Q (2017) Hunger and satiety gauge reward sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:104. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00104>
- Conn PM, Bowers CY (1996) A new receptor for growth hormone-release peptide. *Science* 273:923–920
- Geelissen SME, Beck IME, Darras VM, Kühn ER, van der Geyten S (2003) Distribution and regulation of chicken growth hormone secretagogue receptor isoforms. *Gen Comp Endocrinol* 134:167–174
- Chan C-B, Cheng CH (2004) Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *Mol Cell Endocrinol* 214:81–95. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.020>
- Mary S, Fehrentz J-A, Damian M, Gaibelet G, Orsel H, Verdié P, Mouillac B, Martinez J et al (2013) Heterodimerization with its splice variant blocks the ghrelin receptor 1a in a non-signaling conformation: a study with a purified heterodimer assembled into lipid discs. *J Biol Chem* 288:24656–24665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.453423>
- Navarro G, Aguinaga D, Angelats E, Medrano M, Moreno E, Mallol J, Cortés A, Canela EI et al (2016) A significant role of the truncated ghrelin receptor GHS-R1b in ghrelin-induced signaling in neurons. *J Biol Chem* 291:13048–13062. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.715144>
- Chow KBS, Sun J, Chu KM et al (2012) The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic

- reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol* 348:247–254. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.034>
9. Damian M, Mary S, Maingot M, M'Kadmi C, Gagne D, Leyris JP, Denoyelle S, Gaibelet G et al (2015) Ghrelin receptor conformational dynamics regulate the transition from a preassembled to an active receptor:Gq complex. *Proc Natl Acad Sci* 112:1601–1606. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414618112>
 10. Borroto-Escuela DO, Brito I, Romero-Fernandez W, di Palma M, Oflijan J, Skieterska K, Duchou J, van Craenenbroeck K et al (2014) The G protein-coupled receptor heterodimer network (GPCR-HetNet) and its hub components. *Int J Mol Sci* 15:8570–8590. <https://doi.org/10.3390/ijms15058570>
 11. Su TP, Su TC, Nakamura Y, Tsai SY (2016) The Sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol Sci* 37:262–278. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.01.003>
 12. Corbera J, Vaño D, Martínez D, Vela JM, Zamanillo D, Dordal A, Andreu F, Hernandez E et al (2006) A medicinal-chemistry-guided approach to selective and druglike sigma-1 ligands. *ChemMedChem* 1:140–154. <https://doi.org/10.1002/cmde.200500034>
 13. Mei J, Pasternak GW (2002) Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 300:1070–1074
 14. Sun H, Shi M, Zhang W, Zheng YM, Xu YZ, Shi JJ, Liu T, Gunosewoyo H et al (2016) Development of novel alkoxyisoxazoles as sigma-1 receptor antagonists with antinociceptive efficacy. *J Med Chem* 59:6329–6343. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00571>
 15. McCracken KA, Bowen WD, de Costa BR, Matsumoto RR (1999) Two novel sigma receptor ligands, BD1047 and LR172, attenuate cocaine-induced toxicity and locomotor activity. *Eur J Pharmacol* 370:225–232
 16. Skuza G (1999) Effect of sigma ligands on the cocaine-induced convulsions in mice. *Pol J Pharmacol* 51:477–483
 17. Lever JR, Ferguson-Cantrell EA, Watkinson LD, Carmack TL, Lord SA, Xu R, Miller DK, Lever SZ (2016) Cocaine occupancy of sigma₁ receptors and dopamine transporters in mice. *Synapse* 70:98–111. <https://doi.org/10.1002/syn.21877>
 18. Matsumoto RR, Hewett KL, Pouw B, Bowen WD, Husbands SM, Cao JJ, Hauck Newman A (2001) Rimcazole analogs attenuate the convulsive effects of cocaine: correlation with binding to sigma receptors rather than dopamine transporters. *Neuropharmacology* 41:878–886. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00116-2)
 19. Marcellino D, Navarro G, Sahlholm K, Nilsson J, Agnati LF, Canela EI, Lluís C, Århem P et al (2010) Cocaine produces D2R-mediated conformational changes in the adenosine A(2A)R-dopamine D2R heteromer. *Biochem Biophys Res Commun* 394:988–992. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.104>
 20. Navarro G, Moreno E, Bonaventura J, Brugarolas M, Farré D, Aguinaga D, Mallol J, Cortés A et al (2013) Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. *PLoS One* 8:e61245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061245>
 21. Navarro G, Quiroz C, Moreno-Delgado D, Sierakowiak A, McDowell K, Moreno E, Rea W, Cai NS et al (2015) Orexin-corticotropin-releasing factor receptor heteromers in the ventral tegmental area as targets for cocaine. *J Neurosci* 35:6639–6653. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4364-14.2015>
 22. Cordomi A, Navarro G, Aymerich MS, Franco R (2015) Structures for G-protein-coupled receptor tetramers in complex with G proteins. *Trends Biochem Sci* 40:548–551. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.007>
 23. Schmidt HR, Zheng S, Gurpinar E, Koehl A, Manglik A, Kruse AC (2016) Crystal structure of the human σ 1 receptor. *Nature* 532:527–530. <https://doi.org/10.1038/nature17391>
 24. Hradsky J, Mikhaylova M, Karpova A, Kreutz MR, Zuschratter W. Super-resolution microscopy of the neuronal calcium-binding proteins Calneuron-1 and Caldendrin. *Methods Mol Biol*. 2013;963: 147–69. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-230-8_10
 25. Chen T.-W, Wardill T.J, Sun Y, Pulver S.R, Renninger S.L, Baohan A, Schreiter E.R, Kerr R.A et al (2013), Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499: 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
 26. Liu J, Yu B, Orozco-Cabal L, Grigoriadis DE, Rivier J, Vale WW, Shinnick-Gallagher P, Gallagher JP (2005) Chronic cocaine administration switches corticotropin-releasing Factor2 receptor-mediated depression to facilitation of glutamatergic transmission in the lateral septum. *J Neurosci* 25:577–583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4196-04.2005>
 27. Schmidt HR, Zheng S, Gurpinar E, Koehl A, Manglik A, Kruse AC (2016) Crystal structure of the human σ 1 receptor. *Nature* 532:527–530. <https://doi.org/10.1038/nature17391>
 28. Eglhoff P, Hillenbrand M, Klenk C, Batyuk A, Heine P, Balada S, Schlinkmann KM, Scott DJ et al (2014) Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 111:E655–E662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317903111>
 29. Krumm BE, White JF, Shah P, Grisshammer R (2015) Structural prerequisites for G-protein activation by the neurotensin receptor. *Nat Commun* 6:7895. <https://doi.org/10.1038/ncomms8895>
 30. Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y et al (2011) Crystal structure of the [bgr]2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477: 549–555. <https://doi.org/10.1038/nature10361>
 31. Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR (1997) Structure of RGS4 bound to ALF4-activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 89:251–261
 32. Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Mathiesen JM, Sunahara RK, Pardo L, Weis WI et al (2012) Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 485: 321–326. <https://doi.org/10.1038/nature10954>
 33. van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, Melquiond ASJ, van Dijk M et al (2016) The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *J Mol Biol* 428:720–725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>
 34. Ng GYK, O'Dowd BF, Lee SP et al (1996) Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 227:200–204. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1489>
 35. Hebert TE, Moffett S, Morello JP, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M (1996) A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *J Biol Chem* 271:16384–16392
 36. Maurice T, Romieu P (2004) Involvement of the sigma1 receptor in the appetitive effects of cocaine. *Pharmacopsychiatry* 37(Suppl 3): S198–S207. <https://doi.org/10.1055/s-2004-832678>
 37. Navarro G, Moreno E, Aymerich M, Marcellino D, McCormick PJ, Mallol J, Cortes A, Casado V et al (2010) Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18676–18681. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008911107>
 38. Grundmann M, Kostenis E (2015) Holistic methods for the analysis of cNMP effects. In: *Handb. Exp. Pharmacol.* pp 339–357
 39. Dror RO, Mildorf TJ, Hilger D, Manglik A, Borhani DW, Arlow DH, Philippsen A, Villanueva N et al (2015) SIGNAL TRANSDUCTION. Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science* 348:1361–1365. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5264>
 40. Joffe ME, Grueter BA (2016) Cocaine experience enhances thalamo-accumbens N-methyl-D-aspartate receptor function. *Biol Psychiatry* 80:671–681. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.04.002>

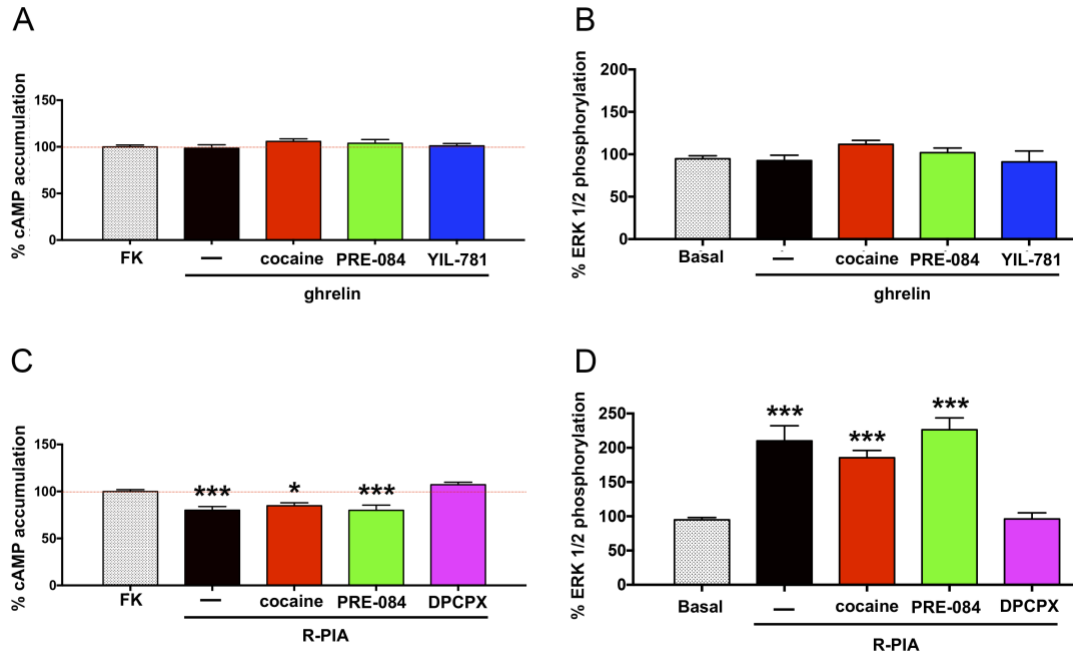
41. Borroto-Escuela DO, Narváez M, Wydra K, Pintsuk J, Pinton L, Jimenez-Beristain A, di Palma M, Jastrzębska J et al (2017) Cocaine self-administration specifically increases A2AR-D2R and D2R-sigma1R heteroreceptor complexes in the rat nucleus accumbens shell. Relevance for cocaine use disorder. *Pharmacol Biochem Behav* 155:24–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.03.003>
42. Trifilieff P, Rives M-L, Urizar E, Piskorowski R, Vishwasrao H, Castrillon J, Schmauss C, Slättman M et al (2011) Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* 51:111–118. <https://doi.org/10.2144/000113719>
43. Fuxe K, Borroto-Escuela DO, Ciruela F, Guidolin D, Agnati LF (2014) Receptor-receptor interactions in heteroreceptor complexes: a new principle in biology. Focus on their role in learning and memory. *Neurosci Discov* 2:6
44. Hayashi T, Su T-P (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell* 131:596–610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036>
45. Wu Z, Bowen WD (2008) Role of sigma-1 receptor C-terminal segment in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activation: constitutive enhancement of calcium signaling in MCF-7 tumor cells. *J Biol Chem* 283:28198–28215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802099200>
46. Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Herrero-Labrador R, Martínez-Murillo R, Merlos M, Vela JM, Garzón J. The σ_1 receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Apr 1;22(10):799–818. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5993>
47. Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Herrero-Labrador R, Burgueño J, Zamanillo D, Garzón J (2014) The calcium-sensitive Sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: implications in antinociception and psychotic diseases. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:1–13. <https://doi.org/10.1017/S1461145714000029>
48. Menkel M, Terry P, Pontecorvo M, Katz JL, Witkin JM (1991) Selective sigma ligands block stimulant effects of cocaine. *Eur J Pharmacol* 201:251–252
49. Barr JL, Deliu E, Brailoiu GC, Zhao P, Yan G, Abood ME, Unterwald EM, Brailoiu E (2015) Mechanisms of activation of nucleus accumbens neurons by cocaine via sigma-1 receptor-inositol 1,4,5-trisphosphate-transient receptor potential canonical channel pathways. *Cell Calcium* 58:196–207. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.05.001>
50. Ujike H, Kuroda S, Otsuki S (1996) Sigma receptor antagonists block the development of sensitization to cocaine. *Eur J Pharmacol* 296:123–128. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00693-1](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00693-1)
51. Romieu P, Martin-Fardon R, Maurice T (2000) Involvement of the sigma1 receptor in the cocaine-induced conditioned place preference. *Neuroreport* 11:2885–2888
52. Romieu P, Phan VL, Martin-Fardon R, Maurice T (2002) Involvement of the sigma(1) receptor in cocaine-induced conditioned place preference: possible dependence on dopamine uptake blockade. *Neuropsychopharmacology* 26:444–455. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00391-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00391-8)
53. Matsumoto RR, McCracken KA, Pouw B et al (2002) Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel ligands and antisense oligodeoxynucleotides. *Neuropharmacology* 42:1043–1055
54. Matsumoto RR, Liu Y, Lerner M, Howard EW, Brackett DJ (2003) Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur J Pharmacol* 469:1–12
55. Matsumoto RR, Gilmore DL, Pouw B, Bowen WD, Williams W, Kausar A, Coop A (2004) Novel analogs of the σ receptor ligand BD1008 attenuate cocaine-induced toxicity in mice. *Eur J Pharmacol* 492:21–26. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.03.037>
56. Kim HF, Hikosaka O (2015) Parallel basal ganglia circuits for voluntary and automatic behaviour to reach rewards. *Brain* 138:1776–1800. <https://doi.org/10.1093/brain/awv134>
57. Kotagale NR, Upadhy M, Hadole PN, Kokare DM, Taksande BG (2014) Involvement of hypothalamic neuropeptide Y in pentazocine induced suppression of food intake in rats. *Neuropeptides* 48:133–141. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2014.02.003>
58. Roman FJ, Pascaud X, Duffy O, Vauche D, Martin B, Junien JL (1989) Neuropeptide Y and peptide YY interact with rat brain sigma and PCP binding sites. *Eur J Pharmacol* 174:301–302
59. Tam SW, Mitchell KN (1991) Neuropeptide Y and peptide YY do not bind to brain sigma and phencyclidine binding sites. *Eur J Pharmacol* 193:121–122

Supplementary 1



Effect of interfering peptides on the σ_1 R-GHS-R1a expression in HEK-293 T cells. Panel A: BiFC complementation experiments were performed in HEK-293 T cells transfected with 0.75 μ g cDNA for GHS-R1a-nYFP and 0.75 μ g cDNA for σ_1 R-cYFP (right panel). Fluorescence due to reconstituted YFP was detected in a Leica SP2 microscope. Nuclei were stained with Hoechst (1/100). As negative control (left panel), BiFC complementation experiments were performed in HEK-293 T cells transfected only with 0.75 μ g cDNA for σ_1 R-cYFP. Scale bar 5 μ m. Panel B: PLA assays in HEK-293 T cells expressing σ_1 R (0.75 μ g of plasmid) and GHS-R1a (1.66 μ g of plasmid) treated for 4 h with TM1, TM2 or TM7 TAT peptides prior to incubation with a polyclonal anti- σ_1 R primary antibody (1/100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, US) and a polyclonal anti-ghrelin primary antibody (1/100, AbCam, Cambridge, UK). Nuclei were labeled using Hoechst (1/100). GHS-R1a- σ_1 R complexes are shown as red dots surrounding Hoechst-stained nuclei. Scale bar 10 μ m. (GIF 283 kb).

Supplementary 2



Effects of cocaine on A_1 adenosine receptor-mediated signaling. In A-D, HEK-293 T cells were transfected with 1 μ g of cDNA for A_1R and 0.75 μ g cDNA for σ_1R -YFP and treated with 30 μ M of cocaine (red), 100 nM of the σ_1R agonist, PRE-084 (green), 2 μ M of the GHS-R1a antagonist, YIL-781 (blue), (A,B) or the A_1R antagonist (1 μ M DPCPX, pink) (C,D) or vehicle (black). Cells were then treated with 100 nM ghrelin (A,B) or the A_1R agonist (100 nM R-PIA). In panels A and C, cells were treated with 0.5 μ M forskolin (FK) prior to cAMP level determination. ERK1/2 phosphorylation (B and D) was analyzed using an AlphaScreen®SureFire® kit (Perkin Elmer). Values are the mean \pm S.E.M. from 6 to 8 different experiments. One-way ANOVA followed by Dunnett's *post-hoc* test showed a significant effect of treatments versus forskolin (cAMP assays, panel A, C) or control (pERK1/2 assays, panel B, D), * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$. (GIF 114 kb



3.3. Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: structural and functional properties.

Mireia Casanovas^{a,b}, Mireia Jiménez-Rosés^c, Arnau Cordoní^c, Alejandro Lillo^d, Ignaci Vega-Quiroga^e, Joan Izquierdo^a, Mireia Medrano^a, Katia Gysling^e, Leonardo Pardo^c, Gemma Navarro^{b,d*} y Rafael Franco^{a,b*}.

*Estos autores han tenido una contribución igual en este trabajo

^a Department Biochemistry and Molecular Biomedicine. School of Biology. University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Centro de Investigación en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

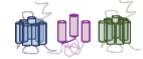
^c Laboratory of Computational Medicine, Biostatistics Unit, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain

^d Department Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^e Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

Manuscrito publicado en la revista *Addiction Biology* (2021) e13017.
<https://doi.org/10.1111/adb.13017>




El consumo de cocaína no solo produce un aumento de los niveles extracelulares de dopamina, sino que también activa a los receptores sigma 1 (σ_1R), que a su vez regulan la función del receptor orexinérgico de grelina (GHS-R1a). Usando técnicas biofísicas y de complementación molecular en presencia de péptidos de interferencia, en este trabajo, hemos identificado la interacción ente los receptores de dopamina D_1 (D_1R), GHS-R1a y σ_1 . El efecto de la cocaína en la funcionalidad del complejo de receptores D_1 -GHS-1a- σ_1 ha sido analizado midiendo los niveles de los segundos mensajeros AMPc y Ca^{2+} . El efecto de la administración aguda o crónica de cocaína en la expresión del complejo de los receptores ha sido analizado mediante ensayos de ligación por proximidad. Además, se han usado procedimientos *in silico* para construir un modelo molecular. Tras la identificación de la interacción del protómero y de la funcionalidad del nuevo complejo de receptores descrito, se ha propuesto un modelo estructural único para el complejo macromolecular formado por σ_1R , D_1R y GHS-R1a. La funcionalidad de este complejo, capaz de acoplarse tanto a una proteína G_s como a una proteína G_q , está afectada por la unión de la cocaína a σ_1R , tal y como se confirma en los resultados obtenidos de los experimentos realizados utilizando muestras de ratón $\sigma_1R^{-/-}$. La



3. Resultados

expresión del complejo macromolecular está diferentemente afectada después de una administración aguda o crónica de cocaína en un modelo de rata Sprague Dawley. La construcción del modelo 3D es consistente con los datos bioquímicos y biofísicos, así como con los datos estructurales disponibles. El complejo formado por σ_1 R, D₁R y GHS-R1a constituye una unidad funcional que es alterada tras la unión de la cocaína a σ_1 R. De forma remarcable, el heterómero puede unirse simultáneamente a dos proteínas G, permitiendo de esta manera a la dopamina promover la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico y a la grelina acumular AMPc intracelular. La acción anoréxica de la cocaína está mediada por dicho complejo cuya expresión es más elevada después de un régimen agudo que de un régimen crónico de consumo de cocaína.

Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: Structural and functional properties

Mireia Casanovas^{1,2}  | Mireia Jiménez-Rosés³  | Arnau Cordoní³ |
Alejandro Lillo⁴ | Ignacio Vega-Quiroga⁵ | Joan Izquierdo¹ | Mireia Medrano^{1,6} |
Katia Gysling⁵ | Leonardo Pardo³ | Gemma Navarro^{2,4} | Rafael Franco^{1,2} 

¹Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, School of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Laboratory of Computational Medicine, Biostatistics Unit, Faculty of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Chile, Santiago, Chile

⁶Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis and Drug Information, Center for Neurosciences, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium

Correspondence

Rafael Franco, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, University of Barcelona, Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain.
Email: rfranco@ub.edu; rfranco123@gmail.com

Present address

Mireia Jiménez-Rosés, Centre of Membrane Proteins and Receptors (COMPARE), University of Birmingham and University of Nottingham, Midlands, UK and Division of Physiology, Pharmacology & Neuroscience, School of Life Sciences, University of Nottingham, Nottingham, NG7 2UH, UK.

Funding information

Regional Catalanian Government, Grant/Award Number: 2017 SGR 1497; Spanish

Abstract

Cocaine not only increases brain dopamine levels but also activates the sigma₁ receptor (σ_1R) that in turn regulates orexigenic receptor function. Identification of interactions involving dopamine D₁ (D₁R), ghrelin (GHS-R_{1a}), and σ_1 receptors have been addressed by biophysical techniques and a complementation approach using interfering peptides. The effect of cocaine on receptor functionality was assayed by measuring second messenger, cAMP and Ca²⁺, levels. The effect of acute or chronic cocaine administration on receptor complex expression was assayed by in situ proximity ligation assay. In silico procedures were used for molecular model building. σ_1R KO mice were used for confirming involvement of this receptor. Upon identification of protomer interaction and receptor functionality, a unique structural model for the macromolecular complex formed by σ_1R , D₁R, and GHS-R_{1a} is proposed. The functionality of the complex, able to couple to both Gs and Gq proteins, is affected by cocaine binding to the σ_1R , as confirmed using samples from $\sigma_1R^{-/-}$ mice. The expression of the macromolecular complex was differentially affected upon acute and chronic cocaine administration to rats. The constructed 3D model is consistent with biochemical, biophysical, and available structural data. The σ_1R , D₁R, and GHS-R_{1a} complex constitutes a functional unit that is altered upon cocaine binding to the σ_1R . Remarkably, the heteromer can simultaneously couple to two G proteins, thus allowing dopamine to signal via Ca²⁺ and ghrelin via cAMP. The anorexic action of cocaine is mediated by such complex whose expression is higher after acute than after chronic administration regimens.

KEYWORDS

anorexia, cocaine addiction, dopamine D₁ receptors, in silico modeling, sigma₁ receptors

Gemma Navarro and Rafael Franco have equal contribution.

Ministry of Science and Innovation, Grant/
Award Numbers: SAF2015-74627-JIN,
SAF2016-77830-R, BFU2015-64405-R

1 | INTRODUCTION

Dopaminergic neurotransmission is key in almost any central process, from motor control to cognition. Dopamine receptor expression in the reward areas of the brain is subject to variations due to a variety of inputs. Actually, dopamine is considered today the *feel-good* neurotransmitter. The so-called reward deficiency syndrome was among the first conditions leading to establish a link between dopamine homeostasis in the central nervous system (CNS) and a feeling of satisfaction. Patients with the syndrome are prone to addiction, not only to drug seeking and consumption but to relapse. Modern imaging techniques have confirmed that the most affected region following drug consumption is the mesocorticolimbic area.^{1,2} About 20 years ago, another syndrome was discovered within parkinsonian patients undergoing a dopamine-replacement therapy. It consisted of addiction, especially evident in gambling and sport betting.^{1,3,4} More recent evidence has linked excess dopamine action in reward areas to almost any kind of addiction.^{5,6} In addition, it has been proposed that activation of the dopamine D₁ receptor (D₁R) in neurons within the *nucleus accumbens* is directly involved in reward, learning and in drug addiction.⁷

Five dopamine receptors have been identified, all of which are members of the superfamily of G protein-coupled receptors (GPCRs). D₁ and D₅ have been classified as D₁-like and couple to heterotrimeric G_s proteins. Ligand binding induces increases in cAMP concentration, protein kinase A (PKA) activation, and protein phosphorylation, integrating neuronal connectivity in CNS via regulation of dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein (DARPP-32) activity. D₂, D₃, and D₄ are considered as D₂-like receptors and couple to heterotrimeric G_i proteins. They induce decreases in cAMP intracellular concentration, PKA deactivation, and DARPP-32 dephosphorylation. The most studied receptors are those heavily expressed in the striatum that participate in motor control. Striatal projection neurons of the direct pathway, that is, directly arriving to the thalamus, almost exclusively express D₁-like receptors, whereas striatal projection neurons of the indirect pathway, that is, innervating the pallidus, predominantly express D₂-like receptors.

Cocaine inhibition of the dopamine transporter was the first finding that linked alteration of dopaminergic neurotransmission to the consumption of this drug of abuse.^{8,9} The marked increase of the extracellular concentration of dopamine in various regions of the brain leads to sensitization of dopamine receptors. Cocaine binds the sigma₁ receptor (σ_1 R), which is attracting interest for its potential as a therapeutic target in neuropathic pain,¹⁰⁻¹² although its physiological role remains unknown. From the recently elucidated 3D structures^{13,14} we now know that the protein contains only one TM helix and forms homotrimers. Interestingly, cocaine can affect dopaminergic neurotransmission by interacting with the σ_1 R. Different laboratories have provided evidence of altered D₁R and D₂R functionality due to

cocaine binding to σ_1 R and subsequent allosteric effect on dopamine receptor function.¹⁵⁻²³ σ_1 R and D₁R interact in heterotopic fashion, and cocaine binding to σ_1 R potentiates D₁R-mediated cAMP production while counteracting D₁R-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway.²⁴ Those results were the first to detect interactions that are instrumental in mediating the behavioral effects of cocaine and provided new perspectives to address the molecular basis of cocaine addiction.

For centuries, and even today, chewing coca leaves has been used to endure in physical activities while suppressing hunger sensation. The so-called hunger hormone, ghrelin, is one of the main players in centrally activating the circuits that regulate food consumption. For years, the relationship between cocaine consumption and hunger suppression has been elusive. Recently, we have demonstrated that the interaction of cocaine with σ_1 R regulates the function of ghrelin GHS-R_{1a} receptors. We showed, in a heterologous system but also in primary cultures of neurons, that cocaine produced the same effect as the selective GHS-R_{1a} antagonist YIL781, that is, suppressing ghrelin action.²⁵ This finding constitutes a novel piece in the puzzle of the events linking consummatory behaviors to cocaine addiction.

In the present report, we show that σ_1 R, D₁R, and GHS-R_{1a} form a macromolecular complex whose functionality can be modulated by cocaine binding to σ_1 R. We propose a model of the complex consistent with biochemical, biophysical, and structural data. Complex expression was also investigated in animals treated with cocaine in both acute and chronic administration regimens. The region targeted in our study has been the striatum due to its high dopaminergic input and its key involvement in the circuitry for reward and decision-making.²⁶⁻²⁸ These results here presented help to understand the involvement of σ_1 R in the cocaine mechanism of action suppressing hunger sensation.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Reagents

Cocaine hydrochloride for culture experiments was provided by La Agencia Española de Medicamento (ref. no. #2003C00220), whereas cocaine hydrochloride for rat in vivo administration was provided to Dr. K. Gysling by the US National Institute on Drug Abuse. SKF81297, ghrelin, SCH23390, and YIL781 were purchased from Tocris (Bristol, UK). The dose for in vitro assays is assumed to attain the brain of a consumer upon acute nasal administration; there is a direct transport of the drug from the nasal cavity to the brain.²⁹ Pertussis toxin (PTX) and cholera toxin (CTX) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and the Gq inhibitor YM254890 was obtained from Focus Biomolecules (Plymouth Meeting, PA, USA).

2.2 | Peptides

Disrupting peptides were synthesized by the proteomics facility of the University Pompeu Fabra. Peptides contained the GRKKRRQRRR sequence of human immunodeficiency virus (HIV) transactivator of transcription (TAT) protein fused to sequences similar to those of the transmembrane (TM) regions for the human GHS-R_{1a} (TM1–TM7) or the human D₁R (TM5–TM7). Since TAT binds to the phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate found on the inner surface of the membrane, the GRKKRRQRRR sequence was placed in the intracellular end of each TM domain to obtain the N-to-C orientation necessary for proper membrane insertion. The degree of purity was >95%. Sequences are indicated in Table S1.

2.3 | Fusion proteins and expression vectors

cDNAs for human versions of A_{2A}, D₁, GABA_B, GHS-R_{1a}, and σ_1 receptors lacking the stop codon were obtained by PCR and subcloned to Rluc-containing vector (pRluc-N1; PerkinElmer, Waltham, MA, USA), the enhanced yellow fluorescent protein-containing vector (pEYFP-N1; Clontech, Heidelberg, Germany), the GFP²-containing vector (p-GFP²; Packard BioScience, USA) or to pcDNA3.1 nVenus and pcDNA3.1 cVenus using sense and antisense primers harboring unique restriction sites for HindIII and BamHI to generate GABA_B-Rluc, D₁R-YFP, D₁R-nYFP, D₁R-cYFP, A_{2A}R-nYFP, and A_{2A}R-cYFP; for EcoRI and KpnI to generate GHS-R_{1a}-Rluc, GHS-R_{1a}-GFP², GHS-R_{1a}-nRluc, GHS-R_{1a}-cRluc, GHS-R_{1a}-nYFP, and GHS-R_{1a}-cYFP; or for BamHI and KpnI to generate σ_1 R-Rluc, σ_1 R-YFP, σ_1 R-nYFP, and σ_1 R-cYFP fusion proteins.

2.4 | Transgenic mice

σ_1 R KO and age-matched CB7L6j mice (8 weeks old, 23–28 g of weight) were kindly provided by Esteve Pharmaceuticals.¹⁰ Under the current legislation, obtaining protocol approval is not needed if animals are sacrificed to obtain a specific tissue. Animal handling, sacrifice, and further experiments were conducted according to the guidelines set in Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council of the European Union that is enforced in Spain by national and regional organisms; also, the 3R rule (replace, refine, reduce) for animal experimentation was taken into account.

2.5 | Cocaine treatment of Sprague–Dawley rats

Male Sprague–Dawley rats weighing 200–220 g were selected for these experiments. Rats were kept in a controlled environment with 12-h light–dark cycle at 21°C. Food and water were *ad libitum* provided. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Biological Sciences and of the *Pontificia Universidad Católica de Chile* (CBB-212/2014) and were performed

following international guidelines (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Rats were divided in three groups of experimental series: chronic cocaine-treated rats, acute cocaine rats, and control animals treated with vehicle. Chronic cocaine-administration protocol consisted of cocaine i.p. injections (15 mg/kg) twice per day for 14 days as elsewhere detailed,³⁰ whereas the acute cocaine treatment protocol consisted of two 15 mg/kg cocaine i.p. injections, one in the morning and one in the afternoon. Daily administration of cocaine and saline solution was performed in all experimental series at the same time in the morning (beginning at 11:00 A.M.) and afternoon (beginning at 5:00 P.M.). The day after last cocaine injection, rats were deeply anesthetized with a 50:5 mg/kg ketamine/xylazine mixture and intracardially perfused with 50 mL of PBS, followed by 500 mL of 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer. Then, animals were guillotined, and brains were further treated with 4% PFA for 2 h and left in 20% sucrose for 2 days.

2.6 | Cell lines, neuronal primary cultures, and transient transfection

HEK-293T cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin, nonessential amino acid solution (1/100), and 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (all were from Gibco, Paisley, Scotland, UK). Cells were maintained at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂ and were passaged when they were 80%–90% confluent.

HEK-293T cells were transiently transfected with the corresponding cDNA using the polyethylenimine (PEI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) method, as previously described.³¹ After transfection, cells were incubated in serum-free medium, which was replaced by complete medium 4 h after. Cells were maintained at 37°C in a humid atmosphere of 5% CO₂. Experiments were carried out 48 h later.

Neuronal primary cultures were prepared from fetuses of 17- to 19-day pregnant females. Neurons were isolated as described in literature.³² In brief, striatum was dissected and digested with trypsin during 15 min at 37°C. Trypsinization was stopped by several washes with HBSS (137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0.34 mM Na₂HPO₄; 0.44 mM KH₂PO₄; 1.26 mM CaCl₂; 0.4 mM MgSO₄; 0.5 mM MgCl₂; and 10 mM HEPES pH 7.4). Cells were brought to a homogeneous suspension by repeated pipetting followed by passage through 0.9- and 0.5-mm needles and then through a 100- μ m pore mesh. Finally, cells were grown in neurobasal medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin, nonessential amino acid solution (1/100), and 2% (v/v) B27 supplement (Gibco) for 12 days. For cAMP assays, cells were grown on six-well plates at a density of 500,000 cells/well; for ERK1/2 phosphorylation assays, neurons were plated in 96-well plates at a density of 50,000 cells/well; and for proximity ligation assay (PLA), neurons were plated in coverslips (12-well plates) at a density of 100,000 cells/well. Cell counting was assessed using trypan blue and a Countess II FL

automated cell counter (Thermo Fisher Scientific-Life Technologies, Waltham, MA, USA).

2.7 | Immunochemical assays

HEK-293T cells transfected with the indicated cDNAs were pretreated with 30 μ M cocaine or vehicle for 30 min, fixed in 4% PFA for 15 min at room temperature, and washed twice with PBS containing 20 mM glycine to quench free aldehyde groups. After permeabilization with PBS-glycine buffer containing 0.2% Triton X-100 (5 min at room temperature), cells were blocked with PBS containing 1% bovine serum albumin (1 h at room temperature). Receptors fused to YFP were detected by YFP own fluorescence (wavelength 530 nm), and Rluc-containing proteins were stained using a mouse monoclonal anti-Rluc antibody (1/200, 1 h, room temperature, EMD Millipore, CA, USA, ref. MAD4400) and a secondary Cyn3-conjugated donkey anti-mouse antibody (1/200, Jackson ImmunoResearch Laboratories [red], West Grove, PA, USA, ref. 715-166-150). Nuclei were stained with Hoechst (1/100, 1 h, room temperature, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Samples were washed several times, mounted with 30% Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA), and observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with an apochromatic 63 \times oil-immersion objectives (NA 1.4) and 405-, 488-, and 561-nm laser lines.

2.8 | Energy transfer assays and bimolecular complementation

For bimolecular fluorescence complementation (BiFC), HEK-293T cells growing in six-well plates were transiently transfected with the indicated amount of cDNA encoding for receptors fused to nYFP or cYFP. Forty-eight h after, cells were incubated for 4 h with the interfering TM-TAT peptides or vehicle in complete DMEM. YFP resulting from complementation was detected by placing cells (adjusted to 0.3 mg/mL protein) in 96-well microplates (black plates with a clear bottom) (Porvair, Wrexham, Wales, UK) and reading the fluorescence in a Mithras LB 940 reader (Berthold, Bad Wildbad, Germany) using a 10-nm bandwidth excitation and emission filters at 485 and 530 nm, respectively.

For BRET with BiFC measurements, HEK-293T cells growing in six-well plates were transfected with a constant amount of the two Rluc hemiprotein fusion proteins (nRluc and cRluc) and increasing amounts of the two YFP hemiprotein fusion proteins (nYFP and cYFP). Forty-eight h after, cell suspension containing 0.2 mg/mL of protein was distributed in 96-well white microplates (Porvair) and treated with 5 μ M coelenterazine H (PJK GmbH, Kleinblittersdorf, Germany). One min after coelenterazine H addition, readings were collected using a Mithras LB 940 (Berthold Technologies), which allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm and the long-wavelength filter at 530 nm. Receptor-reconstituted YFP fluorescence was read using a Mithras LB 940

reader equipped with a high-energy xenon flash lamp using a 10-nm bandwidth excitation and emission filters at 485 and 530 nm, respectively. To quantify receptor-reconstituted-Rluc expression, luminescence readings were performed 10 min after 5- μ M coelenterazine H addition using a 10-nm-bandwidth 485-nm emission filter. Net BRET is defined as $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})] - C_f$, where C_f corresponds to $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})]$ for the Rluc protein when expressed individually. BRET curves were fitted assuming a single phase by nonlinear regression equation using the GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). BRET values are given as milli-BRET units (mBU: 1000 \times net BRET).

For sequential resonance energy transfer (SRET) assays, HEK-293T cells growing in six-well plates were transiently co-transfected with constant amounts of cDNA encoding for the BRET donor (receptor-Rluc) and acceptor (receptor-GFP²) and increasing amounts of cDNA corresponding to the FRET acceptor (receptor-YFP). After 48 h, 100 μ L of cell suspension (0.2 mg/mL protein) was plated in black 96-well microplates with a clear bottom (Porvair). For YFP quantification, fluorescence was read in a Mithras LB 940 reader (Berthold Technologies) using an excitation filter at 485 nm. Receptor fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing only receptor-GFP² and receptor-Rluc. Luminescence quantification was performed 10 min after adding 5 μ M coelenterazine H to cell suspensions using a Mithras LB 940 reader (Berthold Technologies). Finally, for SRET measurement, cell suspension was treated with 5 μ M Deep Blue C (Biotium, Fremont, CA, USA), and SRET signal was determined using a Mithras LB 940 reader, which allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 410 nm and the long-wavelength filter at 530 nm. Net SRET is defined as $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})] - C_f$, where C_f corresponds to long-wavelength emission/short-wavelength emission for cells expressing only protein-Rluc and protein-GFP². SRET curves were fitted assuming a single phase by nonlinear regression equation using the GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). SRET values are given as milli-SRET units (mSU: 1000 \times net SRET).

2.9 | Cytosolic cAMP determination

HEK-393T cells were transiently transfected with cDNAs encoding for D₁R (0.3 μ g cDNA) and GHS-R_{1a} (0.5 μ g cDNA). Two h before initiating the experiment, cell medium was replaced by not supplemented DMEM. Then, HEK-293T cells or neurons (3500 cells/well) were placed in 384-well white ProxiPlate (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) in medium containing 50 μ M zardaverine (Tocris, Bristol, UK). Cells were treated with 30 μ M cocaine or vehicle (15 min), followed by the D₁R antagonist, SCH23390 (1 μ M), or the GHS-R_{1a} antagonist, YIL781 (2 μ M) (15 min), and finally stimulated with the D₁R agonist, SKF81297 (100 nM), and/or the GHS-R_{1a} agonist, ghrelin (100 nM) (15 min). When indicated, cells were treated

overnight with 10 ng/mL PTX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or for 2 h with 100 ng/mL CTX (Sigma-Aldrich) or with 1 μ M Gq inhibitor YM254890 (Focus Biomolecules, Plymouth Meeting, PA, USA). Readings were performed after 1-h incubation at room temperature, and homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer (HTRF) measures were performed using a Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer). Fluorescence at 665 nm was analyzed on a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with an HTRF optical module (BMG Lab Technologies, Offenburg, Germany). The effect of ligands was given in percentage with respect to the reference value.

2.10 | Determination of calcium ion cytosolic levels

HEK-293T cells were transiently co-transfected with cDNAs encoding for D₁R (0.3 μ g cDNA) and GHS-R_{1a} (0.5 μ g cDNA) and for the calmodulin-based calcium sensor (GCaMP6) (0.75 μ g cDNA). Forty-eight h after transfection, cells were detached using Mg²⁺-free Locke's buffer (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose, and 5 mM HEPES pH 7.4) supplemented with 10 μ M glycine. Cell suspension adjusted to 40 μ g/ μ L of protein were plated in 96-well black with clear bottom microplates (Porvair, Wrexham, Wales, UK). Then, cells were pretreated with 30 μ M cocaine (30 min) or vehicle followed by treatment with the D₁R antagonist, SCH23390 (1 μ M), or the GHS-R_{1a} antagonist, YIL781 (2 μ M), (10 min), and finally stimulated with the D₁R agonist, SKF81297 (100 nM), and/or the GHS-R_{1a} agonist, ghrelin (100 nM). When indicated, cells were treated overnight with 10 ng/mL PTX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or for 2 h with 100 ng/mL CTX (Sigma-Aldrich) or with 1 μ M Gq inhibitor YM254890 (Focus Biomolecules, Plymouth Meeting, PA, USA). Immediately after addition of the receptor agonist(s), fluorescence emission intensity of GCaMP6 was recorded at 515 nm upon excitation at 488 nm on the EnSpire multimode plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) every 5 s for 125–150 s.

2.11 | MAPK activation

To determine ERK1/2 phosphorylation, 40,000 HEK-293T cells transiently transfected with cDNAs encoding for D₁R (0.3 μ g cDNA) and GHS-R_{1a} (0.5 μ g cDNA) or 50,000 neurons/well were plated in transparent 96-well microplates. Medium was substituted by serum-free DMEM 2 h before starting the experiment. Then, cells were pretreated at 25°C with 30 μ M cocaine or vehicle (30 min), followed by antagonist (1 μ M SCH23390 for D₁R or 2 μ M YIL781 for GHS-R_{1a}) treatment (15 min) and finally stimulated for 10 min with selective agonists (100 nM SKF81297 for D₁R and/or 100 nM ghrelin for GHS-R_{1a}). Cells were then washed twice with cold PBS before the addition of 30 μ L of lysis buffer (20-min treatment in constant agitation). Supernatants (10 μ L) were placed in white

ProxiPlate 384-well microplates, and ERK1/2 phosphorylation was determined using an AlphaScreen SureFire kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and the EnSpire multimode plate reader (PerkinElmer). The value of reference (basal) was achieved with vehicle (in the absence of agonists). The effect of ligands was given in percentage over the basal value. Experiments in samples from animals were performed using striatal slices preincubated with 30 μ M cocaine or vehicle for 30 min at 32°C, and treated with the D₁R agonist, SKF81297 (100 nM), or the GHS-R_{1a} agonist, ghrelin (100 nM), for 10 minutes.

2.12 | PLA

Primary cultures of striatal neurons, grown on glass coverslips and pretreated with 30 μ M cocaine or vehicle for 30 min, were fixed in 4% PFA for 15 min, washed with PBS containing 20 mM glycine to quench the aldehyde groups, and permeabilized in PBS containing 0.05% Triton X-100 (5 min). 20- μ m-thick coronal sections from male Sprague-Dawley rats or CB57BL/6j mice, cut on a freezing cryostat (Jung CM-3000 Microtome, Leica Microsystems, Mannheim, Germany), were mounted on glass slides and permeabilized with 0.05% Triton X-100 (15 min at room temperature). Heteroreceptor complex formation was detected using the Duolink II in situ PLA detection kit (Duolink PLA Detection Protocol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) that enables detection of receptor clusters. Antibodies against D₁R (Sigma-Aldrich, ref. SAB4500671), σ ₁R (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, ref. 1377075), and GHS-R_{1a} (Abcam, Cambridge, UK, ref. ab95250) were linked to PLA probes to obtain anti-D₁R-PLUS, anti- σ ₁R-PLUS, anti- σ ₁R-MINUS, and anti-GHS-R_{1a}-MINUS using the Duolink PLA Probemaker Conjugation Protocol (Sigma-Aldrich). Samples were incubated with those conjugated antibodies (1/100 dilution); nuclei were stained with Hoechst (1/100; Sigma-Aldrich) and mounted with 30% Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Negative controls were performed by omitting the anti- σ ₁R antibody. Samples were observed in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems) equipped with an apochromatic 63 \times oil-immersion objectives (NA 1.4) and 405- and 561-nm laser lines. For each field of view, a stack of two channels (one per staining) and four Z-stacks with a step size of 1 μ m were acquired. The number of cells containing one or more red spots versus total cells (blue nucleus) and, in spot-containing cells, the ratio *r* (number of red spots/cell) were determined by means of the Duolink ImageTool software (Sigma-Aldrich).

2.13 | Data analysis

All data were obtained from at least five independent experiments and are expressed as the mean \pm SEM. The normality of populations and homogeneity of variances were tested prior to ANOVA. Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism software version 7 (San Diego, CA, USA). Differences were considered

significant when $p < 0.05$. Tests for significance are indicated in figure legends.

2.14 | Computational modeling

The structure of trimeric σ_1 R was taken from the crystal structure (PDB ID 5HK1). An inactive conformation of human GHS-R_{1a} (UniProt: Q92847) was homology modeled based on the crystal structures of the neurotensin 1 receptor, PDB ID 3ZEV,³³ for the C-terminal part of TM7 and helix 8 (PDB residues 364–385 and GHS-R_{1a} residues 316–339) and PDB ID 4XES³⁴ for the remaining parts. The human neurotensin 1 receptor and GHS-R_{1a} share 33% of sequence identity and 51% of sequence similarity. The “active-like” form of GHS-R_{1a}, that is, the one productively coupled to a G protein, was homology modeled using the “inactive” GHS-R_{1a} model and a template consisting of the cytoplasmic halves of the TMs 5 and 6 of the structure of the β_2 -adrenergic receptor in complex with Gs (PDB ID 3SN6³⁵; GHS-R_{1a} residues 224–274). The inactive and active conformations of the D₁R (UniProt: P21728) were, respectively, homology modeled from the crystal structures of β_1 - (PDB ID 4BVN³⁶) and β_2 - (PDB ID 3SN6³⁵) adrenergic receptors (β_1 AR and β_2 AR). We did not include the large intracellular loop 3 in these models. G proteins were modeled as follows: G $_{\beta}$ and G $_{\gamma}$ subunits from the complex β_2 AR/Gs (PDB ID 3SN6,³⁵), G $_{s\alpha}$ subunit from the complex with adenosine A_{2A}R (PDB ID 5G53³⁷), and Gq subunit from PDB ID 6OIJ.³⁸ All receptor homology models were generated using Modeller 9.20.³⁹ For every receptor, we generated 10 models and selected the one with the best Discrete Optimized Protein Energy (DOPE) score. The GHS-R_{1a}- σ_1 R complex was constructed as in our previous report,²⁵ using protein-protein docking with HADDOCK,⁴⁰ under the imposed experimental restraints consisting of TMs 1 and 2 of GHS-R_{1a} contacting the single TM of σ_1 R. For the remaining protomer-protomer complexes, we relied on the dimeric arrangements observed in crystallographic structures, as available in DIMERBOW,⁴¹ that were compatible with the TM interfaces identified experimentally. For the GHS-R_{1a} and D₁R TM5/6 homodimeric interfaces, we selected, as in our previous report,²⁵ the μ OR structure (PDB ID 4DKL⁴²) as template. For the TM1-TM1 heteromeric interface, we selected the κ -opioid receptor structure (PDB ID 4DJH).⁴³ The criteria to select these models among other alternatives were (i) to leave enough volume in the cytoplasmic space to accommodate two G proteins with their α subunits located underneath the internal protomers (see literature^{44,45}) and (ii) to maximize contact surface between both TM helices. Homo- and heterodimers were constructed by superposing the C α 's of both protomers to respective crystallographic interface using the *super* function in PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). For each homodimer, we created two models: one with two inactive protomers and one with one inactive and one active protomer. The definitive heterotetrameric model was constructed by superimposing the second protomer of GHS-R_{1a} and D₁R homodimers to a centrally located GHS-R_{1a}-D₁R heterodimer. When necessary, G proteins were incorporated by superposing the β_2 AR/Gs complex to

the active protomers. All models (dimers, tetramer with and without G proteins) were energy minimized using the ff14SB force field⁴⁶ in AMBER.⁴⁷ All models are available upon request.

3 | RESULTS

3.1 | Dopamine D₁R form heterotrimeric complexes with GHS-R_{1a} and σ_1 receptors in a heterologous expression system

Cocaine binds to the σ_1 R, which in turn interacts with either the D₁R to regulate dopaminergic transmission or with the GHS-R_{1a} to inhibit ghrelin action.^{16,19,25} Accordingly, we postulated that a macromolecular unit containing D₁R, GHS-R_{1a}, and σ_1 R could be established and display particular functional properties. First, we performed immunocytochemistry studies in HEK-293T cells expressing D₁R and GHS-R_{1a}, either individually or in combination. The results show that D₁R was mainly expressed at the plasma membrane level (Figure 1a), whereas GHS-R_{1a} (Figure 1b) was expressed both at the cell surface and inside the cell. Co-transfected cells exhibited a high degree of co-localization between D₁R and GHS-R_{1a} at the plasma membrane (yellow in Figure 1c). Immunocytochemistry is not suitable for demonstrating a physical interaction; accordingly, we used BiFC in HEK-293T cells expressing similar amounts of D₁R-cYFP and GHS-R_{1a}-nYFP (cYFP and nYFP represent the C-terminal and N-terminal nonfluorescent halves of YFP). We observed a clear fluorescent signal when both fusion protein cDNAs were transfected in comparison with a negligible signal when one of the fusion proteins was substituted by the non-fused cYFP or nYFP hemiproteins (Figure 1d). This result confirms the existence of D₁R-GHS-R_{1a} heteromers in transfected HEK-293T cells.

Since it is common for GPCR heteromers to form tetrameric complexes (heteromers of homodimers) that accommodate two different G proteins,^{44,45,48} we investigated the possible formation of tetramers involving D₁R and GHS-R_{1a}. For this purpose, we performed a BRET assay with double bimolecular fluorescence and luminescence complementation in HEK-293T cells expressing GHS-R_{1a}-nRluc, GHS-R_{1a}-cRluc, D₁R-nYFP, and D₁R-cYFP. Complementation occurred as detected by energy transfer between reconstituted Rluc and reconstituted YFP (Figure 1e). We obtained a saturable BRET curve (BRET_{max} = 45 ± 4, BRET₅₀ = 60 ± 10) characteristic of a specific interaction, whereas a linear negative signal was observed when the interaction between adenosine A_{2A} and GHS-R_{1a} receptors was assayed as negative control (Figure 1e). Importantly, these results show that in the heterologous system employed in the assays, GHS-R_{1a} and D₁R receptors can form tetrameric complexes.

We next explored the effect of cocaine treatment on the D₁-GHS-R_{1a} receptor complex with the aim of addressing whether σ_1 R activation may modulate its structure/function. By immunocytochemistry assays, we observed that cocaine treatment in D₁R- or GHS-R_{1a}-transfected HEK-293T cells showed similar D₁ and GHS-R_{1a} receptor expression levels as in untreated cells (Figure 1f,g). Finally,

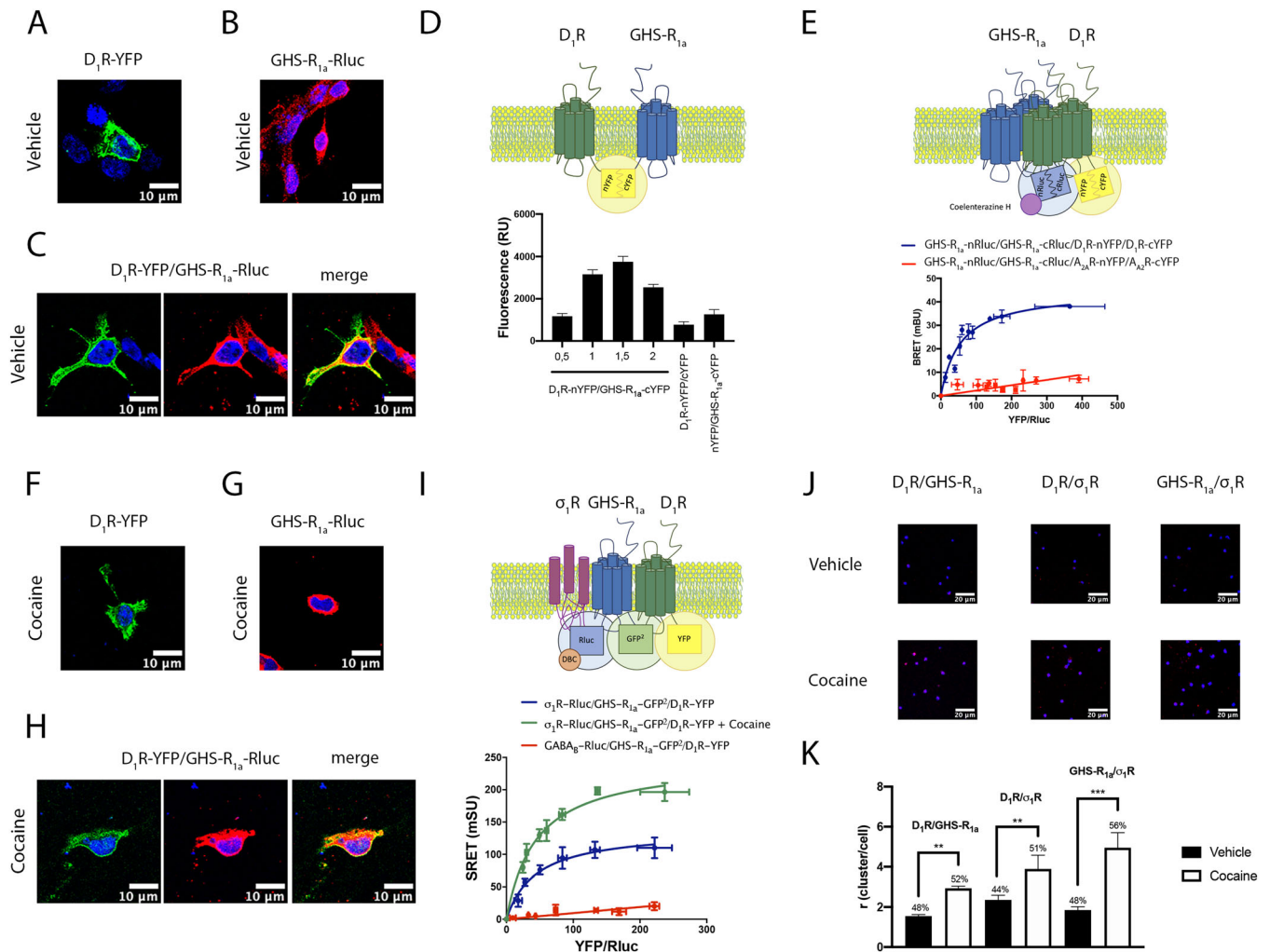


FIGURE 1 Dopamine D₁R, ghrelin GHS-R_{1a}, and σ_1 R may form heteromers in transfected HEK-293T cells and striatal neurons. HEK-293T cells expressing D₁R-YFP (0.5 μg) (d,f), GHS-R_{1a}-Rluc (0.5 μg) (b,g) or both (c,h) were untreated (a–c) or treated (f–h) with cocaine (30 μM) for 30 min. Receptors fused to Rluc (red) were identified by using a primary antibody against Rluc and an anti-mouse Cy3-conjugated secondary antibody. Receptors fused to YFP (green) were identified by YFP own fluorescence. Co-localization (merge) is shown in yellow. Nuclei were stained with Hoechst (blue). Confocal images were obtained near the surface of the slide to observe a higher portion of cell plasma membrane. Scale bar: 10 μm. (d) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays were performed in HEK-293T cells transfected with increasing concentrations of cDNAs for D₁R-nYFP (0.5–2 μg) and GHS-R_{1a}-cYFP (0.5–2 μg) or D₁R-nYFP (1.5 μg) and cYFP (0.5 μg) or nYFP (0.5 μg) and GHS-R_{1a}-cYFP (1.5 μg). A scheme of the BiFC approach is shown. Values are expressed as the fluorescence detected in each case minus the fluorescence detected in non-transfected cells and are the mean ± SEM of six different experiments performed in triplicates. (e) The BRET with the bimolecular fluorescence and luminescence complementation technique (BRET-BiFLC) was performed in HEK-293T cells expressing constant amounts of GHS-R_{1a}-cRluc and GHS-R_{1a}-nRluc (0.5 μg) and increasing concentrations of D₁R-cYFP and D₁R-nYFP (0.5–3 μg) or A_{2A}R-cYFP and A_{2A}R-nYFP (0.5–3 μg). BRET-BiFLC values are the mean ± SEM of eight different experiments. A scheme of BRET-BiFLC approach is shown. (i) Sequential resonance energy transfer (SRET) technique was performed in HEK-293T cells expressing constant amounts of σ_1 R-Rluc (0.5 μg) and GHS-R_{1a}-GFP² (0.5 μg) or D₂-GFP² (0.5 μg) and increasing concentrations of D₁R-YFP (0.2–2 μg) and treated or not with cocaine. A scheme of the SRET approach is shown. SRET values are the mean ± SEM of eight different experiments. DBC = deep blue C. (j,k) Proximity ligation assay (PLA) was performed in striatal neurons treated (white bars) or not (black bars) with 30 μM cocaine. PLA was detected by specific antibodies against D₁, GHS-R_{1a}, and/or σ_1 receptors. Images displaying cluster of heteroreceptor complexes (j) were quantified, and the numbers (r) of clusters/cell for each pair of receptors are shown in the bar graph (k). Average of cells with red dots versus total number of cells is given above each bar. Scale bar: 20 μm. Data are the mean ± SEM of six different experiments. One-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni's multiple comparison tests was used for statistical analysis. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

co-transfected cells exhibited a high degree of co-localization between D₁R and GHS-R_{1a} at the plasma membrane level (yellow in Figure 1h).

We used the SRET technique⁴⁹ to detect complexes formed by three different proteins: σ_1 R-Rluc, GHS-R_{1a}-GFP², and D₁R-YFP (Figure 1i). A saturable SRET curve (SRET_{max} = 138 ± 15,

SRET₅₀ = 44 ± 14) was obtained that indicates specific interaction between the three receptors. The negative control using GABA_B receptor instead of σ_1 R led to a linear unspecific plot. Moreover, when cells were pretreated with cocaine, the SRET was enhanced (SRET_{max} = 244 ± 15, SRET₅₀ = 44 ± 8), thus suggesting either a

higher number of heteromers or a cocaine-induced rearrangement of the quaternary structure of the complex. This result suggests that the GHS-R_{1a}-D₁R heterotetramer interacts with the σ_1 R, which according to its tridimensional structure is a homotrimer.^{13,14}

Complex formation in neurons was addressed by PLA. Because it is not yet possible to detect clusters of three different membrane proteins using this technology, we assumed that detection of the different possible dimers (D₁R-GHS-R_{1a}, GHS-R_{1a}- σ_1 R, and D₁R- σ_1 R) was an indirect but strong evidence of complexes formed by the three proteins. PLA in primary cultures allowed detection of all pairwise combinations of receptors (Figure 1j). For all receptor combinations, pretreatment with cocaine led to a significant increase in the number of clusters per neuron; in comparative terms, the increase was more marked in the case of GHS-R_{1a}- σ_1 R clusters (Figure 1j,k).

3.2 | Effect of cocaine upon signaling via the D₁R-GHS-R_{1a}- σ_1 R macromolecular complex

The main transduction mechanisms of D₁R and GHS-R_{1a} are Gs and Gq/Gi, respectively. We first addressed Gs and Gi signaling by

performing cAMP determination assays in HEK-293T cells expressing D₁R, GHS-R_{1a}, or both (these cells endogenously express the σ_1 R) and in primary cultures of striatal neurons. In single-transfected cells (data not shown), we obtained Gs coupling in D₁R-expressing cells and Gi/Gq coupling in GHS-R_{1a}-expressing cells, consistent with the transduction mechanisms described for individual receptors.⁵⁰ In co-transfected cells (Figure 2a), the D₁R agonist SKF81297 increased cAMP levels, being this effect blocked by the selective D₁R antagonist SCH23390 and partially by the ghrelin receptor antagonist YIL781. Ghrelin did not significantly modify cAMP levels when administered alone, but it reduced the effect of SKF81297. In cells pretreated with cocaine, we observed an enhanced SKF81297-mediated increase of cAMP levels. Similar experiments on cAMP level determination were performed in primary cultures of striatal neurons obtained as described in Section 2. Neurons displayed a similar functional profile (Figure 2b), with the only remarkable exception that ghrelin produced an increase in cAMP levels similar in magnitude to that provoked by SKF81297. This is an important result because it indicates that in the heterotetrameric environment, the GHS-R_{1a} does not signal via Gi but via Gs. Yet, simultaneous treatment with ghrelin and SKF81297 disclosed a negative crosstalk, that is, the combined treatment did not lead to an additive effect.

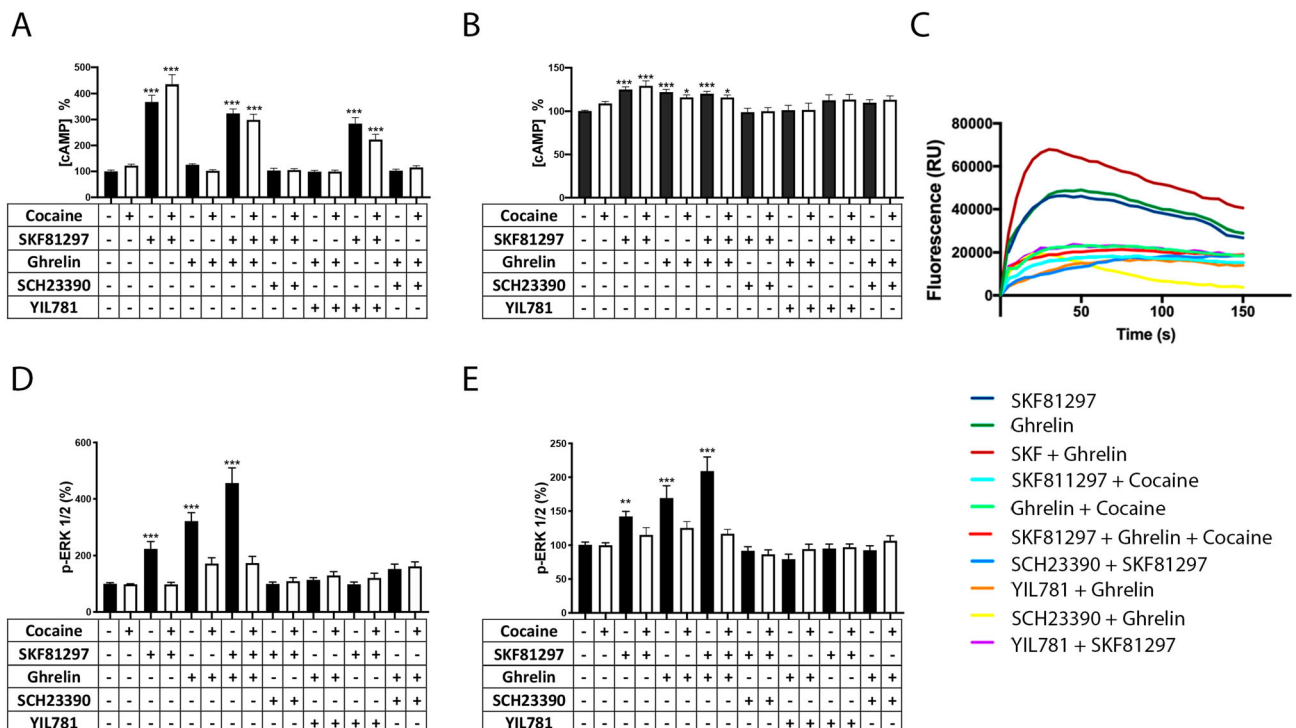


FIGURE 2 Functionality of receptors in the D₁R-GHS-R_{1a}- σ_1 R heteromeric context in both transfected HEK-293T cells and striatal neurons treated or not with cocaine. HEK-293T cells expressing D₁R (0.3 μ g) and GHS-R_{1a} (0.5 μ g) (a,d) and (c) also expressing the GCaMP6 calcium sensor, or striatal neurons (b,e) were treated with 30 μ M cocaine (white bars) or vehicle (black bars) followed by incubation (15 min) with antagonists (SCH23390 [1 μ M] for D₁R or YIL781 [2 μ M] for GHS-R_{1a}). Finally, receptors in the different cells were incubated with agonists (SKF81297 [100 nM] for D₁R and/or ghrelin [100 nM] for GHS-R_{1a}). Cytosolic cAMP (a,b) was determined by the Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer), variations in cytosolic [Ca²⁺] (c) were determined using the calmodulin-based (GCaMP6) calcium sensor as indicated in Section 2, and ERK1/2 phosphorylation (d,e) was analyzed using an AlphaScreen SureFire kit (PerkinElmer). Values are the mean \pm SEM of five to eight different experiments performed in triplicates. One-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni's multiple comparison tests was used for statistical analysis. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus vehicle treatment

Gq-mediated signaling was assessed from the variation in the cytosolic calcium levels as detected in HEK-293T by a fluorescent probe as indicated in Section 2; Figure 2c shows the time course of an experiment that was recorded right after agonist addition to cells. Data obtained in HEK-293T cells transfected with D₁R and GHS-R_{1a} showed Gq coupling of GHS-R_{1a}. Remarkably, not only ghrelin but also SKF81297 mobilized Ca²⁺ in co-transfected cells, and, furthermore, simultaneous treatment with both agonists leads to a higher peak of cytosolic concentration of the ion (Figure 2c). Both cocaine pretreatment and addition of D₁R or GHS-R_{1a} antagonists significantly reduced the agonist-induced calcium signal. These results indicate that Gq activation is possible when any of the two GPCRs in the heteromer is activated.

MAPK pathway activation was assayed by determining ERK1/2 phosphorylation in transfected HEK-293T cells and in primary cultures of striatal neurons. In HEK-293T cells expressing D₁R and GHS-R_{1a}, individual treatment with agonist showed a higher response for ghrelin than for SKF81297, and combined treatment resulted in an additive effect (Figure 2d). Unlike in cAMP assays, we observed a significant degree of cross-antagonism, that is, reduction of the signal of one receptor afforded by the antagonist of the partner receptor. Interestingly, pretreatment with cocaine reduced agonist-induced ERK1/2 phosphorylation. In striatal neurons, the MAPK pathway showed a similar profile; cocaine completely prevented D₁R and GHS-R_{1a} link to MAPK activation (Figure 2e).

3.3 | Model of the quaternary structure of the macromolecular complex

To establish the TM interfaces involved in receptor–receptor interactions, we used TAT peptides in the above-described molecular complementation assays. First, we investigated the interfaces of the GHS-R_{1a} and D₁R homodimers and of the D₁R–GHS-R_{1a} heteromer by means of molecular complementation using cells expressing pairs of receptors fused to the N-terminal half (nYFP) or the C-terminal half of YFP (cYFP). In cells expressing GHS-R_{1a}-nYFP, GHS-R_{1a}-cYFP, and D₁R, TAT peptides containing the sequences of TM 5 from the GHS-R_{1a} reduced the fluorescence resulting from YFP complementation. This is the same result reported in cells lacking D₁R expression.²⁵ In cells expressing D₁R-nYFP and GHS-R_{1a}-cYFP, TAT peptides containing the TM 1 or 2 sequences of the GHS-R_{1a} were able to reduce the fluorescence resulting from YFP complementation (Figure 3a). Based on these results, we constructed a computational model (see Section 2) in which both homodimers arrange using an interface involving TMs 5 and 6, whereas the heteromeric interface consists of a symmetric interaction between TM 1 of both D₁R and GHS-R_{1a} (Figure 3b). Because TM5 of both D₁R protomers is engaged in the homomeric interface, it is unlikely that they participate in the heteromeric interface, and, therefore, we attribute the fluorescence decrease due to the TM5 peptide to an indirect effect.

When BiFC experiments were performed in cells expressing GHS-R_{1a}-nYFP, σ_1 R-cYFP, and D₁R, TAT peptides containing the

sequence of TM1, TM2, or TM5 of the GHS-R_{1a} were able to significantly reduce the fluorescence resulting from YFP complementation (Figure 3c). The results are like those reported in the absence of D₁R.²⁵ A GHS-R_{1a}- σ_1 R interface involving the TM1, TM2, and TM5 of the same GHS-R_{1a} protomer or even with one homodimer with the TMs of a σ_1 R trimer is not possible. Therefore, we propose the coexistence of two arrangements that use two different interfaces: one that involves TMs 1 and 2 and the other that involves TM5 (Figure 3d). In cells expressing D₁R-nYFP, σ_1 R-cYFP, and GHS-R_{1a} and treated with TAT peptides derived from the D₁R, it was observed that TM5 but not TM7 was able to reduce the fluorescence resulting from YFP complementation (Figure 3e). TAT-TM6 led to a trend toward reducing fluorescence but without reaching significance. Interestingly, it is possible to incorporate one D₁R homodimer to the left part of the second complex in Figure 3d to form a structure in which one D₁R-GHS-R_{1a} heterotetramer interacts with one single σ_1 R homotrimer via two different interfaces involving the TM5 of each of the GPCRs (Figure 3f).

We next aimed to further identify the G proteins coupled to this D₁R–GHS-R_{1a}- σ_1 R heteroreceptor complex. In the model in Figure 3f, G protein binding would be possible to both D₁R protomers but only to one GHS-R_{1a} protomer due to steric clashes with σ_1 R. In cAMP assays performed in HEK-293T cells expressing D₁R and GHS-R_{1a}, CTX pretreatment, which alters Gs-mediated signaling, blocked SKF81297-induced increase in cAMP levels, whereas pretreatment with PTX, which alters Gi-mediated signaling, or YM254890, which inhibits Gq signaling, produced no effect (Figure 4a). These results indicate that D₁R–GHS-R_{1a} heteromer function is mediated by Gs coupling. When similar experiments were analyzed by calcium responses elicited by activation of coexpressed D₁R and GHS-R_{1a} (Figure 4b), we observed that YM254890 pretreatment but not PTX or CTX blocked ghrelin-induced cytosolic calcium increase. Figure 4c displays a model that could explain the complex functional readout reported in Figure 2. In this model one GHS-R_{1a} protomer would bind to either Gq or to the noncanonical Gs, whereas the D₁R homodimer could steadily bind to Gs. The proximity between a pre-coupled Gs and the D₁R protomer that interacts with GHS-R_{1a} could facilitate the transfer of Gs from D₁R to GHS-R_{1a} and allow Gs engagement when the GHS-R_{1a} is activated.

3.4 | MAPK signaling and lack of complex expression in σ_1 R knockout mice treated with cocaine

PLA experiments in striatal sections of σ_1 R knockout (KO) mice animals showed that σ_1 R-containing clusters were absent in samples from KO mice (data similar to those of the negative control). In addition, the percentage of cells expressing D₁R-GHS-R_{1a} clusters and the cluster/cell ratio were not significantly different in samples from KO or from control animals (Figure 5a,b).

The first aim of the use of σ_1 R KO mice was to know whether the lack of MAPK signaling when cocaine is present is mediated by the σ_1 R. Accordingly, striatal slices from KO animals (Figure 5c) and age-matched controls (Figure 5d) were preincubated with vehicle or

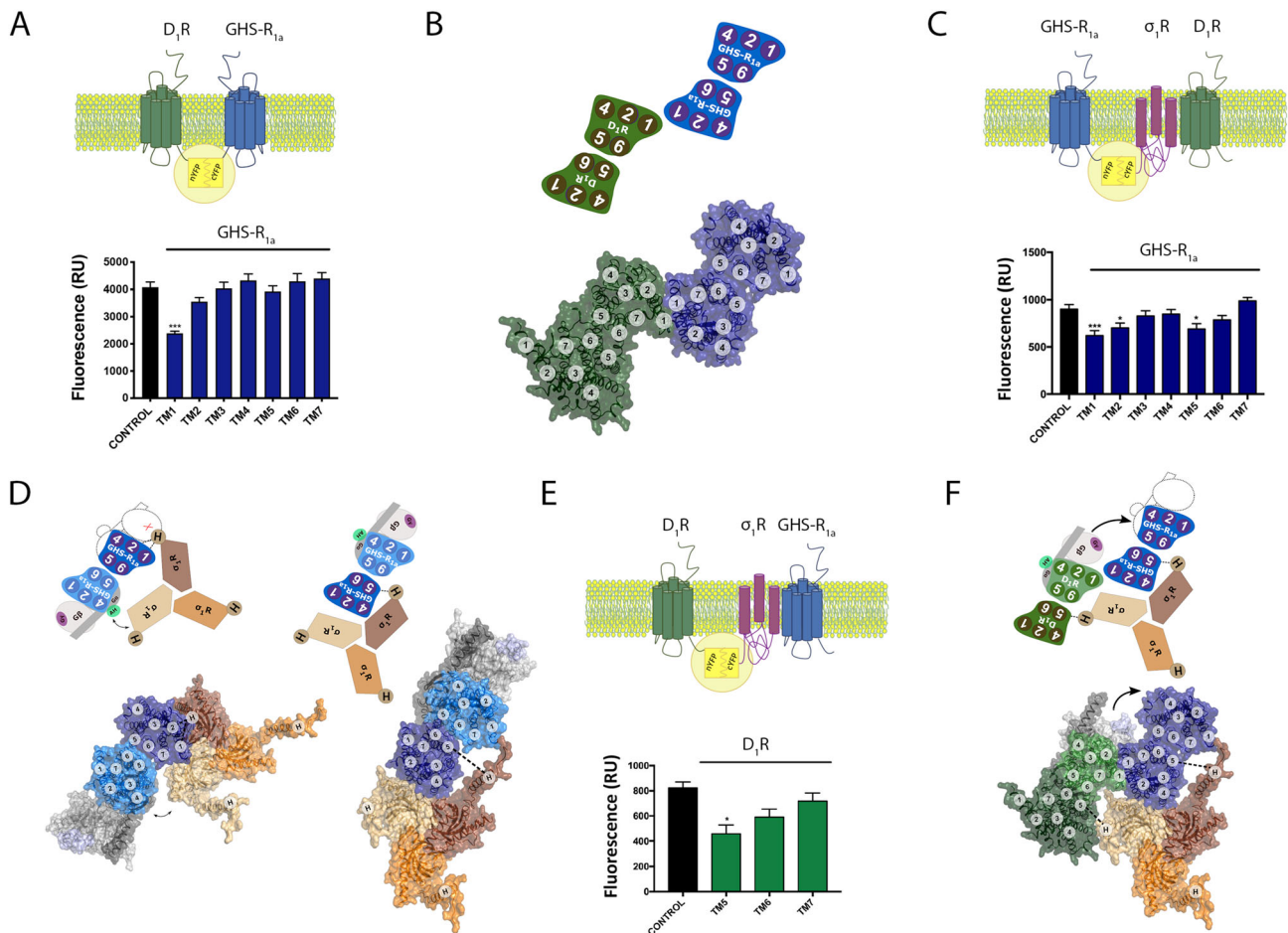


FIGURE 3 Model of the quaternary structure of the macromolecular complex formed by D₁R, GHS-R_{1a}, and sigma₁R. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays were performed in HEK-293T cells expressing D₁R-nYFP and GHS-R_{1a}-cYFP (a), or GHS-R_{1a}-nYFP, sigma₁R-cYFP and D₁R (c), or D₁R-nYFP, sigma₁R-cYFP, and GHS-R_{1a} (e). Fluorescence due to complementation was determined 4 h after treatment with 0.4 μM TAT-TM peptides. A scheme of the experimental approach is given above each graph. Values are expressed as the fluorescence detected in each case minus the fluorescence detected in non-transfected cells and are the mean ± SEM of five different experiments performed in triplicates. One-way ANOVA followed by post hoc Dunnett's multiple comparison tests was used for statistical analysis. **p* < 0.05, ****p* < 0.001 compared with nontreated cells or control conditions. Computational models (cartoon representations and model in backbone trace and surface). (b) Arrangement of the D₁R-GHS-R_{1a} in a heterotetramer formed through symmetric interactions between TMs 5 and 6 within homodimers composed of two "inactive" protomers and a symmetric interaction between TM1 within the two different GPCRs. (d) Proposed coexisting interaction modes of the GHS-R_{1a} homodimer composed of one inactive protomer and one active protomer with the sigma₁R trimer involving TMs 1 and 2 (left) or TMs 5 and 6 (right) of the GHS-R_{1a}. On both arrangements, alpha subunits of G proteins can only bind to one single protomer because in the other there is steric clash between the beta subunit and sigma₁R. Protomers in active conformation (coupled to a G protein) are depicted in lighter colors. On the left hand, one sigma₁R protomer interacts with the TM helices of one GHS-R_{1a}, whereas a second sigma₁R protomer lies near the alpha-helical (AH) domain of the G protein and could eventually modulate G protein activation. On the right hand, one sigma₁R protomer simultaneously interacts with one TM helix of each GHS-R_{1a} protomer, and there is no possibility to modulate G protein activation via interaction with the sigma₁R C-term. (f) Macromolecular complex model of one GHS-R_{1a}-D₁R heterotetramer bound to G_s plus one sigma₁R homotrimer

cocaine and subsequently treated with ghrelin or SKF81297. It was observed that although, in samples from control animals, cocaine treatment blocked SKF and ghrelin induced increases in MAPK phosphorylation, they were ineffective in samples from KO animals. The results of ERK1/2 phosphorylation shown in Figure 5c,d demonstrate that cocaine blocks any D₁R- or GHS-R_{1a}-mediated link to the MAPK pathway, also demonstrating that such effect requires the sigma₁R.

3.5 | D₁R-GHS-R_{1a} signaling is modulated by sigma₁R in acute and chronic conditions

Finally, the number of clusters formed by two receptors was analyzed in naive animals and in animals treated with cocaine following either an acute or a chronic regimen (see Section 2). PLA results obtained in striatal sections with all possible combinations of receptor pairs are shown in Figure 6. On the one hand, the percentage of cells

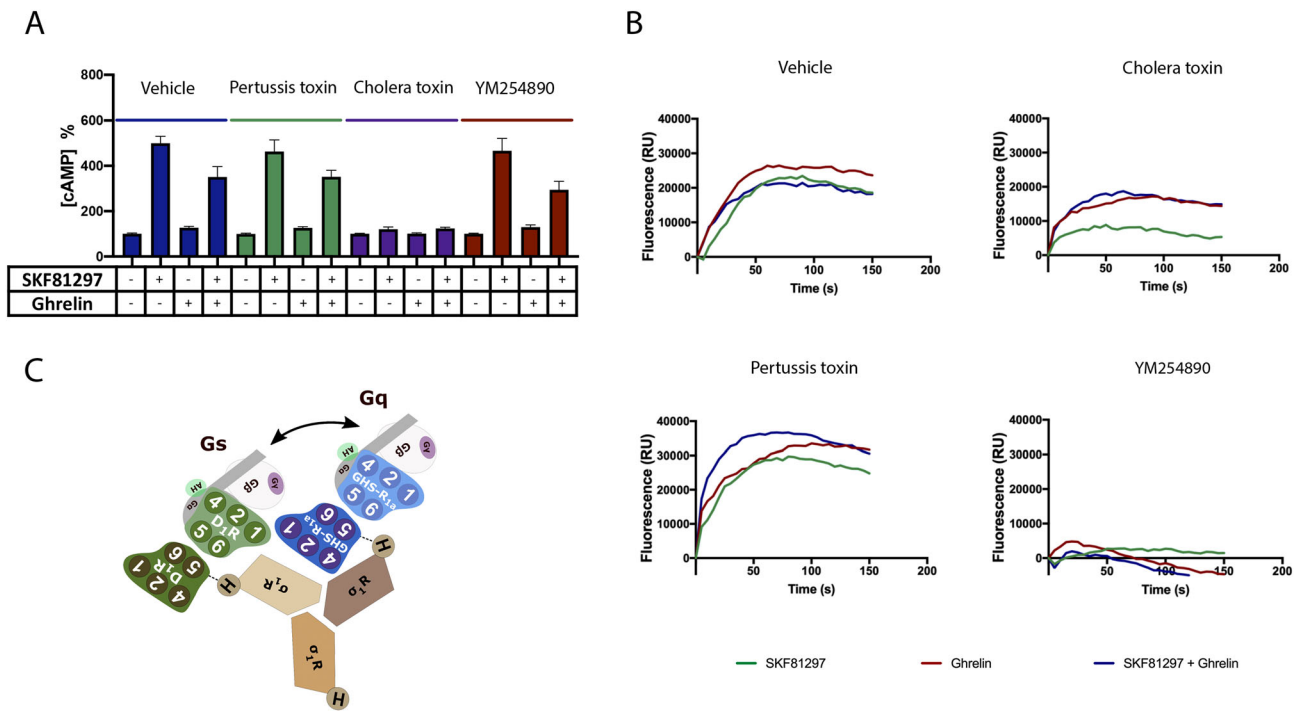


FIGURE 4 The macromolecular complex formed by D_1R , $GHS-R_{1a}$, and σ_1R couples to G_s and to G_q . cAMP determination (a) and calcium mobilization (b) assays were performed in HEK-293T cells expressing D_1R and $GHS-R_{1a}$ and treated with cholera (100 ng/mL) or pertussis (10 ng/mL) toxins or with YM254890 (1 μ M), an inhibitor of G_q (see Section 2 for details on incubation times). Receptors in treated cells were activated using SKF81297 (100 nM) and/or ghrelin (100 nM). Values are the mean \pm SEM of five different experiments. One-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni's multiple comparison tests was used for statistical analysis. *** $p < 0.001$ versus vehicle. Computational model (c) (cartoon representation and model in backbone trace and surface). The double arrow indicates the possible transfer of one G_s from D_1R to $GHS-R_{1a}$ or of one G_q from $GHS-R_{1a}$ to D_1R that may explain the observed G_s signaling via $GHS-R_{1a}$ and G_q via D_1R

expressing D_1R - $GHS-R_{1a}$ complexes was similar in all groups, with a significant but small increase in the number of clusters/cell in the group with acute administration (Figure 6a,b). On the other hand, data for D_1R - σ_1R clusters indicated that the percentage of cells expressing D_1R - σ_1R complexes was similar in all groups, whereas an increase in the number of clusters/cell in sections from the groups treated with cocaine was observed. The increase was about twofold in the case of acute and less marked in chronic treatment (Figure 6a,c). Finally, the results of $GHS-R_{1a}$ - σ_1R expression indicated that the number of cells expressing complexes was similar in all conditions and the number of clusters/cell was significantly increased in the group of acute treatment, whereas the values in samples from naïve and chronic treated animals were similar (Figure 6a,d). In summary, the results concerning the formation of receptor complexes indicated that acute treatment led to marked changes in complex expression and that the number of $GHS-R_{1a}$ - σ_1R complexes returned to normal upon chronic treatment with the drug.

4 | DISCUSSION/CONCLUSION

The results in this paper show the occurrence, in both heterologous and natural systems, of a functional unit that mediates the hunger

suppressive actions of cocaine. The macromolecular complex is constituted by two different GPCRs and the atypical σ_1R receptor of unknown physiological role. Simultaneous detection of D_1R , $GHS-R_{1a}$, and σ_1R in a macromolecular complex is technically challenging, but we took advantage of the SRET technique⁵¹ using receptors fused to either Rluc as a BRET donor, a GFP² protein as a BRET acceptor, or an YFP protein as a FRET acceptor, all of them placed in the cytoplasmic terminal domain. SRET assays demonstrated that interaction of the three receptors together was possible, and further assays of molecular complementation showed that D_1R and $GHS-R_{1a}$ arrange into heterotetramers. Tetramers have been shown for adenosine receptor,^{45,48} whereas $GABA_B$ receptors spontaneously form dimers of heterodimers⁵²; identical protomers within a heterotetramer likely arrange in a head-to-head fashion, and, overall, the tetramer may accommodate two different G proteins (see literature^{41,44}). The 3D structure of σ_1R has revealed that these receptors form homotrimers.^{13,14} Accordingly, the accommodation of all components of the functional unit constituted a challenge, but the signaling studies in the presence and absence of cocaine provided clues that helped to construct an atomistic model that was able to explain all the results in this paper and, also, those previously reported in the literature (see Section 1). Although the use of interfering peptides together with crystallographic data have been valuable templates to construct the

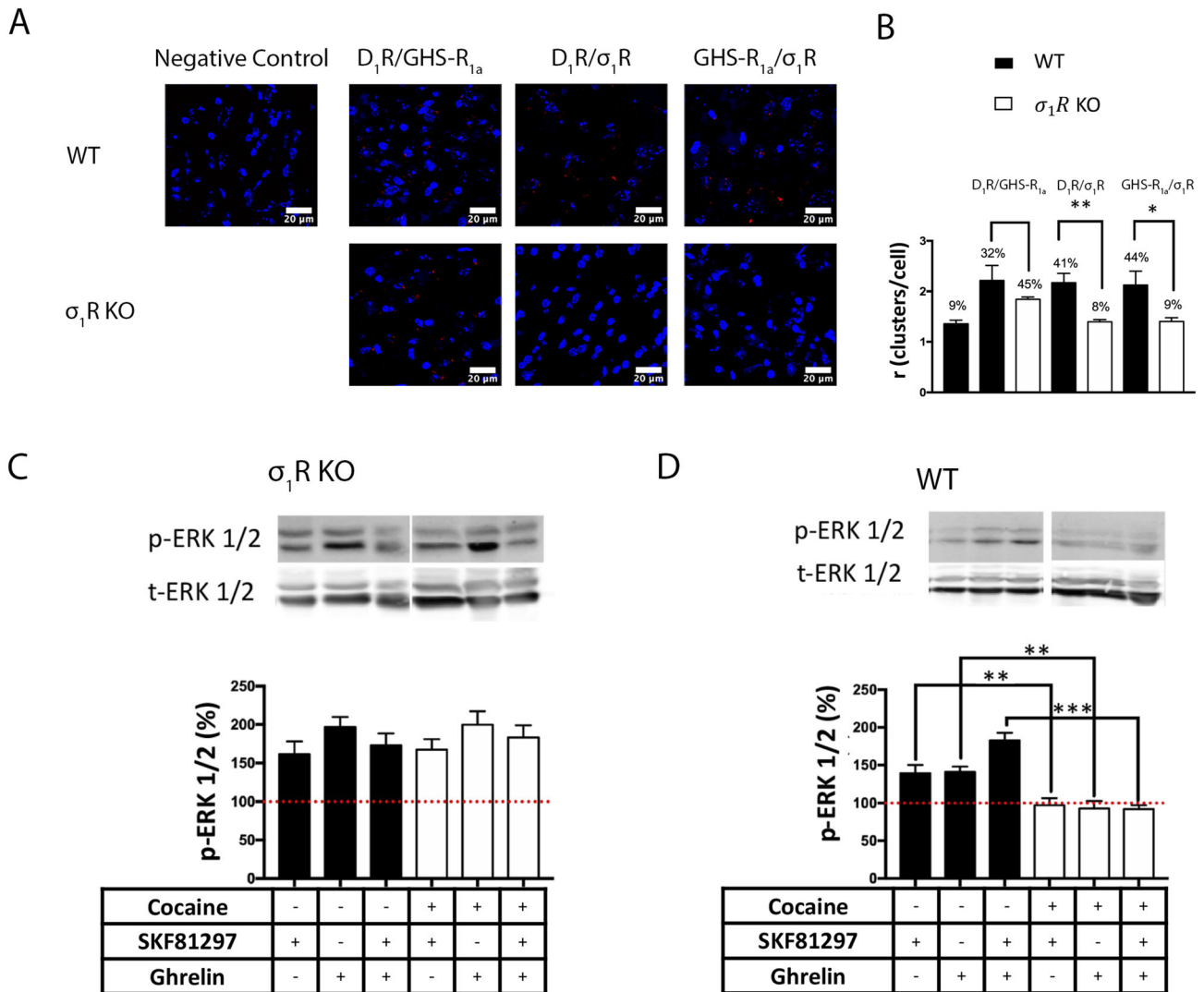


FIGURE 5 Analysis of heteromer expression and functionality in σ_1R KO mice. Proximity ligation assay (PLA) was performed in striatal sections from CB57BL/6J- σ_1R KO mice (white bars) or CB57BL/6 mice (black bars) using specific primary antibodies against D₁R, GHS-R_{1a}, and/or σ_1R . Confocal microscopy images (stacks of four consecutive planes) show heteroreceptor complexes as red clusters; nuclei were Hoechst-stained (blue) (a). Scale bar: 20 μ m. The bar graph in (b) shows the number of red dots/cell, and the number above bars indicates the percentage of cells presenting red dots. Values are the mean \pm SEM of six different experiments. One-way ANOVA with post hoc Bonferroni's multiple tests was used for statistical analysis. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 (wild-type vs. KO). Slices from CB57BL/6J- σ_1R KO mice (c) or CB57BL/6 mice (d) were treated with 30 μ M cocaine for 30 min (white bars) or medium (black bars) prior to 10-min stimulation with the D₁R agonist SKF81297 (100 nM), the GHS-R_{1a} agonist ghrelin (100 nM), or both. Bands from slices obtained from six animals were quantified for ERK1/2 phosphorylation analysis. A representative Western blot is shown in each panel (top). Values represent the mean \pm SEM of the percentage of increase of phosphorylation over the basal levels detected in untreated slices (100%, red line). One-way ANOVA with post hoc Bonferroni's multiple tests were used for statistical analysis. ** p < 0.01, *** p < 0.001 (wild type vs. KO)

presented structural model, further experiments providing information at the residue level together with extensive molecular dynamics simulations will be required to provide a fully reliable model.

GPCR heteromers display properties that are different from those displayed by individual receptors.^{53,54} Here, we show that dopamine activation can induce mobilization of calcium ion from intracellular stores only in the D₁R-GHS-R_{1a} heteromeric context. Some of the dopamine effects in the CNS seem to be mediated by calcium, although they are mediated by receptors that are coupled to Gs/Gi, variation of cAMP levels, and regulation of PKA kinase activity.

Involvement of calcium sensor proteins in dopaminergic central actions has been proved,⁵⁵⁻⁵⁷ but the mechanism linking dopamine action to calcium ion as second messenger is unclear. The model we here propose for the macromolecular complex may have some level of pre-coupling to Gs and Gq, not only making that dopamine, via D₁R, engages Gq and increases cytosolic Ca²⁺ levels but also making that GHS-R_{1a} activation engages Gs, which is placed underneath the D₁R. In summary, the heteromeric complex provides the substrate by which activation of either receptor may lead to Gs- and/or Gq-mediated signaling.

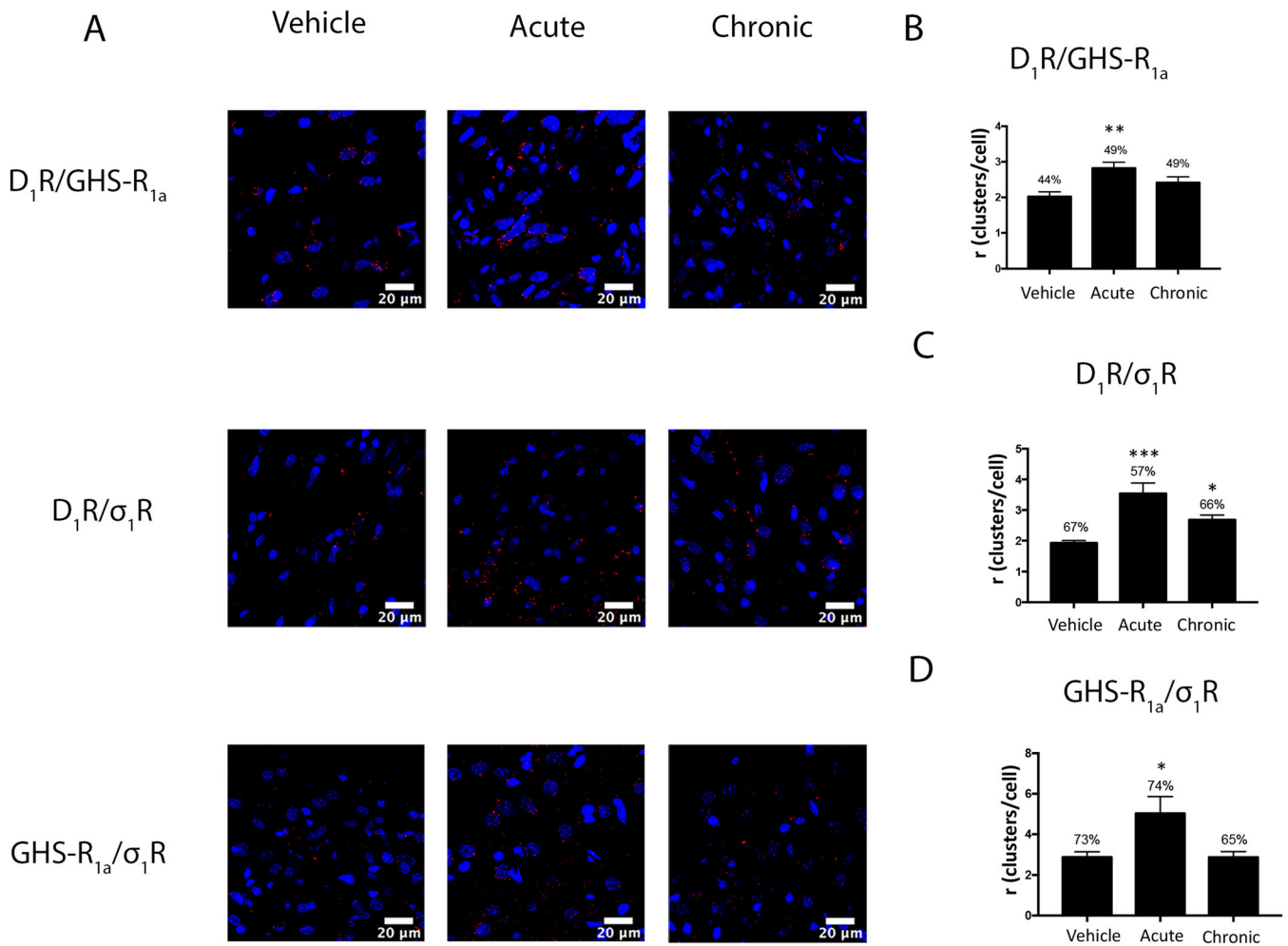


FIGURE 6 Expression level of D_1R - $GHS-R_{1a}$ - σ_1R heteromeric complexes in the striatum of cocaine administered rats. Proximity ligation assay (PLA) was performed in striatal sections from male rats i.p. administered with 15 mg/kg cocaine for 1 (acute) or 14 (chronic) days or vehicle (control) using specific primary antibodies against D_1R and $GHS-R_{1a}$ (b), D_1R and σ_1R (c) or $GHS-R_{1a}$ and σ_1R (d). Confocal microscopy images (stacks of four consecutive planes) show heteroreceptor complexes as red clusters; nuclei were Hoechst-stained (blue) (a). Scale bar: 20 μ m. The bar graph in b–d shows the number of red dots/cell, and the number above bars indicates the percentage of cells presenting red dots. Values are the mean \pm SEM of six different experiments. One-way ANOVA with post hoc Bonferroni's multiple tests was used for statistical analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (vs. vehicle treatment)

It is also important to note that the acute cocaine treatment led to a significant increase not only in $GHS-R_{1a}$ - σ_1R but also in D_1R - σ_1R and $GHS-R_{1a}$ - D_1R complexes; however, in the chronic regimen, the expression levels of all mentioned receptor pairs significantly decreased, indicating an important role of $GHS-R_{1a}$ and D_1R receptors to promote cocaine acute effects.

Remarkably, the functional unit here identified is affected by cocaine in an asymmetric-like fashion. In fact, the Gs-mediated signaling is moderately altered, whereas the calcium release from the endoplasmic reticulum was completely blunted by the drug of abuse. Furthermore, the effect is mediated by the σ_1R as it did not occur in samples from σ_1R KO mice. Fortunately, synthetic agonists and antagonists are available despite the endogenous ligand of the σ_1R remaining unknown. Selective agonists are identified on the basis of a dose-dependent alteration of the binding of the σ_1R to the binding immunoglobulin protein/78-kDa glucose-regulated protein

(BiP/GPR-78).^{58–60} Although the signaling machinery engaged by σ_1R activation is not deciphered, it is known that the receptor promotes homotropic and heterotropic translocation of proteins to the plasma membrane and, via protein–protein interactions, modulates signaling mediated by cell surface GPCRs.⁶¹

To sum up, cocaine via interaction with σ_1R is affecting the action of a neurotransmitter, dopamine, and of an orexigenic hormone and neuromodulator, ghrelin, via the macromolecular complex formed by σ_1 , D_1 , and $GHS-R_{1a}$ receptors. The structure of such a complex allows intermingling of signaling outputs, with ghrelin engaging Gs, which is not the cognate coupling protein for $GHS-R_{1a}$ receptors, and with dopamine engaging Gq, which is not the cognate coupling protein for the D_1 receptor. Cocaine affects the expression of the macromolecular complex, also markedly altering the link of GPCRs in the complex with the MAPK pathway. Impacting on Ca^{2+} -mediated signaling and on the MAPK pathway in reward brain areas is key for food

intake control and for the management of anorexia/bulimia.^{2,62,63} Remarkably, there is another heteromeric complex formed by dopamine D₁ and D₂ receptors that couples to Gq and whose activation attenuates cocaine-induced ERK phosphorylation. Furthermore, the heteromer is able to inhibit the nucleus accumbens field potentials affected by cocaine.^{64,65} The cumulative evidence suggests that GPCR heteromers in complex with cocaine-sensitive σ_1 receptors are involved in the plastic changes underlying cocaine addiction and impacting on food consumption habits.

A better understanding of the mechanisms underlying the action of cocaine and its links to the reward circuits activated by food intake is essential to address both drug addiction and obesity. In fact, obesity is not only considered an epidemic (see literature⁶⁶ for recent review), but it also shares characteristics of drug addiction. Furthermore, the possibility of biased signaling^{67–70} combined with targeting dopamine and ghrelin receptor-containing functional units opens up new avenues for the treatment of addiction and/or eating disorders.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Esteve Pharmaceuticals for kindly providing the σ_1 R KO animals needed in this study. We thank Prof. E.I. Canela for allowing completion of this study that was contemplated within the overall project devoted to investigating the mechanism of cocaine actions in the Molecular Neurobiology laboratory of the University of Barcelona. This work was partially supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN); they may include EU FEDER funds (BFU2015-64405-R, SAF2016-77830-R, and SAF2015-74627-JIN). The laboratory of the University of Barcelona is considered of excellence by the Regional Catalanian Government (*grup consolidat* # 2017 SGR 1497) but does not provide any specific funding for reagents or for payment of services.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC performed most of the experimental work in which AL and JI also participated in a significant manner. MC together with AC, GN, and MJR prepared Figures and tables. MJR performed most of the *in silico* work under the supervision of AC and LP. KG heads the laboratory in Chile where the cocaine treatment was performed; IVQ and MM participated in performing the protocol, isolated brains, and made brain sections. RF coordinated all the project in the different laboratories and, together with AC and GM, prepared the first draft of the manuscript. All coauthors edited the manuscript and approved the submitted version.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interests.

ETHICAL APPROVAL

Studies involving animals were performed strictly following national and international regulations/guidelines, and in the case of cocaine-treated animals, the protocol was approved by the Ethics Committee of Faculty of Biological Sciences and of the *Pontificia Universidad Católica de Chile* (CBB-212/2014), and assays were performed


following international guidelines (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Every single datum in the paper is available upon request to the corresponding authors.

ORCID

Mireia Casanovas  <https://orcid.org/0000-0002-7697-1108>

Mireia Jiménez-Rosés  <https://orcid.org/0000-0002-4049-8670>

Rafael Franco  <https://orcid.org/0000-0003-2549-4919>

REFERENCES

- Blum K, Braverman ER, Holder JM, et al. The reward deficiency syndrome: a biogenetic model for the diagnosis and treatment of impulsive, addictive and compulsive behaviors. *J Psychoactive Drugs*. 2000; 32(sup1):1-112.
- Febo M, Blum K, Badgaiyan RD, et al. Dopamine homeostasis: brain functional connectivity in reward deficiency syndrome. *Front Biosci - Landmark*. 2017;22:669-691.
- Molina JA, Sáinz-Artiga MJ, Fraile A, et al. Pathologic gambling in Parkinson's disease: a behavioral manifestation of pharmacologic treatment? *Mov Disord*. 2000;15(5):869-872.
- Seedat S, Kesler S, Niehaus DJH, Stein DJ. Pathological gambling behaviour: emergence secondary to treatment of Parkinson's disease with dopaminergic agents. *Depress Anxiety*. 2000;11(4):185-186.
- O'Sullivan J. Too much of a good thing: hedonistic homeostatic dysregulation and other behavioural consequences of excessive dopamine replacement therapy in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2020;91(6):566-567.
- Wise RA, Robble MA. Dopamine and addiction. *Annu Rev Psychol*. 2020;71(1):79-106.
- Hikida T, Morita M, Macpherson T. Neural mechanisms of the nucleus accumbens circuit in reward and aversive learning. *Neurosci Res*. 2016;108:1-5.
- Cao CJ, Young MM, Wong JB, Mahran LG, Eldefrawi ME. Putative cocaine receptor in striatum is a glycoprotein with active thiol function. *Membr Biochem*. 1989;8(4):207-220.
- Calligaro DO, Eldefrawi ME. High affinity stereospecific binding of [³H] cocaine in striatum and its relationship to the dopamine transporter. *Membr Biochem*. 7:87-106.
- Fernández-Dueñas V, Burgueño J, Ciruela F. Exploring drug-receptor interaction kinetics: lessons from a sigma-1 receptor transmembrane biosensor. *Front Pharmacol*. 2017;8:4. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00004>
- Merlos M, Burgueño J, Portillo-Salido E, Plata-Salamán CR, Vela JM. Pharmacological modulation of the sigma 1 receptor and the treatment of pain. *Adv Exp Med Biol*. 2017;964:85-107.
- Díaz JL, Christmann U, Fernández A, et al. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of selective sigma1 receptor ligands for the treatment of pain: 4-aminotriazoles. *J Med Chem*. 2015;58(5):2441-2451.
- Schmidt HR, Zheng S, Gурpinar E, Koehl A, Manglik A, Kruse AC. Crystal structure of the human σ_1 receptor. *Nature*. 2016;532(7600):527-530.
- Kruse A. Structural insights into sigma1 function. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 244. 2016:13-25. https://doi.org/10.1007/164_2016_95
- Moreno E, Moreno-Delgado D, Navarro G, et al. Cocaine disrupts histamine H3 receptor modulation of dopamine D1 receptor signaling: σ_1 -D1-H3 receptor complexes as key targets for reducing Cocaine's effects. *J Neurosci*. 2014;34(10):3545-3558.

16. Aguinaga D, Medrano M, Vega-Quiroga I, et al. Cocaine effects on dopaminergic transmission depend on a balance between sigma-1 and sigma-2 receptor expression. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00017>
17. Navarro G, Moreno E, Bonaventura J, et al. Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor Heteromers. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e61245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061245>
18. Borroto-Escuela DO, Narváez M, Wydra K, et al. Cocaine self-administration specifically increases A2AR-D2R and D2R-sigma1R heteroreceptor complexes in the rat nucleus accumbens shell. Relevance for cocaine use disorder. *Pharmacol Biochem Behav*. 2017;155:24-31.
19. Barr JL, Deliu E, Brailoiu GC, et al. Mechanisms of activation of nucleus accumbens neurons by cocaine via sigma-1 receptor-inositol 1,4,5-trisphosphate-transient receptor potential canonical channel pathways. *Cell Calcium*. 2015;58(2):196-207.
20. Lever JR, Fergason-Cantrell EA, Watkinson LD, et al. Cocaine occupancy of sigma 1 receptors and dopamine transporters in mice. *Synapse*. 2016;70(3):98-111.
21. Katz JL, Hiranita T, Hong WC, Job MO, McCurdy CR. A role for sigma receptors in stimulant self-administration and addiction. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;244:177-218.
22. Matsumoto RR, Hewett KL, Pouw B, et al. Rimcazole analogs attenuate the convulsive effects of cocaine: correlation with binding to sigma receptors rather than dopamine transporters. *Neuropharmacology*. 2001;41(7):878-886.
23. Garcés-Ramírez L, Green JL, Hiranita T, et al. Sigma receptor agonists: receptor binding and effects on mesolimbic dopamine neurotransmission assessed by microdialysis. *Biol Psychiatry*. 2011;69(3):208-217.
24. Navarro G, Moreno E, Aymerich M, et al. Direct involvement of σ -1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107(43):18676-18681.
25. Aguinaga D, Medrano M, Cordero A, et al. Cocaine blocks effects of hunger hormone, ghrelin, via interaction with neuronal sigma-1 receptors. *Mol Neurobiol*. 2019;56(2):1196-1210.
26. Delgado MR. Reward-related responses in the human striatum. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol.1104 Blackwell Publishing Inc; 2007.
27. Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(37):15037-15042.
28. Cox J, Witten IB. Striatal circuits for reward learning and decision-making. *Nat Rev Neurosci*. 2019;20(8):482-494.
29. Sherry Chow H-H, Chen Z, Matsuura GT. Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats. *J Pharm Sci*. 1999;88(8):754-758.
30. Liu J, Yu B, Orozco-Cabal L, et al. Chronic cocaine administration switches corticotropin-releasing factor2 receptor-mediated depression to facilitation of glutamatergic transmission in the lateral septum. *J Neurosci*. 2005;25(3):577-583.
31. Navarro G, Hradsky J, Lluís C, et al. NCS-1 associates with adenosine a(2A) receptors and modulates receptor function. *Front Mol Neurosci*. 2012;5:53.
32. Hradsky J, Mikhaylova M, Karpova A, Kreutz MR, Zuschratter W. Super-resolution microscopy of the neuronal calcium-binding proteins calneuron-1 and caldendrin. *Methods Mol Biol*. 2013;963:147-169.
33. Egloff P, Hillenbrand M, Klenk C, et al. Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(6):E655-E662.
34. Krumm BE, White JF, Shah P, Grishammer R. Structural prerequisites for G-protein activation by the neurotensin receptor. *Nat Commun*. 2015;6(1):7895.
35. Rasmussen SGFF, Devree BT, Zou Y, et al. Crystal structure of the β 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*. 2011;477(7366):549-557.
36. Miller-Gallacher JL, Nehmé R, Warne T, et al. The 2.1 Å resolution structure of cyanopindolol-bound β 1-adrenoceptor identifies an intramembrane Na⁺ ion that stabilises the ligand-free receptor. *PLoS ONE*. 2014;9.
37. Carpenter B, Nehmé R, Warne T, Leslie AGW, Tate CG. Structure of the adenosine a(2A) receptor bound to an engineered G protein. *Nature*. 2016;536(7614):104-107.
38. Maeda S, Qu Q, Robertson MJ, Skiniotis G, Kobilka BK. Structures of the M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor/G-protein complexes. *Science (80-)*. 2019;364:552-557.
39. Martí-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Šali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2000;29(1):291-325.
40. van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, et al. The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *J Mol Biol*. 2016;428:720-725.
41. García-Recio A, Navarro G, Franco R, Olivella M, Guixà-González R, Cordero A. DIMERBOW: exploring possible GPCR dimer interfaces. *Bioinformatics*. 2020;36(10):3271-3272.
42. Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, et al. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*. 2012;485(7398):321-326.
43. Wu H, Wacker D, Mileni M, et al. Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JD1c. *Nature*. 2012;485:327-332.
44. Cordero A, Navarro G, Aymerich MS, Franco R. Structures for G-protein-coupled receptor tetramers in complex with G proteins. *Trends Biochem Sci*. 2015;40(10):548-551.
45. Navarro G, Cordero A, Zelman-Femiak M, et al. Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. *BMC Biol*. 2016;14(1):26.
46. Maier JA, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser KE, Simmerling C. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J Chem Theory Comput*. 2015;11(8):3696-3713.
47. Case DA, Belfon K, Ben-Shalom IY, et al. AMBER 2020. San Francisco: University of California; 2020.
48. Navarro G, Cordero A, Brugarolas M, et al. Cross-communication between Gi and Gs in a G-protein-coupled receptor heterotetramer guided by a receptor C-terminal domain. *BMC Biol*. 2018;16(24):1-15.
49. Navarro G, Carriba P, Gandía J, et al. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal*. 2008;8:1088-1097.
50. Alexander SP, Christopoulos A, Davenport AP, et al. The concise guide to pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. 2019(176):S21-S141.
51. Carriba P, Navarro G, Ciruela F, et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods*. 2008;5(8):727-733.
52. Maurel D, Comps-Agrar L, Brock C, et al. Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods*. 2008;5(6):561-567.
53. Ferré S, Baler R, Bouvier M, et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol*. 2009;5(3):131-134.
54. Franco R, Martínez-Pinilla E, Lanciego JL, Navarro G. Basic pharmacological and structural evidence for class A G-protein-coupled receptor heteromerization. *Front Pharmacol*. 2016;7:76.
55. Bergson C, Levenson R, Goldman-Rakic PS, Lidow MS. Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca(2+) connection in dopamine signaling. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(9):486-492.
56. Navarro G, Aguinaga D, Moreno E, et al. Intracellular calcium levels determine differential modulation of allosteric interactions within G

- protein-coupled receptor heteromers. *Chem Biol.* 2014;21(11):1546-1566.
57. Mundhenk J, Fusi C, Kreutz MR. Caldendrin and calneurons—EF-hand CaM-like calcium sensors with unique features and specialized neuronal functions. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:16.
58. Prezzavento O, Arena E, Sánchez-Fernández C, et al. (+)- and (-)-Phenazocine enantiomers: evaluation of their dual opioid agonist/ σ 1 antagonist properties and antinociceptive effects. *Eur J Med Chem.* 2017;125:603-610.
59. Sun H, Shi M, Zhang W, et al. Development of novel alkoxyisoxazoles as sigma-1 receptor antagonists with antinociceptive efficacy. *J Med Chem.* 2016;59(13):6329-6343.
60. Hayashi T, Su T. The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology. *Curr Neuropharmacol.* 2005;3(4):267-280.
61. Su TP, Su TC, Nakamura Y, Tsai SY. The sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol Sci.* 2016;37(4):262-278.
62. Ng E, Varaschin RK, Su P, et al. Neuronal calcium sensor-1 deletion in the mouse decreases motivation and dopamine release in the nucleus accumbens. *Behav Brain Res.* 2016;301:213-225.
63. Blum K, Thanos PK, Wang G-J, et al. The food and drug addiction epidemic: targeting dopamine homeostasis. *Curr Pharm des.* 2017;23:6050-6061.
64. Perreault ML, Hasbi A, Shen MYF, et al. Disruption of a dopamine receptor complex amplifies the actions of cocaine. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2016;26:1366-1377.
65. Hasbi A, Perreault ML, Shen MYF, et al. Activation of dopamine D1-D2 receptor complex attenuates cocaine reward and reinstatement of cocaine-seeking through inhibition of DARPP-32, ERK, and Δ FosB. *Front Pharmacol.* 2018;8:924. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00924>
66. Constant A, Moirand R, Thibault R, Val-Laillet D. Meeting of minds around food addiction: insights from addiction medicine, nutrition, psychology, and neurosciences. *Nutrients.* 2020;12:1-24.
67. Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(3):205-216.
68. Kenakin T, Watson C, Muniz-Medina V, Christopoulos A, Novick S. A simple method for quantifying functional selectivity and agonist bias. *ACS Chem Neurosci.* 2012;3(3):193-203.
69. Franco R, Aguinaga D, Jiménez J, Lillo J, Martínez-Pinilla E, Navarro G. Biased receptor functionality versus biased agonism in G-protein-coupled receptors. *Biomol Concepts.* 2018;9(1):143-154.
70. Franco R, Rivas-Santisteban R, Reyes-Resina I, Navarro G. *The old and new visions of biased agonism through the prism of adenosine receptor signaling and receptor/receptor and receptor/protein interactions.* *Pharmacol: Front;* 2020 In the Press.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Casanovas M, Jiménez-Rosés M, Cordero A, et al. Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: Structural and functional properties. *Addiction Biology.* 2021; e13017. <https://doi.org/10.1111/adb.13017>

Supplementary material for

Research Article

Structural and functional insights into the macromolecular complex that likely mediates the hunger suppressive actions of cocaine

By Mireia Casanovas, Mireia Jiménez-Rosés, Arnau Cordero, Alejandro Lillo, Joan Izquierdo, Mireia Medrano, Katya Gysling, Leonardo Pardo, Gemma Navarro, Rafael Franco

GHS-R_{1a}
TM1
APLLAGVTATSVALFVVGIAGNLLTMLVV- GRKKRRQRRR
TM2
RRRQRKKRG -LYLSSMAFSDLLIFLSMPLDLV
TM3
FQFVSESSTYATVLTITALSV- GRKKRRQRRR
TM4
RRRQRKKRG -VKLVIFVIWAVAFSSAGPIFVL
TM5
LLTVMVWVSSIFFFLPVFSLTVLYSLI- GRKKRRQRRR
TM6
RRRQRKKRG -MLAVVVF AFILCWLPFHVGRYLF
TM7
YCNLVSFVLFYLSAAINPILYNIM- GRKKRRQRRR
D₁R
TM5
TYAISSVISFYIPVAIMIVTYTRIIY- YGRKKRRQRRR
TM6
YGRKKRRQRRR -TLSVIMGVFVCCWLPPFILNCILPFCG
TM7
FDVFVWFGWANSSLNPIIYAFNADF- YGRKKRRQRRR

Supplementary Table S1. Chemical structure of cell-penetrating synthetic peptides. Amino acid sequences (one letter code) of interference peptides corresponding to the amino acids of TM helices from GHS-R_{1a} or D₁R fused to the transactivator of transcription (TAT) peptide (GRKKRRQRRR sequence for GHS-R_{1a}-derived peptides or YGRKKRRQRRR sequence for D₁R-derived peptides) of the human immunodeficiency virus.



3. Resultados

3.4. Differential effect of amphetamine over the corticotropin-releasing factor CRF₂ receptor, the orexin OX₁ receptor and the CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex.

Gemma Navarro^{a,b,1}, Mireia Medrano^{b,c,1}, David Aguinaga^{b,c}, Ignacio Vega-Quiroga^d, Alejandro Lillo^c, Jasmina Jiménez^b, **Mireia Casanovas**^{b,c}, Enric I. Canela^{b,c}, Josefa Mallol^{b,c}

^a Department of Biochemistry and Physiology, Pharmacy and Food Science School, University of Barcelona, Spain

^b Centro de Investigación en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, University of Barcelona, Spain

^d Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

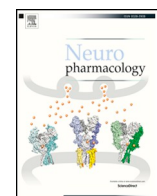
Manuscrito publicado en la revista *Neuropharmacology* (2019) 152:102-111.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.014>

El estrés es uno de los factores subyacentes al comportamiento de la búsqueda de sustancias de abuso que muy a menudo va acompañado de una pérdida del apetito. En este trabajo, hemos demostrado que el receptor de orexina 1 (OX₁R) puede formar complejos con el receptor del factor liberador de corticotropina CRF₂. Dos características específicas de este heterómero son un *cross*-antagonismo y un bloqueo inducido por CRF₂R sobre la señalización de OX₁R. En células HEK-293T que expresan solamente uno de estos dos receptores, la señal inducida por sus respectivos agonistas es potenciada por el tratamiento con anfetamina. Los receptores sigma 1 (σ_1 R) y sigma 2 (σ_2 R) son dianas de sustancias de abuso y, a pesar de compartir un nombre similar, los dos receptores no están relacionados estructuralmente y se desconoce su papel fisiológico. En este trabajo hemos observado que los receptores σ_1 interaccionan con CRF₂R y que los receptores σ_2 interaccionan con OX₁R. Además, hemos observado que los efectos de la anfetamina sobre los receptores de CRF₂ están mediados por σ_1 R, mientras que los efectos de esta sustancia sobre OX₁R se producen a través de σ_2 R. El tratamiento con anfetamina potencia la regulación negativa entre el heterómero CRF₂R-OX₁R, probablemente, por un complejo macromolecular que involucra a los dos receptores sigma y a estos dos GPCR. Finalmente, en experimentos de microdiálisis *in vivo* hemos observado que la anfetamina potencia la liberación de dopamina y glutamato en el área tegmental ventral (ATV) inducida por el tratamiento con orexina-A. De forma remarcable, los efectos *in vivo* de la orexina-A



3. Resultados

son bloqueados por un antagonista selectivo del CRF₂R. Estos resultados muestran el impacto que tiene la anfetamina sobre la señalización de los receptores OX₁R, CRF₂R y del heterómero CRF₂R-OX₁R y sugieren el *cross*-antagonismo como una herramienta instrumental para la detección de heterómeros de GPCR *in vivo*



Differential effect of amphetamine over the corticotropin-releasing factor CRF₂ receptor, the orexin OX₁ receptor and the CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex



Gemma Navarro^{a,b,1}, Mireia Medrano^{b,c,1}, David Aguinaga^{b,c}, Ignacio Vega-Quiroga^d, Alejandro Lillo^c, Jasmina Jiménez^b, Mireia Casanovas^{b,c}, Enric I. Canela^{b,c}, Josefa Mallol^{b,c}, Katia Gysling^d, Rafael Franco^{b,c,*}

^a Department of Biochemistry and Physiology, Pharmacy and Food Science School, University of Barcelona, Spain

^b Centro de Investigación en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

^c Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, University of Barcelona, Spain

^d Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

HIGHLIGHTS

- Orexin 1 receptors (OX₁R) may heteromerize with the corticotropin releasing factor CRF₂ receptor.
- Sigma1 receptors interact with CRF₂ receptors and that sigma2 receptors interact with OX₁R.
- Amphetamine may impact on sigma1 and on sigma2 receptors.
- Amphetamine effect on CRF₂ is mediated by sigma1 and the effect on OX₁ is mediated by sigma2.
- *In vivo* cross-antagonism showed occurrence of OX₁R/CRF₂R-heteromer mediated signaling.

ARTICLE INFO

Keywords:

Heteromers
G-protein-coupled receptor
GPCR
GPCR heteromer
Stress
Addiction
Orexin
Sigma receptors

ABSTRACT

Stress is one of the factors underlying drug seeking behavior that often goes in parallel with loss of appetite. We here demonstrate that orexin 1 receptors (OX₁R) may form complexes with the corticotropin releasing factor CRF₂ receptor. Two specific features of the heteromer were a cross-antagonism and a blockade by CRF₂ of OX₁R signaling. In cells expressing one of the receptors, agonist-mediated signal transduction mechanisms were potentiated by amphetamine. Sigma 1 (σ_1) and 2 (σ_2) receptors are targets of drugs of abuse and, despite sharing a similar name, the two receptors are structurally unrelated and their physiological role is not known. We here show that σ_1 receptors interact with CRF₂ receptors and that σ_2 receptors interact with OX₁R. Moreover, we show that amphetamine effect on CRF₂ receptors was mediated by σ_1 R whereas the effect on OX₁ receptors was mediated by σ_2 R. Amphetamine did potentiate the negative cross-talk occurring within the CRF₂-OX₁ receptor heteromer context, likely by a macromolecular complex involving the two sigma receptors and the two GPCRs. Finally, *in vivo* microdialysis experiments showed that amphetamine potentiated orexin A-induced dopamine and glutamate release in the *ventral tegmental area* (VTA). Remarkably, the *in vivo* orexin A effects were blocked by a selective CRF₂R antagonist. These results show that amphetamine impacts on the OX₁R-, CRF₂R- and OX₁R/CRF₂R-mediated signaling and that cross-antagonism is instrumental for *in vivo* detection of GPCR heteromers.

This article is part of the Special Issue entitled 'Receptor heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions'.

1. Introduction

The first reference to a possible involvement of orexins in the effects

of drugs of abuse appeared in 2003 and showed that orexigenic peptide neurons respond to the chronic administration of morphine followed by abrupt withdrawal symptoms caused by opioid receptor antagonists

* Corresponding author. Departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Diagonal 643. Previsi Building, 08028, Barcelona, Spain.

E-mail addresses: rfranco@ub.edu, rfranco123@gmail.com (R. Franco).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.014>

Received 8 July 2018; Received in revised form 16 October 2018; Accepted 9 November 2018

Available online 19 November 2018

0028-3908/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

(Georgescu et al., 2003). Subsequent studies examined the effect of orexigenic peptides in the reward mechanism associated with consumption of drugs of abuse. It is today accepted that orexins have an important role in responses associated with both food and drug rewards (Aston-Jones et al., 2010; Harris et al., 2005). The exact nature of the effects of orexins in this context is unknown because of their complex involvement in different aspects of drug addiction, aversive or appetitive motivation, interactions with Pavlovian or instrumental learning processes and induced hedonic states.

Stress and drug addiction correlate in advanced societies. Therefore, the mechanisms of stress and of reward must be interconnected. A relevant regulator of stress responses is the corticotropin releasing factor (CRF), which is one of the main players in the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (Gallagher et al., 2008). CRF is a peptide synthesized and secreted by hypophysiotropic neurons that, in response to stress, is released into the hypophyseal portal veins that give access to the anterior pituitary gland. Therefore, CRF activates its cognate receptors and induces the release of the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) into the systemic circulation, where it travels to its main target, the adrenal gland. ACTH stimulates the synthesis and secretion of glucocorticoids in the adrenal cortex (Bamberger et al., 1996). In fact, the actions of glucocorticoids are mediated by glucocorticoid (GR) and mineral corticoid (MR) receptors, that are widely expressed in the brain, including areas involved in emotion, memory, and behavior such as the septum, hippocampus, and prefrontal cortex (Morimoto et al., 1996; Viengchareun et al., 2007).

A first aim of this paper was to investigate whether a drug of addiction, namely amphetamine, affected the response of orexin or of CRF receptors in a heterologous system. As orexin and CRF receptors belong to the superfamily of G-protein-coupled receptors (GPCR), G-protein-dependent and -independent signaling pathways were analyzed. As GPCRs often form heteromeric complexes, the potential of receptors to form direct receptor-receptor interactions was assayed and proved.

Sigma 1 receptors (σ_1R) are an atypical type of membrane receptors whose exact function is not known. They have been proposed as mediators of pluripotent modulation in living cells (Su et al., 2016) and research on this protein is gaining momentum due to its potential as target to combat neuropathic pain (Corbera et al., 2006; Mei and Pasternak, 2002; Sun et al., 2016). In fact, the three-dimensional structure has been recently elucidated. σ_1R protomers, with a single transmembrane domain and a C-terminal tail having a cupin-like β -barrel with a buried ligand-binding site, arranged into homotrimers (Schmidt et al., 2016). Interestingly, it is a target of different drugs of abuse, cocaine and methamphetamine among them (Cobos et al., 2008; Nguyen et al., 2005). Due to the reports showing that σ_1R may interact with metabotropic receptors for a variety of hormones/neurotransmitters, it was tempting to speculate that the receptor may be regulating the expression and function of GPCRs and of GPCR heteromers. As σ_1R may form heteromers with corticotropin-releasing factor CRF₁ receptor (Navarro et al., 2015), the occurrence of σ_1R -containing heteroreceptor complexes and the effect of amphetamine on orexin-CRF heteromer-mediated signaling.

2. Results

2.1. Orexin-1 receptors form heteromeric complexes with CRF₂ receptors in a heterologous expression system

To determine whether orexin receptor 1 (OX₁R) colocalized at the plasma membrane level with corticotropin-releasing factor 2 receptor (CRF₂R), immunocytochemistry assays were undertaken in HEK-293T cells transfected with 0.75 μ g cDNA for CRF₂R-YFP, 0.4 μ g cDNA for OX₁R-RLuc or both. CRF₂R expression was detected by the YFP own fluorescence while OX₁R expression was detected by a specific antibody against RLuc (1/100) followed by a secondary Cy3-antibody. OX₁R showed a membrane localization and CRF₂R was localized at the plasma membrane but also in intracellular structures (Fig. 1A).

Colocalization of both receptors was marked (detected in yellow in Fig. 1).

Immunocytochemistry assays are not suitable to demonstrate physical interactions. Thus, bioluminescence energy transfer (BRET) assays were developed in HEK-293T cells expressing a constant amount of OX₁R-RLuc and increasing amounts of CRF₂R-YFP. The saturation BRET curve shown in Fig. 1B indicates a specific interaction between CRF₂R and OX₁R (BRET_{max} 46 \pm 3 mBU, BRET₅₀ 33 \pm 6) (Fig. 1B). As negative control, HEK-293T cells were transfected with the cDNA for GHS-R1a-RLuc (0.75 μ g cDNA) and increasing amounts of the cDNA for CRF₂R-YFP (0.1–1.2 μ g cDNA) and an unspecific linear signal was obtained (Fig. 1B).

2.2. Functional characterization of CRF₂R-OX₁R complexes

It is well established that GPCR heteroreceptor complexes display unique properties that differ from those of the individual receptors. To describe the heteromer-specific signaling characteristics, HEK-293T cells coexpressing CRF₂R and OX₁R were treated with the specific antagonist for CRF₂R, K41498 (1 μ M), the specific antagonist for OX₁R, SB334867 (1 μ M) or vehicle, followed by activation of receptors with CRF (100 nM) and/or Orexin A (100 nM). Four different techniques were used to address signal transduction. In cAMP determination assays we observed that CRF treatment induced a significant increase in cAMP levels, i.e. G-coupling of the CRF₂R. Orexin A decreased 0.5 μ M forskolin-induced cAMP levels, thus underscoring Gi-coupling of OX₁R (Fig. 2A). Interestingly, coactivation with CRF and Orexin A induced a signal similar to that obtained with CRF, indicating that CRF₂R engagement blocks OX₁R coupling to Gi in the CRF₂R-OX₁R complex. When cells were pretreated with K41498, the CRF₂R antagonist, a complete inhibition of both the CRF and the Orexin A effects was observed. Such cross-antagonism is an often-found property of GPCR heteromers (Franco et al., 2007). The pretreatment with the antagonist of OX₁R, SB334867, offered a partial cross-antagonism when cells were stimulated with CRF (Fig. 2A). In the analysis of calcium mobilization, CRF induced no effect whereas Orexin A, consistent with canonical Gq coupling of OX₁R, produced a transient response with a maximum of cytosolic calcium concentration at 30 s after ligand addition. Interestingly, coactivation with both ligands significantly reduced Orexin A-induced effects. Moreover, cross-antagonism was found; in fact, not only SB334867 but also K41498 inhibited the effect of Orexin A (Fig. 2B). In ERK1/2 phosphorylation and label-free assays, the effect of either CRF or Orexin A was significantly higher than that obtained when cells were simultaneously treated with the two agonists (Fig. 2C and D). The results reflect allosteric interactions within the heteromer that impair signaling when the two protomers are activated. Once more, a cross-antagonism phenomenon was detected as shown by the effect of antagonists displayed in Fig. 2C and D. Taken together, the functional characterization of the CRF₂R-OX₁R complex results in finding a partial or total cross-antagonism and an allosteric-driven negative cross-talk that was more evident when quantifying the effect of Orexin A in the presence of CRF.

2.3. Amphetamine potentiates CRF₂ and OX₁ receptor signaling in a heterologous expression system

As the sensation of hunger is suppressed by amphetamine, we investigated whether the drug could affect CRF₂-OX₁ receptor heteromer-mediated signaling. HEK-293T cells transfected with the cDNA (0.6 μ g) for CRF₂R were pretreated for 30 min with amphetamine (2 μ M) (white bars) or vehicle (black bars) and activated using CRF (100 nM) (Fig. 3A and B). The increase in cAMP levels (around 290%) was further enhanced by the drug (390%). Due to the lack of OX₁R expression, coactivation with CRF and Orexin A provided in both conditions, with and without amphetamine, similar results as with CRF (Fig. 3A). In OX₁R-expressing cells, Orexin A led to a reduction in the forskolin-induced cAMP levels (24% reduction), that was potentiated (to 48% reduction) when 2 μ M amphetamine was added (Fig. 3B). Interestingly,

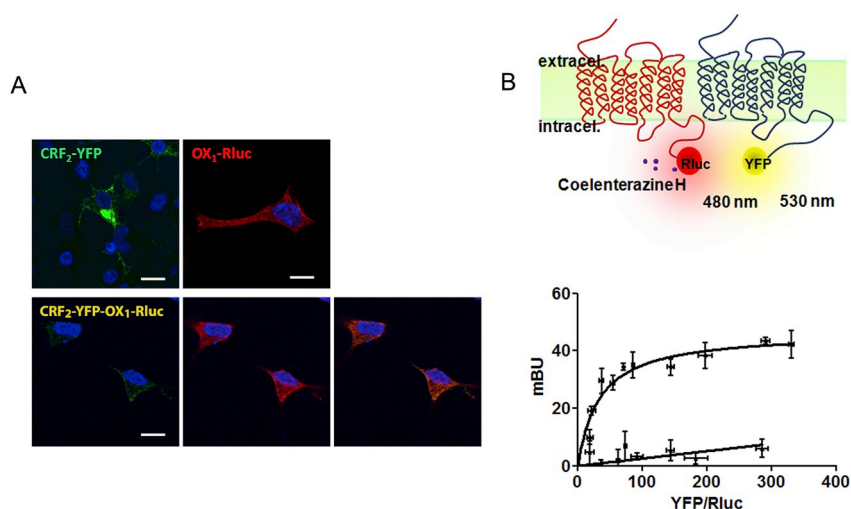


Fig. 1. Expression and interaction of CRF₂ and orexin OX₁ receptors in a heterologous system. Panel A: Receptors expressed in HEK-293T cells transfected with 0.75 μg cDNA for CRF₂-YFP, 0.4 μg cDNA for OX₁-RLuc or both were identified by YFP fluorescence (green) or by a monoclonal anti-RLuc (1/100) primary antibody and a cyanine-3-conjugated (1/200) secondary antibody (red). Images include planes near the slide surface. Colocalization of both receptors is shown in yellow. Nuclei were stained with Hoechst (1/100, blue). Relative fluorescence intensity was 59 for CRF₂-YFP and 46 for OX₁-RLuc (SD < 10%). Scale bar 20 μm. Panel B: BRET was performed in HEK-293T cells expressing a constant amount of OX₁-RLuc (0.4 μg cDNA) (or GHS-R_{1a}-RLuc – 0.75 μg cDNA- as negative control) and increasing amounts of CRF₂-YFP (0.1–1.2 μg cDNA) (Fig. 1B). Values are the mean ± SEM of 6 different experiments. A schematic representation of the assay is shown (top).

similar results were obtained when CRF₂R or OX₁R expressing cells (0.6 μg cDNA each) were analyzed by the DMR label-free assay (Fig. 3 C, D), i.e. a significant increase in agonist-induced changes in mass distribution was found in cells pretreated with amphetamine (2 μM) for 30 min. In agreement with its coupling to a Gs protein, activation of the receptor in CRF₂R expressing HEK-293T cells did not lead to alteration in cytoplasmic calcium levels (Fig. 3E). In OX₁R-expressing cells, Orexin A produced a characteristic peak of cytosolic calcium that was further increased with amphetamine (2 μM) pretreatment. These results agree with those observed in cAMP and DMR signals, indicating that amphetamine pretreatment potentiates both CRF₂R and OX₁R G-protein-dependent signaling pathways. Finally, the MAPK activation assays showed that treatment with 100 nM CRF in cells individually expressing CRF₂R increased by 2-fold the basal levels of ERK1/2 phosphorylation and amphetamine pretreatment led to a relatively small potentiation (Fig. 3G). In contrast, in cells expressing OX₁R, the significant effect of 100 nM Orexin A (> 4-fold increase over basal) was significantly reduced upon 2 μM amphetamine pretreatment (Fig. 3H). These results indicate that amphetamine impacts on both CRF₂R- and OX₁R-mediated dependent signaling.

2.4. Amphetamine effects over CRF₂R depend on σ₁R expression

Corticotropin-releasing hormones act via two different receptors, CRF₁R and CRF₂R. We have recently reported (Navarro et al., 2015) the physical interaction between CRF₁R and σ₁R, demonstrating that CRF₁R receptors participate in cocaine-dependent actions. It has also been reported (Cobos et al., 2008; Nguyen et al., 2005) that different drugs of abuse, cocaine and methamphetamine among them, may bind to σ₁R. Accordingly, we wondered whether the amphetamine modulation of CRF₂R action could be mediated by σ₁R. First, HEK-293T cells were transfected with a constant amount of cDNA (0.3 μg) for σ₁R-RLuc and increasing amounts of cDNA for CRF₂R-YFP (0.1–1.5 μg). A positive and saturable BRET curve, indicative of dimer formation, was obtained (Fig. 4A). We subsequently addressed the potential of σ₁R to mediate the effect of amphetamine on CRF₂R by silencing σ₁R expression using a siRNA approach. Importantly, we used HEK-293T cells expressing CRF₂R with (Fig. 4D) or without the siRNA (Fig. 4C) to determine cAMP levels in cells pretreated for 30 min with vehicle (black bars) or with 2 μM amphetamine (white bars). The results showed that σ₁R-silenced cells did not exhibit the amphetamine-modulating effect. It is assumed that amphetamine potentiation of CRF-induced cAMP signaling was due to binding of the drug to σ₁R and to the CRF₂ and σ₁ receptor

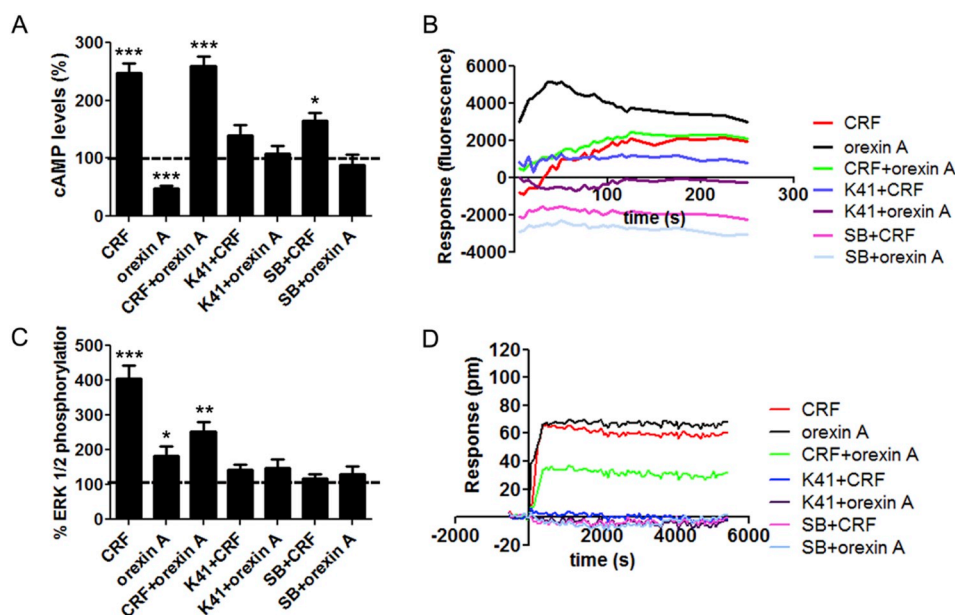


Fig. 2. Functional characterization of the CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex. HEK-293T cells transfected with 0.5 μg cDNA for CRF₂ receptor and with 0.6 μg cDNA for OX₁ receptor were pretreated with the CRF₂ receptor antagonist, K41498 (1 μM) or the OX₁ receptor antagonist SB334687 (1 μM) followed by treatment with CRF (100 nM), orexin A (100 nM) or both. cAMP levels (A), calcium release (B), ERK1/2 phosphorylation (C) and DMR (D) data were collected. In panel A data are represented in percentage (100% represented by the forskolin effect) and were obtained in the presence of 0.5 μM forskolin except when the effect of CRF, individually or in combination with other reagents, was assayed. In panel C data are represented in percentage over basal (100% represented by a dotted line). Values are the mean ± SEM of 8 different experiments. In all cases, one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison *post hoc* test showed a significant effect over basal (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

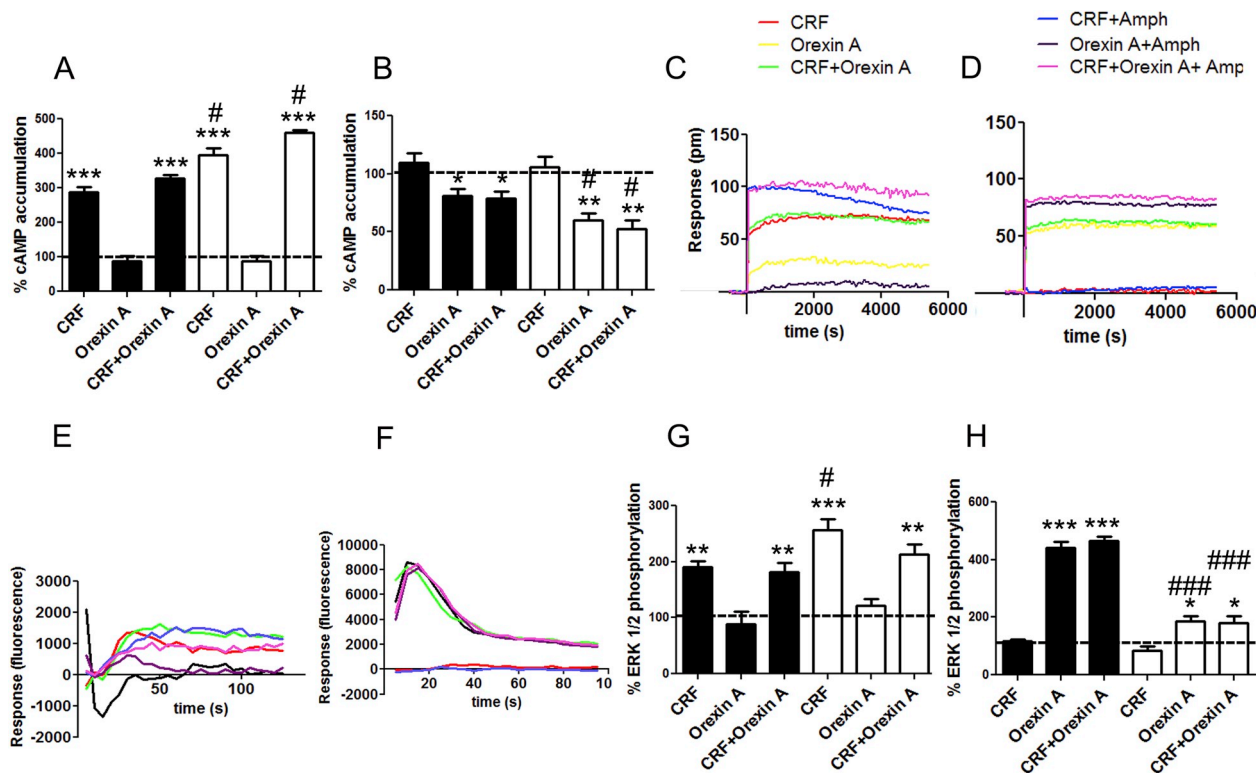


Fig. 3. Amphetamine potentiates both, orexin- and CRF-induced signaling. HEK-293T cells transfected with 0.75 μ g cDNA for CRF₂ receptor (A, C, E, G) or with 1 μ g cDNA for OX₁ receptor (B, D, F, H) were pretreated with 2 μ M amphetamine (white bars) or vehicle (black bars) for 30 min prior to CRF (100 nM), orexin A (100 nM) or combined treatments. cAMP levels (A–B), calcium release (C–D), DMR (E–F) and ERK1/2 phosphorylation (G–H) data were collected. Data are given in percentage respect to basal (A) or respect to cAMP levels obtained in the presence of 0.5 μ M forskolin (B); in A and B 100% a dotted line indicates the 100% value. Values are the mean \pm SEM of 7 different experiments. In all cases, one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison *post hoc* test showed a significant effect over basal (or over forskolin in the case of cAMP assays using orexin A) (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001), or amphetamine treatment versus vehicle (#*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001).

interaction (Fig. 4D).

2.5. Amphetamine effects over OX₁R depend on σ ₂R expression

It is known that OX₁R are not able to physically interact with σ ₁R (Navarro et al., 2015). Thus, it is difficult to understand how amphetamine could modulate Orexin A effects. It has been reported (Cobos et al., 2008; Nguyen et al., 2005) that different drugs of abuse may bind to σ ₂R. To know whether amphetamine effects on OX₁R function could be due to the formation of a σ ₂R-OX₁R complex, HEK-293T cells expressing a constant amount of OX₁R-RLuc (0.35 μ g) and increasing amounts of σ ₂R-YFP (0.05–0.4 μ g) were assayed for BRET. A specific interaction between σ ₂R and OX₁R receptors was deduced from the saturable BRET curve (BRET_{max} 21 \pm 4, BRET₅₀ 43 \pm 14) (Fig. 4B). Functional studies were then undertaken in HEK-293T cells expressing OX₁R and endogenous σ ₂R (Fig. 4C) or in cells in which the expression of σ ₂R was silenced by a specific siRNA (Fig. 4E). Amphetamine (2 μ M) pretreatment only modulated the action of Orexin A action on forskolin-induced cAMP levels when σ ₂R was expressed. In summary, amphetamine potentiation of receptor-G_i coupling seemed due to the physical interaction between OX₁R and σ ₂R.

2.6. Amphetamine potentiates the negative cross-talk displayed by the OX₁R-CRF₂R heteromer

We next moved to test the effect of the drug of abuse on the heteromer-mediated signaling. Immunocytochemistry assays were performed in a heterologous expression system to investigate whether amphetamine could affect the expression of OX₁R-CRF₂R heteromers. OX₁R was expressed at the plasma membrane level with no major

changes in cells pretreated with amphetamine. CRF₂R, which showed a mainly intracellular expression in the absence of amphetamine, increased surface expression in cells treated with the drug. Moreover, colocalization between CRF₂R and OX₁R at the plasma membrane level increased (Fig. 5A). To analyze the amphetamine effect over CRF₂R-OX₁R heteromeric complexes, a BRET assay was performed in cells expressing a constant amount of OX₁R-RLuc and increasing amounts of CRF₂R-YFP. Similar results were obtained in cells untreated (black line) or treated with 2 μ M amphetamine (red line) (BRET_{max} 56 \pm 2, BRET₅₀ 9 \pm 1 and BRET_{max} 62 \pm 4, BRET₅₀ 10 \pm 2, respectively) (Fig. 5B). These results indicate that amphetamine does not significantly alter the structure of the CRF₂R and OX₁R complex. Finally, to assess any effect of amphetamine over the CRF₂R-OX₁R complex, cAMP, ERK1/2 phosphorylation, calcium mobilization and label-free assays were performed in cotransfected cells pretreated with receptor antagonists (1 μ M K41498 or 1 μ M SB334867) and with 2 μ M amphetamine or vehicle. When receptors were activated using CRF (100 nM) or Orexin A (100 nM), amphetamine potentiated both CRF- and Orexin A-receptor-mediated effects. Remarkably, upon receptor coactivation, the negative cross-talk observed in the absence of amphetamine, was not only maintained in the presence of the drug but it was potentiated. Moreover, the cross-antagonism phenomenon described in Fig. 2 also appeared when amphetamine was added to HEK-293T cells coexpressing CRF₂R and OX₁R. Altogether, it can be concluded that amphetamine addition exacerbates CRF₂R-OX₁R heteromer-mediated signaling.

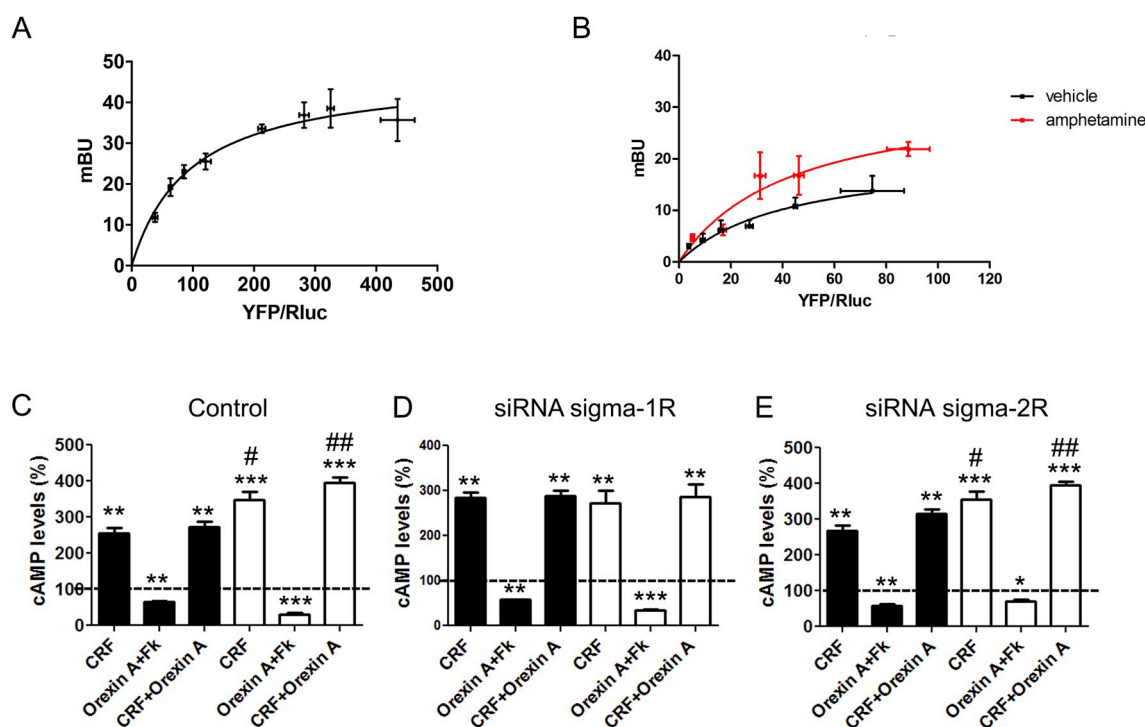


Fig. 4. CRF₂ receptors interact with σ_1 (sigma-1R) and OX₁ receptors interact with σ_2 receptors (sigma-2R). Panel A: HEK-293T cells were transfected with a constant amount of cDNA (0.3 μ g) for σ_1 R-RLuc and with increasing amounts of cDNA for CRF₂R-YFP (0.1–1.5 μ g). Values are the mean \pm SEM of 6 different experiments. Panel B: HEK-293T cells were transfected with a constant amount of cDNA (0.35 μ g) for OX₁R-RLuc and with increasing amounts of cDNA for σ_2 R-YFP (0.05–0.4 μ g). Values are the mean \pm SEM of 7 different experiments. Panels C–E: HEK-293T cells transfected with 0.5 μ g cDNA for CRF₂ receptor and with 0.6 μ g cDNA for OX₁ receptor in the absence (C) or presence of siRNA (RNAi) for σ_1 R (D) or for σ_2 R (E) were pretreated with 2 μ M amphetamine (white bars) or vehicle (black bars) for 30 min prior to receptor activation using CRF (100 nM), orexin A (100 nM) or both. In panels C–E data are represented in percentage and were obtained in the presence of 0.5 μ M forskolin except when the effect of CRF, individually or in combination with other reagents, was assayed (100% -dotted line- is the basal level or the level obtained by 0.5 μ M forskolin treatment). Values are the mean \pm SEM of 8 different experiments. In all cases, one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison *post hoc* test showed a significant effect over basal (**p* < 0.05***p* < 0.01****p* < 0.001, or amphetamine treatment versus vehicle (#*p* < 0.05, ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001).

2.7. Microdialysis experiments showed both amphetamine potentiating Orexin A-induced dopamine and glutamate release and *in vivo* cross-antagonism

The ability of amphetamine to modulate the OX₁R function was addressed in a more physiological setup, namely in microdialysis experiments performed in living animals. Data from these assays provide surrogate measures for dopamine and glutamate release and/or interstitial concentration in the VTA. Fig. 6A shows the typical placement of the microdialysis probe in the VTA, at 5.2 mm posterior to bregma. As it can be seen in Fig. 6B, in amphetamine-treated rats (white), infusion of Orexin A (10 μ M) for 20 min to VTA produced an increase in extracellular dopamine (top) and glutamate (bottom) compared to saline-control rats (black). These data agree with that obtained in HEK-293T cells indicating that amphetamine treatment potentiates OX₁R function. Remarkably, the increase of both extracellular dopamine (top) and glutamate levels (bottom) was counteracted by a previous VTA infusion of the CRF₂R selective antagonist K41498 (1 μ M) (Fig. 6C), demonstrating the negative cross-antagonism previously described in HEK-293T cells. These results are probably the first to report a cross-antagonism in *in vivo* conditions.

3. Discussion

The results here presented are evidence of a novel interaction involving two GPCRs, OX₁R and CRF₂R, in both heterologous expression systems and natural sources. Two allosterically-mediated specific properties of this heteroreceptor complex were i) a blockade by CRF of OX₁R signaling and ii) a cross-antagonism, which was instrumental to

detect the heteromers even in living animals. A review on the uniqueness of GPCR heteromers as example of the ability of antagonists of one protomer to antagonize the signaling of another protomer in a heteroreceptor complex is provided elsewhere (Franco et al., 2016). The structure of complexes formed by GPCRs and coupled G proteins is instrumental for heteromer-function (Cordomi et al., 2015). The negative modulation of the effect of Orexin A by CRF suggests that some of the effects of Orexin A on the HPA (Spinazzi et al., 2006; Steiner et al., 2013) occur at the level of receptors forming heteromers in brain cells. Our results also constitute an underlying framework to address therapeutic approaches to combat stress-related psychiatric disorders in which the hypocretin/orexin system has a relevant role (reviewed in James et al., 2017). It should be noted that the expression of the orexin receptor has been characterized in cells of the HPA axis (Czerwinska et al., 2017). We also demonstrate that amphetamine modulates both OX₁R and CRF₂R-mediated signaling and that the effect of the drug was mediated by sigma receptors forming heteromers with OX₁R and CRF₂R. The overall mechanism constitutes an example of cytotrin signaling that may underlie both short-term and long-term transcription-mediated events (Navarro et al., 2017).

Two are the sigma receptors identified to date: the non-opioid receptor, σ_1 R, and σ_2 R, whose identity with the Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC-1) protein is in doubt (Chu et al., 2015). Despite endogenous ligands have not been yet identified, drugs of abuse may interact with these two receptors at “physiologically” relevant concentrations. Recent studies have demonstrated that cocaine binding to σ_1 R regulates GPCR signaling, likely, by means of direct interaction between the σ_1 R and, among other, dopamine D₁ (Navarro et al., 2010) (Moreno et al., 2014) and D₂ (Navarro et al., 2013) and

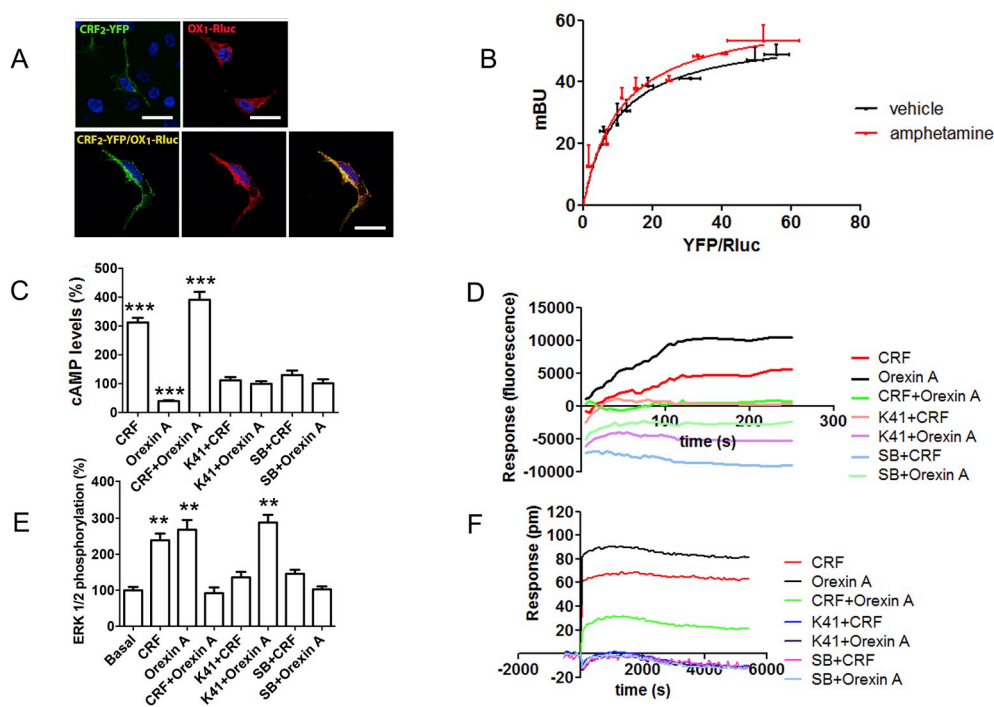


Fig. 5. Amphetamine effect over CRF₂-OX₁ heteroreceptor complexes. Panel A: HEK-293T cells transfected with 0.75 μ g cDNA for CRF₂-YFP, 0.4 μ g cDNA for OX₁-RLuc or both were pretreated with 2 μ M amphetamine for 30 min. Receptors were identified by YFP fluorescence (green) or a monoclonal anti-RLuc (1/100) primary antibody and a cyanine-3-conjugated (1/200) secondary antibody (red). Images include planes near the slide surface. Colocalization of the two receptors is shown in yellow. Nuclei were stained with Hoechst (1/100, blue). Relative fluorescence intensity was 47 for CRF₂-YFP and 58 for OX₁-RLuc (SD < 15%) (see legend of Fig. 1 for fluorescence intensity comparison). Scale bar: 20 μ m. Panel B: BRET was performed in HEK-293T cells transfected with a constant amount of cDNA (0.4 μ g) for CRF₂-YFP and increasing amounts of cDNA (0.2–1.5 μ g) for OX₁-RLuc and treated with 2 μ M amphetamine (red line) or vehicle (black line) for 30 min prior to data recording. Values are the mean \pm SEM of 7 different experiments. Panels C–F: HEK-293T cells transfected with 0.5 μ g cDNA for CRF₂ receptor and 0.6 μ g cDNA for OX₁ receptor were pretreated with 2 μ M amphetamine (30 min), further treated with the CRF₂ receptor antagonist K41498 (1 μ M) or the OX₁ receptor antagonist SB334687 (1 μ M), and finally with CRF (100 nM), Orexin A (100 nM) or both. cAMP levels (C), calcium release (D), ERK1/2 phosphorylation (E) and DMR (F) data were collected. In panels C and E data are represented in percentage over basal. In panel C data were obtained in the presence of 0.5 μ M forskolin except when the effect of CRF, individually or in combination with other reagents, was assayed. Values are the mean \pm SEM of 8 different experiments. In all cases, one way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison *post hoc* test showed a significant effect over basal (**p* < 0.05***p* < 0.01****p* < 0.001).

corticotropin-releasing factor CRF₁ receptors (Navarro et al., 2015). Although its role as true receptor is not demonstrated, synthetic agonists and antagonists are available for σ_1 R. PRE-084 is considered a selective agonist due to its ability to dose-dependently dissociate σ_1 R from a binding immunoglobulin protein/78 kDa glucose-regulated protein (BiP/GPR-78) (Hayashi and Su, 2007). Once the agonist binds to σ_1 R, the receptor translocates to the plasma membrane and modulates cell responses via protein-protein-interaction events related to ion handling (Su et al., 2016; Wu and Bowen, 2008). Of special interest here is the regulation of GPCR functionality. σ_1 R not only binds cocaine but methamphetamine and, therefore, drugs of abuse use σ_1 R to mediate some of their effects (Lever et al., 2016; Nguyen et al., 2005; Shull, 2002; Skuza, 1999). Drugs impeding the interaction of cocaine with σ_1 R are proposed to reduce drug-seeking behavior (Matsumoto et al., 2001).

There is evidence of σ_2 R involvement in amphetamine effect on dopamine transport (Izenwasser et al., 1998; Weatherspoon and Werling, 1999). In addition, treatment with σ_2 R antagonists counteracts cocaine-induced locomotor stimulation in mice (Guo and Zhen, 2015; Lever et al., 2014). Our results now point to a relevant role of σ_2 R on mediating effect of drugs of abuse and by mechanisms also involving interaction with GPCRs and modulation of their functionality. Remarkably, we here report that the effect of amphetamine on CRF₂R was mediated by σ_1 R, whereas the effect of the drug on OX₁R was, instead, mediated by σ_2 R. Although direct studies with amphetamine have not been reported, it is known that methamphetamine may bind to both sigma receptors although with more affinity to the σ_1 R (Nguyen et al., 2005).

The results of microdialysis are relevant as they demonstrate that Orexin A leads in the VTA to increases in interstitial concentration of both dopamine and glutamate. The finding fits with hypocretin-mediated increased glutamatergic neurotransmission in this area (Borgland et al., 2008), with regulation of dopamine neuron activity driven by prefrontal cortex activation (Moorman and Aston-Jones, 2010), with fast scan cyclic voltammetry-based data on regulation of dopamine

concentration in the nucleus accumbens shell (Patyal et al., 2012), and with regulation of synaptic plasticity elicited by morphine (Baimel and Borgland, 2015). Interestingly, CRF₂ receptor is expressed in VTA terminals of neurons projecting from the hypothalamus (Slater et al., 2016). The effect of local administration of amphetamine on increasing VTA dopamine concentration was already reported in the nineties (Byrnes and Wallace, 1997; Pan et al., 1996). Later on, differential effects due to different administration regimes of amphetamine (and of cocaine) administration was reported (Zhang et al., 2001). In addition a review on the evidence of glutamatergic and dopaminergic neurotransmission involvement in the behavioral actions exerted by amphetamine was provided (Vanderschuren and Kalivas, 2000). The mediation of GABA_B receptors on the alteration of glutamate and dopamine efflux after amphetamine administration was also suggested (Giorgetti et al., 2002). Interestingly, evidence points that metabotropic but not ionotropic receptors in the nucleus accumbens, are involved in the amphetamine-mediated increase in dopamine efflux/levels (Darracq et al., 2001). It is however intriguing that amphetamine may block “inhibitory glutamate transmission in dopamine neurons” (Paladini et al., 2001).

Finally, our results suggest that σ_2 R may, at least partially, mediate the hunger-suppressive action of amphetamine by interacting with orexigenic receptors in CRF₂R-OX₁R heteromer contexts. Despite extensive evidence supporting the formation of GPCR oligomers in heterologous systems, the lack of appropriate methodology makes controversial their existence in their native environment. A specific pharmacological property for the heteroreceptor complex is critical for identify such signaling complexes in native tissue. In the present study, we observed that Orexin A caused an increase of extracellular dopamine and glutamate levels in the VTA that was counteracted by a previous VTA infusion of a CRF₂R selective antagonist. These microdialysis experiments demonstrate the negative cross-antagonism previously described *in vitro* and confirm that this dimeric entity is functionally relevant *in vivo*. To our knowledge, this is the first report showing *in vivo*

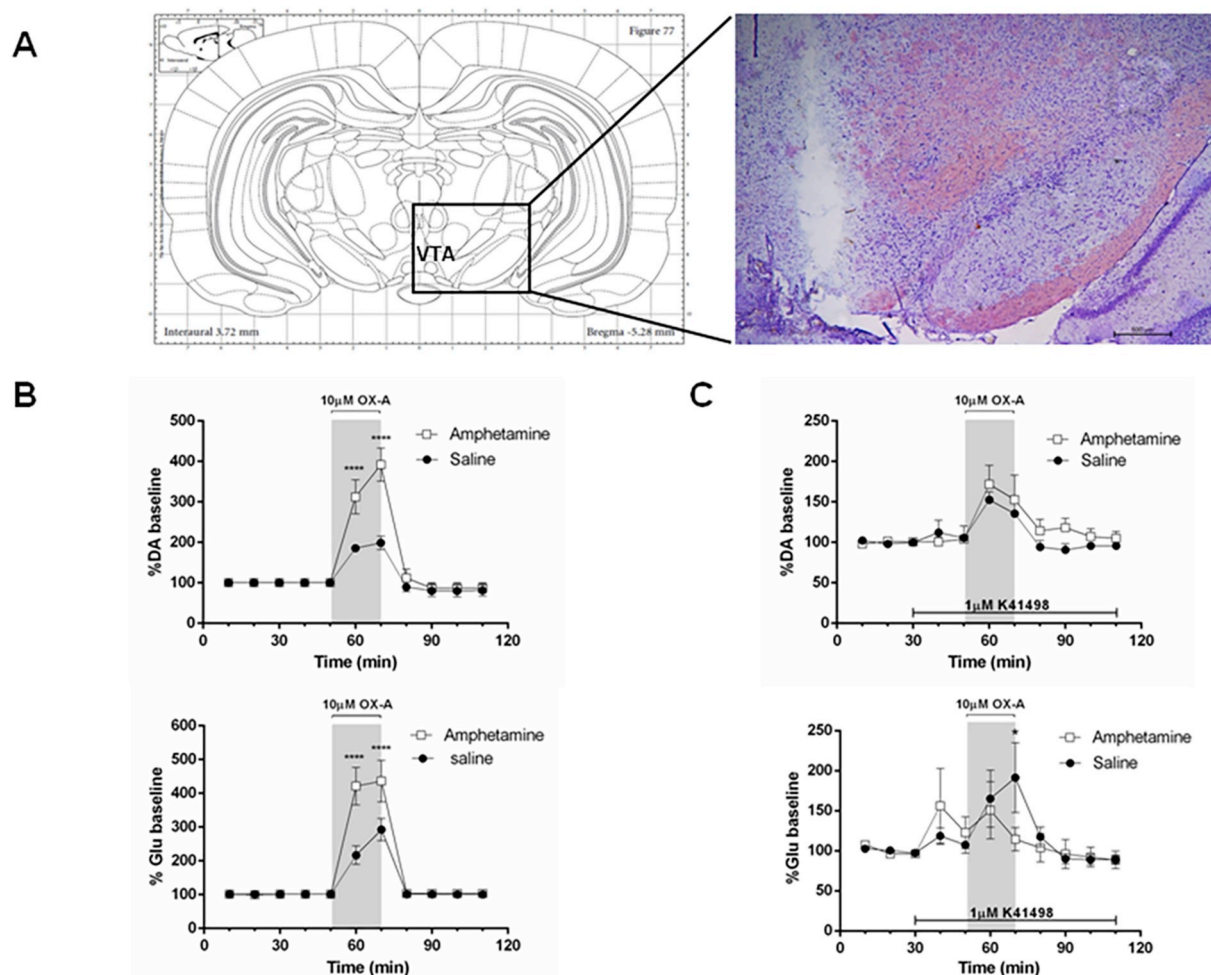


Fig. 6. Amphetamine potentiates orexin-induced extracellular glutamate and dopamine release in the VTA. Panel A: scheme extracted from the rat brain atlas (Paxinos et al., 1985) and showing the placement of the microdialysis probe, at 5.2 mm posterior to bregma, 0.7 lateral and 8.7 mm ventral. Panel B: Infusion in VTA of orexin A (10 μM) for 20 min (vertical grey bars) was followed by determination of dopamine (DA, top) and Glutamate (Glu, bottom) levels. Data from saline infusion are in black and data from amphetamine-treated rats are in white. Panel C: effect of VTA infusion of Orexin A (10 μM) for 20 min (vertical grey bars) after 20 min treatment with the CRF₂R antagonist K41498 (1 μM, horizontal black line) on extracellular dopamine (DA, top) and glutamate (Glu, bottom) release. Data from control rats are in black and data from amphetamine-treated rats are in white. In panels B and C data are represented in percentage over basal. Values are the mean ± SEM of 5 different experiments. In all cases, two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison *post hoc* test showed a significant effect over basal (*p < 0.05; **** p < 0.0001).

GPCR heteromer identification by cross-antagonism. Thus, the present study conveys a novel approach to add to those that allow identification of GPCR heteromers in natural sources (Franco et al., 2016).

4. Materials and methods

4.1. Reagents

Orexin A, CRF, SB334867 and K41498 were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). DL-Amphetamine hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). For the microdialysis experiments, amphetamine sulfate was donated by Laboratorio Chile S.A (Nuñoa, Santiago, Chile).

4.2. Cell lines

HEK-293T cells were grown in DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Halethorpe, MD) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 μg/ml sodium pyruvate, 100 units/mL penicillin/streptomycin, minimum Eagle's medium non-essential amino acid solution (1/100) and 5% (v/v) heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (all

supplements were from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK).

4.3. Expression vectors and fusion proteins

Human cDNAs for CRF₂ receptor, OX₁ receptor, σ₁ receptor, σ₂ receptor and GHS-R1a cloned into pcDNA3.1, were amplified without their stop codons using sense and antisense primers harboring the following: EcoRI and KpnI sites to clone OX₁ receptor and σ₂ receptor in the pcDNA3.1RLuc vector (pRLuc-N1, PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA) and to clone CRF₂ receptor and GHS-R1a in the pEYFP-N1 vector (enhanced yellow variant of GFP; Clontech, Heidelberg, Germany); HindIII and BamHI sites to clone σ₁R in pEYFP-N1 vector; EcoRI and BamHI sites to clone A_{2A} receptor in pEYFP-N1 vector. Amplified fragments were subcloned to be in-frame with restriction sites of pRLuc-N1 or pEYFP-N1 vectors to provide plasmids that express proteins fused to RLuc or YFP on the C-terminal end (OX₁-RLuc, CRF₂-YFP, GHS-R1a-YFP, σ₁R-RLuc and σ₂R-RLuc).

4.4. Cell transfection

HEK-293T cells growing in 6-well dishes were transiently

transfected with the corresponding protein cDNA by the PEI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) method. Cells were incubated with the corresponding cDNA together with PEI (5.47 mM in nitrogen residues) and 150 mM NaCl in a serum-starved medium. After 4 h, the medium was changed to a fresh complete culture medium. Cells were maintained at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂.

4.5. Resonance energy transfer-based assays

For BRET assays (Hinz et al., 2018), HEK-293T cells were transiently co-transfected with a constant amount of cDNA encoding for receptor-RLuc and with increasing amounts of cDNA corresponding to receptor-YFP. 24 h after transfection, cells were adjusted to 20 µg of protein using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) and bovine serum albumin for standardization. To quantify fluorescence proteins, cells were distributed in 96-well black microplates with a transparent bottom (Corning 3600, Corning, NY), and the fluorescence was read in a Fluostar Optima fluorimeter (BMG Labtech, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp using a 10 nm bandwidth excitation filter at 485 nm for receptor-YFP reading. Receptor fluorescence expression was determined as fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing receptor-RLuc alone. For BRET measurements, cells were distributed in 96-well white microplates with white bottoms (Corning) and 5 µM of coelenterazine H (Molecular Probes, Eugene, OR) was added. One minute after adding coelenterazine H, BRET was determined using a Mithras LB 940 reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany), which allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm and the long-wavelength filter at 530 nm. To quantify protein-RLuc expression, luminescence readings were performed 10 min after 5 µM coelenterazine H addition using a Mithras LB 940. The net BRET is defined as [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)]-Cf, where Cf corresponds to [(long-wavelength emission)/(short-wavelength emission)] for the donor construct expressed alone in the same experiment. GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA) was used to fit data. BRET is expressed as mili BRET units, mBU (net BRET x 1000).

4.6. Immunocytochemistry

Transiently transfected HEK-293T cells were incubated 30 min with vehicle or 2 µM amphetamine and immediately, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed twice with PBS containing 20 mM glycine (buffer A) to quench the aldehyde groups. After permeabilization with buffer A containing 0.2% Triton X-100 for 5 min, cells were treated with PBS containing 1% bovine serum albumin. After 1 h at room temperature, cells expressing receptor-RLuc were labeled with a primary mouse monoclonal anti-RLuc antibody (1/100, EMD Millipore, Darmstadt, Germany) for 1 h, washed, and stained with a secondary antibody for Cy3 donkey anti-mouse (1/100, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, MD). Receptors fused to YFP were detected by their fluorescent properties. Cell nuclei were stained with Hoechst (Sigma-Aldrich). Samples were washed, mounted with 30% Mowiol (Calbiochem) and observed under a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Using the Fiji package (pacific.mpi-cbg.de), fluorescence intensity was analyzed in the different channels in 5 areas of 10 different cells. Images contain multiple planes including those near the slide surface.

4.7. Dynamic mass redistribution assays (DMR)

Cell mass redistribution induced upon receptor activation were detected by illuminating the underside of a biosensor with polychromatic light and measuring the changes in the wavelength of the reflected monochromatic light that is a sensitive function of the index of refraction. The magnitude of this wavelength shift (in picometers) is

directly proportional to the amount of DMR. HEK-293T cells were seeded in 384-well sensor microplates to obtain 70–80% confluent monolayers constituted by approximately 10,000 cells per well. Previous to the assay, cells were washed twice with assay buffer (HBSS with 20 mM HEPES, pH 7.15) and incubated 2 h with assay-buffer (24 °C, 30 µl/well). Hereafter, the sensor plate was scanned and a baseline optical signature was recorded for 10 min before adding 10 µl of amphetamine or the specific antagonists 30 min prior to agonist stimulation; all test compounds were dissolved in assay buffer. The cell signaling signature was determined using an EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer) by a label-free technology. Then, DMR responses were monitored for at least 4000 s. Results were analyzed using EnSpire Workstation Software v 4.10.

4.8. Intracellular calcium release

Cells were co-transfected with the cDNA for the indicated receptors and 0.75 µg of GCaMP6 calcium sensor (Chen et al., 2013) using the PEI method. 24 h after transfection, 150,000 cells/well in 96-well black, clear-bottom microtiter plates were incubated with Mg²⁺-free Locke's buffer (pH 7.4) (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose and 5 mM HEPES) supplemented with 10 µM glycine, and receptor ligands were added as indicated (antagonists were added 10 min before agonist stimulation). The fluorescence emission intensity of GCaMP6 was recorded at 515 nm upon excitation at 488 nm on the EnSpire® multimode plate reader for 335 s every 15 s and 100 flashes/well.

4.9. cAMP Accumulation

Homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer assays were performed using the Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer Life Sciences) (Navarro et al., 2018, 2016). The optimal cell density was first established for an appropriate fluorescent signal by measuring the time-resolved FRET signal as a function of 0.5 µM forskolin concentration using different cell densities. Forskolin dose-response curves were related to the cAMP standard curve to establish which cell density provides a response that covers most of the dynamic range of the cAMP standard curve. Cells growing in medium containing 50 µM zarveridine were pretreated with vehicle or 2 µM amphetamine for 30 min at 25 °C. Then, 3000 HEK-293T cells/well in 384-well microplates were treated with the antagonists or the corresponding vehicle for 15 min and stimulated with agonists for 15 min before adding 0.5 µM forskolin or vehicle and incubating for an additional 15-min period. Fluorescence at 665 nm was analyzed on a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with a homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer optical module (BMG Labtech).

4.10. ERK phosphorylation assays

To determine ERK1/2 phosphorylation, 40,000 cells/well were placed in transparent Deltalab 96-well microplates and kept at the incubator for 24 h. Then, cells were transfected using the PEI method and incubated for a 48 h period. 2–4 h before the experiment, the medium was substituted by serum-starved DMEM medium. Then, cells were pretreated at 25 °C for 10 min with vehicle or antagonists in serum-starved DMEM medium and treated for 7 min with agonists. Cells were then washed twice with cold PBS before addition of lysis buffer (20 min treatment in agitation). 10 µL of each supernatant were placed in white ProxiPlate 384-well microplates and ERK 1/2 phosphorylation was determined using AlphaScreen® SureFire® kit (Perkin Elmer) following the instructions of the supplier and using an EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

4.11. Animals

Male Sprague-Dawley rats weighing 200–230 g were selected for the experiments. They were kept in a controlled environment with a 12-h light-dark cycle and at 21 °C room temperature. Food and water were provided *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of Faculty of Biological Sciences of “Pontificia Universidad Católica de Chile” and follow the international guidelines (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

4.12. Experimental procedure

Animals keep housing and handling in colony for 3 days once of arrived and then were divided randomly into two groups that received injection of either AMPH (1.5 mg/kg, i.p) or an equivalent volume of saline solution once per day. The procedure was carried out at 10:00–11:00 a.m., once a day for a five consecutive days. After 5 days of abstinence, microdialysis experiment was performed.

4.13. Microdialysis and analysis of samples

The animals were deeply anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p). Body temperature of the animals was maintained at 37 °C with an electrical blanket controlled by a thermostat. A quarter of the initial dose of chloral hydrate was given every hour to maintain the animal anesthetized during the course of the experiments. Concentric brain microdialysis probes, 2 mm in length (CMA 12, CMA Microdialysis AB, Solna, Sweden) were implanted in the VTA. The coordinates used, according to the atlas of Paxinos et al. (1985), were: VTA: antero-posterior (AP): 5.2 mm, medial-lateral (ML) 0.7 mm and dorso-ventral (DV) – 8.7 mm. Microdialysis probes were perfused with Krebs-Ringer's phosphate buffer with 0.02% BSA (KRP-BSA) at a rate of 2 µL/min using a Harvard infusion pump (Model 22; Dover, MA, USA). After a 90 min stabilization period, 10 min samples were collected in 4 µL of 0.2 M perchloric acid. K411498 (1 µM) and orexina A (10 µM) were added intra-VTA in the perfusion media as indicated in the respective figures. At the end of each experiment, animals were killed by decapitation and brains quickly removed and stored in formalin. Brain coronal sections of 30 µm were stained with Cresyl violet to verify probe location under microscope.

4.13.1. Determination of dopamine and glutamate in dialysate samples

HPLC-amperometric quantification of dopamine was performed as described previously (Galleguillos et al., 2010). HPLC-fluorometric determination for amino acids was performed as described previously (Sotomayor-Zárate et al., 2010).

HPLC-electrochemical determination of dopamine was performed as previously described (Sotomayor et al., 2005). The retention time for dopamine was 11.0 min and the detection limit was 0,1 fmol/µL. HPLC-fluorometric determination of glutamate was performed as previously described (Sotomayor-Zárate et al., 2010). The retention time for glutamate was 2.8 min and the detection was 5 fmol/µL.

Acknowledgements

Supported by CiberNed's intramural program (Ref. No. PI2016/02) and by grants from Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BFU2015-64405-R, and SAF2017-84117-R; they may include FEDER funds).

References

Aston-Jones, G., Smith, R.J., Sartor, G.C., Moorman, D.E., Massi, L., Tahsili-Fahadan, P., Richardson, K.A., 2010. Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: a role in reward-seeking and addiction. *Brain Res.* 1314, 74–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.106>.

- Baimel, C., Borgland, S.L., 2015. Orexin signaling in the VTA gates morphine-induced synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 35, 7295–7303. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4385-14.2015>.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M., Chrousos, G.P., 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 17, 245–261. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-3-245>.
- Borgland, S.L., Storm, E., Bonci, A., 2008. Orexin B/hypocretin 2 increases glutamatergic transmission to ventral tegmental area neurons. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1545–1556. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06397.x>.
- Byrnes, J.J., Wallace, L.J., 1997. Amphetamine-induced sensitization and release of dopamine in slices from the ventral tegmental area of rats is enhanced following administration of cholera toxin into the ventral tegmental area. *Neurosci. Lett.* 223, 45–48.
- Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreier, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., Looger, L.L., Svoboda, K., Kim, D.S., 2013. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>.
- Chu, U.B., Mavlyutov, T.A., Chu, M.L., Yang, H., Schulman, A., Mesangeau, C., McCurdy, C.R., Guo, L.W., Ruoho, A.E., 2015. The sigma-2 receptor and Progesterone receptor membrane component 1 are different binding sites derived from independent genes. *EBioMedicine* 2, 1806–1813. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.017>.
- Cobos, E., Entrena, J., Nieto, F., Cendan, C., Pozo, E., 2008. Pharmacology and therapeutic potential of Sigma1 receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 344–366. <https://doi.org/10.2174/157015908787386113>.
- Corbera, J., Vaño, D., Martínez, D., Vela, J.M., Zamanillo, D., Dordal, A., Andreu, F., Hernandez, E., Perez, R., Escriche, M., Salgado, L., Yeste, S., Serafini, M.T., Pascual, R., Alegre, J., Calvet, M.C., Cano, N., Carro, M., Buschmann, H., Holenz, J., 2006. A medicinal-chemistry-guided approach to selective and druglike sigma 1 ligands. *ChemMedChem* 1, 140–154. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200500034>.
- Cordomí, A., Navarro, G., Aymerich, M.S., Franco, R., 2015. Structures for G-protein-coupled receptor tetramers in complex with G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 40, 548–551. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.07.007>.
- Czerwinska, J., Chojnowska, K., Kaminski, T., Bogacka, I., Smolinska, N., Kaminska, B., 2017. Orexin receptor expression in the hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes of free-living European beavers (Castor fiber L.) in different periods of the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 240, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.09.013>.
- Darraaq, L., Drouin, C., Blanc, G., Glowinski, J., Tassin, J.P., 2001. Stimulation of metabotropic but not ionotropic glutamatergic receptors in the nucleus accumbens is required for the D-amphetamine-induced release of functional dopamine. *Neuroscience* 103, 395–403.
- Franco, R., Casadó, V., Cortés, A., Ferrada, C., Mallol, J., Woods, A., Lluís, C., Canela, E.I., Ferré, S., 2007. Basic concepts in G-protein-coupled receptor homo- and heterodimerization. *Sci. World J.* 7. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.197>.
- Franco, R., Martínez-Pinilla, E., Lanciego, J.L.J.L., Navarro, G., 2016. Basic pharmacological and structural evidence for class A G-protein-coupled receptor heterodimerization. *Front. Pharmacol.* 7, 76. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00076>.
- Gallagher, J.P., Orozco-Cabal, L.F., Liu, J., Shinnick-Gallagher, P., 2008. Synaptic physiology of central CRH system. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.075>.
- Galleguillos, D., Fuentealba, J.A., Gómez, L.M., Saver, M., Gómez, A., Nash, K., Burger, C., Gysling, K., Andrés, M.E., 2010. Nurr1 regulates RET expression in dopamine neurons of adult rat midbrain. *J. Neurochem.* 114, 1158–1167. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06841.x>.
- Georgescu, D., Zachariou, V., Barrot, M., Mieda, M., Willie, J.T., Eisch, A.J., Yanagisawa, M., Nestler, E.J., DiLeone, R.J., 2003. Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J. Neurosci.* 23, 3106–3111. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2338-03.2003>.
- Giorgetti, M., Hotsenpiller, G., Froestl, W., Wolf, M.E., 2002. In vivo modulation of ventral tegmental area dopamine and glutamate efflux by local GABA(B) receptors is altered after repeated amphetamine treatment. *Neuroscience* 109, 585–595.
- Guo, L., Zhen, X., 2015. Sigma-2 receptor ligands: neurobiological effects. *Curr. Med. Chem.* 22, 989–1003.
- Harris, G.C., Wimmer, M., Aston-Jones, G., 2005. A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437, 556–559. <https://doi.org/10.1038/nature04071>.
- Hayashi, T., Su, T.P., 2007. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell* 131, 596–610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.036>.
- Hinz, S., Navarro, G., Borroto-Escuela, D., Seibt, B.F., Ammon, C., Filippo, E. De, Danish, A., Lacher, S.K., Červinková, B., Raféhi, M., Fuxe, K., Schiedel, A.C., Franco, R., Müller, C.E., 2018. Adenosine A2A receptor ligand recognition and signaling is blocked by A2B receptors. *Oncotarget* 9, 13593–13611. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24423>.
- Izenwasser, S., Thompson-Montgomery, D., Deben, S.E., Chowdhury, I.N., Werling, L.L., 1998. Modulation of amphetamine-stimulated (transporter mediated) dopamine release in vitro by sigma2 receptor agonists and antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 346, 189–196.
- James, M.H., Campbell, E.J., Dayas, C.V., 2017. Role of the Orexin/Hypocretin system in stress-related psychiatric disorders. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, pp. 197–219. <https://doi.org/10.1007/97854201656>.
- Lever, J.R., Ferguson-Cantrell, E.A., Watkinson, L.D., Carmack, T.L., Lord, S.A., Xu, R., Miller, D.K., Lever, S.Z., 2016. Cocaine occupancy of sigma 1 receptors and dopamine transporters in mice. *Synapse* 70, 98–111. <https://doi.org/10.1002/syn.21877>.
- Lever, J.R., Miller, D.K., Green, C.L., Ferguson-cantrell, E.A., Watkinson, L.D., Carmack, T.L., Fan, K. hsien, Lever, S.Z., 2014. A selective sigma-2 receptor ligand antagonizes

- cocaine-induced hyperlocomotion in mice. *Synapse* 68, 73–84. <https://doi.org/10.1002/syn.21717>.
- Matsumoto, R.R., Hewett, K.L., Pouw, B., Bowen, W.D., Husbands, S.M., Cao, J.J., Newman, A.H., 2001. Rimcazole analogs attenuate the convulsive effects of cocaine: correlation with binding to sigma receptors rather than dopamine transporters. *Neuropharmacology* 41, 878–886. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00116-2).
- Mei, J., Pasternak, G.W., 2002. Sigma1 receptor modulation of opioid analgesia in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 300, 1070–1074. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.3.1070>.
- Moorman, D.E., Aston-Jones, G., 2010. Orexin/hypocretin modulates response of ventral tegmental dopamine neurons to prefrontal activation: diurnal influences. *J. Neurosci.* 30, 15585–15599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2871-10.2010>.
- Moreno, E., Moreno-Delgado, D., Navarro, G., Hoffmann, H.M., Fuentes, S., Rosell-Vilar, S., Gasperini, P., Rodríguez-Ruiz, M., Medrano, M., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Lluís, C., Ferré, S., Ortiz, J., Canela, E., McCormick, P.J., 2014. Cocaine disrupts histamine H3 receptor modulation of dopamine D1 receptor signaling: σ 1-D1-H3 receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects. *J. Neurosci.* 34, 3545–3558. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4147-13.2014>.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., Kawata, M., 1996. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 26, 235–269.
- Navarro, G., Cordero, A., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., Pérez-Benito, L., Ferre, S., Cortés, A., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., Pardo, L., McCormick, P.J., Franco, R., 2018. Cross-communication between Gi and Gs in a G-protein-coupled receptor heterotetramer guided by a receptor C-terminal domain. *BMC Biol.* 16, 24. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0491-x>.
- Navarro, G., Cordero, A., Zelman-Femiak, M., Brugarolas, M., Moreno, E., Aguinaga, D., Pérez-Benito, L., Cortés, A., Casadó, V., Mallol, J., Canela, E., Lluís, C., Pardo, L., García-Sáez, A.J., McCormick, P.J., Franco, R., 2016. Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. *BMC Biol.* 14, 26. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0247-4>.
- Navarro, G., Franco, N., Martínez-Pinilla, E., Franco, R., 2017. The epigenetic cytochrome pathway to the nucleus. Epigenetic factors, epigenetic mediators, and epigenetic traits. *A biochemist perspective. Front. Genet.* 8, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00179>.
- Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Canela, E.I., Ortiz, J., Fuxe, K., Lluís, C., Ferre, S., Franco, R., 2010. Direct involvement of σ 1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 107, 18676–18681. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008911107>.
- Navarro, G., Moreno, E., Bonaventura, J., Brugarolas, M., Farré, D., Aguinaga, D., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Lluís, C., Ferre, S., Franco, R., Canela, E., McCormick, P.J., 2013. Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. *PLoS One* 8, e61245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061245>.
- Navarro, G., Quiroz, C., Moreno-Delgado, D., Sierakowski, A., McDowell, K., Moreno, E., Rea, W., Cai, N.-S., Aguinaga, D., Howell, L.A., Hausch, F., Cortés, A., Mallol, J., Casadó, V., Lluís, C., Canela, E.I., Ferré, S., McCormick, P.J., 2015. Orexin-corticotropin-releasing factor receptor heteromers in the ventral tegmental area as targets for cocaine. *J. Neurosci.* 35, 6639–6653. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4364-14.2015>.
- Nguyen, E.C., McCracken, K.A., Liu, Y., Pouw, B., Matsumoto, R.R., 2005. Involvement of sigma (σ) receptors in the acute actions of methamphetamine: receptor binding and behavioral studies. *Neuropharmacology* 49, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.04.016>.
- Paladini, C.A., Fiorillo, C.D., Morikawa, H., Williams, J.T., 2001. Amphetamine selectively blocks inhibitory glutamate transmission in dopamine neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 275–281. <https://doi.org/10.1038/85124>.
- Pan, W.H., Sung, J.C., Fuh, S.M., 1996. Locally application of amphetamine into the ventral tegmental area enhances dopamine release in the nucleus accumbens and the medial prefrontal cortex through noradrenergic neurotransmission. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 278, 725–731.
- Patyal, R., Woo, E.Y., Borgland, S.L., 2012. Local hypocretin-1 modulates terminal dopamine concentration in the nucleus accumbens shell. *Front. Behav. Neurosci.* 6, 82. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00082>.
- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., Topple, A., 1985. Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J. Neurosci. Methods* 13, 139–143. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90026-3).
- Schmidt, H.R., Zheng, S., Gурpinar, E., Koehl, A., Manglik, A., Kruse, A.C., 2016. Crystal structure of the human σ 1 receptor. *Nature* 532, 527–530. <https://doi.org/10.1038/nature17391>.
- Shull, K.R., 2002. Contact mechanics and the adhesion of soft solids. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* [https://doi.org/10.1016/S0927-796X\(01\)00039-0](https://doi.org/10.1016/S0927-796X(01)00039-0).
- Skuzza, G., 1999. Effect of sigma ligands on the cocaine-induced convulsions in mice. *Pol. J. Pharmacol.* 51, 477–483.
- Slater, P.G., Noches, V., Gysling, K., 2016. Corticotropin-releasing factor type-2 receptor and corticotropin-releasing factor-binding protein coexist in rat ventral tegmental area nerve terminals originated in the lateral hypothalamic area. *Eur. J. Neurosci.* 43, 220–229. <https://doi.org/10.1111/ejn.13113>.
- Sotomayor-Zárate, R., Araya, K.A., Pereira, P., Blanco, E., Quiroz, G., Pozo, S., Carreño, P., Andrés, M.E., Forray, M.I., Gysling, K., 2010. Activation of GABA-B receptors induced by systemic amphetamine abolishes dopamine release in the rat lateral septum. *J. Neurochem.* 114, 1678–1686. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06877.x>.
- Sotomayor, R., Forray, M.I., Gysling, K., 2005. Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic inhibitory tone in the ventral tegmental area. *J. Neurosci. Res.* 81, 132–139. <https://doi.org/10.1002/jnr.20537>.
- Spinazzi, R., Andreis, P.G., Rossi, G.P., Nussdorfer, G.G., 2006. Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol. Rev.* 58, 46–57. <https://doi.org/10.1124/pr.58.1.4>.
- Steiner, M.A., Sciarretta, C., Brisbare-Roch, C., Strasser, D.S., Studer, R., Jenck, F., 2013. Examining the role of endogenous orexins in hypothalamus-pituitary-adrenal axis endocrine function using transient dual orexin receptor antagonism in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 38, 560–571. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.07.016>.
- Su, T.P., Su, T.C., Nakamura, Y., Tsai, S.Y., 2016. The sigma-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 262–278. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.01.003>.
- Sun, H., Shi, M., Zhang, W., Zheng, Y.M., Xu, Y.Z., Shi, J.J., Liu, T., Gunosewoyo, H., Pang, T., Gao, Z.B., Yang, F., Tang, J., Yu, L.F., 2016. Development of novel alkoxyisoxazoles as sigma-1 receptor antagonists with antinociceptive efficacy. *J. Med. Chem.* 59, 6329–6343. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00571>.
- Vanderschuren, L.J., Kalivas, P.W., 2000. Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berlin)* 151, 99–120.
- Viengchareun, S., Le Menuet, D., Martinier, L., Munier, M., Pascual-Le Tallec, L., Lombès, M., 2007. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl. Recept. Signal.* 5, e012. <https://doi.org/10.1621/nrs.05012>.
- Weatherspoon, J.K., Werling, L.L., 1999. Modulation of amphetamine-stimulated [3H] dopamine release from rat pheochromocytoma (PC12) cells by sigma type 2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 289, 278–284.
- Wu, Z., Bowen, W.D., 2008. Role of sigma-1 receptor C-terminal segment in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor activation: constitutive enhancement of calcium signaling in MCF-7 tumor cells. *J. Biol. Chem.* 283, 28198–28215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802099200>.
- Zhang, Y., Loonam, T.M., Noailles, P.A., Angulo, J.A., 2001. Comparison of cocaine- and methamphetamine-evoked dopamine and glutamate overflow in somatodendritic and terminal field regions of the rat brain during acute, chronic, and early withdrawal conditions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 937, 93–120.



3.5. Methamphetamine blocks adenosine A_{2A} receptor activation via sigma 1 and cannabinoid CB₁ receptors

Mireia Casanovas^{1,2}, Irene Reyes-Resina¹, Alejandro Lillo³, Jaume Lillo^{1,2}, Raul López-Arnau⁴, Jorge Camarasa⁴, Elena Escubedo⁴, Gemma Navarro^{2,3*} y Rafael Franco^{2,5*}.

*Estos autores han tenido una contribución igual en este trabajo

¹Biology School, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁴Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Chemistry School, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Este artículo se ha publicado en la revista *International Journal of Molecular Sciences* (2021), 22 (5): 2743 <https://doi.org/10.3390/ijms22052743>

La metanfetamina es una de las sustancias de abuso más consumida en todo el mundo. Un efecto secundario importante del consumo crónico de metanfetamina es la neurodegeneración que conduce a una disminución de la esperanza de vida. El objetivo de este trabajo ha sido comprobar si la metanfetamina afecta a uno de los receptores implicados en eventos de neurodegeneración/neuroprotección, el receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}R). En primer lugar, hemos observado que la metanfetamina no es capaz de afectar la funcionalidad del A_{2A}R cuando este receptor se expresa en células HEK-293T transfectadas. Sin embargo, el A_{2A}R se vuelve sensible a la sustancia de abuso cuando forma complejos con el receptor cannabinoide CB₁ (CB₁R) y el receptor sigma 1 (σ₁R). La señalización tanto de A_{2A}R como de CB₁R se encuentra afectada por el tratamiento con metanfetamina en células que co-expresan ambos receptores. En cultivos primarios de neuronas estriatales, se ha detectado el complejo heteromérico A_{2A}R-CB₁R y el tratamiento con metanfetamina no solo altera su expresión, sino que bloquea completamente la señalización mediada por la activación de A_{2A}R y CB₁R en la vía de las MAP quinasas. En conclusión, la metanfetamina, con la participación de σ₁R, altera la funcionalidad y la expresión de dos receptores que interaccionan,



3. Resultados

A_{2A}R, que es una diana terapéutica para la neuroprotección, y CB₁R, que es el receptor acoplado a proteína G (GPCR) más expresado en el cerebro humano.



Article

Methamphetamine Blocks Adenosine A_{2A} Receptor Activation via Sigma 1 and Cannabinoid CB₁ Receptors

Mireia Casanovas ^{1,2}, Irene Reyes-Resina ^{1,†} , Alejandro Lillo ³, Jaime Lillo ^{1,2}, Raul López-Arnau ⁴ , Jorge Camarasa ⁴, Elena Escubedo ⁴ , Gemma Navarro ^{2,3,*} and Rafael Franco ^{2,5,*}

- ¹ Biology School, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; mireiacasanovas@ub.edu (M.C.); ire-reyes@hotmail.com (I.R.-R.); jaumelillo@ub.edu (J.L.)
- ² Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed), Instituto de Salud Carlos III, 28031 Madrid, Spain
- ³ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; alilloma55@gmail.com
- ⁴ Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; raullopezarnau@ub.edu (R.L.-A.); jcamarasa@ub.edu (J.C.); eescubedo@ub.edu (E.E.)
- ⁵ Chemistry School, Department of Biochemistry and Molecular Biomedicine, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
- * Correspondence: dimartts@hotmail.com or g.navarro@ub.edu (G.N.); rfranco@ub.edu (R.F.); Tel.: +34-934-034-500 (G.N.); +34-934-021-208 (R.F.)
- † These authors contributed equally to this work.
- ‡ Current address: RG Neuroplasticity, Leibniz Institute for Neurobiology, Brenneckestr. 6, 39118 Magdeburg, Germany.



Citation: Casanovas, M.; Reyes-Resina, I.; Lillo, A.; Lillo, J.; López-Arnau, R.; Camarasa, J.; Escubedo, E.; Navarro, G.; Franco, R. Methamphetamine Blocks Adenosine A_{2A} Receptor Activation via Sigma 1 and Cannabinoid CB₁ Receptors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2743. <https://doi.org/10.3390/ijms22052743>

Academic Editor: Per Svenningsson

Received: 14 February 2021

Accepted: 1 March 2021

Published: 9 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Abstract: Methamphetamine is, worldwide, one of the most consumed drugs of abuse. One important side effect is neurodegeneration leading to a decrease in life expectancy. The aim of this paper was to check whether the drug affects one of the receptors involved in neurodegeneration/neuroprotection events, namely the adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R). First, we noticed that methamphetamine does not affect A_{2A} functionality if the receptor is expressed in a heterologous system. However, A_{2A}R becomes sensitive to the drug upon complexes formation with the cannabinoid CB₁ receptor (CB₁R) and the sigma 1 receptor (σ₁R). Signaling via both adenosine A_{2A}R and cannabinoid CB₁R was affected by methamphetamine in cells co-expressing the two receptors. In striatal primary cultures, the A_{2A}R–CB₁R heteromer complex was detected and methamphetamine not only altered its expression but completely blocked the A_{2A}R- and the CB₁R-mediated activation of the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway. In conclusion, methamphetamine, with the participation of σ₁R, alters the expression and function of two interacting receptors, A_{2A}R, which is a therapeutic target for neuroprotection, and CB₁R, which is the most abundant G protein-coupled receptor (GPCR) in the brain.

Keywords: G protein-coupled receptor GPCR; striatal neurons; heteromer; drug of abuse; neuroprotection



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Methamphetamine is one of the most consumed drugs of abuse in developed countries. It causes significant health and socio-economic problems that impact on sufferers, families, and the civil Society as a whole. Cocaine and methamphetamine share their ability to increase the brain levels of one of the main neurotransmitters, dopamine. Seemingly, the two drugs share some of the mechanisms that lead to addiction, but they also display differential trends.

Five dopamine receptors have been identified so far: D₁, D₂, D₃, D₄ and D₅. They belong to the superfamily of G protein-coupled receptor (GPCRs) and, in mammals, they

are expressed in neural cells but also in many other cell types. In the central nervous system, these receptors mediate the effects of dopamine in almost any higher function: from cognition to motor control. Plastic changes affecting the expression of dopamine receptors in the neurons of the reward circuits are concomitant with drug addiction and relapse. Dopamine action is counterbalanced by adenosine, a neuromodulator whose receptors, A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3 , in addition to being GPCRs, are widely distributed in the central nervous system (CNS). Among adenosine receptors, A_{2A} is arising as a target for neuroprotection. There are several studies, both in vitro and in animal models of neurodegenerative diseases, that show that antagonists of this receptor have neuroprotective potential. These results add to the epidemiological finding that natural antagonists of adenosine receptors, such as caffeine, theophylline or theobromine, reduce the risk of suffering from Parkinson's or Alzheimer's diseases [1–9].

In the basal ganglia, dopamine and adenosine receptors interact to form functional complexes. Interestingly, we have previously discovered a functional complex that mediates the motor effects of cannabinoids formed by A_{2A} , D_2 and a cannabinoid receptor, CB_1 [10–12]. Endocannabinoids are neuromodulators acting on two GPCRs, cannabinoid CB_1 and CB_2 receptors (CB_1R and CB_2R), which are expressed in different systems of the mammalian body. Some effects of natural phytocannabinoids are mediated by these receptors, that are differentially expressed in the CNS: the CB_1 is more abundant in neurons and the CB_2 is more abundant in non-neuronal cells. Although trans(-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), the most well-known compound of *Cannabis sativa*, has psychotropic effects, its potential to induce addiction is controversial. Accordingly, the role of cannabinoid receptors in addiction is not well understood.

Relevant for this project was (i) the discovery that Δ^9 -THC blocks methamphetamine-induced neurotoxicity [13,14] and (ii) the recent discovery that an allosteric modulator of the CB_1R , cannabidiol [15], suppresses the cognitive effect of Δ^9 -THC via the A_{2A}/CB_1 receptor heteromer [16].

It is known that, to exert some of its noxious effects, cocaine binds to the sigma 1 receptor (σ_1R), which does not belong to the GPCR family and has no known endogenous agonist [17–21]. Intriguingly, methamphetamine alters the functionality of the σ_1R , although the underlying mechanism remains obscure [22–26]. The aim of this paper was to investigate whether methamphetamine, in a σ_1R -dependent or -independent fashion, was able to alter the interaction and functionality of the heteromer formed by A_{2A} and CB_1 receptors (A_{2A} - CB_1 Het) in both a heterologous expression system and primary cultures of striatal neurons.

2. Results

2.1. Methamphetamine Does Not Disrupt the Formation of A_{2A} and CB_1 Receptor Complexes in a Heterologous Expression System

The effect of methamphetamine on receptor expression was first assessed in transfected HEK-293T cells. Immunocytochemistry assays showed that the membrane expression level of CB_1R was not altered when cells were pre-treated for 1 h with methamphetamine (1 μ M) (Figure 1A,D). Similar results were observed in HEK-293T cells expressing $A_{2A}R$ (Figure 1B,E). When analyzing HEK-293T cells expressing equal amounts of CB_1R and $A_{2A}R$, the two receptors colocalized at the plasma membrane level (yellow in Figure 1C) and methamphetamine pretreatment did not induce any significant change in colocalization (Figure 1F).

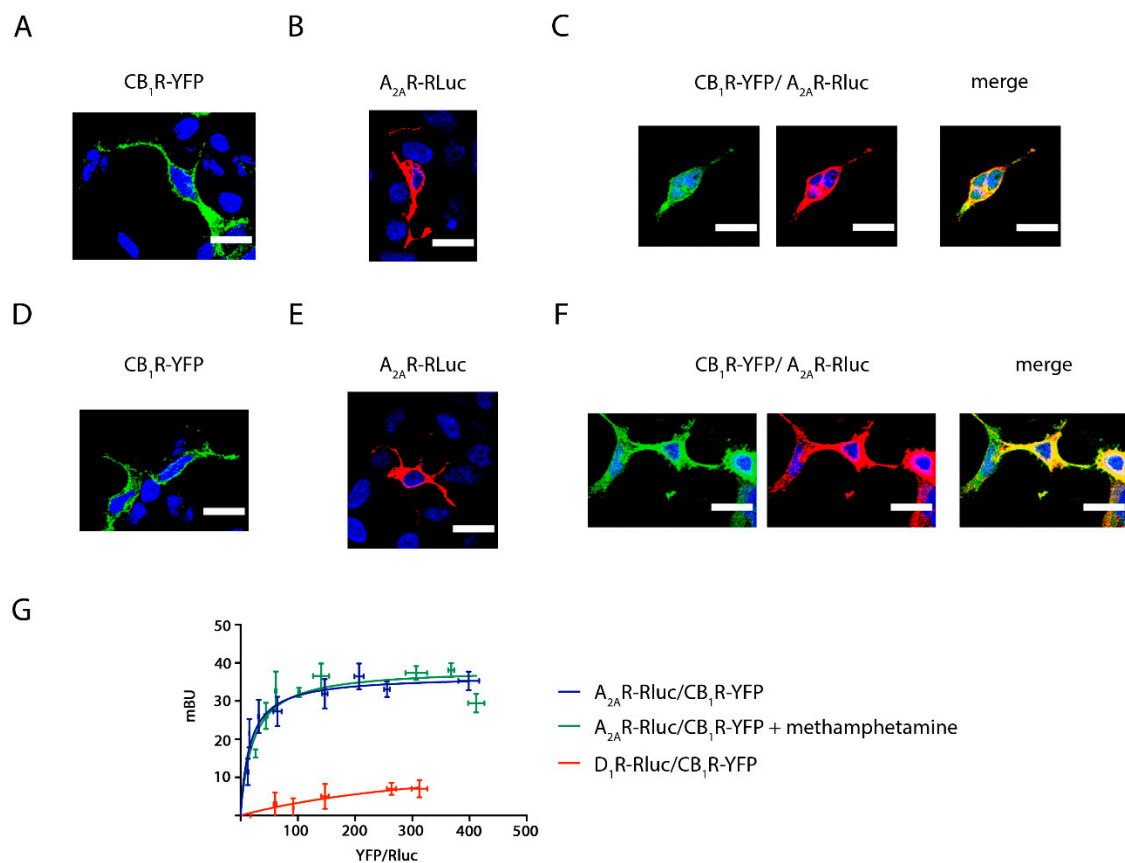


Figure 1. The effect of methamphetamine on A_{2A}R–CB₁R colocalization and receptor–receptor interaction. Confocal microscopy images were obtained in HEK-293T cells transfected with 0.5 μ g cDNA coding for CB₁R-YFP (A,D), with 0.5 μ g cDNA for A_{2A}R-Rluc (B,E) or with 0.5 μ g cDNA for both CB₁R-YFP and A_{2A}R-Rluc (C,F). Cells were treated with 1 μ M methamphetamine (D–F) or vehicle (A–C) for 1 h. Receptors fused to Rluc (red) were identified by immunocytochemistry and receptors fused to YFP (green) were identified by their own fluorescence. Colocalization is shown in yellow. Nuclei were stained with Hoechst (blue). Images are taken near the surface of the slide to observe a higher portion of the plasma membrane. Scale bars: 20 μ m. (G): Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assays were performed in HEK-293T cells transfected with a constant amount of the cDNA coding for A_{2A}R fused to Rluc (1 μ g) or the cDNA coding for D₁R fused to Rluc (0.5 μ g to 4.5 μ g) (red line) and increasing amounts of the cDNA coding for CB₁R fused to YFP (0.5 μ g to 4.5 μ g). Transfected cells were treated (green dots) or not (blue dots) with 1 μ M methamphetamine. BRET is expressed as milli BRET units (mBU) and is given as the mean \pm SEM of 8 different experiments grouped by amount of BRET acceptor.

A closer inspection using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) showed a saturation curve, thus confirming the formation of complexes of A_{2A}R-Rluc and CB₁R-YFP (BRET_{max} = 37 \pm 2; BRET₅₀ = 17 \pm 4), and a lack of effect of methamphetamine (BRET_{max} = 39 \pm 3; BRET₅₀ = 22 \pm 9). A linear relationship was found for the negative control performed using plasmids encoding for receptors that do not heteromerize, D₁R-Rluc and CB₁R-YFP (Figure 1G).

2.2. Methamphetamine Blocks CB₁R Function in HEK-293T Cells Expressing the A_{2A}–CB₁Het

HEK-293T cells transfected with the cDNA for A_{2A} and CB₁ receptors, i.e., expressing heteromers formed by the two receptors (A_{2A}–CB₁Hets), were pre-treated with selective antagonists (SCH 58261 for A_{2A}R or SR 141716A for CB₁R) prior to treatment with selective agonists (CGS 21680 for A_{2A}R and/or arachidonyl-2'-chloroethylamide -ACEA- for CB₁R) and the following signaling outputs were analyzed: cytosolic cAMP and Ca²⁺ level determination, ERK1/2 and Akt phosphorylation, β -arrestin 2 recruitment and dynamic mass redistribution (DMR).

Due to $A_{2A}R$ coupling to the Gs protein, which activates adenylyl cyclase, and CB_1R coupling to the Gi protein, which inhibits adenylyl cyclase, we analyzed the effect of agonists, alone or in combination, in naïve cells and in cells pretreated with forskolin (0.5 μ M, 15 min, FK), the activator of the adenylyl cyclase. The $A_{2A}R$ agonist, CGS 21680, induced a significant increase in cAMP (around 3-fold compared to basal condition), while treatment with the CB_1R agonist, ACEA, induced a significant decrease over forskolin cAMP level increases (Figure 2A). These results indicate that both $A_{2A}R$ and CB_1R can be activated when forming $A_{2A}R$ – CB_1R complexes and are able to couple to their respective cognate G proteins. An often-found feature of heteromers is cross-antagonism, i.e., the antagonist of one receptor also blocks the signal mediated by the partner receptor within the heteromer. When cotransfected cells were pre-treated with the selective antagonists before agonist stimulation, it was observed that the $A_{2A}R$ antagonist counteracted $A_{2A}R$ signaling, while it had a slight effect over CB_1R activation. A qualitatively similar result was obtained using the CB_1R antagonist, i.e., blockade of activation of the cognate receptor, CB_1R , but not of $A_{2A}R$ activation (Figure 2A). When a similar experiment was undertaken in cells treated for 1 h with methamphetamine before stimulation with selective agonists, CB_1R signaling was negligible (Figure 2B). After methamphetamine action, cross-antagonism was still undetectable. It should be noted that ACEA does not affect basal cAMP production and that, at the concentration used, CGS does not affect forskolin-induced cAMP production.

In cells expressing $A_{2A}R$ – CB_1R Hets, both agonists, CGS 21680 and ACEA, increased ERK1/2 and Akt phosphorylation. Moreover, when the same cells were simultaneously coactivated with both agonists, the effect was lower than the sum of individual effects at the same ligand concentration (Figure 2C,E). Interestingly, the $A_{2A}R$ antagonist not only blocked the CGS 21680- but also the ACEA-induced effect. Such cross-antagonism was also detected when cells were treated with the selective CB_1R antagonist. Under the same assay conditions, pretreatment with methamphetamine completely blocked CB_1R function and decreased $A_{2A}R$ -mediated function (Figure 2D,F).

After receptor activation, most GPCRs recruit β -arrestin before internalization. Interestingly, when analyzing β -arrestin recruitment in HEK-293T cells coexpressing $A_{2A}R$ and CB_1R , it was observed that recruitment was very small (Figure 3A). However, β -arrestin recruitment was potentiated in cells pretreated with methamphetamine (Figure 3B).

Dynamic mass redistribution (DMR) is a technique that allows detection of G protein-mediated signaling in living cells by measuring cytoskeleton movements derived from receptor activation [27–30]. Selective agonists led to a significant signal although simultaneous treatment with agonists did not lead to summation of effects. The use of the output signal in the presence of antagonists underscored cross-antagonism (Figure 3C). Analysis by DMR of $A_{2A}R$ activation showed that it was partially inhibited by methamphetamine pre-treatment, while CB_1R activation was completely blocked by the drug of abuse (Figure 3D).

In agreement with $A_{2A}R$ coupling to Gs and CB_1R coupling to Gi protein, neither activation of $A_{2A}R$, nor of CB_1R led to significant alterations in cytoplasmic Ca^{2+} levels (Figure 3E). Although some drugs are able to produce a shift in the G protein-coupled to a given GPCR, methamphetamine did not promote Gq coupling to $A_{2A}R$ or to CB_1R receptors (Figure 3F).

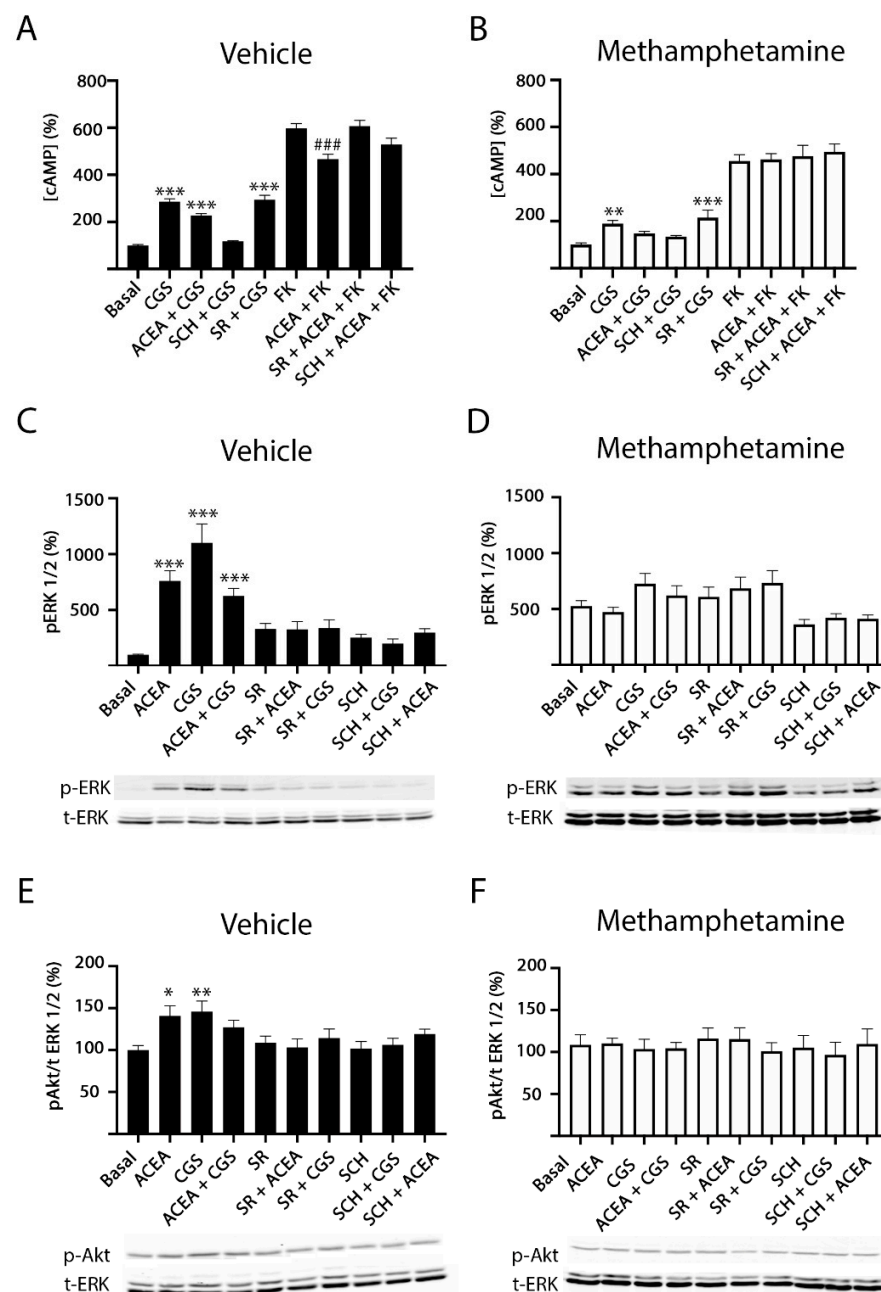


Figure 2. Methamphetamine effect on A_{2A} - CB_1 Het functionality: cAMP and ERK/Akt phosphorylation. HEK-293T cells co-transfected with cDNAs for $A_{2A}R$ (0.5 μ g) and for CB_1R (0.6 μ g) were treated (30 min) with vehicle (A,C,E) or 1 μ M methamphetamine (B,D,F) and subsequently treated with 500 nM of the $A_{2A}R$ antagonist SCH 58261 (SCH) or with 500 nM of the CB_1R antagonist SR 141716A (SR). Receptors were activated using 100 nM of the $A_{2A}R$ agonist CGS 21680 (CGS), with 200 nM of the CB_1R agonist, ACEA or both, before adding 0.5 μ M forskolin (FK) or vehicle. The cytosolic cAMP levels (A,B) and the extracellular signal-regulated (ERK) 1/2 (C,D) or Akt (E,F) phosphorylation signals were determined. Results are expressed as percentage over basal and are the mean \pm SEM of six experiments performed in triplicates. A one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison post hoc test showed a significant effect (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. basal condition; ### $p < 0.001$ vs. FK condition). In (C–F) a representative Western blot is shown (bottom). p-ERK indicates phosphorylated ERKs, t-ERK indicates total ERKs, p-AKT indicates phosphorylated AKTs.

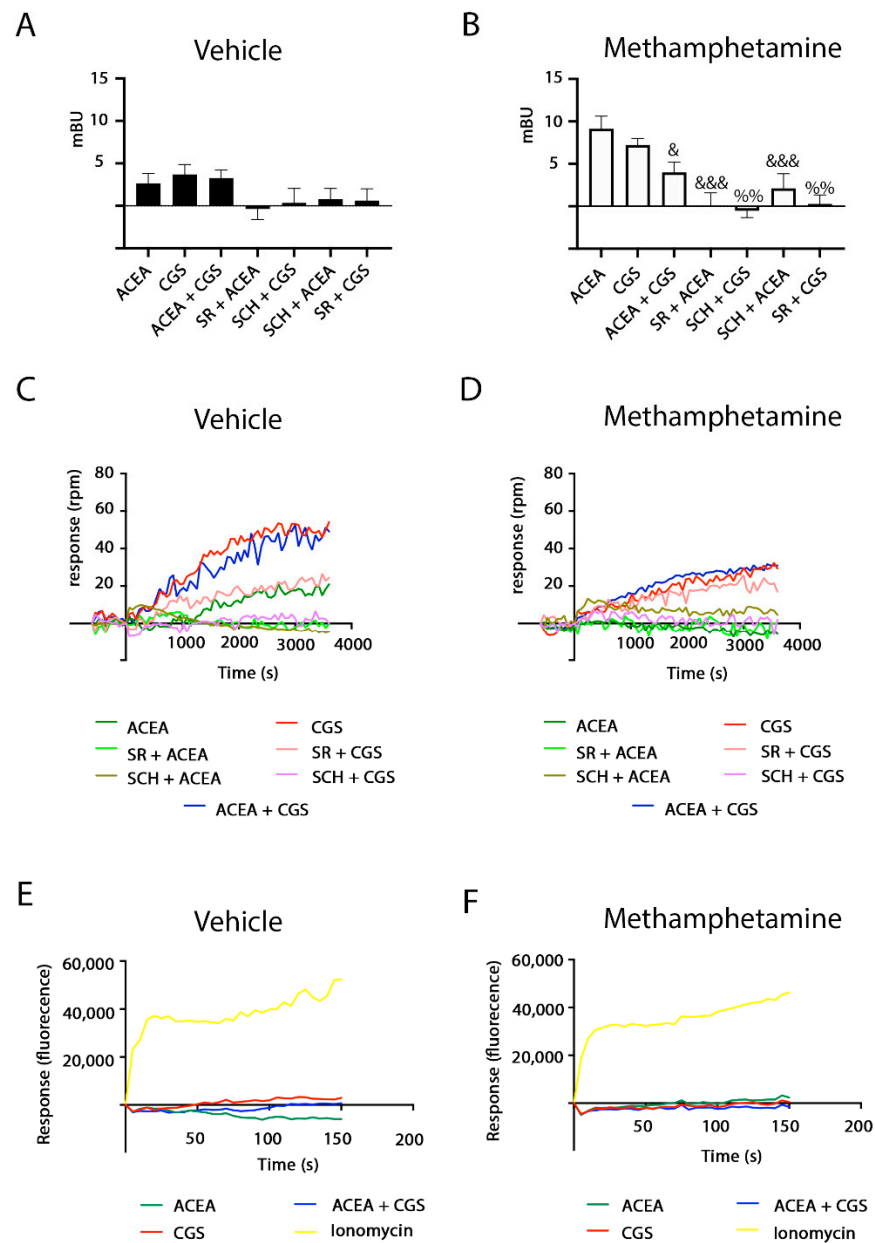


Figure 3. Methamphetamine effect on A_{2A} - CB_1 Het functionality: β -arrestin-2 recruitment, dynamic mass redistribution (DMR) and Ca^{2+} mobilization. HEK-293T cells transfected with cDNAs corresponding to A_{2A} R-YFP (0.4 μ g), CB_1 R (0.3 μ g) and β -arrestin-2-Rluc (0.5 μ g) (**A,B**) or with A_{2A} R (0.5 μ g), CB_1 R (0.6 μ g) (**C,D**) and 6GCaMP calcium sensor (1.5 μ g) (**E,F**) were treated (30 min) with vehicle (**A,C,E**) or with 1 μ M methamphetamine (**B,D,F**) and subsequently treated with 500 nM of the A_{2A} R antagonist SCH 58261 (SCH) or with 500 nM of the CB_1 R antagonist SR 141716A (SR). Receptors were activated using 100 nM of the A_{2A} R agonist CGS 21680 (CGS), with 200 nM of the CB_1 R agonist ACEA or both. In (**E,F**), a portion of the cells were stimulated with 1 μ M ionomycin as a positive control. The BRET data resulting from β -arrestin-2 recruitment (**A,B**), time-dependent DMR representative traces (**C,D**) and time-dependent representative traces of cytoplasmic Ca^{2+} levels (**E,F**) are shown. In (**A,B**), BRET is expressed as milli BRET units (mBU) and is given as the mean \pm SEM of six different experiments grouped by amount of BRET acceptor. A one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison post hoc test showed a significant effect over 100% (& $p < 0.05$, &&& $p < 0.001$ vs. ACEA condition; %% $p < 0.01$ vs. CGS condition).

2.3. Methamphetamine Action in Cells Expressing A_{2A} or CB_1 Receptors

It should be noted that the σ_1R , which mediates the action of some drugs of abuse, is endogenously expressed in HEK-293T cells [20,21,31,32]. Hence, we next addressed the mechanisms by which methamphetamine alters signaling in cells expressing A_{2A} or CB_1 receptors. We first analyzed data from HEK-293T cells expressing only the $A_{2A}R$. In cAMP level determination assays, the CGS 21680-induced increase in cAMP levels was not affected by pretreatment with methamphetamine (Figure 4A). This result was different from that observed in Figure 2A,B, where in HEK-293T cells expressing A_{2A} – CB_1 Hets, methamphetamine pretreatment partially blocked $A_{2A}R$ signaling. Data from MAPK pathway activation shows that methamphetamine per se is able to activate this signaling pathway; combined treatment of the drug of abuse and CGS 21680 resulted in an additive-like response, i.e., the drug did not disrupted the link of $A_{2A}R$ activation to the MAPK pathway (Figure 4B). Hence, it appears that the action of methamphetamine on the $A_{2A}R$ depends on CB_1R expression and, likely, on A_{2A} – CB_1 Het expression.

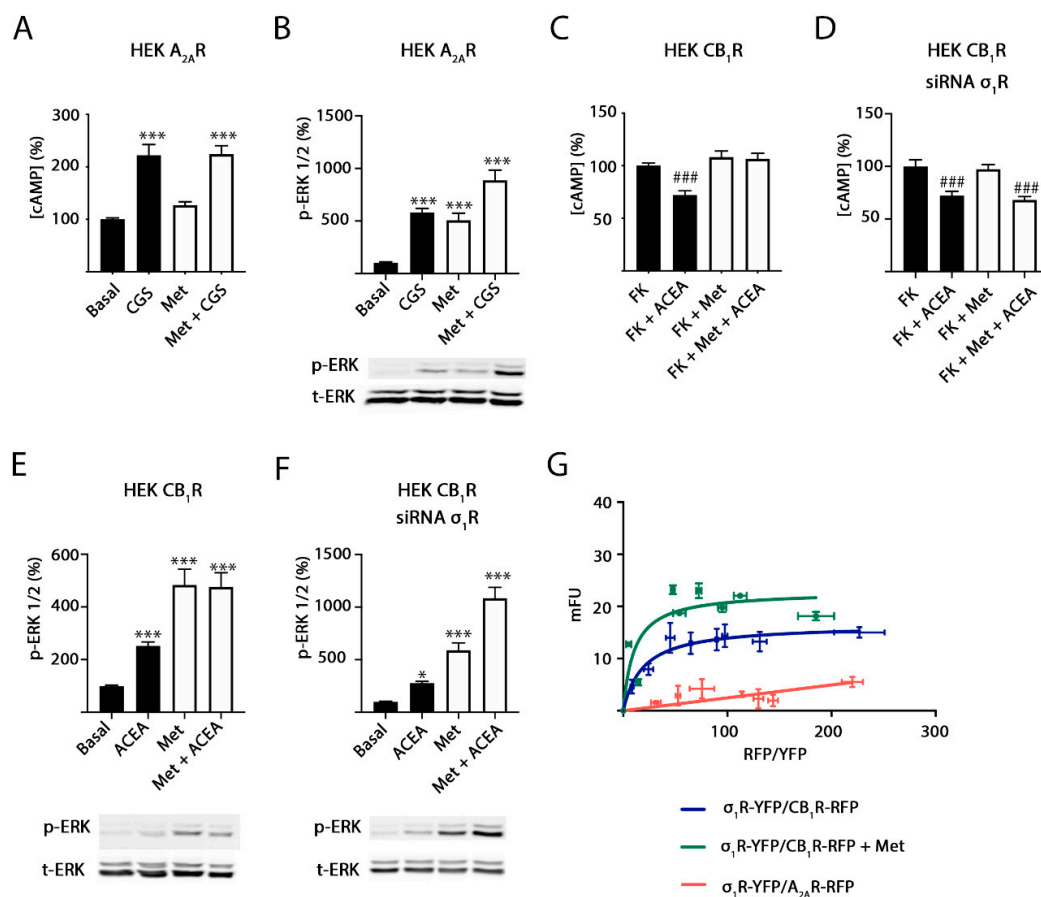


Figure 4. σ_1R involvement in methamphetamine effects on A_{2A} and CB_1 receptors. HEK-293T cells transfected with cDNAs coding for $A_{2A}R$ (0.5 μ g) (A,B) or for CB_1R (0.6 μ g) (C–F) in the absence (A–C,E) or presence (D,F) of siRNA for σ_1R (3 μ g) to silence σ_1R were stimulated with 1 μ M methamphetamine (Met, white bars) or vehicle (black bars) for 30 min. Cells were treated with 100 nM of the $A_{2A}R$ agonist CGS 21680 (CGS) (A,B) or with 200 nM of the CB_1R agonist, ACEA (C–F). 0.5 μ M of forskolin (FK) was used to determine G_i coupling to the CB_1R . Then, cAMP levels (A,C,D) and ERK1/2 phosphorylation (B,E,F) were determined and expressed as percentage over basal or, in the case of cAMP in CB_2R -expressing cells, over forskolin treatment. Values are the mean \pm SEM ($n = 5$, in triplicates). One-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison post hoc test showed a significant effect (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. basal condition, ### $p < 0.001$ vs. FK condition). In (B,E,F), a representative Western blot is shown (bottom). In (G), FRET experiments were performed in HEK-293T cells transfected with 0.25 μ g of cDNA for σ_1R -YFP and increasing amounts of cDNA for CB_1R -RFP (0.2 μ g to 2 μ g) or for $A_{2A}R$ -RFP (0.1 μ g to 1.5 μ g). When indicated cells were pretreated with 1 μ M methamphetamine. Results were grouped by amount of FRET acceptor. p-ERK indicates phosphorylated ERKs, t-ERK indicates total ERKs.

In contrast, the effect of methamphetamine on CB₁R-mediated signaling is not dependent on A_{2A}R expression. In fact, ACEA effects on forskolin-induced increases of cAMP levels (Figure 4C) and on MAPK pathway activation (Figure 4E) were blocked by methamphetamine. To further explain the mechanism by which methamphetamine may block CB₁R action, we focused on the σ_1 receptor (σ_1 R), which is a transmembrane receptor that does not belong to the GPCR family. It is a target of cocaine and its functionality in rodents is altered upon methamphetamine treatment [22,26,33]. Interestingly, the methamphetamine blockade of CB₁R signaling was mediated by the σ_1 R as it disappeared when a siRNA designed for σ_1 R silencing was used (Figure 4D,F). In terms of ERK phosphorylation, the methamphetamine action was not further increased by the activation of the CB₁R (Figure 4E). However, a summation effect was obtained in cells in which the σ_1 R was silenced (Figure 4F). Altogether, the results suggest that the σ_1 R mediates the inhibition of the CB₁R to the MAPK and cAMP pathways exerted by methamphetamine and that σ_1 R and CB₁R could physically interact. We performed fluorescence resonance energy transfer (FRET) assays using cells expressing a constant amount of cDNA for σ_1 R-YFP and increasing amounts of cDNA for CB₁R-RFP. The interaction is possible as deduced from the saturation curve (Figure 4G). FRET parameters were: FRET_{max} = 17 ± 1 and FRET₅₀ = 19 ± 5. The interaction was maintained in cells pretreated with methamphetamine although with a significant alteration in FRET parameters (FRET_{max} = 23 ± 3, FRET₅₀ = 10 ± 5). On the one hand, these results indicate that the drug produces an increase in CB₁R- σ_1 R complexes or a structural reorganization leading to an approximation of the two fluorescent proteins. On the other hand, in agreement with the lack of effect of methamphetamine on the A_{2A}R when the CB₁R is not present, FRET assays showed a linear nonspecific signal, i.e., a lack of interaction between σ_1 R-YFP and A_{2A}R-RFP (Figure 4G, red line).

2.4. σ_1 Receptor Involvement in Methamphetamine Action in Cells Expressing A_{2A}-CB₁Hets

Experiments similar to those described in the previous section were performed in cotransfected cells, that is, in cells expressing A_{2A}-CB₁Hets. Figure 5A shows that the activation of the A_{2A}R with CGS 21680 was significantly altered by methamphetamine pretreatment. Therefore, alteration of A_{2A}R-mediated signaling is dependent upon CB₁R expression and A_{2A}-CB₁ receptor heteromerization (Figure 5). Furthermore, the σ_1 R was required as the effect of the drug on A_{2A}R-mediated signaling disappeared in cells in which the σ_1 R was silenced (Figure 5B) but not in cells treated with a siRNA designed for calneuron-1 silencing (Figure 5C). These results suggest that a functional complex formed by the three receptors is expressed in these cells. In contrast, the results obtained using the agonist of the CB₁R were similar to those found in cells only expressing the cannabinoid receptor (Figure 5D-F). To test the hypothesis of trimer formation, we took advantage of a technique that allows to detect interactions of three different proteins, namely sequential resonance energy transfer (SRET). These experiments were performed in HEK-293T cells expressing σ_1 R-Rluc, CB₁R-YFP and transfected with increasing amounts of cDNA for A_{2A}R-RFP. Saturation of the SRET curve (Figure 5G) indicates that the three proteins interact (the dopamine D₁ receptor was used as a negative control). The SRET signal did not significantly change upon treatment with methamphetamine (SRET_{max} = 21 ± 2 and SRET₅₀ = 34 ± 12 in the absence of the drug and SRET_{max} = 25 ± 3 and SRET₅₀ = 24 ± 10 in the presence of methamphetamine). As the A_{2A}R is unable to interact with σ_1 R (Figure 4G), it is hypothesized that the trimer is formed by the CB₁R ability to bind to both A_{2A}R and σ_1 R.

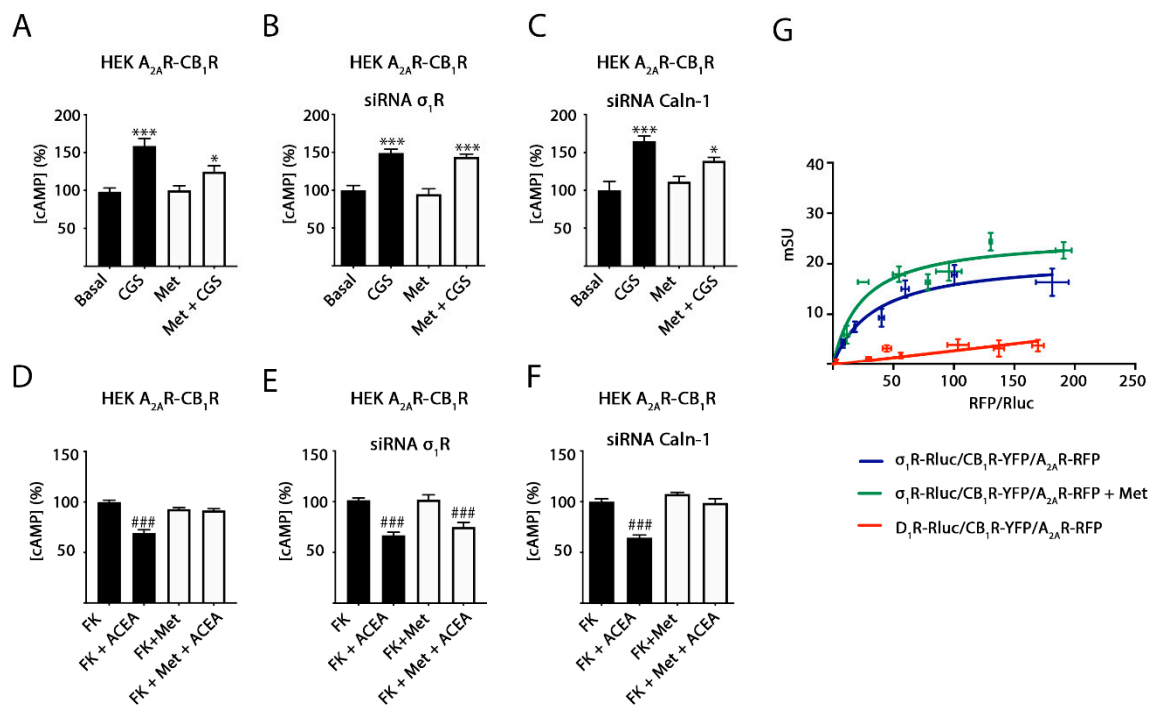


Figure 5. σ_1 R involvement in methamphetamine effects on A_{2A} - CB_1 Hets. HEK-293T cells were co-transfected with cDNAs coding for A_{2A} R (0.5 μ g) and for CB_1 R (0.6 μ g) (A–F). When indicated, σ_1 R (B,E) or calneuron-1 (Caln-1) (C,F) were silenced using 3 μ g specific siRNA. Cells were pretreated with 1 μ M methamphetamine (Met, white bars) or vehicle (black bars) for 30 min. GPCRs were activated either using 100 nM of the A_{2A} R agonist, CGS 21680 in naïve cells (CGS, (A–C)) or 200 nM of the CB_1 R agonist, ACEA, in cells treated with 0.5 μ M of forskolin (FK) (D–F). Then, cAMP levels (A–F) were determined and expressed as a percentage over basal (A_{2A} R) or forskolin (CB_1 R). Values are the mean \pm SEM of five different experiments performed in triplicates. One-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison post hoc test showed significant effects (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. basal condition or ### $p < 0.001$ vs. FK condition). In (G), SRET experiments were performed in HEK-293T cells transfected with constant amounts of cDNAs for σ_1 R-Rluc (0.5 μ g) or D_1 R-Rluc (0.33 μ g) and for CB_1 R-YFP (1 μ g) and increasing amounts of cDNA for A_{2A} R-RFP (0.25 μ g to 2.5 μ g). Results were grouped by amount of SRET acceptor.

2.5. CB_1 R- σ_1 R Expression Is Altered When Striatal Primary Cultures of Neurons Are Treated with Methamphetamine

The in situ proximity ligation assay (PLA) is instrumental in detecting in natural sources complexes formed by two membrane proteins [34,35]. PLA was determined in primary cultures of striatal neurons. Heteromers are detected as red dots surrounding Hoechst-stained nuclei. Sixty-eight percent of neurons expressed red dots when analyzing CB_1 R- A_{2A} R complexes by using anti- A_{2A} R and anti- CB_1 R antibodies, with around five red dots per cell expressing dots (Figure 6A,B). Moreover, when analyzing CB_1 R- σ_1 R complexes, similar values were observed: 64% of neurons showed red clusters with around five red dots per cell expressing dots. When A_{2A} R- σ_1 R complexes were analyzed, 44% of neurons showed red clusters with around 3 red dots per cell expressing dots. Due to the fact that A_{2A} R does not interact with σ_1 R (Figure 4G), it seems likely that a significant amount of neurons are expressing A_{2A} - CB_1 - σ_1 R heterotrimer. Unfortunately, PLA is unable to detect complexes formed by three proteins.

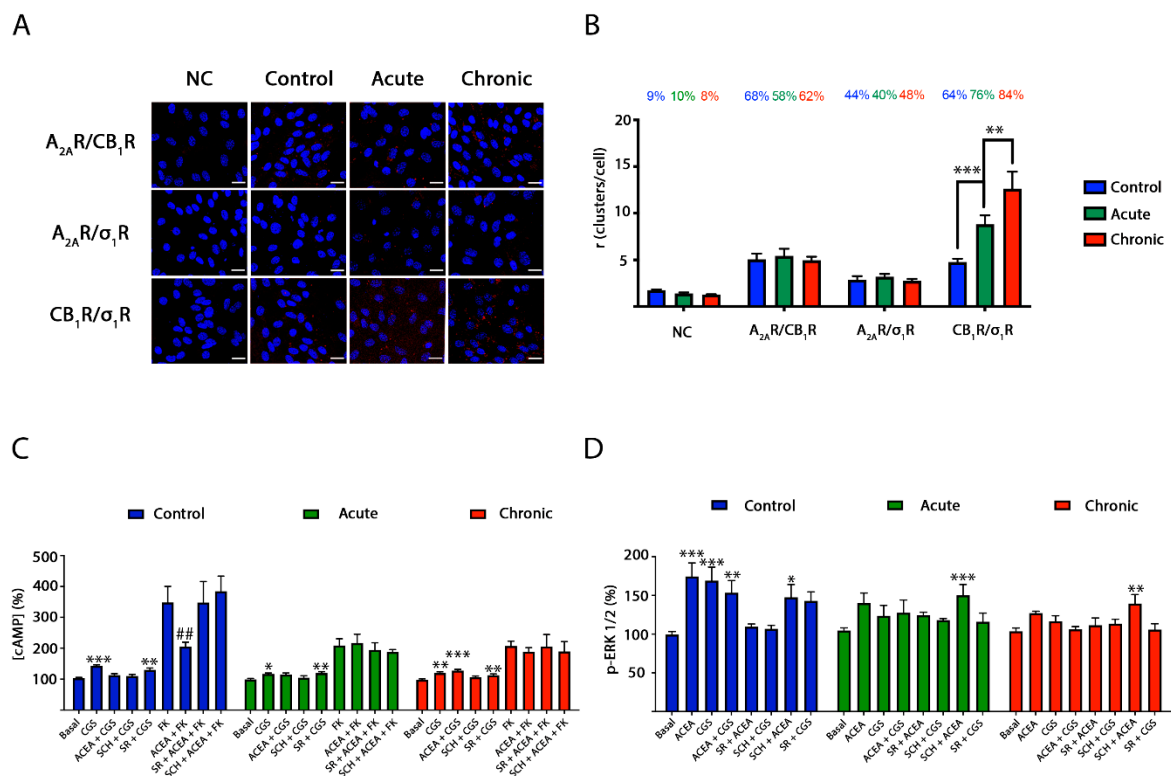


Figure 6. Methamphetamine effect on A_{2A}–CB₁Het expression and signaling in striatal neurons. (A,B) Proximity ligation assays (PLA) were performed in striatal neurons treated with 1 μM methamphetamine for two hours (acute, green bars), for one week (chronic, red bars) or with vehicle (control, blue bars) using primary antibodies specific for the A_{2A}, σ₁ and CB₁ receptors. As a negative control (NC), neurons were only treated with the primary antibody against CB₁R. See Methods for details on the steps in the PLA procedure. Confocal microscopy images (stacks of 4 consecutive planes) show heteroreceptor complexes as red clusters over Hoechst-stained nuclei (blue). Scale bar 20 μm (A). The bar graph (B) shows the number of red dots/neuron and the number above the bars indicates the percentage of neurons presenting red dots. Values are the mean ± SEM (*n* = 8–10). A two-way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparison post hoc test were used for statistical analysis (** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001). cAMP levels (C) and ERK 1/2 phosphorylation (D) were determined in striatal neurons treated with methamphetamine 1 μM for two hours (acute, green bars) or for one week (chronic, blue bars) or vehicle (control, blue bars). When indicated cells were incubated with 500 nM of the A_{2A}R antagonist SCH 58261 (SCH) or with 500 nM of the CB₁R antagonist SR 141716A (SR). Receptors activated using 100 nM of the A_{2A}R agonist CGS 21680 (CGS) or with 200 nM of the CB₁R agonist ACEA. Forskolin (FK) was used to determine Gi coupling to the CB₁ receptor (C). The values are the mean ± SEM of six experiments performed in triplicates. A two-way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparison post hoc test were used for statistical analysis (* *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001 vs. basal condition; ## *p* < 0.01 versus FK condition).

PLA experiments were also performed in striatal neurons treated with 1 μM methamphetamine for two hours (acute) or for one week (chronic). On the one hand, the drug in either acute or chronic treatment did not affect the expression of A_{2A}R–CB₁R and of A_{2A}R–σ₁R complexes. On the other hand, the expression of CB₁R–σ₁R complexes was significantly increased upon acute treatment (76% of neurons expressing red dots and around 10 red dots per cell expressing dots) and even more after the chronic regime (84% of neurons expressing red dots and around 13 red dots per cell expressing dots) (Figure 6A,B).

2.6. Blockade by Methamphetamine of CB₁R–A_{2A}R Complex Signaling in Striatal Neurons

First, in signaling assays performed in striatal neurons, the A_{2A}–CB₁Het print, namely cross-antagonism, was detected (Figure 6). In addition, the non-additive effect observed in the heterologous expression system was detected (Figure 6). After demonstrating A_{2A}–CB₁Het expression by PLA (see previous section) and by detection of the heteromer print, further assays were performed to evaluate how methamphetamine may affect signal-

ing in these cells. Primary cultures of striatal neurons were treated for two hours (acute) or for one week (chronic) with methamphetamine prior to assessing the effect of $A_{2A}R$ or CB_1R agonists on cAMP levels and MAPK pathway activation. Interestingly, it was first observed that ACEA-induced decreases of cAMP levels were partially inhibited by acute and chronic methamphetamine treatments (Figure 6C), while ERK1/2 phosphorylation was completely blocked (Figure 6D). Similarly, CGS 21680-induced increases in cAMP levels were partially blocked after acute and chronic methamphetamine treatments, while ERK1/2 phosphorylation was completely blunted (Figure 6C,D). These results show that the drug, likely via interaction with σ_1R in a heteromer context, partially reduces G-protein-mediated signaling while completely abolishing MAPK pathway activation. Interestingly, the effect on $A_{2A}R$ signaling to the MAPK pathway did not occur in the presence of a CB_1R antagonist.

3. Discussion

Cannabinoids and adenosine are two important neuromodulators in the central nervous system (CNS). Two of their receptors have attracted interest due to their potential as therapeutic targets. On the one hand, the CB_1R is, reportedly, the most abundant GPCR in the CNS and is mainly expressed in neurons [36–38]. Its potential is limited as some of their agonists, such as the natural *Cannabis sativa*-derived compound Δ^9 -THC, lead to psychotropic effects, while its antagonists may have serious side effects [39]. On the other hand, the $A_{2A}R$ receptor is heavily expressed in the brain striatum where it regulates dopamine neurotransmission. In addition, (i) it is expressed in other brain areas, in both neurons and glia [40], and (ii) there is cumulative evidence of its participation in neurodegenerative/neuroprotection events. Importantly, a first in class $A_{2A}R$ antagonist, istradefylline, has been approved for the therapy of Parkinson's disease (NouriasTM in Japan and NouriazTM in the USA) [41–46]. This approval puts the $A_{2A}R$ on the front line to combat neurodegeneration and/or to afford neuroprotection.

The mechanisms of neurodegeneration due to methamphetamine consumption are not well understood yet. It should be noted that the σ_1R is a common factor in cocaine and methamphetamine addiction [26]. It is well established that cocaine binds to this atypical transmembrane receptor, which is structurally different to GPCRs, occurs as a homotrimer and has no known endogenous agonist [47–49]. In animals treated with methamphetamine, the alterations involve σ_1R -mediated events. About 15 years ago it was reported that locomotor effects of the drug could be reverted if animals were administered antisense probes that reduced the expression of the σ_1R receptor in the brain; similar results were obtained using the commercially available antagonists [22]. Our first hypothesis, namely that the σ_1R could interact with the $A_{2A}R$ and mediate effects of the drug on the receptor was not proven. Not only did the two receptors not interact, but methamphetamine did not directly affect $A_{2A}R$ functionality. However, CB_1R is required for methamphetamine altering $A_{2A}R$ signaling.

Previous experience has shown us that the σ_1R may interact with GPCRs to form complexes that mediate some of the relevant central effects exerted by cocaine. For instance, an interaction between σ_1 , orexin and corticotropin-releasing factor receptors are the target of cocaine in the ventral tegmental area [50]. Remarkably, the anorexic effect of cocaine is, at least in part, due to the formation of a complex between the σ_1R and the ghrelin receptor that allows the blockade of ghrelin action [31]. Our next hypothesis was then to consider interactions of the σ_1R with GPCR heteromers, whose functionality is different from that exerted by individual receptors [51–53]. In fact, biased signaling may be achieved by GPCR heteromers and/or by complexes formed by GPCRs and other proteins [54]. We here demonstrate that σ_1R may interact with the CB_1R so that σ_1R , CB_1R and $A_{2A}R$ may form trimers.

Although the $A_{2A}R$ may interact with several other GPCRs (see www.gpcr-hetnet.com/, accessed on 7 March 2021), we were interested in interactions with the receptors of cannabinoids and, in particular, with the most abundant GPCR among CNS neurons, the

CB₁R. Actually, the interaction of these two GPCRs in an heterologous expression system and, among others, in the striatum and in CA1 neurons in the hippocampus, has been reported [10,16,55–58]. Then, we aimed at finding whether the σ_1 R could interact with the CB₁R and, upon confirming this possibility, whether methamphetamine acting on σ_1 R could alter A_{2A}R-mediated signaling via the A_{2A}–CB₁Het. The results not only confirmed the hypothesis but showed a strong effect upon the A_{2A}R in co-transfected HEK-293 cells and in primary cultures of striatal neurons. Alterations by the drug in cAMP-dependent signaling are important but less than those in the MAPK pathway. In fact, the A_{2A}–CB₁Het is coupled to both G_s and G_i and both are altered, thus leading to a counterbalancing effect. In contrast, the effect of the drug on the MAPK pathway was in the same direction for both receptors, i.e., blocking the activation of the pathway. In addition, the results indicate that methamphetamine acts on a functional unit formed by the three receptors but with the A_{2A}R being unable to bind to σ_1 R and with the CB₁R able to bind both σ_1 and A_{2A} receptors.

In summary, methamphetamine alters A_{2A}R-mediated signaling in striatal neurons but only if the CB₁R is present and the A_{2A}–CB₁Het is expressed. Failure to properly activate the MAPK signaling pathway in neurons unrolls the neurodegenerative mechanism due to the lack of those transcription factors that favor the expression of neuroprotective molecules (see [59] for review).

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

Forskolin and receptor ligands CGS 21680 hydrochloride, ACEA, SCH 58261 and SR 141716A were purchased from Tocris Bioscience (Bristol, UK). Ionomycin and methamphetamine hydrochloride were purchased from MERK (St. Louis, MO, USA). siRNAs were purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA).

4.2. Expression Vectors

cDNAs for the human version of cannabinoid CB₁, adenosine A_{2A}, dopamine D₁ and σ_1 receptors without the stop codon were obtained by PCR and subcloned to a Rluc-containing vector (pRluc-N1; PerkinElmer, Wellesley, MA, USA), to an enhanced yellow fluorescent protein-containing vector (pEYFP-N1; Clontech, Heidelberg, Germany) or to a cherry (RFP)-containing vector (pcDNA 3.1 Cherry) using sense and antisense primers harboring unique restriction sites for HindIII and BamHI to generate A_{2A}R-Rluc, D₁R-Rluc, CB₁R-YFP, D₁R-YFP, A_{2A}R-RFP and CB₁R-RFP or for BamHI and KpnI to generate σ_1 R-Rluc and σ_1 R-YFP fusion proteins.

4.3. Cell Culture and Transfection

HEK-293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin, MEM Non-Essential Amino Acids Solution (1/100) and 5% (*v/v*) heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (all from Gibco, Paisley, Scotland, UK). Cells were maintained in a humid atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C and were passaged when they were 80–90% confluent (number of passages < 18). Cells were transiently transfected with the corresponding cDNAs using the Polyethylenimine (PEI) (MERK, St. Louis, MO, USA) method as previously described [28,60] or with siRNA using the lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) method following the instructions of the supplier cells were incubated with transfection reagents in serum-free medium; 4 h later the medium was replaced by complete medium. Experiments were carried out 48 h later.

To prepare mouse neuronal primary cultures, striatum from embryos (E19) was removed and neurons were isolated as described by Hradsky et al., 2013 [61]. In brief, striatum was digested with trypsin for 15 min at 37 °C. Trypsinization was stopped by several washes with HBSS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 1.26 mM CaCl₂, 0.4 mM MgSO₄, 10 mM HEPES pH 7.4). Cells were brought to a

homogeneous suspension by passage through 0.9 mm and 0.5 mm needles and through a 100 μm -pore mesh. Finally, cells were grown in neurobasal medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin, MEM Non-Essential Amino Acids Solution (1/100) (all from Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) and 2% (*v/v*) B27 supplement (Gibco, Paisley, Scotland, UK) for 12 days. For cAMP assays, cells were grown on 6-well plates at a density of 500,000 cells/well, for ERK 1/2 phosphorylation assays, cells were plated in 96-well plates at a density of 50,000 cells/well and for the proximity ligation assay, neurons were plated in coverslips in 12-well plates at a density of 100,000 cell/well. Cell counting was assessed using trypan blue and a countless II FL automated cell counter (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

The animal handling and protocols were conducted in accordance with the European Council Directive 2010/63/UE and the current Spanish legislation (RD53/2013). The ethics committee of the University of Barcelona were in charge of law implementation.

4.4. Immunocytochemistry

HEK-293T cells expressing A_{2A}R-Rluc and/or CB₁R-YFP seeded in coverslips were treated for one hour with vehicle or 1 μM methamphetamine, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) containing 20 mM glycine to quench the aldehyde groups before permeabilization with PBS-glycine containing 0.2% Triton X-100 (5 min). Cells were treated for 1 h with PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA), labelled with a primary mouse monoclonal anti-Rluc (1/100; EMD Millipore, Darmstadt, Germany, Ref. MAB4400) antibody for 1 h, and subsequently treated for 1 h with an anti-mouse Cy3-conjugated IgG (red) (1/200; Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, Ref. 715-166-150) antibody. Nuclei were stained with Hoechst (1/100; MERK, St. Louis, MO, USA, Ref. B1155). Samples were washed several times and mounted with 30% Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA). CB₁R-YFP expression was detected by YFP own fluorescence (green). Images were obtained in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with an apochromatic 63X oil-immersion objective (N.A. 1.4), and 405 nm, 488 nm and 561 nm laser lines.

4.5. Resonance Energy Transfer Assays

For bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays, HEK-293T cells were transiently co-transfected with constant amount of cDNAs encoding for receptor-Rluc fusion proteins and increasing amounts of cDNAs corresponding to receptor-YFP fusion proteins. Forty-eight hours post-transfection, cells were detached using 0.1% glucose HBSS buffer and the cell suspension was adjusted to 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of protein using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) and BSA for standardization. Cells were treated with 1 μM methamphetamine or vehicle 1 h prior to each quantification. To quantify protein-YFP expression, cells were distributed in 96-well black plates with a clear bottom (Porvair, Wrexham, Wales, UK) and fluorescence was read in a Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10-nm bandwidth excitation filter at 485 nm and 530 nm emission filter readings. For BRET measurements, cells were distributed in 96-well white plates with a clear bottom (Porvair) and readings were collected 1 min after the addition of 5 μM coelenterazine H (PJK GMBH, Kleinblittersdorf, Germany) using a Mithras LB 940, which allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 485 nm and the long-wavelength filter at 530 nm. To quantify protein-Rluc expression, luminescence readings were performed 10 min after 5 μM coelenterazine H addition using a Mithras LB 940 reader.

For fluorescence resonance energy transfer (FRET) assays, HEK-293T cells were transiently co-transfected with a constant amount of cDNAs encoding for receptor-YFP and increasing amounts of cDNAs corresponding to receptor-Cherry (RFP). Forty-eight hours after transfection, cells were detached using HBSS buffer with 0.1% glucose and cell suspension was adjusted to 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of protein using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) and bovine serum albumin (BSA) for standardization. Cells were treated with

1 μM methamphetamine or vehicle 1 h prior to each quantification. Cells were distributed in 96-well black plates with a clear bottom (Corning). To quantify protein-YFP expression and protein-cherry expression, fluorescence was read in a FluoStar Optima Fluorimeter (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) equipped with a high-energy xenon flash lamp, using a 10-nm bandwidth excitation filters at 485 nm (for YFP) and 540 nm (for RFP) and emission filters at 530 nm (for YFP) and 590 nm (for Cherry) readings. For FRET measurements, fluorescence was read in a FluoStar Optima Fluorimeter equipped with a high-energy xenon flash lamp, which allows the integration of the signals detected in the short-wavelength filter at 530 nm and the long-wavelength filter at 590 nm.

Net BRET and net FRET were defined as $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})] - C_f$ where C_f corresponds to $[(\text{long-wavelength emission})/(\text{short-wavelength emission})]$ for the donor construct expressed alone in the same experiment (Rluc for BRET and YFP for FRET). The GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA) was used to fit the data. BRET and FRET are expressed as milli BRET units, mBU (net BRET \times 1000) or milli FRET units, mFU (net FRET \times 1000), respectively. The relative amount of BRET or FRET is given as a function of $1000 \times$ the ratio between the fluorescence of the acceptor (YFP for BRET or Cherry for FRET) and the activity of the donor (Rluc for BRET or YFP for FRET).

For sequential resonance energy transfer (SRET) assays (see [12]), HEK-293T cells were transiently co-transfected with constant amounts of cDNA coding for the BRET donor (receptor-Rluc), the first acceptor (receptor-YFP) and increasing amounts of cDNA corresponding to the second acceptor (receptor-RFP). After 48 h, cells were detached using HBSS buffer with 0.1% glucose and cell suspension was adjusted to 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of protein using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) and bovine serum albumin (BSA) for standardization. Cells were treated with 1 μM methamphetamine or vehicle 1 h prior to each quantification. To quantify protein-RFP expression, fluorescence was read in a FluoStar Optima Fluorimeter (BMG Labtechnologies) using a 10-nm bandwidth excitation filter at 540 nm and an emission filter at 590 nm. Receptor fluorescence expression was determined as the fluorescence of the sample minus the fluorescence of cells expressing only receptor-Rluc and receptor-YFP. To quantify receptor-Rluc expression, luminescence readings were performed 10 min after 5 μM coelenterazine H addition using a Mithras LB 94 reader (Berthold Technologies). For SRET measurements, the cell suspension was treated with 5 μM coelenterazine H for 1 min and the SRET signal was determined using a Mithras LB 940 reader (485 nm) (short wavelength emission) and FluoStar Optima Fluorimeter (590 nm) (long wavelength emission). Net SRET was defined as $[(\text{long wavelength emission})/(\text{short wavelength emission})] - C_f$, where C_f corresponds to long wavelength emission/short wavelength emission for cells expressing only protein-Rluc and protein-YFP. SRET curves were fitted assuming a single phase by non-linear regression equation using the Graphpad Prism software (San Diego, CA, USA). SRET values are given as milli SRET units (mSU: $1000 \times$ net SRET). The relative amount of SRET is given as a function of $1000 \times$ the ratio between the fluorescence of the FRET acceptor (RFP) and the activity of the BRET donor (Rluc).

4.6. Cytosolic cAMP Determination

HEK-293T cells were transfected with the cDNA encoding for $A_{2A}R$ and/or for CB_1R , and when indicated, with the siRNA for σ_1R or for *caln-1*. Neuronal primary cultures were pretreated with 1 μM methamphetamine or vehicle for 2 h (acute treatment) or for one week (chronic treatment). Transfected HEK-293T cells were pretreated (20 min) with 1 μM methamphetamine or vehicle. Two hours before initiating the experiment, culture medium for transfected HEK-293T or primary neurons was replaced by serum-starved DMEM medium. Cells were detached, resuspended in DMEM medium containing 50 μM zardaverine (Tocris Bioscience, Bristol, UK) and plated (4000 cells/well) in white ProxiPlate 384-well microplates (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). HEK-293T cells or neurons were treated with the corresponding antagonists (SCH 58261 for $A_{2A}R$ or SR 141716A for CB_1R)

or vehicle and stimulated (15 min) with the corresponding agonists (CGS 21680 for A_{2A}R and/or ACEA for CB₁R) or vehicle before adding 0.5 μM forskolin (15 min). Readings were performed after 1-h incubation at room temperature. Homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer (HTRF) measurements were performed using the Lance Ultra cAMP kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Fluorescence at 665 nm was analyzed on a PHERAstar Flagship microplate reader equipped with an HTRF optical module (BMG Lab technologies, Offenburg, Germany). The effect of ligands was given in percentage with respect to the reference value.

4.7. Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) and Protein Kinase B (Akt) Phosphorylation Assays

HEK-293T cells were transfected with the cDNA encoding for A_{2A}R and/or for CB₁R, and when indicated, with the siRNA of σ₁R. Two to four hours before initiating the experiment, the culture medium was replaced by serum-starved DMEM medium. Cells were incubated at 37 °C with 1 μM methamphetamine (30 min) or vehicle, followed with the corresponding antagonist (SCH 58261 for A_{2A}R or SR 141716A for CB₁R) (20 min) and stimulated (7 min) with the corresponding agonists (CGS 21680 for A_{2A}R and/or ACEA for CB₁R). After the indicated incubation period, the reaction was stopped by placing cells onto ice. Then, cells were washed twice with cold PBS and lysed by the addition of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaF, 150 mM NaCl, 45 mM β-glycerolphosphate, 1% Triton X-100, 20 μM phenyl-arsine oxide, 0.4 mM NaVO₄ and protease inhibitor mixture (MERK, St. Louis, MO, USA)). Cellular debris were removed by centrifugation at 13,000 × g for 10 min at 4 °C, and protein was adjusted to 1 mg/mL by the bicinchoninic acid method (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) using a commercial bovine serum albumin dilution (BSA) (ThermoFisher Scientific) for standardization. Finally, cells were denatured by placing them at 100 °C for 5 min. Akt and ERK1/2 phosphorylation were determined by western blot. Equivalent amounts of protein (20 μg) were subjected to electrophoresis (10% SDS-polyacrylamide gel) and transferred onto PVDF membranes (Immobilon-FL PVDF membrane, MERK, St. Louis, MO, USA) for 90 min. Then, the membranes were blocked for 1 h at room temperature (constant shaking) with Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) and labelled with a mixture of primary mouse anti-phospho-ERK 1/2 antibody (1:2000, MERK, Ref. M8159), primary rabbit anti-ERK 1/2 antibody (1:40,000, MERK, Ref. M5670), which recognizes both phosphorylated and non-phosphorylated ERK 1/2, and primary rabbit anti-phosphoAkt antibody (1:2500, Signalway Antibody, Baltimore, MA, USA, Ref. 11054) overnight at 4 °C with shaking. Then, the membranes were washed three times with PBS containing 0.05% tween and visualized by the addition of a mixture of IRDye 800 anti-mouse antibody (1:10,000, MERK, Ref. 926-32210) and IRDye 680 anti-rabbit antibody (1:10,000, MERK, Ref. 926-68071) for 2 h at room temperature. Membranes were washed 3 times with PBS-tween 0.05% and once with PBS and left to dry. Bands were analyzed using Odyssey infrared scanner (LI-COR Biosciences). Band densities were quantified using the scanner software, and the level of phosphorylated ERK 1/2 and Akt was normalized using the total ERK 1/2 protein band intensities. Results obtained are represented as the percent over basal (non-stimulated cells).

To determine the ERK 1/2 phosphorylation in striatal neuronal primary cultures, 50,000 neurons/well were plated in transparent 96-well microplates and kept in the incubator for 12 days. Neurons were pretreated with 1 μM methamphetamine for 2 h (acute treatment) or for one week (chronic treatment) or vehicle. Two to four hours before initiating the experiment, the medium was substituted by serum-starved DMEM medium. Then, neurons were pre-treated at room temperature for 15 min with the specific antagonist (SCH 58261 for A_{2A}R or SR141716A for CB₁R) or vehicle, and finally stimulated for 10 min with the specific agonists (CGS 21680 for A_{2A}R and/or ACEA for CB₁R). Neurons were then washed twice with cold PBS before the addition of 30 μL lysis buffer (20 min treatment in constant agitation). Subsequently, 10 μL of each supernatant were placed in white ProxiPlate 384-well microplates (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and the ERK 1/2 phosphorylation was determined using the AlphaScreen[®]SureFire[®] kit (PerkinElmer)

following the instructions of the supplier and using an EnSpire[®] Multimode Plate Reader (PerkinElmer). The effect of ligands is given as percentage over the reference values.

4.8. Dynamic Mass Redistribution (DMR) Assays

Cell mass redistribution induced upon receptor activation was detected by illuminating the underside of a biosensor with a polychromatic light and measuring the changes in the wavelength of the reflected monochromatic light, which was a sensitive function of the index of refraction. The magnitude of this wavelength shift (in picometers) was directly proportional to the amount of dynamic mass redistribution (DMR). HEK-293T cells co-transfected with the cDNA coding for A_{2A}R and for CB₁R were seeded in 384-well sensor microplates (Corning[®] Epic[®] 384-well Cell Assay Microplate) (MERK, St. Louis, MO, USA) to obtain a 70–80% confluent monolayer constituted by approximately 10,000 cells per well. Before the assay, cells were washed twice with assay buffer (HBSS with 20 mM HEPES pH 7.15 containing 0.1% DMSO) and maintained for 2 h at 24 °C in the same buffer (30 µL/well). Then, the sensor plate was scanned, and a baseline optical signature was recorded for 10 min before adding 10 µL of the specific antagonists (SCH 58261 for A_{2A}R or SR141716A for CB₁R) in the presence or in the absence of 1 µM methamphetamine and recorded for 30 min, followed by the addition of 10 µL of the specific agonists (CGS 21680 for A_{2A}R and/or ACEA for CB₁R) and monitoring for another 60 min. All of the tested compounds were dissolved in the assay buffer. The cell signaling signature was determined using an EnSpire[®] Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) by a label-free technology. Results were analyzed using the EnSpire Workstation Software v 4.10 (PerkinElmer).

4.9. Determination of Cytoplasmic Calcium Ion Levels

HEK-293T cells were co-transfected with the cDNAs coding for A_{2A}R, CB₁R and GCaMP6 calcium sensor. At 48 h post-transfection, cells were detached using Mg²⁺ Locke's buffer (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2.3 mM CaCl₂, 5.6 mM glucose and 5 mM HEPES, pH 7.4) supplemented with 10 µM glycine, and the cell suspension was adjusted to 40 µg/µL of protein using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) and BSA for standardization. Cells were plated in 96-well black with clear bottom microplates (Porvair) and pretreated with 1 µM methamphetamine or vehicle for 1 h before treatment with the specific antagonists (SCH 58261 for A_{2A}R or SR 141716A for CB₁R) for 10 min, followed by the addition of the specific receptor agonists (CGS 21680 for A_{2A}R and/or ACEA for CB₁R) or 1 µM ionomycin a few seconds before readings. Fluorescence emission intensity of the GCaMP6 was recorded at 515 nm upon excitation at 488 nm on the EnSpire[®] Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) for 150 s every 5 s.

4.10. β-Arrestin 2 Recruitment

HEK-293T cells were co-transfected with the cDNA coding for A_{2A}-YFP, CB₁R and β-arrestin 2-Rluc. At 48 h post-transfection, cells were detached using 0.1% glucose HBSS buffer and the cell suspension was adjusted to 30 µg/µL of protein using a Bradford assay kit (Bio-Rad, Munich, Germany) and BSA for standardization. Cells were plated in 96-well black with clear bottom plates (Porvair) and pretreated with 1 µM methamphetamine or vehicle for 30 min before treatment with the specific antagonists (SCH 58261 for A_{2A}R or SR 141716A for CB₁R) for 10 min. Coelenterazine H (5 µM) (PJK GMBH, Kleinblittersdorf, Germany) was added before stimulation with the specific agonists (CGS 21680 for A_{2A}R and/or ACEA for CB₁R) for 2 min. Then, BRET between β-arrestin 2-Rluc and A_{2A}R-YFP was determined as described above (see Resonance Energy Transfer Assays).

4.11. Proximity Ligation Assays (PLA)

Striatal neuronal primary cultures grown on glass coverslips were pretreated with 1 µM methamphetamine for 2 h (acute treatment) or for one week (chronic treatment) or vehicle. In brief, neurons were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, washed

with PBS containing 20 mM glycine to quench the aldehyde groups, and permeabilized with the same buffer containing 0.05% Triton X-100 for 5 min. After 1 h incubation at 37 °C with blocking solution, the neurons were treated with specific antibodies against A_{2A}, CB₁ or σ_1 receptors. The following combinations of antibodies were used: mouse monoclonal anti-A_{2A}R (1/100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Paisley, UK, Ref. 32261) and rabbit polyclonal anti-CB₁R (1/100; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA, Ref. PA1-745), rabbit polyclonal anti-A_{2A}R (1/100, ThermoFisher Scientific, Ref. PA1-042) and mouse monoclonal anti- σ_1 R (1/100, Santa Cruz Biotechnology, Ref. 137075) or rabbit polyclonal anti-CB₁R (1/100, ThermoFisher Cientific) and mouse monoclonal anti- σ_1 R (1/100, Santa Cruz Biotechnology). Cells were processed using the PLA probes detecting mouse and rabbit antibodies (1/100, Duolink II PLA probe anti-rabbit plus and Duolink II PLA probe anti-mouse, MERK, St. Louis, MO, USA) in the presence of Hoechst (1/100, MERK). Preparations were mounted using 30% Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA, USA). Negative controls were performed by omitting one of the primary antibodies. Images were obtained in a Leica SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) equipped with apochromatic 63X oil-immersion objectives (N.A. 1.4), and 405 and 561 nm laser lines. For each field of view, a stack of two channels (one per staining) and 3 to 4 Z stacks with a step size of 1 μ m were acquired. The number of cells containing one or more red spots versus total cells (blue nucleus) and, in spot-containing cells, the ratio *r* (number of red spots/cell), were determined using the Duolink Image tool software (MERK).

4.12. Statistical Analysis

Graph data are the mean \pm SEM (*n* = 6 at least). GraphPad Prism software version 8 (San Diego, CA, USA) was used for the data fitting and statistical analysis. A one-way or two-way ANOVA followed by the post-hoc Bonferroni's test were used when comparing multiple values. Significant differences were considered when the *p* value was <0.05.

Author Contributions: Conceptualization, G.N. and R.F.; methodology, G.N., M.C., I.R.-R., J.L. and A.L.; validation, R.F., I.R.-R. and G.N.; formal analysis, M.C., G.N., I.R.-R. and R.F.; investigation, M.C., I.R.-R., J.L. and A.L.; resources, J.C., R.L.-A. and E.E.; data curation, R.F. and I.R.-R. writing—original draft preparation, M.C., R.F., I.R.-R. and G.N.; writing—review and editing, J.C., M.C., I.R.-R., A.L., J.L., R.L.-A., E.E., G.N. and R.F.; supervision G.N. and R.F.; funding acquisition, G.N. and R.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2017-84117-R and RTI2018-09204-B-I00; they may include FEDER funds) and partially supported by the AARFD-17-503612 grant from the US Alzheimer's Association.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy restrictions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

A _{2A} R	Adenosine A _{2A} receptor
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA	Bovine Serum Albumin
CB ₁ R	Cannabinoid CB ₁ receptor
CB ₂ R	Cannabinoid CB ₂ receptor
CGS	CGS 21680
CNS	Central nervous system
D ₁ R	Dopamine D ₁ receptor

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMR	Dynamic Mass Redistribution
GPCR	G Protein-Coupled Receptor
FBS	Fetal Bovine Serum
FK	Forskolin
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
HTRF	Homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer
Met	Methamphetamine
MAPK	Mitogen activated protein kinase
PBS	Phosphate-buffered saline
PLA	Proximity Ligation Assay
SCH	SCH 58261
SR	SR 141716A
SRET	Sequential Resonance Energy Transfer
Δ^9 -THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
σ_1 R	Sigma 1 receptor

References

- Oñatibia-Astibia, A.; Franco, R.; Martínez-Pinilla, E. Health benefits of methylxanthines in neurodegenerative diseases. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*, 1600670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Franco, R.; Oñatibia-Astibia, A.; Martínez-Pinilla, E. Health benefits of methylxanthines in cacao and chocolate. *Nutrients* **2013**, *5*, 4159–4173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Eskelinen, M.H.; Ngandu, T.; Tuomilehto, J.; Soininen, H.; Kivipelto, M. Midlife healthy-diet index and late-life dementia and Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Dis. Extra* **2011**, *1*, 103–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sindi, S.; Kåreholt, I.; Eskelinen, M.; Hooshmand, B.; Lehtisalo, J.; Soininen, H.; Ngandu, T.; Kivipelto, M. Healthy dietary changes in midlife are associated with reduced dementia risk later in life. *Nutrients* **2018**, *10*, 1649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Eskelinen, M.H.; Ngandu, T.; Tuomilehto, J.; Soininen, H.; Kivipelto, M. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: A population-based CAIDE study. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, *16*, 85–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Eskelinen, M.H.; Kivipelto, M. Caffeine as a protective factor in dementia and Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2010**, *20*, S167–S174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Canas, P.M.; Porciuncula, L.O.; Cunha, G.M.A.; Silva, C.G.; Machado, N.J.; Oliveira, J.M.A.; Oliveira, C.R.; Cunha, R.A. Adenosine A2A Receptor Blockade Prevents Synaptotoxicity and Memory Dysfunction Caused by β -Amyloid Peptides via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 14741–14751. [[CrossRef](#)]
- Nobre, H.V.; Cunha, G.M.D.A.; De Vasconcelos, L.M.; Magalhães, H.I.F.; Neto, R.N.O.; Maia, F.D.; De Moraes, M.O.; Leal, L.K.A.M.; Viana, G.S.D.B. Caffeine and CSC, adenosine A2A antagonists, offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochem. Int.* **2010**, *56*, 51–58. [[CrossRef](#)]
- Espinosa, J.; Rocha, A.; Nunes, F.; Costa, M.S.; Schein, V.; Kazlauskas, V.; Kalinine, E.; Souza, D.O.; Cunha, R.A.; Porciuncula, L.O. Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia. *J. Alzheimer's Dis. JAD* **2013**, *34*, 509–518. [[CrossRef](#)]
- Carriba, P.; Ortiz, O.; Patkar, K.; Justinova, Z.; Stroik, J.; Themann, A.; Müller, C.; Woods, A.S.; Hope, B.T.; Ciruela, F.; et al. Striatal Adenosine A2A and Cannabinoid CB1 Receptors Form Functional Heteromeric Complexes that Mediate the Motor Effects of Cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *32*, 2249–2259. [[CrossRef](#)]
- Navarro, G.; Carriba, P.; Gandía, J.; Ciruela, F.; Casadó, V.; Cortés, A.; Mallol, J.; Canela, E.I.; Lluís, C.; Franco, R.; et al. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *Sci. World J.* **2008**, *8*, 1088–1097. [[CrossRef](#)]
- Carriba, P.; Navarro, G.; Ciruela, F.; Ferré, S.; Casadó, V.; Agnati, L.; Cortés, A.; Mallol, J.; Fuxe, K.; Canela, E.I.E.I.; et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 727–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Castelli, M.P.; Madeddu, C.; Casti, A.; Casu, A.; Casti, P.; Scherma, M.; Fattore, L.; Fadda, P.; Ennas, M.G. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol prevents methamphetamine-induced neurotoxicity. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98079. [[CrossRef](#)]
- Chipana, C.; García-Ratés, S.; Camarasa, J.; Pubill, D.; Escubedo, E. Different oxidative profile and nicotinic receptor interaction of amphetamine and 3,4-methylenedioxy-methamphetamine. *Neurochem. Int.* **2008**, *52*, 401–410. [[CrossRef](#)]
- Laprairie, R.B.; Bagher, A.M.; Kelly, M.E.M.; Donovan-Wright, E.M. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 4790–4805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aso, E.; Fernández-Dueñas, V.; López-Cano, M.; Taura, J.; Watanabe, M.; Ferrer, I.; Luján, R.; Ciruela, F. Adenosine A2A-Cannabinoid CB1 Receptor Heteromers in the Hippocampus: Cannabidiol Blunts Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-Induced Cognitive Impairment. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 5382–5391. [[CrossRef](#)]
- Lever, J.R.; Ferguson-Cantrell, E.A.; Watkinson, L.D.; Carmack, T.L.; Lord, S.A.; Xu, R.; Miller, D.K.; Lever, S.Z. Cocaine occupancy of sigma 1 receptors and dopamine transporters in mice. *Synapse* **2016**, *70*, 98–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

18. Romieu, P.; Martin-Fardon, R.; Maurice, T. Involvement of the sigma1 receptor in the cocaine-induced conditioned place preference. *Neuroreport* **2000**, *11*, 2885–2888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Maurice, T.; Romieu, P. Involvement of the sigma1 receptor in the appetitive effects of cocaine. *Pharmacopsychiatry* **2004**, *37*, 198–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Aguinaga, D.; Medrano, M.; Vega-Quiroga, I.; Gysling, K.; Canela, E.I.; Navarro, G.; Franco, R. Cocaine effects on dopaminergic transmission depend on a balance between sigma-1 and sigma-2 receptor expression. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Navarro, G.; Moreno, E.; Bonaventura, J.; Brugarolas, M.; Farré, D.; Aguinaga, D.; Mallol, J.; Cortés, A.; Casadó, V.; Lluís, C.; et al. Cocaine Inhibits Dopamine D2 Receptor Signaling via Sigma-1-D2 Receptor Heteromers. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Nguyen, E.C.; McCracken, K.A.; Liu, Y.; Pouw, B.; Matsumoto, R.R. Involvement of sigma (σ) receptors in the acute actions of methamphetamine: Receptor binding and behavioral studies. *Neuropharmacology* **2005**, *49*, 638–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ujike, H.; Kuroda, S.; Otsuki, S. sigma Receptor antagonists block the development of sensitization to cocaine. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *296*, 123–128. [[CrossRef](#)]
24. Katz, J.L.; Hiranita, T.; Hong, W.C.; Job, M.O.; McCurdy, C.R. A role for sigma receptors in stimulant self-administration and addiction. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2017**, *244*, 177–218. [[PubMed](#)]
25. Zhang, Y.; Lv, X.; Bai, Y.; Zhu, X.; Wu, X.; Chao, J.; Duan, M.; Buch, S.; Chen, L.; Yao, H. Involvement of sigma-1 receptor in astrocyte activation induced by methamphetamine via up-regulation of its own expression. *J. Neuroinflamm.* **2015**, *12*, 29. [[CrossRef](#)]
26. Yasui, Y.; Su, T.P. Potential molecular mechanisms on the role of the sigma-1 receptor in the action of cocaine and methamphetamine. *J. Drug Alcohol Res.* **2016**, *5*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Grundmann, M.; Kostenis, E. (Eds.) Holistic Methods for the Analysis of cNMP Effects. In *Non-Canonical Cyclic Nucleotides; Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer: Cham, Switzerland, 2015; Volume 238, pp. 339–357. [[CrossRef](#)]
28. Hinz, S.; Navarro, G.; Borroto-Escuela, D.; Seibt, B.F.; Ammon, C.; De Filippo, E.; Danish, A.; Lacher, S.K.; Červinková, B.; Rafehi, M.; et al. Adenosine A2A receptor ligand recognition and signaling is blocked by A2B receptors. *Oncotarget* **2018**, *9*, 13593–13611. [[CrossRef](#)]
29. Kenakin, T. A holistic view of GPCR signaling. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 928–929. [[CrossRef](#)]
30. Grundmann, M. Label-free dynamic mass redistribution and bio-impedance methods for drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2017**, *2017*, 9.24.1–9.24.21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Aguinaga, D.; Medrano, M.; Cordoní, A.; Jiménez-Rosés, M.; Angelats, E.; Casanovas, M.; Vega-Quiroga, I.; Canela, E.I.; Petrovic, M.; Gysling, K.; et al. Cocaine Blocks Effects of Hunger Hormone, Ghrelin, Via Interaction with Neuronal Sigma-1 Receptors. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 1196–1210. [[CrossRef](#)]
32. Aguinaga, D.; Casanovas, M.; Rivas-Santisteban, R.; Reyes-Resina, I.; Navarro, G.; Franco, R. The sigma-1 receptor as key common factor in cocaine and food seeking behaviors. *J. Mol. Endocrinol.* **2019**, *63*, R81–R92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Itzhak, Y. Repeated methamphetamine-treatment alters brain δ receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *230*, 243–244. [[CrossRef](#)]
34. Borroto-escuela, D.O.; Hagman, B.; Woolfenden, M.; Pinton, L.; Jiménez-beristain, A.; Ofl, J.; Narvaez, M.; Di Palma, M.; Feltmann, K.; Sartini, S.; et al. Receptor and Ion Channel Detection in the Brain. *Neuromethods* **2016**, *110*, 109–124.
35. Borroto-Escuela, D.O.; Romero-Fernandez, W.; Pérez-Alea, M.; Narvaez, M.; Tarakanov, A.O.; Mudó, G.; Agnati, L.F.; Ciruela, F.; Belluardo, N.; Fuxe, K. The existence of FGFR1-5-HT1A receptor heterocomplexes in midbrain 5-HT neurons of the rat: Relevance for neuroplasticity. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 6295–6303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Micale, V.; Mazzola, C.; Drago, F. Endocannabinoids and neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* **2007**, *56*, 382–392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lu, H.-C.C.; Mackie, K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol. Psychiatry* **2016**, *79*, 516–525. [[CrossRef](#)]
38. Alexander, S.P.; Christopoulos, A.; Davenport, A.P.; Kelly, E.; Mathie, A.; Peters, J.A.; Veale, E.L.; Armstrong, J.F.; Faccenda, E.; Harding, S.D.; et al. The concise guide to pharmacology 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, S21–S141. [[CrossRef](#)]
39. Sam, A.H.; Salem, V.; Ghatei, M.A. Rimonabant: From RIO to Ban. *J. Obes.* **2011**, *2011*, 432607. [[CrossRef](#)]
40. Rosin, D.L.; Robeva, A.; Woodard, R.L.; Guyenet, P.G.; Linden, J. Immunohistochemical Localization of Adenosine A2A Receptors in the Rat Central Nervous System. *J. Comp. Neurol.* **1998**, *401*, 163–186. [[CrossRef](#)]
41. Jenner, P.; Mori, A.; Hauser, R.; Morelli, M.; Fredholm, B.B.; Chen, J.F. Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2009**, *15*, 406–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Navarro, G.; Borroto-Escuela, D.O.D.O.; Fuxe, K.; Franco, R. Purinergic signaling in Parkinson's disease. Relevance for treatment. *Neuropharmacology* **2015**, *104*, 161–168. [[CrossRef](#)]
43. Kondo, T.; Mizuno, Y. Japanese Istradefylline Study Group A long-term study of istradefylline safety and efficacy in patients with Parkinson disease. *Clin. Neuropharmacol.* **2015**, *38*, 41–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mizuno, Y.; Kondo, T. Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline reduces daily OFF time in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **2013**, *28*, 1138–1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Pinna, A.; Pontis, S.; Borsini, F.; Morelli, M. Adenosine A2A receptor antagonists improve deficits in initiation of movement and sensory motor integration in the unilateral 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Synapse* **2007**, *61*, 606–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Simola, N.; Fenu, S.; Baraldi, P.G.; Tabrizi, M.A.; Morelli, M. Blockade of globus pallidus adenosine A2A receptors displays antiparkinsonian activity in 6-hydroxydopamine-lesioned rats treated with D1 or D2 dopamine receptor agonists. *Synapse* **2008**, *62*, 345–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chu, U.B.; Ruoho, A.E. Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. *Mol. Pharmacol.* **2016**, *89*, 142–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Alon, A.; Schmidt, H.; Zheng, S.; Kruse, A.C. Structural perspectives on sigma-1 receptor function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *964*, 5–13. [[PubMed](#)]
49. Kruse, A. Structural Insights into Sigma1 Function. In *Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors*; Handbook of Experimental Pharmacology; Kim, F., Pasternak, G., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; Volume 244, pp. 13–25. [[CrossRef](#)]
50. Navarro, G.; Quiroz, C.; Moreno-Delgado, D.; Sierakowiak, A.; McDowell, K.; Moreno, E.; Rea, W.; Cai, N.-S.; Aguinaga, D.; Howell, L.A.; et al. Orexin-corticotropin-releasing factor receptor heteromers in the ventral tegmental area as targets for cocaine. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 6639–6653. [[CrossRef](#)]
51. Ferré, S.; Baler, R.; Bouvier, M.; Caron, M.G.; Devi, L.A.; Durrux, T.; Fuxe, K.; George, S.R.; Javitch, J.A.; Lohse, M.J.; et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 131–134. [[CrossRef](#)]
52. Franco, R.; Canals, M.; Marcellino, D.; Ferré, S.; Agnati, L.; Mallol, J.; Casadó, V.; Ciruela, F.; Fuxe, K.; Lluís, C.; et al. Regulation of heptaspanning-membrane-receptor function by dimerization and clustering. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 238–243. [[CrossRef](#)]
53. Ginés, S.; Ciruela, F.; Burgueño, J.; Casadó, V.; Canela, E.I.; Mallol, J.; Lluís, C.; Franco, R. Involvement of caveolin in ligand-induced recruitment and internalization of A(1) adenosine receptor and adenosine deaminase in an epithelial cell line. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1314–1323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Franco, R.; Aguinaga, D.; Jiménez, J.; Lillo, J.; Martínez-Pinilla, E.; Navarro, G. Biased receptor functionality versus biased agonism in G-protein-coupled receptors. *Biomol. Concepts* **2018**, *9*, 143–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ferré, S.; Lluís, C.; Justinova, Z.; Quiroz, C.; Orru, M.; Navarro, G.; Canela, E.I.; Franco, R.; Goldberg, S.R. Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 443–453. [[CrossRef](#)]
56. Tebano, M.T.; Martire, A.; Chiodi, V.; Peponi, R.; Ferrante, A.; Domenici, M.R.; Frank, C.; Chen, J.-F.; Ledent, C.; Popoli, P. Adenosine A2A receptors enable the synaptic effects of cannabinoid CB1 receptors in the rodent striatum. *J. Neurochem.* **2009**, *110*, 1921–1930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Martire, A.; Tebano, M.T.; Chiodi, V.; Ferreira, S.G.; Cunha, R.A.; Köfalvi, A.; Popoli, P. Pre-synaptic adenosine A2A receptors control cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of striatal glutamatergic neurotransmission. *J. Neurochem.* **2011**, *116*, 273–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Chiodi, V.; Ferrante, A.; Ferraro, L.; Potenza, R.L.; Armida, M.; Beggiato, S.; Pèzzola, A.; Bader, M.; Fuxe, K.; Popoli, P.; et al. Striatal adenosine-cannabinoid receptor interactions in rats over-expressing adenosine A2A receptors. *J. Neurochem.* **2016**, *136*, 907–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Rai, S.N.; Dilmashin, H.; Birla, H.; Singh, S.S.; Zahra, W.; Rathore, A.S.; Singh, B.K.; Singh, S.P. The Role of PI3K/Akt and ERK in Neurodegenerative Disorders. *Neurotox. Res.* **2019**, *35*, 775–795. [[CrossRef](#)]
60. Martínez-Pinilla, E.; Rodríguez-Pérez, A.I.; Navarro, G.; Aguinaga, D.; Moreno, E.; Lanciego, J.L.L.; Labandeira-García, J.L.L.; Franco, R. Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *96*, 131–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Hradsky, J.; Mikhaylova, M.; Karpova, A.; Kreutz, M.R.; Zuschratter, W. Super-resolution microscopy of the neuronal calcium-binding proteins Calneuron-1 and Caldendrin. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *963*, 147–169. [[PubMed](#)]

A decorative graphic at the bottom of the page features three clusters of laboratory glassware. The left cluster consists of four blue-tinted test tubes and a blue-tinted flask. The middle cluster consists of three pink-tinted test tubes and a pink-tinted flask. The right cluster consists of four green-tinted test tubes and a green-tinted flask. Each cluster is accompanied by a stylized, hand-drawn squiggle in the same color as the glassware. The text '4. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN' is centered over the middle cluster.

**4. RESUMEN DE
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



4. Resumen de resultados y discusión

La adicción a sustancias de abuso es una enfermedad crónica que afecta al SNC, provocando una necesidad incontrolable de seguir tomando una determinada sustancia aun conociendo las consecuencias negativas que este acto conlleva en el organismo (273). Esta enfermedad supone un problema a nivel mundial y conlleva un enorme gasto público no solo para tratar a los pacientes enfermos, sino también para paliar todos los problemas sociales y económicos asociados a la adicción; como por ejemplo el tráfico, la corrupción, la violencia y la fabricación ilegal de estas sustancias (279,444). España es uno de los países de la Unión Europea con mayor tasa de consumo de psicoestimulantes, sobre todo en la población joven de entre 16 y 35 años (445). Sin embargo, aunque durante los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para encontrar una cura eficaz para esta enfermedad, la eficacia terapéutica de los tratamientos actuales es limitada, siendo la recaída un desafío clínico muy importante. Una de las principales dificultades de encontrar una cura es que la adicción a sustancias de abuso es un trastorno mental que implica distintas áreas del cerebro. Además, cada tipo de adicción tiene su mecanismo de acción característico, de manera que es necesario buscar estrategias individualizadas (373). Por este motivo, tener más conocimiento sobre los mecanismos de acción que subyacen a la adicción nos permitiría proponer nuevas dianas farmacológicas para tratar esta enfermedad, además de intentar reparar los daños que se producen en el cerebro a causa de un consumo crónico de estas sustancias de abuso.

Una característica común del consumo de psicoestimulantes es la sobreestimulación de la vía de recompensa provocada por un aumento de los niveles de dopamina en la sinapsis, que, a corto plazo, producen la euforia característica de su consumo, y, a largo plazo, termina por provocar adicción (272,273,277). Hace aproximadamente cuatro décadas se descubrió que sustancias estimuladoras del SNC como la cocaína o la metanfetamina producían parte de sus efectos uniéndose a los receptores sigma 1 (σ_1R) y 2 (σ_2R) (359,368,446). Sin embargo, aunque existe un gran interés terapéutico sobre estos dos receptores, muchos de los detalles moleculares de cómo consiguen sus acciones fisiológicas/patológicas se desconocen. Durante los últimos años, se han hecho grandes avances sobre el conocimiento de la estructura de los receptores sigma, publicándose en 2016 la estructura cristalina de σ_1R (321,322). Se conoce que aunque la expresión de σ_1R es sobretodo a nivel intracelular, una vez activado, este receptor es capaz de ir a la membrana plasmática donde podrá interactuar y modular la señalización de otras proteínas, incluyendo varios GPCR (75,141,144,316), como los receptores de dopamina D_1 (141) y D_2 (316).

Actualmente, alrededor del 30-40% de los medicamentos que hay en el mercado actúan sobre un GPCR (8,11,18). Esta gran popularidad de los GPCR como diana terapéutica es debida a varias características de esta superfamilia de proteínas, como su participación en la mayoría de los procesos fisiológicos/patológicos del ser humano, su expresión en la mayoría de los tejidos y su capacidad para activar distintas vías de señalización. Además, su expresión a nivel de la membrana plasmática los hace accesibles a fármacos hidrofílicos, de manera que no es necesario



4. Resumen de resultados y discusión

crear ingeniería biomédica para que los medicamentos puedan cruzar la membrana plasmática (13,447). Otra característica de los GPCR muy importante, y que empieza a ser totalmente aceptada por la comunidad científica, es la capacidad que tienen para interactuar con otros GPCR, generando nuevas entidades con propiedades bioquímicas y farmacológicas distintas (44–46,448,449). La heteromerización de GPCR hace que estos receptores sigan siendo la principal diana terapéutica en investigación biomédica y en el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces y con menos efectos secundarios (21,51,65,82,450).

A lo largo de la realización de esta Tesis Doctoral se han usado varias técnicas biofísicas y bioquímicas para demostrar la interacción entre GPCR y receptores sigma y para estudiar su funcionalidad (**Figura 33**). Se han usado técnicas de transferencia de energía (BRET, FRET) y de complementación biomolecular (BiLC, BiFC) para demostrar la existencia de heterodímeros, de heterotrímeros (SRET) o de heterotetrámeros (combinando BiLFC y BRET) (64,73). Sin embargo, estas técnicas no se pueden usar para demostrar la existencia de heterómeros de GPCR en sistemas nativos, como cultivos primarios o cortes de secciones de cerebro. En este caso se puede aprovechar el ensayo de ligación por proximidad (PLA) que permite detectar agrupaciones de parejas de receptores como puntos rojos (83). Otra estrategia para detectar la presencia de heterómeros en sistemas nativos es la detección de la huella del heterómero, previamente determinada en un sistema heterólogo, usando la técnica de HTRF (*homogeneous time-resolved fluorescence energy transfer*) para cuantificar la acumulación de AMPc intracelular, usando el indicador fluorescente de calcio GCaMP6 para detectar la liberación de calcio del retículo endoplásmico, usando un western blot para detectar la activación de la vía de las MAPK mediante la fosforilación de las ERK 1/2 y la Akt o usando la redistribución dinámica de masas (DMR) para detectar los cambios globales producidos en la célula (45,46). Finalmente, con toda esta información sumada a la obtenida usando péptidos TAT que permiten identificar los dominios de interacción entre los distintos receptores, la utilización de toxinas selectivas para demostrar que un heterómero señala a través de una determina proteína G y la información disponible de la estructura cristalina de varios GPCR (451), se han podido crear modelos computacionales de posibles complejos macromoleculares formados por distintos protómeros de GPCR y receptores sigma.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral demuestran la importancia de la heteromerización entre diversos GPCR, así como su interacción con los receptores sigma, en la patología de la adicción. En concreto, en este trabajo hemos estudiado los efectos anorexigénicos y neurodegenerativos del consumo de sustancias de abuso como la cocaína, la anfetamina y la metanfetamina.

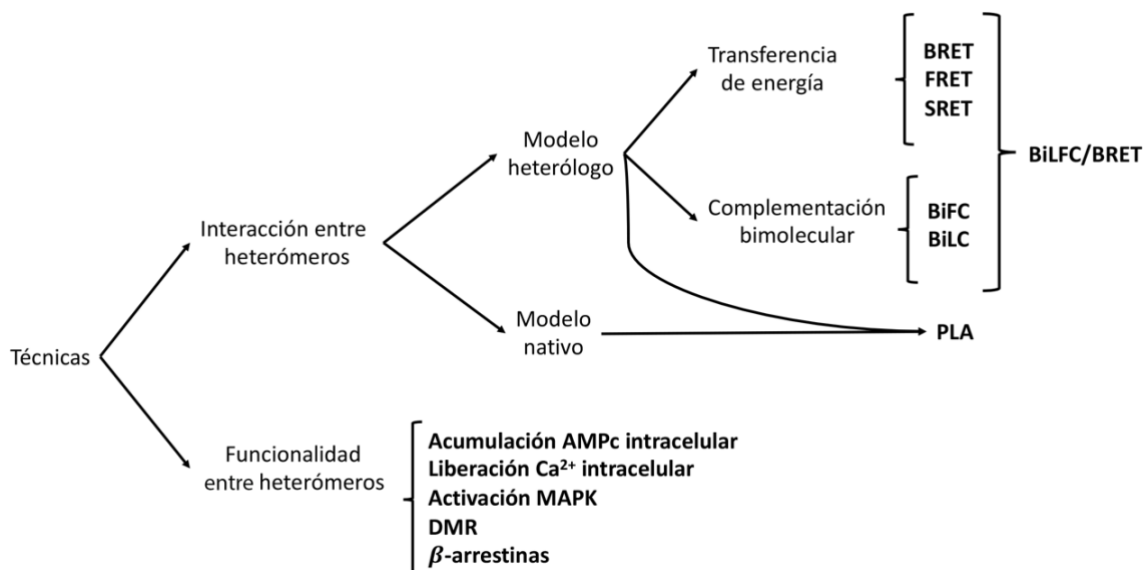
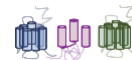


Figura 33 Esquema de las principales técnicas bioquímicas y biofísicas usadas en la realización de esta Tesis Doctoral.

Desde hace miles de años, tribus sudamericanas han consumido hojas de la planta de la coca (*Erythroxylum coca*) para poder sobrevivir durante sus largos viajes cruzando las montañas andinas con muy poca comida. A pesar del conocimiento ancestral de la acción supresora del apetito del consumo de cocaína, el mecanismo molecular mediante el cual esta sustancia de abuso consigue disminuir el hambre no está del todo claro. Por ese motivo, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha consistido en estudiar cuál es este mecanismo. Estudios recientes demuestran que el receptor σ_1 podría tener un papel muy importante en el rompecabezas que explica la relación entre la cocaína y los comportamientos asociados a la búsqueda de alimentos (452). De hecho, Cottone y colaboradores demostraron que el antagonista de σ_1 R BD-1063 bloqueaba la necesidad de comer de forma compulsiva en ratas (453). Más tarde, Cifani y colaboradores también concluyeron que el uso de antagonistas de σ_1 R era prometedor para tratar la ingesta compulsiva de alimentos (454). Una de las principales hormonas que regulan la ingesta de comida y la homeostasis energética es la grelina (150). Existen dos receptores de grelina que provienen de variantes de *splicing* alternativo de un mismo gen: el GHS-R1a, un GPCR completamente funcional, y el GHS-R1b, un GPCR truncado al cual le faltan las dos últimas regiones TM (30). Las principales acciones fisiológicas de la grelina se producen a través de su unión con la isoforma 1a, mientras que la isoforma 1b no puede unir grelina ni acoplarse a proteína G, pero ejerce una función reguladora sobre GHS-R1a (154,156). Además, se ha demostrado que GHS-R1a y GHS-R1b son capaces de interaccionar para formar una única unidad de señalización (155).

Abizaid y colaboradores demostraron que la grelina modula la actividad sináptica de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo mientras promueve el apetito (455). Por el otro lado, Egecioglu y colaboradores (456) demostraron que la grelina, a través de su unión a GHS-R1a,



4. Resumen de resultados y discusión

participa en las propiedades gratificantes de los psicoestimulantes como la cocaína o la anfetamina. Con toda esta información, nos planteamos la hipótesis que a lo mejor la cocaína podría producir sus efectos anorexigénicos a través de la interacción entre sigma 1 y el receptor de grelina 1a.

En el artículo “*Cocaine blocks effects of hunger hormone, ghrelin, via interaction with neuronal sigma-1 receptors*” (457) hemos demostrado por primera vez que σ_1R es capaz de interactuar y modular la actividad de GHS-R1a. Además, hemos propuesto un primer modelo del complejo macromolecular formado por GHS-R1a-GHS-R1b- σ_1R usando técnicas biofísicas de complementación bimolecular con péptidos TAT y la información estructural disponible (451), mediante el cual se podría explicar, en parte, cómo la cocaína es capaz de inhibir el apetito (**Figura 34**). En este trabajo, usando ensayos de inmunocitoquímica se ha detectado que σ_1R estaba expresado principalmente a nivel intracelular, mientras que GHS-R1a se localiza tanto a nivel de membrana plasmática como en estructuras intracelulares. Además, en células HEK-293T co-transfectadas con σ_1R y GHS-R1a observamos una colocalización en la membrana plasmática entre estos dos receptores. Mediante experimentos de saturación de BRET demostramos que σ_1R y GHS-R1a interactúan de forma específica. Una vez demostrada la formación de complejos entre estos dos receptores, quisimos estudiar si la cocaína podía modificar la expresión y la señalización mediada por GHS-R1a. Aunque no se conoce el ligando endógeno de σ_1R , se han diseñado compuestos sintéticos (338,355,362,458) que se clasifican como agonistas si son capaces de disociar de manera dosis dependiente σ_1R de BiP/GPR-78, y como antagonistas si son capaces de revertir este efecto (328). Una vez activado, σ_1R se transloca a la membrana plasmática, donde puede modular la respuesta celular interactuando con diversas proteínas (338). Además, varios autores han publicado que agonistas de σ_1R son capaces de aumentar los efectos producidos por el consumo de cocaína, mientras que antagonistas de este receptor disminuyen estos efectos (360,364,371,459). En los ensayos de inmunocitoquímica realizados en células HEK-293T transfectadas con el ADNc de σ_1R -YFP y GHS-R1a-Rluc y pre-tratadas con cocaína obtuvimos una colocalización mayor entre GHS-R1a y σ_1R en la membrana plasmática que en las células sin tratar. Además, este aumento también se producía cuando se trataron las mismas células con el agonista de σ_1R PRE-084, demostrando una especificidad de la acción de la cocaína sobre σ_1R . Estos resultados sugieren que la activación de σ_1R promueve su translocación a membrana, tal y como se había publicado anteriormente (141).

Resultados obtenidos previos a la realización de esta Tesis Doctoral demostraron que la isoforma 1b del receptor de grelina favorecía el transporte de la isoforma 1a hacia la membrana plasmática donde, además, era capaz de modular su funcionalidad. Por un lado, a concentraciones relativamente bajas, GHS-R1b potenciaba la función de GHS-R1a, mientras que a una concentración elevada ejercía contrario, es decir, inhibía su señalización (156). Con estos resultados previos,



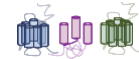
4. Resumen de resultados y discusión

usamos HEK-293T (que expresan de forma endógena el receptor σ_1R (75,141,316)) transfectadas con 1,66 μ g de ADNc de GHS-R1a y 0,25 μ g de ADNc de GHS-R1b.

Como el receptor de grelina es capaz de señalizar a través de G_i (158), estudiamos, en primer lugar, cómo afectaba el tratamiento con cocaína y PRE-084 a la acumulación de AMPc intracelular. En estos experimentos, observamos que no solo el antagonista de GHS-R1a YIL 781 bloquea la disminución de AMPc intracelular inducida por el tratamiento con grelina, sino que este bloqueo también se produce con el pretratamiento con cocaína y el agonista de σ_1R PRE-084. Estos resultados sugieren que la cocaína inhibe la señalización mediada por GHS-R1a, actuando como un antagonista de este receptor. El tratamiento con cocaína también bloquea la señalización inducida por la grelina en otras vías de señalización como la fosforilación de las ERK 1/2, la liberación de calcio intracelular desde el retículo endoplásmico y los ensayos de redistribución dinámica de masas. De esta manera, la cocaína no solo bloquea la señalización vía proteína G_i o G_q , sino que también la dependiente de las subunidades $\beta\gamma$. Además, este bloqueo se produce a través de la unión de la cocaína a σ_1R , ya que en células tratadas con ARN de interferencia (ARNsi) para silenciar la expresión de σ_1R , la cocaína no es capaz de bloquear la señalización inducida por el GHS-R1a. De esta manera, en este trabajo, hemos demostrado por primera vez que σ_1R interacciona con los receptores orexinérgicos de grelina, proponiendo un mecanismo molecular mediante el cual la cocaína regula las acciones supresoras del hambre.

El siguiente objetivo que nos planteamos en este trabajo ha consistido en intentar identificar el heterómero GHS-R1a- σ_1R en un modelo más fisiológico. La mayoría de las acciones fisiológicas del consumo de la cocaína en el SNC ocurren en el estriado, una parte del cerebro muy importante en la vía de recompensa (87,91). Este sistema, además, es activado por recompensas básicas para la supervivencia de todos los organismos, como comer (163,460–463). Con este objetivo, realizamos ensayos de PLA en cultivos primarios de neuronas de estriado. Esta técnica permite detectar *clusters* de heterómeros de receptores que se encuentran a una distancia inferior a 30 nm (70,83) y ha sido usado por varios autores para demostrar la existencia de heterómeros tanto en cultivos primarios como en cortes de cerebro (68,464). Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento agudo con cocaína aumenta la formación del heterómero GHS-R1a- σ_1R en cultivos primarios de neuronas estriatales. Por el otro lado, una vía muy importante en los procesos de adicción a las sustancias de abuso es la vía de las MAPK (452,465). En concreto, la cocaína es capaz de aumentar la fosforilación de las ERK en varias regiones del cerebro, efectos que se convierten en cambios en la plasticidad sináptica producidos por el consumo de esta sustancia de abuso (465,466). Tanto el tratamiento con cocaína como con PRE-084 bloquean la activación de las MAPK inducida por el tratamiento con grelina a través de su unión a σ_1R , ya que no se observa cuando silenciamos la expresión de σ_1R . Estos resultados son muy parecidos a los que se observaron en células HEK-293T transfectadas con GHS-R1a y GHS-R1b. En resumen, la vía de las MAP quinasas surge como un mediador clave de

4. Resumen de resultados y discusión



las acciones centrales producidas en respuesta a la administración de cocaína y su capacidad para inhibir el apetito (452). Finalmente, la directa interacción entre GHS-R1a y σ_1 R se ha demostrado en secciones de cerebro de rata tratadas de forma aguda y crónica con cocaína. En este modelo hemos realizado experimentos de PLA donde hemos observado que el tratamiento agudo con cocaína induce un incremento de la expresión del complejo GHS-R1a- σ_1 R. Borroto-Escuela y colaboradores demostraron también la importancia de σ_1 R en una fase aguda de la adicción a cocaína, en este caso a través de la interacción de σ_1 R con el receptor de dopamina D₂ (467).

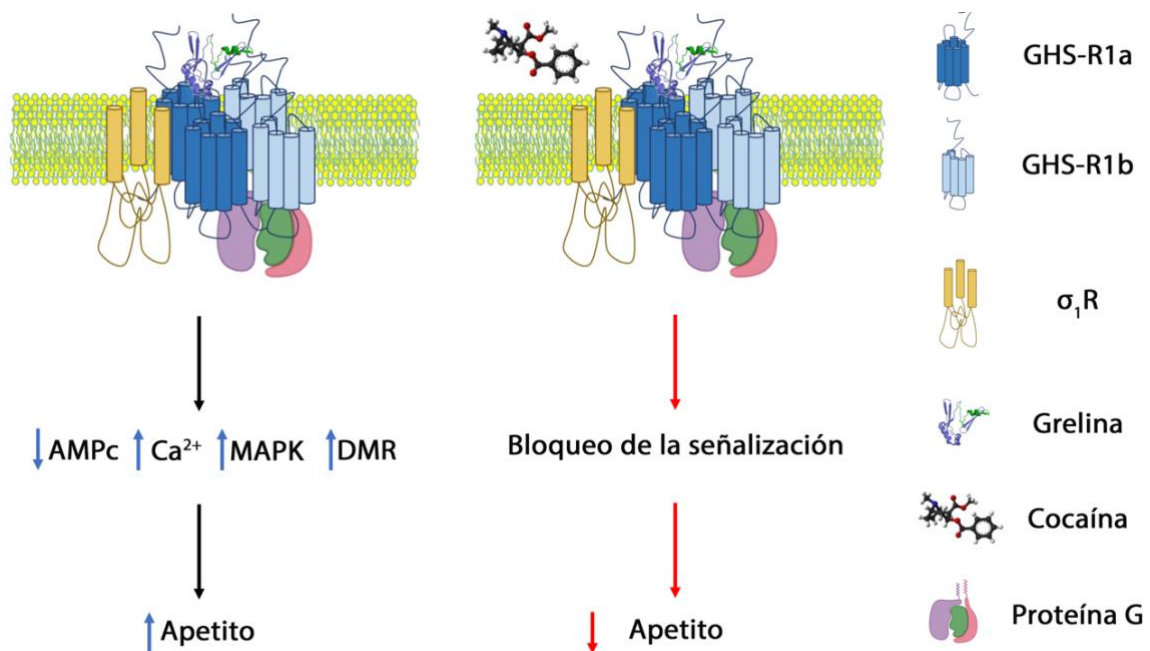


Figura 34 Mecanismo molecular mediante el cual la cocaína podría suprimir el apetito. Para la creación de esta figura se han usado elementos de Biorender.com.

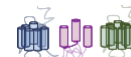
Para seguir profundizando en el mecanismo de acción de la cocaína en la señalización del receptor de grelina, quisimos estudiar la estructura cuaternaria del macrocomplejo formado por los receptores GHS-R1a, GHS-R1b y σ_1 R. Importante para este trabajo fueron los descubrimientos previos a la realización de esta Tesis Doctoral indicando que el receptor de grelina 1a es capaz de formar homodímeros (GHS-R1a-GHS-R1a) y heterómeros con la isoforma 1b (GHS-R1a-GHS-R1b) (154–156), aunque los dominios específicos mediante los cuales se producía dicha interacción no se habían estudiado. Además, combinando la técnica de BRET con complementación bimolecular, Navarro y colaboradores demostraron que un tetrámero formado por dos protómeros de GHS-R1a y dos protómeros de GHS-R1b era posible (156). Para poder identificar las regiones TM involucradas, combinamos la técnica de complementación bimolecular con el tratamiento con péptidos sintéticos. Cada uno de estos péptidos tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una región TM



4. Resumen de resultados y discusión

del receptor de grelina fusionado al péptido transactivador de la transcripción (TAT), que permitirá al péptido penetrar dentro de la célula, anclándose a la membrana plasmática con una correcta orientación. Cada uno de estos péptidos interactuará con un dominio específico del receptor, interrumpiendo la interacción entre los distintos protómeros (71,468). Usando esta estrategia identificamos que la interacción entre GHS-R1a-GHS-R1a implica los TM 5/6, mientras que la heteromerización entre GHS-R1a y GHS-R1b se produce vía TM 4/5. Además, observamos dos interfaces de interacción entre GHS-R1a y σ_1R : TM 1/2 y TM 5/6, mientras que σ_1R interactúa a través de los dominios TM 1/2 con GHS-R1b. Los GPCR tienen una estructura altamente conservada de 7 dominios TM (1,23,38), de manera que proponemos, en base a estos resultados, que las regiones TM 1/2 y TM 5/6 pueden estar involucradas en la interacción entre un GPCR y σ_1R . En el caso concreto del tetrámero GHS-R1a-GHS-R1a-GHS-R1b-GHS-R1b, la interacción entre GHS-R1a y σ_1R tiene que ser principalmente a través de las regiones TM 1/2 de GHS-R1a, ya que el receptor de grelina estará interactuando vía TM 4/5 con otro GHS-R1a y vía 5/6 con un GHS-R1b. Con toda esta información, la estructura cristalina del receptor sigma 1 recientemente publicada (334,469) y con la colaboración del laboratorio de Medicina Computacional de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, hemos podido construir un modelo 3D del complejo macromolecular formado por GHS-R1a, GHS-R1b y σ_1R . Este modelo no se puede explicar con un solo protómero de GHS-R1a, ya que éste no se puede unir simultáneamente a σ_1R y a G_i a causa de impedimentos estéricos entre las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G_i y el voluminoso dominio C-terminal intracelular de σ_1R . De esta manera, la mínima unidad funcional sería un homodímero de GHS-R1a (unido por TM 5/6) en el cual un protómero se uniría a proteína G y el otro sería el responsable de la unión con la región TM de un protómero del homotrímero σ_1R . De forma interesante, en este modelo, el dominio citoplasmático de uno de los protómeros de σ_1R es capaz de interactuar con la subunidad alfa de la proteína G_i , lo que podría explicar, en parte, cómo la cocaína, uniéndose a σ_1R , es capaz de modular la señalización mediada por GHS-R1a. Finalmente, dado que σ_1R es un trímero (334), y que en el modelo que hemos propuesto una única hélice del trímero σ_1R está interactuando con el tetrámero GHS-R1a-GHS-R1a-GHS-R1b-GHS-R1b, podríamos especular que las otras dos regiones TM del heterotrímero de receptor sigma 1 se podrían unir a otros dos tetrámeros de receptores de grelina, sugiriendo que en realidad el complejo macromolecular es de un orden superior. Sin embargo, no se dispone de la tecnología apropiada para contrastar esta hipótesis actualmente.

Por otro lado, se ha sugerido que el sistema de señalización de grelina desempeña un papel clave en la conexión entre el control homeostático del apetito y los aspectos hedónicos de la ingesta de alimentos a través de la interacción con los circuitos dopaminérgicos de la vía mesocorticolímbica del sistema de recompensa (151,456,463,470). Además, a parte de formar homodímeros, el receptor



4. Resumen de resultados y discusión

de grelina 1a puede interactuar físicamente con otros GPCR (471,472), incluyendo los receptores de dopamina y de serotonina (44). Resultados previos a la realización de esta Tesis Doctoral demostraron que el GHS-R1a era capaz de señalar a través de $G_{s/olf}$ en cultivos primarios de neuronas de estriado, sugiriendo que este cambio de proteína G era debido a la interacción con el receptor de dopamina D_1 , cuya señalización canónica es a través de $G_{s/olf}$ (156). Por el otro lado, Jiang y colaboradores usando un modelo de ratones *Ghsr-IRES-tauGFP* demostraron la colocalización entre GHS-R1a y D_1R en este modelo celular, además de reportar un aumento en la acumulación de AMPc intracelular al activar las células con grelina (473). Finalmente, varios autores han demostrado que la cocaína es capaz de alterar la neurotransmisión dopaminérgica, modificando la funcionalidad de sus receptores a través de la interacción con los receptores sigma (122,139,147,474). En esta Tesis Doctoral nos hemos querido centrar en los efectos inducidos por la cocaína sobre D_1R , dado que la activación de este receptor en neuronas del NAc está directamente involucrada en la vía de recompensa, en el aprendizaje y la memoria y en la adicción a sustancias de abuso (475). Resultados previos en el grupo de investigación donde se ha desarrollado esta Tesis Doctoral demostraron que la cocaína, uniéndose a σ_1R , potenciaba la estimulación de AMPc intracelular inducida por la activación de D_1R , mientras que bloqueaba el efecto inducido por D_1R en la vía de las MAPK (141). Además, como hemos discutido anteriormente, la unión de la cocaína a σ_1R bloquea la señalización inducida por la grelina (457). En base a estos precedentes, nos propusimos estudiar si existía un complejo macromolecular formado por receptores de D_1 , GHS-1a y σ_1R que regularan las acciones de la cocaína en el estriado.

En el artículo “*Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: Structural and functional properties*” (476) hemos propuesto, a partir de datos biofísicos, bioquímicos y estructurales, un complejo macromolecular formado por receptores D_1 , GHS-1a y σ_1 , cuya funcionalidad es alterada por la unión de la cocaína a σ_1R y que podría explicar un mecanismo molecular mediante el cual la cocaína ejerce sus efectos anorexigénicos (**Figura 35**).

En primer lugar, observamos que células HEK-293T co-transfectadas con el ADNc para D_1R y GHS-R1a presentan una alta colocalización en la membrana plasmática entre estos dos receptores que no se altera por el tratamiento con cocaína. Seguidamente, demostramos que realmente estos dos receptores son capaces de interactuar usando la técnica de BiFC. Transfectando cantidades equivalentes del ADNc para D_1R -cYFP y GHS-R1a-nYFP (donde cYFP y nYFP representan las dos hemiproteínas de la proteína fluorescente Venus YFP, una variante de la YFP más eficiente), hemos observado una clara señal de fluorescencia que demuestra la interacción entre D_1R y GHS-R1a. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jiang y colaboradores, que demostraron la heteromerización entre D_1R -GHS-R1a en distintas poblaciones de neuronas (473). Más tarde, Kern y colaboradores también demostraron la existencia del heterómero D_1R -GHS-R1a en neuronas de hipocampo (477). Ambos grupos hipotetizaron que en realidad este heterómero estaba formado por



4. Resumen de resultados y discusión

dos homodímeros de cada receptor, formando un tetrámero, aunque no lo pudieron demostrar experimentalmente. La formación de tetrámeros en GPCR es un fenómeno que se ha reportado en algunos casos y permite al complejo señalizar a través de dos proteínas G (49,81,478). Algunos autores han descrito la capacidad de GHS-R1a para formar tetrámeros con otros GPCR, como son el receptor de dopamina D₂ (479) o el GHS-R1b (156). Para demostrar nuestra hipótesis de que D₁R y GHS-R1a podrían formar tetrámeros, hemos usado la técnica de BiLFC/BRET. Los sensores de BRET utilizados son como donador las dos hemiproteínas de la Rluc8 (nRluc y cRluc), una variante de la Rluc más eficiente, y como aceptor las dos hemiproteínas de la Venus YFP (nYFP y cYFP). Si el fenómeno de BRET se produce, es porque tanto la Rluc8 como la Venus YFP se han reconstituido, de manera que se puede transferir la energía entre la Rluc8 y la YFP. Este fenómeno solo es posible si los cuatro receptores están muy próximos en el espacio (77). Al transfectar en células HEK-293T una concentración constante del ADNc para GHS-R1a-nRluc y GHS-R1a-cRluc y concentraciones crecientes del ADNc para D₁R-nYFP y D₁R-cYFP hemos obtenido una curva de saturación de BRET que demuestra la interacción entre las cuatro proteínas, es decir, que D₁R y GHS-R1a son capaces de formar complejos tetraméricos.

Para estudiar si la cocaína es capaz de modular el complejo D₁R-GHS-R1a aprovechamos la técnica de SRET (73) que nos permite detectar un posible complejo trimérico formado por D₁R, GHS-R1a y σ_1 R. Esta técnica se basa en dos fenómenos secuenciales de BRET y FRET que permiten la transferencia de energía entre tres proteínas distintas. Al transfectar células HEK-293T con el ADNc para σ_1 R-Rluc, GHS-R1a-GFP² y D₁R-YFP obtuvimos una curva de saturación de SRET positiva que es mayor previo tratamiento de las células con cocaína. Este aumento en la transferencia de energía producido por el tratamiento con la sustancia de abuso se podría explicar mediante dos sucesos: i) la cocaína produce un aumento en el número de heterómeros D₁R-GHS-R1a o ii) la cocaína induce un cambio conformacional en el heterómero D₁R-GHS-R1a que provoca que las proteínas de fusión estén más cerca y, por lo tanto, la eficiencia de transferencia de energía sea mayor.

Una vez demostrada la estructura cuaternaria del complejo D₁R-GHS-R1a, nos propusimos estudiar a través de qué proteínas G señalizaba. Como tanto D₁R como GHS-R1a se acoplan a proteínas G que modulan los niveles de AMPc intracelular (G_s y G_i, respectivamente) (480), realizamos ensayos de acumulación de AMPc en células HEK-293T co-transfectadas con el ADNc de estos dos receptores y en cultivos primarios de neuronas de estriado. Hay que recordar que las células HEK-293T expresan de forma endógena σ_1 R, de manera que la cocaína puede ejercer sus efectos a través de σ_1 R en este modelo celular sin necesidad de transfectarlo. Tal y como se había descrito previamente, la estimulación de D₁R con su agonista SKF 81297 incrementa la acumulación de AMPc y la cocaína potencia este efecto (141). Sin embargo, la grelina no es capaz de disminuir los niveles de AMPc. En neuronas, se observó, además, que la grelina también es capaz de estimular la producción de AMPc, de una forma similar a la que se obtiene con el agonista de D₁R. Estos



4. Resumen de resultados y discusión

resultados indican que cuando GHS-R1a se encuentra heteromerizando con D₁R no señala a través de G_i, sino que lo hace a través de G_s (156). La hipótesis que el heterómero señala a través de G_{s/olf} se contrastó usando toxinas que selectivamente bloquean la señalización de una determinada proteína G. Estos experimentos demuestran que solo la toxina colérica, que produce una estimulación continua de la subunidad G α , impide la estimulación de AMPc intracelular producida por la activación de D₁R. De esta manera, el heterómero D₁R-GHS-R1a señala a través de una G_s. Por otro lado, analizando la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico, observamos que el receptor D₁ es capaz de activar esta vía solo cuando está heteromerizando con el receptor de grelina 1a. Aunque los receptores de dopamina están acoplados a G_s/G_i, y, por lo tanto regulan los niveles de AMPc y la actividad de la PKA (121,122,134), varios autores han demostrado la participación de proteínas sensores de calcio en las acciones centrales de la dopamina (55-57). Los mecanismos moleculares que conectan la acción de la dopamina con el catión Ca²⁺ no están del todo claros. Se ha reportado que la heteromerización entre los receptores D₁ y D₂ permite a estos dos receptores inducir la movilización de calcio en el estriado (55). También se ha descrito que la heteromerización de D₁R con el receptor del factor liberador de corticotropina 2 (CRF₂R) también permite al D₁R movilizar calcio intracelular desde el retículo endoplásmico en células HEK-293T co-transfectadas con D₁R y CRF₂R (143). Además, identificamos una característica de esta nueva entidad funcional (del heterómero D₁R-GHS-R1a), un *cross*-antagonismo bidireccional, en el cual el antagonista de GHS-R1a YIL 781 no solo bloquea la señal de la grelina, sino también la inducida por el agonista del D₁R SKF 81297. De la misma manera, el antagonista del D₁R SCH 23390, también es capaz de bloquear la señal inducida por la grelina, además de la ejercida por su propio agonista. Estos resultados sugieren que el heterómero D₁R-GHS-R1a está señalizando a través de G_q, hipótesis que demostramos al utilizar el inhibidor específico de G_q YM 254890. Finalmente, quisimos estudiar cuál era el efecto de la cocaína sobre la liberación de calcio intracelular, observando un bloqueo de la señal inducida tanto por la grelina como por el SKF 81297, con un efecto similar al que provocaba el pretratamiento con cualquiera de los antagonistas. Así, la cocaína afecta de forma diferencial la señalización mediada por el heterómero D₁R-GHS-R1a, potenciando la estimulación de AMPc intracelular e inhibiendo la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico.

Con todos estos datos propusimos un modelo estructural que consiste en un tetrámero formado por un homodímero de D₁R y un homodímero de GHS-R1a que se puede unir a dos proteínas G, una G_s y una G_q, permitiendo de esta manera, a la grelina acumular AMPc intracelular y al D₁R promover la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico y *viceversa*. Debido a impedimentos estéricos, no es posible que en un solo protómero de D₁R y de GHS-R1a puedan haber dos proteínas G, de manera que la formación del tetrámero parece ser la explicación más plausible (48,49,481). Jiang y colaboradores también propusieron un heterotetrámero D₁R-GHS-R1a para que cupieran dos proteínas G, aunque en su caso era una G_i y una G_s basados en el hecho que la grelina

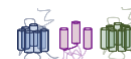


4. Resumen de resultados y discusión

era capaz de amplificar la señalización dopaminérgica en el hipocampo (473). Por otro lado, Kern y colaboradores concluyeron que el acoplamiento a G_q por el heterotetrámero D_1R -GHS-R1a era esencial para el inicio de la plasticidad sináptica en neuronas del hipocampo. En este caso propusieron un tetrámero asimétrico GHS-R1a- D_1R -GHS-R1a- D_1R en el que un protómero de GHS-R1a y otro protómero de D_1R eran capaces de acoplarse a G_q para promover la movilización de calcio intracelular (477). También estudiamos la vía de las MAPK en HEK-293T co-transfectadas con D_1R y GHS-R1a y en cultivos primarios de neuronas de estriado. En ambos modelos celulares obtuvimos el mismo patrón: un *cross*-antagonismo bidireccional y el bloqueo de la cocaína de la señal inducida tanto por grelina como por SKF 81297. Además, el bloqueo de la cocaína se produce a través de su unión a σ_1R , dado que en un modelo de ratones KO para σ_1R , el pretratamiento con cocaína no es capaz de bloquear la señalización inducida tanto por D_1R ni por GHS-R1a.

Todos estos resultados demuestran que el heterómero D_1R -GHS-R1a puede tener un papel muy importante en el proceso de adicción a la cocaína. A continuación, para evaluar el papel del heterómero D_1R -GHS-R1a en las distintas fases de la adicción a cocaína, quisimos estudiar su expresión en cortes de cerebro de ratas tratadas de forma aguda o crónica con cocaína. Como ya hemos explicado, la técnica de PLA nos permite detectar *clusters* de parejas de receptores, sin embargo, en nuestro caso queríamos estudiar la interacción entre tres receptores distintos. Como esta técnica no nos permite detectar a los tres receptores a la vez, estudiamos la diferente expresión de todas las combinaciones de parejas posibles entre estos tres receptores: D_1R -GHS-R1a, D_1R - σ_1R y GHS-R1a- σ_1R . En todas ellas, observamos un aumento de puntos de PLA en el tratamiento agudo con cocaína que volvía a los niveles basales en las muestras tratadas con vehículo o con un tratamiento crónico. Estos resultados sugieren un rol más importante del heterotrímero D_1R -GHS-R1a- σ_1R en los efectos agudos del consumo de cocaína.

En último lugar, quisimos identificar las regiones TM involucradas en la interacción entre D_1R , GHS-R1a y σ_1R . Resultados previos a la realización de esta Tesis Doctoral demostraron que la homodimerización D_1R - D_1R era a través de los dominios TM 5 (71), mientras que la homodimerización GHS-R1a-GHS-R1a era a través de los TM 5/6 (457). Experimentos de complementación bimolecular usando péptidos TAT de las regiones TM de GHS-R1a y de D_1R , demostraron que la heteromerización entre D_1R -GHS-R1a es a través de los dominios TM 1. Con esta información, sumada a los datos estructurales disponibles hasta el momento (451), hemos construido un modelo computacional en el que los dos homodímeros (D_1R - D_1R y GHS-R1a-GHS-R1a) interactúan a través de TM 5/6 y la heteromerización (D_1R -GHS-R1a) se produce a través de una interacción simétrica entre los TM 1/1 de ambos GPCR. Analizando la interacción entre estos dos GPCR y σ_1R , observamos que GHS-R1a sigue siendo capaz de interacción a través de dos posibles interfaces con el receptor sigma 1 i) TM 1/2 o ii) TM 5 cuando este está co-expresado con D_1R . Por el otro lado, el D_1R interactúa a través de su TM 5 con la única región TM de σ_1R , cuando



4. Resumen de resultados y discusión

está co-transfectado con GHS-R1a. De esta manera, es posible diseñar un modelo en el cual el heterotetrámero puede interactuar con un σ_1R del trímero a través de dos dominios TM que implican un TM5 de cada uno de los homodímeros de D₁R y GHS-R1a.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo ayudan a entender el papel de σ_1R en el mecanismo de acción de la cocaína inhibiendo el apetito y proponen el heterómero D₁R-GHS-R1a como una nueva diana terapéutica para el tratamiento tanto de la adicción a cocaína como de desórdenes alimentarios.

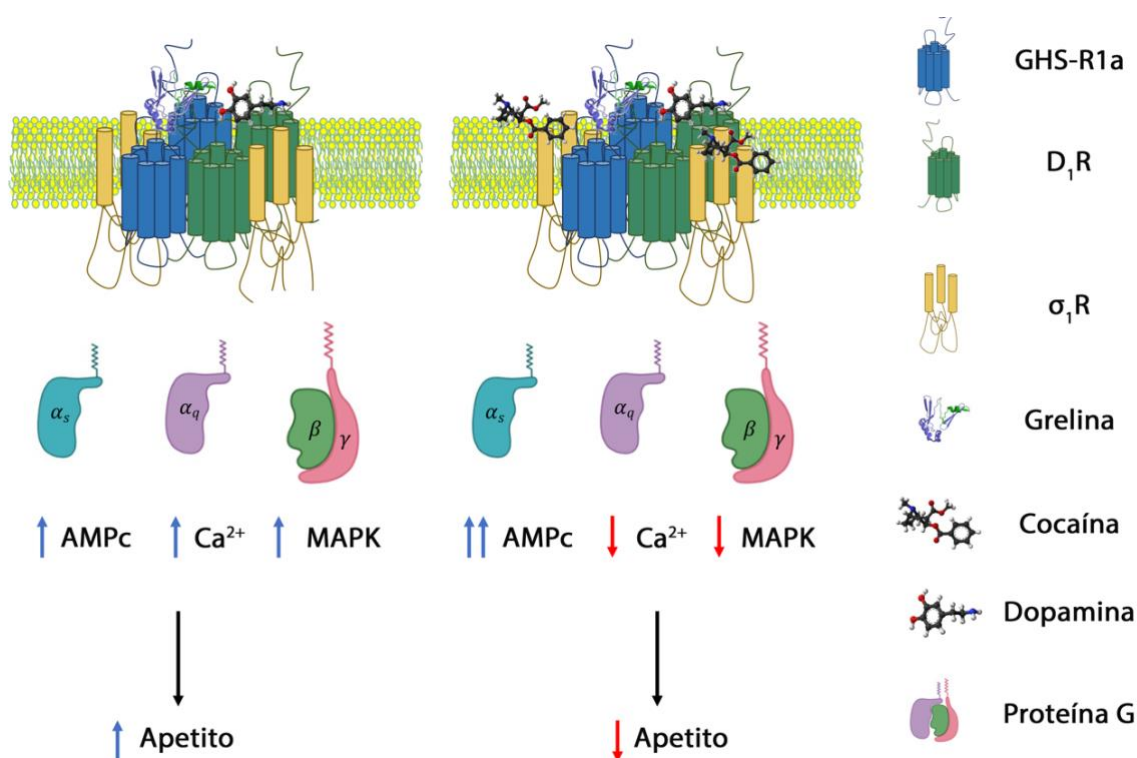


Figura 35 Representación esquemática del tetrámero formado por un homodímero de D₁R y un homodímero de GHS-R1a y cómo el tratamiento con cocaína altera su funcionalidad a través de su unión a σ_1R . Para la creación de esta figura se han usado elementos de Biorender.com.

Otra hormona que regula los procesos relacionados con la ingesta de alimentos es la orexina. Esta hormona consigue sus efectos a través de su unión con los receptores OX₁R y OX₂R (482). Se han reportado varias evidencias científicas que demuestran que las orexinas ejercen un rol muy importante en las respuestas asociadas con la recompensa, tanto de la obtención de la comida como del consumo de sustancias de abuso, sobretodo a través de su unión a OX₁R (166,167,185,483,484). Por ejemplo, la adicción a anfetamina afecta la señalización fisiológica del ATV, alterando la funcionalidad de mediadores como la orexina-A y CRF. El CRF es un neuropéptido que se libera como respuesta al estrés, siendo, además, muy importante en los procesos de recaída a las sustancias de abuso. De hecho, Fuenzalida y colaboradores demostraron la heteromerización en células vivas



4. Resumen de resultados y discusión

entre CRF₂R y D₁R, lo que refuerza la hipótesis del rol de CRF en la adicción (143). Además, Morisot y colaboradores sugirieron el bloqueo de CRF₂R como nueva diana terapéutica para tratar la adicción a la cocaína, basados en el hecho de que ratones KO para CRF₂R no presentaban el estrés producido por la abstinencia a la cocaína (485). Todas estas evidencias demuestran una estrecha relación entre los mecanismos que regulan los procesos del estrés y los que regulan el sistema de recompensa (184,198,215,486). Además, varios autores han reportado evidencias de que el sistema orexinérgico contribuye significativamente a la mediación del estrés, así como a la conducta ansiosa y depresiva (180,183,185,186,487–489). Con todas estas evidencias, nuestra hipótesis ha sido que tanto el sistema que regula las respuestas al estrés, principalmente a través de CRF, como el sistema orexinérgico, sobre todo a través de OX₁R, jugarían un papel muy importante en los mecanismos moleculares que regulan la búsqueda y la recaída de sustancias estimulantes del SNC, en concreto de la amfetamina. De hecho, años antes a la realización de esta Tesis Doctoral, en el mismo grupo de investigación se propuso un mecanismo mediante el cual el estrés inducía la búsqueda de cocaína a través de un complejo formado por los receptores CRF₁, OX₁ y σ_1 (490), estableciendo, por lo tanto, una interacción entre la adicción, el estrés y el control de la ingesta de alimentos regulado por factores orexinérgicos. En base a todas estas evidencias nos propusimos estudiar como, en este caso la amfetamina, afecta la señalización de OX₁R y CRF₂R.

En el artículo “*Differential effect of amphetamine over the corticotropin-releasing factor receptor CRF₂, the orexin receptor OX₁ and the CRF₂-OX₁ heteroreceptor complex*” presentamos evidencias de la interacción entre OX₁R y CRF₂R en un modelo heterólogo y en cerebro de rata y de cómo su señalización se ve afectada por el tratamiento con amfetamina (**Figura 36**). En primer lugar, mediante la técnica de inmunocitoquímica demostramos que los receptores OX₁ y CRF₂ colocalizan a nivel de membrana plasmática y, mediante la técnica de BRET, que son capaces de interactuar físicamente formando el heterómero CRF₂R-OX₁R. Además, identificamos dos características de la huella del heterómero CRF₂R-OX₁R analizando su señalización a través de segundos mensajeros como: la acumulación de AMPc intracelular, la movilización de calcio desde el retículo endoplásmico, la redistribución dinámica de masas (DMR) y la fosforilación de ERK 1/2 en células HEK-293T co-transfectadas con CRF₂R y OX₁R. En todas estas vías de señalización se identificó un *cross*-antagonismo bidireccional, es decir, que cualquiera de los dos antagonistas, K 41498 para CRF₂R y SB 334867 para OX₁R, son capaces de bloquear, parcial o totalmente, la señalización inducida tanto por CRF como por orexina-A. Además, también hemos observado otro fenómeno característico del heterómero CRF₂R-OX₁R, un *crossstalk* negativo de CRF₂R sobre OX₁R. Navarro y colaboradores, cuando estudiaron el heterómero CRF₁R-OX₁R, también identificaron un *crossstalk* negativo del receptor CRF₁R sobre OX₁R, lo que sugiere que el sistema de CRF podría modular negativamente al sistema orexinérgico (490) y que algunos de los efectos del CRF tienen lugar



mediante la formación de complejos heteroméricos entre sus receptores y los receptores de orexina a nivel del SNC (491).

Estas dos características únicas del heterómero CRF₂R-OX₁R se pueden usar para identificar su expresión en un modelo más fisiológico, como cultivos primarios o tejido nativo (46,53,449). Como tanto OX₁R como CRF₂R están expresados en los terminales de las neuronas del ATV que proyectan desde el hipotálamo (172,492), realizamos experimentos de microdiálisis en el ATV de ratas. En estos experimentos, demostramos que la liberación de dopamina y glutamato inducida por el tratamiento con orexina-A es bloqueada por el pretratamiento con el antagonista de CRF₂R K 41498. De esta manera, este *cross*-antagonismo demuestra la existencia del heterómero CRF₂R-OX₁R en el ATV de rata. Recientemente, Gerbier y colaboradores demostraron la existencia del heterómero formado por los receptores de melatonina MT₂ y de serotonina 5-HT_{2C} en cerebro de ratón basándose en el bloqueo por parte del antagonista del receptor 5-HT_{2C}, SB 243213, sobre la liberación de calcio intracelular inducida por el tratamiento sobre el receptor de MT₂ con melatonina (493).

Una vez caracterizado el heterómero, nos propusimos estudiar cómo afectaba el tratamiento con amfetamina a la señalización mediada tanto por el heterómero como por sus receptores individualmente. Por un lado, el tratamiento con amfetamina potencia la acumulación de AMPc inducido por CRF en células transfectadas con CRF₂R. Aunque no se han realizado estudios que directamente demuestren que la amfetamina es capaz de unirse a los receptores sigma, sí que se ha demostrado que la metanfetamina, compuesto derivado de la amfetamina y por lo tanto con una estructura química muy parecida (302), sí que es capaz de unirse a cualquiera de los dos receptores sigma, mostrando una afinidad mayor para σ_1 R (315). Además, una vez demostrada la capacidad de σ_1 R para interactuar con CRF₁R (490), quisimos estudiar si la modulación de la señal inducida por el tratamiento con amfetamina sobre CRF₂R se producía también a través de sigma 1. Mediante la técnica de BRET, demostramos que σ_1 R puede interactuar físicamente con CRF₂R y que cuando se silencia la expresión de σ_1 R, el tratamiento con amfetamina no produce ningún efecto sobre la señalización inducida por CRF₂R en células HEK-293T transfectadas con CRF₂R. De esta manera, demostramos que los efectos de la amfetamina sobre la señalización de CRF₂R se producen a través de la unión específica de la amfetamina a σ_1 R. Por el otro lado, en células HEK-293T que solo expresan el receptor de OX₁ también observamos una potenciación en la señalización de AMPc, además de un bloqueo en la vía de las MAPK, inducido por la amfetamina. De esta manera, el tratamiento con amfetamina afecta de distinta manera a la señalización mediada por proteína G respecto a la vía independiente, poniendo de manifiesto el fenómeno de *biased agonism* (32,204). Los efectos de la amfetamina sobre la señalización de OX₁R no pueden ser debidos a la interacción de OX₁R con σ_1 R, ya que previamente se había demostrado que este GPCR no era capaz de interactuar con este receptor sigma (490). Se ha sugerido que σ_2 R puede jugar un papel muy



importante en la regulación de los procesos implicados en la adicción (446). En concreto, Klawonn y colaboradores observaron que el tratamiento con el agonista de σ_2R Siramesine disminuye los efectos producidos por un consumo agudo de cocaína en la locomoción y en la liberación de dopamina en el estriado (361). Por el otro lado, Lever y colaboradores publicaron que agonistas selectivos de σ_2R , como las tetrahidroisoquinolinil benzamidas, disminuyen la hiperlocomoción provocada por el consumo de cocaína en ratones (367). Por este motivo, quisimos estudiar si la anfetamina produce sus efectos sobre OX_1R a través de su unión a σ_2R . Mediante experimentos de saturación de BRET demostramos que OX_1R sí que era capaz de interactuar con σ_2R . Además, en células HEK-293T transfectadas con OX_1R y en las que se ha silenciado la expresión de σ_2R , la anfetamina no es capaz de potenciar la acción de OX_1R . Estos resultados muestran un nuevo papel de σ_2R en la regulación de los efectos del consumo de sustancias de abuso a través de su interacción con OX_1R .

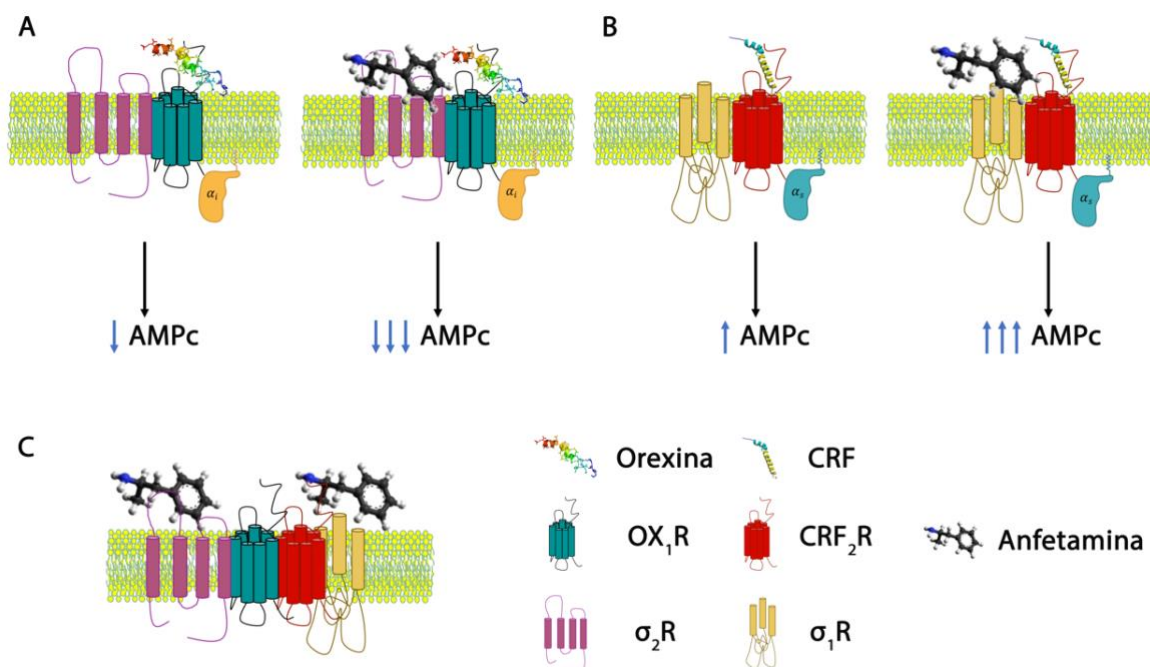
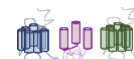


Figura 36 Mecanismo de acción de la anfetamina sobre OX_1R (A), CRF_2R (B) y el heterómero CRF_2R-OX_1R (C). Para la creación de esta figura se han usado elementos de Biorender.com.

Finalmente, en un contexto de heterómero CRF_2R-OX_1R observamos que la anfetamina no altera la estructura de este complejo, ya que no modifica la colocalización a nivel de membrana plasmática ni los parámetros obtenidos en la curva de saturación de BRET del heterómero CRF_2R-OX_1R . Contrariamente, el tratamiento con anfetamina potencia los efectos de la activación por separado de tanto CRF_2R como de OX_1R y aumenta aun más el *crossstalk* negativo identificado en ausencia de la sustancia de abuso, además de no modificar el *cross*-antagonismo. De esta manera, la



4. Resumen de resultados y discusión

anfetamina estaría modulando la señalización de tanto CRF₂R como OX₁R, mediante la unión a σ_1 R y σ_2 R. Estos resultados sugieren que la adicción a la anfetamina aumenta la señal mediada por el heterómero CRF₂R-OX₁R y podrían explicar en parte los efectos gratificantes e inhibidores del hambre del consumo de anfetamina (181), así como la importancia de CRF₂R en la recaída al consumo de anfetamina (198,208).

La metanfetamina es un derivado sintético de la anfetamina que provoca una mayor adicción y su consumo a largo plazo termina produciendo neurodegeneración, lo que conlleva una disminución de la esperanza de vida (437,494,495). Dos neuromoduladores muy importantes del SNC que se encuentran implicados en procesos de neuroprotección/neurodegeneración son los endocannabinoides y la adenosina. Por un lado, el receptor cannabinoide CB₁ es el GPCR más abundante en el SNC y se encuentra expresado principalmente en neuronas (480,496). Se han reportado evidencias de que el bloqueo del receptor cannabinoide CB₁ reduce la liberación de dopamina inducida por el consumo de psicoestimulantes como la metanfetamina (257). Además, Kern y colaboradores demostraron que CB₁R era capaz de formar heterómeros con D₂R (56), lo que refuerza la hipótesis que este receptor puede tener un papel importante en la adicción a sustancias de abuso. Por otro lado, varios autores han reportado que el bloqueo del receptor A_{2A} tiene un papel neuroprotector ante diferentes enfermedades neurodegenerativas (224,228,437). De hecho, el antagonista del A_{2A}R Istradefylline ha sido aprobado para tratar la enfermedad de Párkinson (230,497,498). Además, la adenosina regula la transmisión dopaminérgica a través de interacciones antagónicas entre los heterómeros A₁R-D₁R y A_{2A}R-D₂R (61,261). De esta manera, interacciones directas o indirectas entre estos dos GPCR (CB₁R y A_{2A}R) podrían estar involucradas en la modulación de la actividad motora (269) y en la adicción a sustancias de abuso (230,269,499). Se han reportado numerosas evidencias de la directa interacción entre A_{2A}R y CB₁R en el estriado y en el hipocampo (260,262), sin embargo, el mecanismo exacto de la implicación del heterómero A_{2A}R-CB₁R en adicción no está del todo claro. Por este motivo, en esta Tesis Doctoral nos hemos propuesto estudiar si el tratamiento con metanfetamina podría modular la señalización mediada por el heterómero A_{2A}R-CB₁R en el estriado.

En el artículo “*Methamphetamine blocks adenosine A_{2A} receptor activation via sigma 1 and cannabinoid CB₁ receptors*” (500) propusimos un mecanismo molecular mediante el cual la metanfetamina es capaz de alterar la señalización mediada por A_{2A}R y CB₁R a través de un complejo formado por estos dos GPCR y σ_1 R (**Figura 37**). Dada la habilidad ya descrita que los receptores A_{2A} y CB₁ son capaces de formar complejos heteroméricos en células HEK-293T (263), quisimos estudiar en primer lugar si el tratamiento con metanfetamina es capaz de alterar la formación del heterómero A_{2A}R-CB₁R. Mediante la técnica de inmunocitoquímica y de BRET, demostramos que la metanfetamina no altera de forma evidente ni la localización ni la interacción entre los receptores A_{2A} y CB₁. Sin embargo, el pretratamiento con metanfetamina en células HEK-293T co-transfectadas



4. Resumen de resultados y discusión

con A_{2A}R y CB₁R induce un bloqueo total de la señalización mediada por CB₁R, además de un bloqueo parcial de la señalización a través de A_{2A}R.

Para profundizar en el mecanismo molecular mediante el cual la metanfetamina afecta la funcionalidad del heterómero A_{2A}R-CB₁R estudiamos el efecto de la metanfetamina en células HEK-293T transfectadas con el ADNc de solo A_{2A}R o solo CB₁R. Sorprendentemente, observamos que la metanfetamina es capaz de bloquear totalmente la señalización mediada por CB₁R, pero no produce ningún efecto en la funcionalidad del A_{2A}R. Estos resultados sugieren que la acción de la metanfetamina sobre la funcionalidad del A_{2A}R depende de su interacción con CB₁R. Después de demostrarse que la metanfetamina es capaz de unirse y alterar la funcionalidad del receptor σ_1 (315,372,501), quisimos estudiar si el efecto inducido por la metanfetamina sobre la funcionalidad de CB₁R es a través de σ_1 R. Esta hipótesis fue contrastada, ya que al silenciar la expresión de σ_1 R con ARNsí para este receptor, la metanfetamina no puede bloquear la señalización inducida por CB₁R en células HEK-293T transfectadas con el ADNc de CB₁R. Estos resultados demuestran que la metanfetamina bloquea la señalización de CB₁R a través de la interacción con σ_1 R, sugiriendo que estos dos receptores podrían formar heterómeros. Experimentos de saturación de FRET demostraron que CB₁R y σ_1 R pueden heteromerizar, obteniendo una curva de saturación mayor cuando se tratan las células con metanfetamina. Sanchez-Blazquez y colaboradores también demostraron que estos dos receptores (CB₁ y σ_1) podían interactuar usando complementación bimolecular en células CHO transfectadas y en Co-IP en sinaptosomas de cerebro de ratón (502). Además, estos mismos autores demostraron que la interacción entre CB₁R y NMDAR es dependiente de σ_1 R y que un mal funcionamiento del receptor sigma contribuiría a una desproporcionada regulación a la baja de la actividad del NMDAR, constituyendo un factor de riesgo grave para el desarrollo de esquizofrenia entre los consumidores de cannabis (502). Por el contrario, mediante experimentos de saturación de FRET, demostramos que σ_1 R no puede formar heterómeros con A_{2A}R, lo que podría explicar el porqué la metanfetamina no es capaz de alterar la señalización del A_{2A}R cuando está expresado de forma aislada. Un resultado de RET negativo no significa que dos proteínas no puedan interactuar, ya que esta falta de transferencia de energía podría deberse a problemas de orientación entre las proteínas de fusión (64). Sin embargo, la no interacción entre A_{2A}R y σ_1 R también ha sido demostrada con la técnica de BRET¹ (316) y BRET² (457) por otros autores, lo que parece demostrar que realmente los receptores de A_{2A} y σ_1 no pueden interactuar físicamente.

Cuando nos encontramos en un contexto de células HEK-293T que co-expresan A_{2A}R y CB₁R, la silenciación de la expresión de σ_1 R también impide el bloqueo, parcial o total, de la señalización mediada tanto por A_{2A}R, como por CB₁R, respectivamente. De esta manera, para que la metanfetamina pueda alterar la funcionalidad mediada por A_{2A}R, es necesaria la presencia tanto de CB₁R como σ_1 R, lo que sugiere la posibilidad de que estos tres receptores formen un heterotrímero.

4. Resumen de resultados y discusión



Para comprobar esta hipótesis realizamos experimentos de saturación de SRET transfectando en células HEK-293T una concentración constante del ADNc para σ_1 R-Rluc y CB_1 R-YFP y concentraciones crecientes del ADNc para A_{2A} R-RFP. La curva de saturación de SRET obtenida demuestra la interacción entre estas tres proteínas. De esta manera, hipotetizamos que la formación del trímero A_{2A} R- CB_1 R- σ_1 R es posible gracias a la habilidad de CB_1 R de interaccionar tanto con σ_1 R y como con A_{2A} R simultáneamente. Esta característica también se observa en el trímero D_1 R- H_3 R- σ_1 R, en el que el receptor sigma solo es capaz de interaccionar con el receptor de histamina H_3 en presencia del receptor de dopamina D_1 (144). El tratamiento con metanfetamina no altera de forma significativa los parámetros de SRET en el trímero A_{2A} R- CB_1 R- σ_1 R, de la misma forma que el tampoco alteraba el BRET entre A_{2A} R- CB_1 R. Estos resultados demuestran que la metanfetamina, a través de su unión a σ_1 R, no induce ningún cambio estructural en el heterómero A_{2A} R- CB_1 R, ni altera la formación de nuevos complejos heteroméricos A_{2A} R- CB_1 R, pero sí que es capaz de afectar a la señalización del heterómero A_{2A} R- CB_1 R.

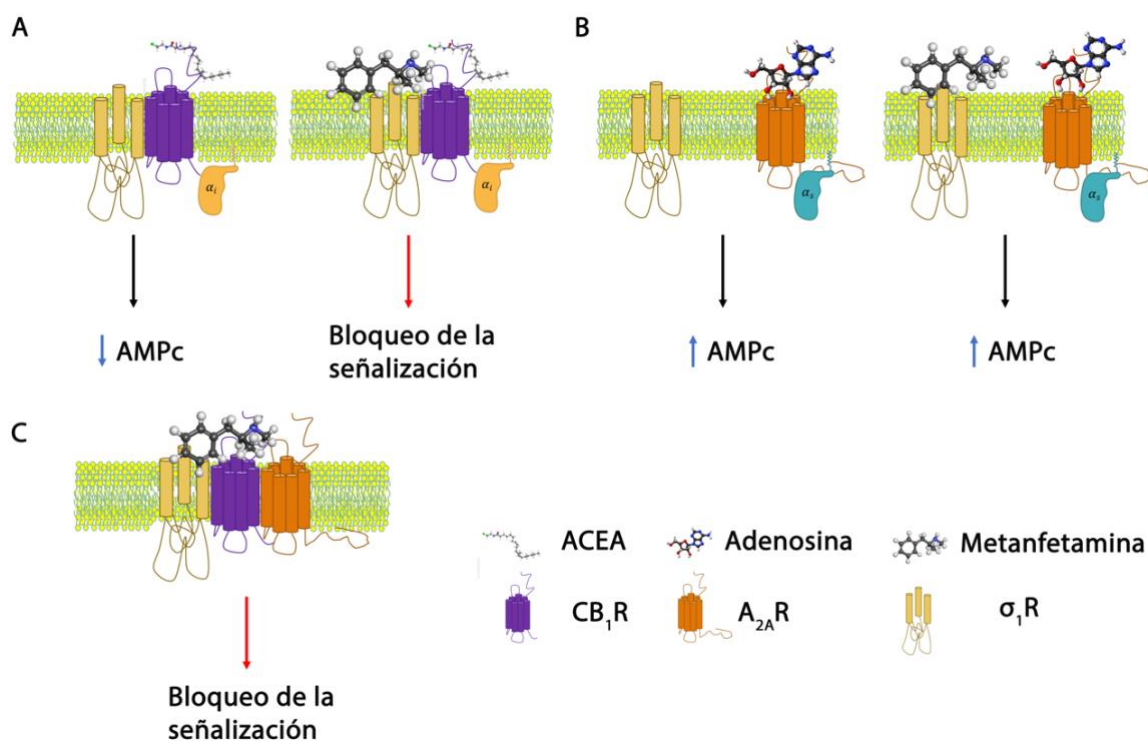


Figura 37 Representación esquemática del mecanismo molecular mediante el cual la metanfetamina altera la funcionalidad de CB_1 R (A), A_{2A} R (B) o el heterómero A_{2A} R- CB_1 R (C). Para la creación de esta figura se han usado elementos de Biorender.com

Finalmente, quisimos estudiar cómo la metanfetamina podía afectar la expresión del heterómero A_{2A} R- CB_1 R- σ_1 R en el estriado de ratón. Dado que se ha demostrado que los receptores A_{2A} y CB_1 co-existen y están interaccionando en el estriado (263), donde también se ha demostrado



4. Resumen de resultados y discusión

la expresión de σ_1R en la membrana plasmática (144), nos propusimos tratar cultivos primarios de neuronas estriatales con metanfetamina mediante un tratamiento agudo (2 horas) o crónico (1 semana) y analizar los niveles de expresión de los heterómeros: $A_{2A}R$ - σ_1R , CB_1R - σ_1R y $A_{2A}R$ - CB_1R . Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con metanfetamina aumenta la expresión de CB_1R - σ_1R en un tratamiento agudo y aun más en un régimen crónico. Contrariamente, los *clusters* de $A_{2A}R$ - CB_1R se mantienen constantes en presencia y ausencia de metanfetamina. Hay que mencionar que se detectaron algunos puntos de PLA del heterómero $A_{2A}R$ - σ_1R , cuando estos dos receptores no podían interactuar físicamente mediante FRET. Este resultado se puede explicar a causa de la formación del heterotrímero $A_{2A}R$ - CB_1R - σ_1R . Además, en cultivos primarios de neuronas estriatales observamos que el tratamiento con metanfetamina es capaz de bloquear tanto la señalización mediada por CB_1R , como la mediada por $A_{2A}R$, tanto en la acumulación de AMPc intracelular, como en la fosforilación de las MAPK. Así, estos resultados sugieren a este heterómero ($A_{2A}R$ - CB_1R) como diana para para revertir la neurodegeneración inducida por el consumo crónico de metanfetamina.

Los principales hallazgos de esta Tesis Doctoral proponen nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento farmacológico de la adicción a la cocaína, la anfetamina y la metanfetamina (**Figura 38**). Las evidencias halladas durante la realización de este trabajo ponen de manifiesto un papel muy importante de la heteromerización de los GPCR en el mecanismo molecular que regula los procesos de adicción a las sustancias de abuso y varios comportamientos relacionados con la ingesta de alimentos a través de su unión a los receptores sigma (σ_1R y σ_2R). Un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares de la acción de las sustancias de abuso que participan en los circuitos de recompensa activados por la ingesta de alimentos es esencial para tratar tanto desórdenes alimentarios como la adicción a estas sustancias. De hecho, estos dos tipos de enfermedades comparten muchas características (285,503,504). De esta manera, se podrían buscar estrategias comunes para tratar ambos tipos de enfermedades usando los nuevos conocimientos obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral, en los que se propone el heterómero D_1R -GHS-R1a para tratar la adicción a cocaína y la obesidad, el heterómero CRF_2R - OX_1R para tratar la recaída al consumo de sustancias de abuso y disminuir el estrés, en particular en un contexto de adicción a la anfetamina, y el heterómero $A_{2A}R$ - CB_1R para combatir la neurodegeneración que provoca el consumo de sustancias de abuso como la metanfetamina.

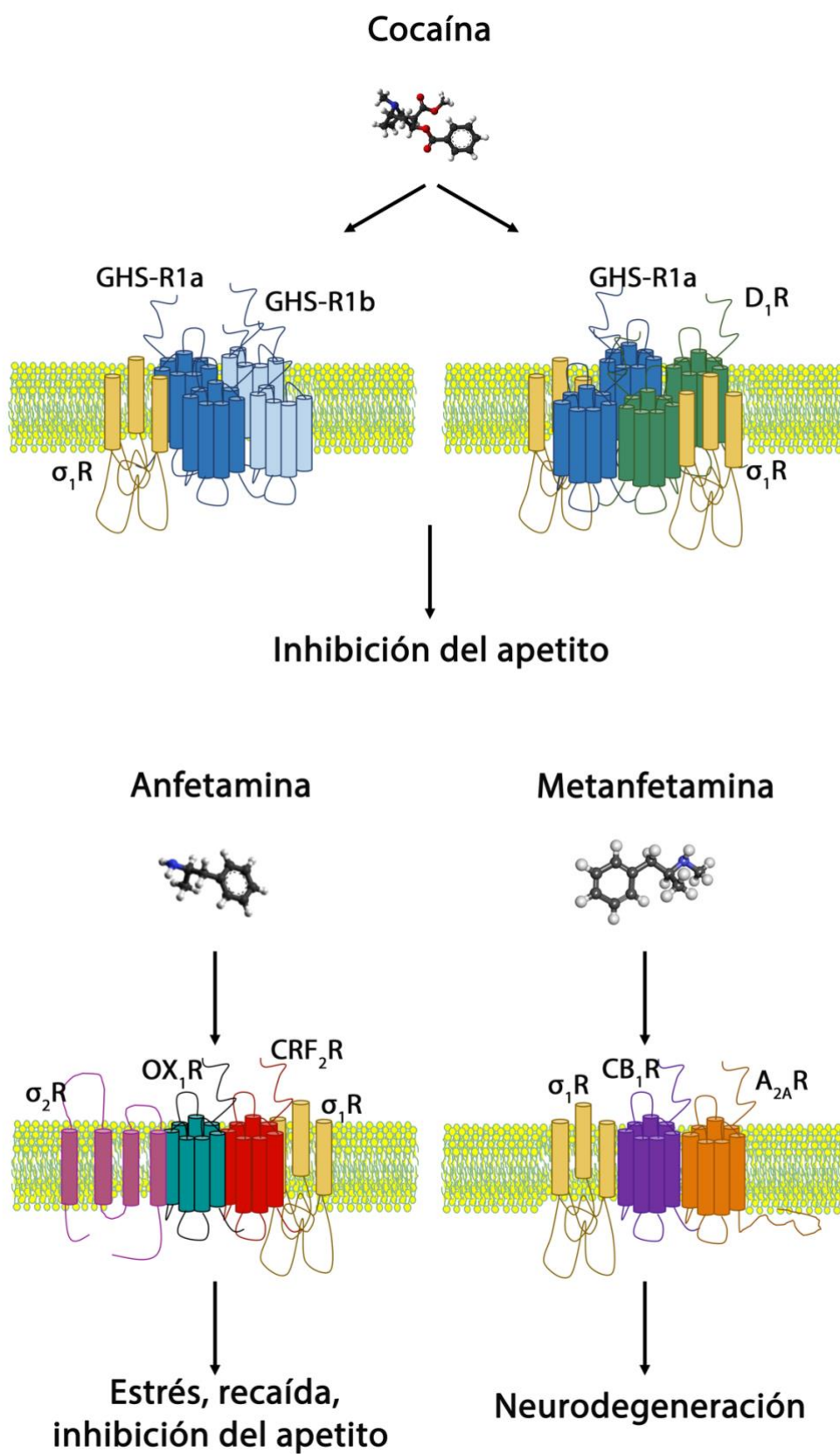
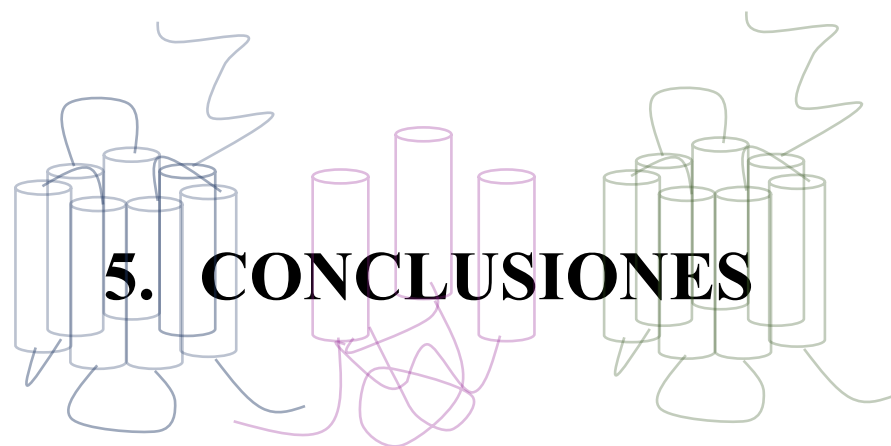


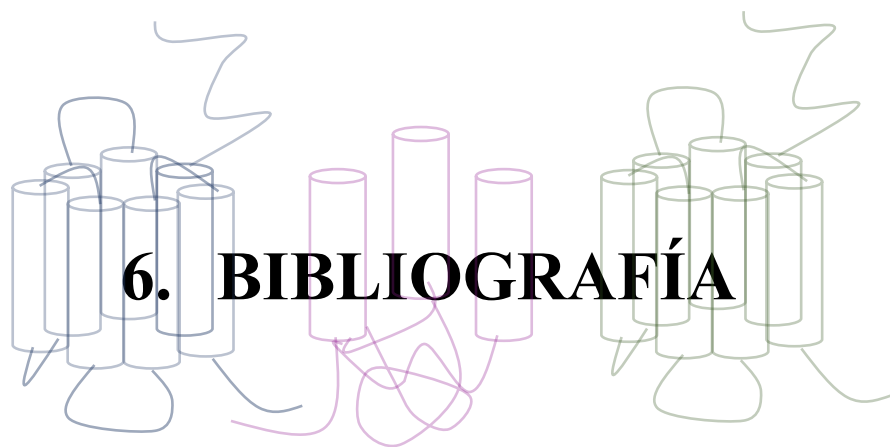
Figura 38 Resumen de los principales hallazgos obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral.



5. CONCLUSIONES



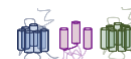
1. It has been demonstrated using resonance energy transfer assays and confocal microscopy that σ_1 R is able to colocalize and form heteromers with ghrelin receptor 1a (GHS-R1a) in both transfected HEK-293T cells and rat striatal neurons. Moreover, cocaine binding to σ_1 R completely blocks the signaling induced by GHS-R1a. These results suggest a molecular mechanism linking cocaine use with appetite suppression.
2. One homodimer of dopamine D_1 R and one homodimer of ghrelin GHS-R1a may form a heterotetramer complexed with both G_s and G_q proteins. This newly described macromolecular unit allows dopamine to release calcium from the endoplasmic reticulum and ghrelin to accumulate cAMP in the cytoplasm. In addition, using the SRET technique it has been demonstrated that D_1 R, GHS-R1a and σ_1 R may form heterotrimeric complexes where cocaine, binding to σ_1 R, affects functionality by promoting cAMP accumulation and blocking calcium release and MAPK activation. Finally, the D_1 R-GHS-R1a heteromer has been detected in both primary cultures and striatal sections, being higher expressed in an acute regimen of cocaine administration. These results propose a molecular mechanism by which cocaine may mediate its anorexigenic action.
3. The orexin 1 receptor (OX_1 R) may heteromerize with the corticotropin-releasing factor receptor 2 (CRF_2 R) in transfected HEK-293T cells and in rat VTA cells. This heteromerization leads to functional consequences such as a negative crosstalk and a bidirectional cross-antagonism. In addition, amphetamine potentiates agonist-induced signalling of CRF_2 R via σ_1 R and of OX_1 R via σ_2 R. These results suggest a molecular mechanism linking stress response with relapse of amphetamine use.
4. It has been noticed using resonance energy transfer assays that σ_1 R is able to physically interact with the cannabinoid CB_1 receptor (CB_1 R) but not with the adenosine A_{2A} receptor (A_{2A} R). Moreover, the SRET assays have shown that A_{2A} R- CB_1 R- σ_1 R complexes do occur. Methamphetamine binding to σ_1 R can block A_{2A} -mediated signaling when this receptor is heteromerizing with the CB_1 R, whereas this drug can completely block CB_1 R signaling irrespective of whether it is forming heteromer with the A_{2A} R or not. Therefore, the A_{2A} R- CB_1 R heteromer could be used as a new therapeutic target to combat neurodegeneration associated with chronic methamphetamine use.



6. BIBLIOGRAFÍA



1. Marinissen MJ, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci.* 2001 Jul;22(7):368-76. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01678-3. PMID: 11431032.
2. George SR, O'Dowd BF, Lee SP. G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Oct;1(10):808-20. doi: 10.1038/nrd913. PMID: 12360258.
3. Ghosh E, Kumari P, Jaiman D, Shukla AK. Methodological advances: the unsung heroes of the GPCR structural revolution. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Feb;16(2):69-81. doi: 10.1038/nrm3933. Epub 2015 Jan 15. PMID: 25589408.
4. Schiöth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 2005 May 15;142(1-2):94-101. doi: 10.1016/j.ygcen.2004.12.018. Epub 2005 Feb 5. PMID: 15862553.
5. Conn PM, Ulloa-Aguirre A, Ito J, Janovick JA. G protein-coupled receptor trafficking in health and disease: lessons learned to prepare for therapeutic mutant rescue in vivo. *Pharmacol Rev.* 2007 Sep;59(3):225-50. doi: 10.1124/pr.59.3.2. PMID: 17878512.
6. Prazeres DM, Martins SA. G protein-coupled receptors: an overview of signaling mechanisms and screening assays. *Methods Mol Biol.* 2015;1272:3-19. doi: 10.1007/978-1-4939-2336-6_1. PMID: 25563173.
7. Zalewska M, Siara M, Sajewicz W. G protein-coupled receptors: abnormalities in signal transmission, disease states and pharmacotherapy. *Acta Pol Pharm.* 2014 Mar-Apr;71(2):229-43. PMID: 25272642.
8. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Dec;16(12):829-842. doi: 10.1038/nrd.2017.178. Epub 2017 Oct 27. PMID: 29075003; PMCID: PMC6882681.
9. Dijkman PM, Castell OK, Goddard AD, Munoz-Garcia JC, de Graaf C, Wallace MI, et al. Dynamic tuneable G protein-coupled receptor monomer-dimer populations. *Nat Commun.* 2018 Apr 27;9(1):1710. doi: 10.1038/s41467-018-03727-6. PMID: 29703992; PMCID: PMC5923235.
10. Kim HR, Duc NM, Chung KY. Comprehensive Analysis of Non-Synonymous Natural Variants of G Protein-Coupled Receptors. *Biomol Ther (Seoul).* 2018 Mar 1;26(2):101-108. doi: 10.4062/biomolther.2017.073. PMID: 28934823; PMCID: PMC5839487.
11. Sriram K, Insel PA. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Mol Pharmacol.* 2018 Apr;93(4):251-258. doi: 10.1124/mol.117.111062. Epub 2018 Jan 3. PMID: 29298813; PMCID: PMC5820538.
12. Insel PA, Sriram K, Gorr MW, Wiley SZ, Michkov A, Salmerón C, et al. GPCRomics: An Approach to Discover GPCR Drug Targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2019 Jun;40(6):378-387. doi: 10.1016/j.tips.2019.04.001. Epub 2019 May 8. PMID: 31078319; PMCID: PMC6604616.
13. Wacker D, Stevens RC, Roth BL. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell.* 2017 Jul 27;170(3):414-427. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.009. PMID: 28753422; PMCID: PMC5560499.
14. Congreve M, de Graaf C, Swain NA, Tate CG. Impact of GPCR Structures on Drug Discovery. *Cell.* 2020 Apr 2;181(1):81-91. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.003. PMID: 32243800.
15. Kroeze WK, Sheffler DJ, Roth BL. G-protein-coupled receptors at a glance. *J Cell Sci.* 2003 Dec 15;116(Pt 24):4867-9. doi: 10.1242/jcs.00902. PMID: 14625380.
16. Davies MN, Secker A, Freitas AA, Mendao M, Timmis J, Flower DR. On the hierarchical classification of G protein-coupled receptors. *Bioinformatics.* 2007 Dec 1;23(23):3113-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btm506. Epub 2007 Oct 22. PMID: 17956878.
17. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* 2003 Jun;63(6):1256-72. doi: 10.1124/mol.63.6.1256. PMID: 12761335.



6. Bibliografia

18. Odoemelum CS, Percival B, Wallis H, Chang MW, Ahmad Z, Scholey D, et al. G-Protein coupled receptors: Structure and function in drug discovery. *RSC Adv.* 2020;10(60):36337–48. doi: 10.1039/D0RA08003A
19. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science.* 2000 Aug 4;289(5480):739–45. doi: 10.1126/science.289.5480.739. PMID: 10926528.
20. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jan;9(1):60-71. doi: 10.1038/nrm2299. PMID: 18043707.
21. Guidolin D, Marcoli M, Tortorella C, Maura G, Agnati LF. Receptor-Receptor Interactions as a Widespread Phenomenon: Novel Targets for Drug Development? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Feb 18;10:53. doi: 10.3389/fendo.2019.00053. PMID: 30833931; PMCID: PMC6387912.
22. Kise R, Ono Y, Kawakami K, Inoue A. Toward understanding the role of G-protein signaling. *Curr Opin Endocr Metab Res.* 2021;16:51–5. doi: 10.1016/j.coemr.2020.08.006
23. Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol.* 2018 Jan;25(1):4-12. doi: 10.1038/s41594-017-0011-7. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29323277; PMCID: PMC6535338.
24. Li J, Ge Y, Huang JX, Strømgaard K, Zhang X, Xiong XF. Heterotrimeric G Proteins as Therapeutic Targets in Drug Discovery. *J Med Chem.* 2020 May 28;63(10):5013-5030. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01452. Epub 2019 Dec 26. PMID: 31841625.
25. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang XY. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol.* 2016 Sep 25;428(19):3850-68. doi: 10.1016/j.jmb.2016.08.002. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27515397; PMCID: PMC5023507.
26. Kostenis E, Pfeil EM, Annala S. Heterotrimeric Gq proteins as therapeutic targets? *J Biol Chem.* 2020 Apr 17;295(16):5206-5215. doi: 10.1074/jbc.REV119.007061. Epub 2020 Mar 2. PMID: 32122969; PMCID: PMC7170519.
27. Seyedabadi M, Ghahremani MH, Albert PR. Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): Molecular determinants of GPCR/transducer selectivity and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2019 Aug;200:148-178. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.006. Epub 2019 May 8. PMID: 31075355.
28. Campbell AP, Smrcka AV. Targeting G protein-coupled receptor signalling by blocking G proteins. *Nat Rev Drug Discov.* 2018 Nov;17(11):789-803. doi: 10.1038/nrd.2018.135. Epub 2018 Sep 28. PMID: 30262890; PMCID: PMC6409483.
29. Gurevich VV, Gurevich EV. Biased GPCR signaling: Possible mechanisms and inherent limitations. *Pharmacol Ther.* 2020 Jul;211:107540. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107540. Epub 2020 Mar 19. Erratum in: *Pharmacol Ther.* 2020 Jul 1;:107615. PMID: 32201315; PMCID: PMC7275904.
30. Cornejo MP, Mustafá ER, Cassano D, Banères JL, Raingo J, Perello M. The ups and downs of growth hormone secretagogue receptor signaling. *FEBS J.* 2021 Jan 18. doi: 10.1111/febs.15718. Epub ahead of print. PMID: 33460513.
31. Davis S, Laroche S. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav.* 2006;5 Suppl 2:61-72. doi: 10.1111/j.1601-183X.2006.00230.x. PMID: 16681801.
32. Franco R, Rivas-Santisteban R, Reyes-Resina I, Navarro G. The Old and New Visions of Biased Agonism Through the Prism of Adenosine Receptor Signaling and Receptor/Receptor and Receptor/Protein Interactions. *Front Pharmacol.* 2021 Jan 29;11:628601. doi: 10.3389/fphar.2020.628601. PMID: 33584311; PMCID: PMC7878529.
33. De Deurwaerdère P, Bharatiya R, Chagraoui A, Di Giovanni G. Constitutive activity of 5-HT receptors: Factual analysis. *Neuropharmacology.* 2020 May 15;168:107967. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.107967. Epub 2020 Jan 17. PMID: 31958408.
34. Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem.* 2006 Aug;1(8):761-82. doi: 10.1002/cmdc.200600134. PMID: 16902930.



35. Daly CA, Smit MJ, Plouffe B. The constitutive activity of the viral-encoded G protein-coupled receptor US28 supports a complex signalling network contributing to cancer development. *Biochem Soc Trans.* 2020 Aug 28;48(4):1493-1504. doi: 10.1042/BST20190988. PMID: 32779712; PMCID: PMC7458396.
36. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1768(4):794-807. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.10.021. Epub 2006 Nov 15. PMID: 17188232; PMCID: PMC1876727.
37. Gao ZG, Toti KS, Campbell R, Suresh RR, Yang H, Jacobson KA. Allosteric Antagonism of the A2A Adenosine Receptor by a Series of Bitopic Ligands. *Cells.* 2020 May 12;9(5):1200. doi: 10.3390/cells9051200. PMID: 32408534; PMCID: PMC7290864.
38. Manglik A, Kruse AC. Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Activation. *Biochemistry.* 2017 Oct 24;56(42):5628-5634. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00747. Epub 2017 Oct 10. PMID: 28967738; PMCID: PMC6613644.
39. Hermans E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2003 Jul;99(1):25-44. doi: 10.1016/s0163-7258(03)00051-2. PMID: 12804697.
40. Rajagopal S, Shenoy SK. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. *Cell Signal.* 2018 Jan;41:9-16. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.01.024. Epub 2017 Jan 28. PMID: 28137506; PMCID: PMC5533627.
41. Calebiro D, Godbole A. Internalization of G-protein-coupled receptors: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018 Apr;32(2):83-91. doi: 10.1016/j.beem.2018.01.004. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29678288.
42. Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res.* 2006 Sep 15;99(6):570-82. doi: 10.1161/01.RES.0000242563.47507.ce. PMID: 16973913.
43. Milligan G, Ward RJ, Marsango S. GPCR homo-oligomerization. *Curr Opin Cell Biol.* 2019 Apr;57:40-47. doi: 10.1016/j.ceb.2018.10.007. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30453145; PMCID: PMC7083226.
44. Borroto-Escuela DO, Brito I, Romero-Fernandez W, Di Palma M, Oflijan J, Skieterska K, et al. The G protein-coupled receptor heterodimer network (GPCR-HetNet) and its hub components. *Int J Mol Sci.* 2014 May 14;15(5):8570-90. doi: 10.3390/ijms15058570. PMID: 24830558; PMCID: PMC4057749.
45. Ferré S, Ciruela F, Casadó V, Pardo L. Oligomerization of G protein-coupled receptors: Still doubted? *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2020;169:297-321. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.11.006. Epub 2019 Dec 12. PMID: 31952690.
46. Ferré S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T, et al. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol.* 2009 Mar;5(3):131-4. doi: 10.1038/nchembio0309-131. PMID: 19219011; PMCID: PMC2681085.
47. Stroebel D, Paoletti P. Architecture and function of NMDA receptors: an evolutionary perspective. *J Physiol.* 2021 May;599(10):2615-2638. doi: 10.1113/JP279028. Epub 2020 Aug 30. PMID: 32786006.
48. Cordoní A, Navarro G, Aymerich MS, Franco R. Structures for G-Protein-Coupled Receptor Tetramers in Complex with G Proteins. *Trends Biochem Sci.* 2015 Oct;40(10):548-551. doi: 10.1016/j.tibs.2015.07.007. PMID: 26410595.
49. Cordoní A, Navarro G, Pardo L, Franco R. Structure of G-protein-coupled receptor heteromers. *GPCRs Struct Funct Drug Discov.* 2020;1(2000):109-19. doi: 10.1016/B978-0-12-816228-6.00007-6
50. Navarro G, Cordoní A, Casadó-Anguera V, Moreno E, Cai NS, Cortés A, et al. Evidence for functional pre-coupled complexes of receptor heteromers and adenylyl cyclase. *Nat Commun.* 2018 Mar 28;9(1):1242. doi: 10.1038/s41467-018-03522-3. PMID: 29593213; PMCID: PMC5871782.
51. Albizu L, Moreno JL, González-Maeso J, Sealton SC. Heteromerization of G protein-coupled receptors: relevance to neurological disorders and neurotherapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010 Nov;9(5):636-50. doi: 10.2174/187152710793361586. PMID: 20632964; PMCID: PMC3066024.

6. Bibliografía



52. Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep.* 2004 Jan;5(1):30-4. doi: 10.1038/sj.embor.7400052. PMID: 14710183; PMCID: PMC1298963.
53. Franco R, Casadó V, Cortés A, Mallol J, Ciruela F, Ferré S, et al. G-protein-coupled receptor heteromers: function and ligand pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2008 Mar;153 Suppl 1(Suppl 1):S90-8. doi: 10.1038/sj.bjp.0707571. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18037920; PMCID: PMC2268068.
54. Ciruela F, Casadó V, Rodrigues RJ, Luján R, Burgueño J, Canals M, et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci.* 2006 Feb 15;26(7):2080-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3574-05.2006. PMID: 16481441; PMCID: PMC6674939.
55. Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, et al. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 9;104(2):654-9. doi: 10.1073/pnas.0604049104. Epub 2006 Dec 28. PMID: 17194762; PMCID: PMC1766439.
56. Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol.* 2005 May;67(5):1697-704. doi: 10.1124/mol.104.006882. Epub 2005 Feb 14. PMID: 15710746.
57. Haspula D, Clark MA. Cannabinoid Receptors: An Update on Cell Signaling, Pathophysiological Roles and Therapeutic Opportunities in Neurological, Cardiovascular, and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 17;21(20):7693. doi: 10.3390/ijms21207693. PMID: 33080916; PMCID: PMC7590033.
58. Gomes I, Ayoub MA, Fujita W, Jaeger WC, Pflieger KD, Devi LA. G Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56:403-25. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135952. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26514203; PMCID: PMC5147582.
59. Nguyen HT, Reyes-Alcaraz A, Yong HJ, Nguyen LP, Park HK, Inoue A, et al. CXCR7: a β -arrestin-biased receptor that potentiates cell migration and recruits β -arrestin2 exclusively through G $\beta\gamma$ subunits and GRK2. *Cell Biosci.* 2020 Nov 23;10(1):134. doi: 10.1186/s13578-020-00497-x. PMID: 33292475; PMCID: PMC7686738.
60. Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, et al. GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature.* 1998 Dec 17;396(6712):674-9. doi: 10.1038/25348. PMID: 9872315.
61. Ginés S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casadó V, Canela EI, et al. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 18;97(15):8606-11. doi: 10.1073/pnas.150241097. PMID: 10890919; PMCID: PMC26995.
62. Angers S, Salahpour A, Bouvier M. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:409-35. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091701.082314. PMID: 11807178.
63. Fuxe K, Borroto-Escuela DO, Marcellino D, Romero-Fernandez W, Frankowska M, Guidolin D, et al. GPCR heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions. *Curr Med Chem.* 2012;19(3):356-63. doi: 10.2174/092986712803414259. PMID: 22335512.
64. Guo H, An S, Ward R, Yang Y, Liu Y, Guo XX, et al. Methods used to study the oligomeric structure of G-protein-coupled receptors. *Biosci Rep.* 2017 Apr 20;37(2):BSR20160547. doi: 10.1042/BSR20160547. PMID: 28062602; PMCID: PMC5398257.
65. Gomes I, Fujita W, Chandrakala MV, Devi LA. Disease-specific heteromerization of G-protein-coupled receptors that target drugs of abuse. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;117:207-65. doi: 10.1016/B978-0-12-386931-9.00009-X. PMID: 23663971; PMCID: PMC3973131.
66. Ferrada C, Moreno E, Casadó V, Bongers G, Cortés A, Mallol J, et al. Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br J Pharmacol.* 2009 May;157(1):64-75. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00152.x. PMID: 19413572; PMCID: PMC2697789.
67. Martínez-Pinilla E, Rodríguez-Pérez AI, Navarro G, Aguinaga D, Moreno E, Lanciego JL, et al. Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat



- striatum. *Biochem Pharmacol.* 2015 Jul 15;96(2):131-42. doi: 10.1016/j.bcp.2015.05.006. Epub 2015 May 16. PMID: 25986885.
68. Lillo A, Martínez-Pinilla E, Reyes-Resina I, Navarro G, Franco R. Adenosine A2A and A3 Receptors Are Able to Interact with Each Other. A Further Piece in the Puzzle of Adenosine Receptor-Mediated Signaling. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 17;21(14):5070. doi: 10.3390/ijms21145070. PMID: 32709103; PMCID: PMC7404137.
 69. Ciruela F, Vilardaga JP, Fernández-Dueñas V. Lighting up multiprotein complexes: lessons from GPCR oligomerization. *Trends Biotechnol.* 2010 Aug;28(8):407-15. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.05.002. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20542584; PMCID: PMC3065825.
 70. Gomes I, Sierra S, Devi LA. Detection of Receptor Heteromerization Using In Situ Proximity Ligation Assay. *Curr Protoc Pharmacol.* 2016 Dec 13;75:2.16.1-2.16.31. doi: 10.1002/cpph.15. PMID: 27960030; PMCID: PMC5758307.
 71. Guitart X, Navarro G, Moreno E, Yano H, Cai NS, Sánchez-Soto M, et al. Functional selectivity of allosteric interactions within G protein-coupled receptor oligomers: the dopamine D1-D3 receptor heterotetramer. *Mol Pharmacol.* 2014 Oct;86(4):417-29. doi: 10.1124/mol.114.093096. Epub 2014 Aug 5. PMID: 25097189; PMCID: PMC4164978.
 72. Gnad T, Navarro G, Lahesmaa M, Reverte-Salisa L, Copperi F, Cordini A, et al. Adenosine/A2B Receptor Signaling Ameliorates the Effects of Aging and Counteracts Obesity. *Cell Metab.* 2020 Jul 7;32(1):56-70.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2020.06.006. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32589947; PMCID: PMC7437516.
 73. Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferré S, Casadó V, Agnati L, et al. Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods.* 2008 Aug;5(8):727-33. doi: 10.1038/nmeth.1229. Epub 2008 Jun 29. PMID: 18587404.
 74. Navarro G, Carriba P, Gandía J, Ciruela F, Casadó V, Cortés A, et al. Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *ScientificWorldJournal.* 2008 Oct 11;8:1088-97. doi: 10.1100/tsw.2008.136. PMID: 18956124; PMCID: PMC5848735.
 75. Aguinaga D, Medrano M, Vega-Quiroga I, Gysling K, Canela EI, Navarro G, et al. Cocaine Effects on Dopaminergic Transmission Depend on a Balance between Sigma-1 and Sigma-2 Receptor Expression. *Front Mol Neurosci.* 2018 Feb 12;11:17. doi: 10.3389/fnmol.2018.00017. PMID: 29483862; PMCID: PMC5816031.
 76. Medrano M, Aguinaga D, Reyes-Resina I, Canela EI, Mallol J, Navarro G, et al. Orexin A/Hypocretin Modulates Leptin Receptor-Mediated Signaling by Allosteric Modulations Mediated by the Ghrelin GHS-R1A Receptor in Hypothalamic Neurons. *Mol Neurobiol.* 2018 Jun;55(6):4718-4730. doi: 10.1007/s12035-017-0670-8. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28717967.
 77. Gandía J, Galino J, Amaral OB, Soriano A, Lluís C, Franco R, et al. Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique. *FEBS Lett.* 2008 Sep 3;582(20):2979-84. doi: 10.1016/j.febslet.2008.07.045. Epub 2008 Aug 7. PMID: 18675812.
 78. Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM. Combining SRET2 and BiFC to Study GPCR Heteromerization and Protein-Protein Interactions. *Methods Mol Biol.* 2019;1947:199-215. doi: 10.1007/978-1-4939-9121-1_11. PMID: 30969418.
 79. Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec JC, Shi L, Filizola M, et al. Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J.* 2008 Sep 3;27(17):2293-304. doi: 10.1038/emboj.2008.153. PMID: 18668123; PMCID: PMC2529367.
 80. Gao X, Enten GA, DeSantis AJ, Volkman BF, Gaponenko V, Majetschak M. Characterization of heteromeric complexes between chemokine (C-X-C motif) receptor 4 and $\alpha 1$ -adrenergic receptors utilizing intermolecular bioluminescence resonance energy transfer assays. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jul 23;528(2):368-375. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.094. Epub 2020 Feb 19. PMID: 32085899; PMCID: PMC7937191.
 81. Navarro G, Cordini A, Zelman-Femiak M, Brugarolas M, Moreno E, Aguinaga D, et al. Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and

6. Bibliografía

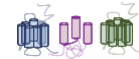


- Gs. *BMC Biol.* 2016 Apr 5;14:26. doi: 10.1186/s12915-016-0247-4. PMID: 27048449; PMCID: PMC4822319.
82. Derouiche L, Massotte D. G protein-coupled receptor heteromers are key players in substance use disorder. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019 Nov;106:73-90. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.09.026. Epub 2018 Sep 29. PMID: 30278192.
 83. Hegazy M, Cohen-Barak E, Koetsier JL, Najor NA, Arvanitis C, Sprecher E, et al. Proximity Ligation Assay for Detecting Protein-Protein Interactions and Protein Modifications in Cells and Tissues in Situ. *Curr Protoc Cell Biol.* 2020 Dec;89(1):e115. doi: 10.1002/cpcb.115. PMID: 33044803; PMCID: PMC8041061.
 84. Bono F, Mutti V, Fiorentini C, Missale C. Dopamine D3 Receptor Heteromerization: Implications for Neuroplasticity and Neuroprotection. *Biomolecules.* 2020 Jul 9;10(7):1016. doi: 10.3390/biom10071016. PMID: 32659920; PMCID: PMC7407647.
 85. Sahlholm K, Gómez-Soler M, Valle-León M, López-Cano M, Taura JJ, Ciruela F, et al. Antipsychotic-Like Efficacy of Dopamine D2 Receptor-Biased Ligands is Dependent on Adenosine A2A Receptor Expression. *Mol Neurobiol.* 2018 Jun;55(6):4952-4958. doi: 10.1007/s12035-017-0696-y. Epub 2017 Aug 5. PMID: 28779351.
 86. Fuxe K, Guidolin D, Agnati LF, Borroto-Escuela DO. Dopamine heteroreceptor complexes as therapeutic targets in Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2015 Mar;19(3):377-98. doi: 10.1517/14728222.2014.981529. Epub 2014 Dec 8. PMID: 25486101.
 87. Andrianarivelo A, Saint-Jour E, Walle R, Trifilieff P, Vanhoutte P. Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations. *Neuropharmacology.* 2019 Jul 1;152:42-50. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.12.003. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30529032.
 88. Fujita W. The Possible Role of MOPr-DOPr Heteromers and Its Regulatory Protein RTP4 at Sensory Neurons in Relation to Pain Perception. *Front Cell Neurosci.* 2020 Nov 13;14:609362. doi: 10.3389/fncel.2020.609362. PMID: 33304244; PMCID: PMC7693438.
 89. Ferré S. Hormones and Neuropeptide Receptor Heteromers in the Ventral Tegmental Area. Targets for the Treatment of Loss of Control of Food Intake and Substance Use Disorders. *Curr Treat Options Psychiatry.* 2017;4(2):167-183. doi: 10.1007/s40501-017-0109-x. Epub 2017 Apr 22. PMID: 28580231; PMCID: PMC5432584.
 90. Jenner P, Mori A, Aradi SD, Hauser RA. Istradefylline - a first generation adenosine A2A antagonist for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother.* 2021 Mar;21(3):317-333. doi: 10.1080/14737175.2021.1880896. Epub 2021 Feb 22. PMID: 33507105.
 91. Borroto-Escuela DO, Carlsson J, Ambrogini P, Narváez M, Wydra K, Tarakanov AO, et al. Understanding the Role of GPCR Heteroreceptor Complexes in Modulating the Brain Networks in Health and Disease. *Front Cell Neurosci.* 2017 Feb 21;11:37. doi: 10.3389/fncel.2017.00037. PMID: 28270751; PMCID: PMC5318393.
 92. Pintsuk J, Borroto-Escuela DO, Pomierny B, Wydra K, Zaniwska M, Filip M, et al. Cocaine self-administration differentially affects allosteric A2A-D2 receptor-receptor interactions in the striatum. Relevance for cocaine use disorder. *Pharmacol Biochem Behav.* 2016 May;144:85-91. doi: 10.1016/j.pbb.2016.03.004. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26987369.
 93. Huang B, St Onge CM, Ma H, Zhang Y. Design of bivalent ligands targeting putative GPCR dimers. *Drug Discov Today.* 2021 Jan;26(1):189-199. doi: 10.1016/j.drudis.2020.10.006. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33075471; PMCID: PMC7856001.
 94. Sierra S, Gupta A, Gomes I, Fowkes M, Ram A, Bobeck EN, et al. Targeting Cannabinoid 1 and Delta Opioid Receptor Heteromers Alleviates Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain. *ACS Pharmacol Transl Sci.* 2019 Aug 9;2(4):219-229. doi: 10.1021/acspstsci.9b00008. Epub 2019 Jun 5. PMID: 31565698; PMCID: PMC6764458.
 95. Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Dec 1;2(12):a009621. doi: 10.1101/cshperspect.a009621. PMID: 23071379; PMCID: PMC3543080.
 96. Groenewegen HJ. The basal ganglia and motor control. *Neural Plast.* 2003;10(1-2):107-20. doi: 10.1155/NP.2003.107. PMID: 14640312; PMCID: PMC2565420.



97. Bevan MD. Motor Control: A Basal Ganglia Feedback Circuit for Action Suppression. *Curr Biol.* 2021 Feb 22;31(4):R191-R193. doi: 10.1016/j.cub.2020.11.067. PMID: 33621506.
98. Haber SN, Knutson B. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology.* 2010 Jan;35(1):4-26. doi: 10.1038/npp.2009.129. PMID: 19812543; PMCID: PMC3055449.
99. Ikemoto S, Yang C, Tan A. Basal ganglia circuit loops, dopamine and motivation: A review and enquiry. *Behav Brain Res.* 2015 Sep 1;290:17-31. doi: 10.1016/j.bbr.2015.04.018. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25907747; PMCID: PMC4447603.
100. Ferré S, Diamond I, Goldberg SR, Yao L, Hourani SM, Huang ZL, et al. Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry implications for drug addiction, sleep and pain. *Prog Neurobiol.* 2007 Dec;83(5):332-47. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.04.002. Epub 2007 May 1. PMID: 17532111; PMCID: PMC2141681.
101. Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, et al. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature.* 2013 Feb 14;494(7436):238-42. doi: 10.1038/nature11846. Epub 2013 Jan 23. PMID: 23354054; PMCID: PMC4039389.
102. Parker JG, Marshall JD, Ahanonu B, Wu YW, Kim TH, Grewe BF, et al. Diametric neural ensemble dynamics in parkinsonian and dyskinetic states. *Nature.* 2018 May;557(7704):177-182. doi: 10.1038/s41586-018-0090-6. Epub 2018 May 2. PMID: 29720658; PMCID: PMC6526726.
103. Markowitz JE, Gillis WF, Beron CC, Neufeld SQ, Robertson K, Bhagat ND, et al. The Striatum Organizes 3D Behavior via Moment-to-Moment Action Selection. *Cell.* 2018 Jun 28;174(1):44-58.e17. doi: 10.1016/j.cell.2018.04.019. Epub 2018 May 17. PMID: 29779950; PMCID: PMC6026065.
104. Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.* 1998 Sep;86(2):353-87. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00004-9. PMID: 9881853.
105. Kravitz AV, Freeze BS, Parker PR, Kay K, Thwin MT, Deisseroth K, et al. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature.* 2010 Jul 29;466(7306):622-6. doi: 10.1038/nature09159. Epub 2010 Jul 7. PMID: 20613723; PMCID: PMC3552484.
106. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989 Oct;12(10):366-75. doi: 10.1016/0166-2236(89)90074-x. PMID: 2479133.
107. Nambu A, Tokuno H, Takada M. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neurosci Res.* 2002 Jun;43(2):111-7. doi: 10.1016/s0168-0102(02)00027-5. PMID: 12067746.
108. Nambu A. A new dynamic model of the cortico-basal ganglia loop. *Prog Brain Res.* 2004;143:461-6. doi: 10.1016/S0079-6123(03)43043-4. PMID: 14653188.
109. Polyakova Z, Chiken S, Hatanaka N, Nambu A. Cortical Control of Subthalamic Neuronal Activity through the Hyperdirect and Indirect Pathways in Monkeys. *J Neurosci.* 2020 Sep 23;40(39):7451-7463. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0772-20.2020. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32847963; PMCID: PMC7511188.
110. Mallet N, Micklem BR, Henny P, Brown MT, Williams C, Bolam JP, et al. Dichotomous organization of the external globus pallidus. *Neuron.* 2012 Jun 21;74(6):1075-86. doi: 10.1016/j.neuron.2012.04.027. PMID: 22726837; PMCID: PMC3407962.
111. Abdi A, Mallet N, Mohamed FY, Sharott A, Dodson PD, Nakamura KC, et al. Prototypic and arkypallidal neurons in the dopamine-intact external globus pallidus. *J Neurosci.* 2015 Apr 29;35(17):6667-88. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4662-14.2015. PMID: 25926446; PMCID: PMC4412890.
112. Glajch KE, Kelper DA, Hegeman DJ, Cui Q, Xenias HS, Augustine EC, et al. Npas1+ Pallidal Neurons Target Striatal Projection Neurons. *J Neurosci.* 2016 May 18;36(20):5472-88. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1720-15.2016. PMID: 27194328; PMCID: PMC4871984.

6. Bibliografia

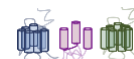


113. Aristieta A, Barresi M, Azizpour Lindi S, Barrière G, Courtand G, de la Crompe B, et al. A Disynaptic Circuit in the Globus Pallidus Controls Locomotion Inhibition. *Curr Biol.* 2021 Feb 22;31(4):707-721.e7. doi: 10.1016/j.cub.2020.11.019. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33306949.
114. Schultz W. Subjective neuronal coding of reward: temporal value discounting and risk. *Eur J Neurosci.* 2010 Jun;31(12):2124-35. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07282.x. Epub 2010 May 24. PMID: 20497474.
115. Cooper S, Robison AJ, Mazei-Robison MS. Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics.* 2017 Jul;14(3):687-697. doi: 10.1007/s13311-017-0525-z. PMID: 28324454; PMCID: PMC5509624.
116. Nair-Roberts RG, Chatelain-Badie SD, Benson E, White-Cooper H, Bolam JP, Ungless MA. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience.* 2008 Apr 9;152(4):1024-31. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.046. Epub 2008 Feb 7. PMID: 18355970; PMCID: PMC2575227.
117. Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, Menéndez-González M, Pöppel E. Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med.* 2010 Oct 6;3:24. doi: 10.1186/1755-7682-3-24. PMID: 20925949; PMCID: PMC2958859.
118. Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jun;5(6):483-94. doi: 10.1038/nrn1406. PMID: 15152198.
119. Haber SN. Corticostriatal circuitry. *Dialogues Clin Neurosci.* 2016 Mar;18(1):7-21. doi: 10.31887/DCNS.2016.18.1/shaber. PMID: 27069376; PMCID: PMC4826773.
120. Liljeholm M, O'Doherty JP. Contributions of the striatum to learning, motivation, and performance: an associative account. *Trends Cogn Sci.* 2012 Sep;16(9):467-75. doi: 10.1016/j.tics.2012.07.007. Epub 2012 Aug 10. PMID: 22890090; PMCID: PMC3449003.
121. Ayano G. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *J Ment Disord Treat.* 2016;2(2):2-5. doi: 10.4172/2471.271X.10000120
122. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2019 Jan;39(1):31-59. doi: 10.1007/s10571-018-0632-3. Epub 2018 Nov 16. PMID: 30446950.
123. Baik JH. Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front Neural Circuits.* 2013 Oct 11;7:152. doi: 10.3389/fncir.2013.00152. PMID: 24130517; PMCID: PMC3795306.
124. Salgado S, Kaplitt MG. The Nucleus Accumbens: A Comprehensive Review. *Stereotact Funct Neurosurg.* 2015;93(2):75-93. doi: 10.1159/000368279. Epub 2015 Feb 18. PMID: 25720819.
125. Soares-Cunha C, de Vasconcelos NAP, Coimbra B, Domingues AV, Silva JM, Loureiro-Campos E, et al. Nucleus accumbens medium spiny neurons subtypes signal both reward and aversion. *Mol Psychiatry.* 2020 Dec;25(12):3241-3255. doi: 10.1038/s41380-019-0484-3. Epub 2019 Aug 28. Erratum in: *Mol Psychiatry.* 2019 Sep 18;: PMID: 31462765; PMCID: PMC7714688.
126. Britt JP, Benaliouad F, McDevitt RA, Stuber GD, Wise RA, Bonci A. Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron.* 2012 Nov 21;76(4):790-803. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.040. PMID: 23177963; PMCID: PMC3607383.
127. Stuber GD, Wise RA. Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci.* 2016 Feb;19(2):198-205. doi: 10.1038/nn.4220. PMID: 26814589; PMCID: PMC4927193.
128. Tottenham N, Sheridan MA. A review of adversity, the amygdala and the hippocampus: a consideration of developmental timing. *Front Hum Neurosci.* 2010 Jan 8;3:68. doi: 10.3389/neuro.09.068.2009. PMID: 20161700; PMCID: PMC2813726.
129. Mishina M, Ohyama M, Ishii K, Kitamura S, Kimura Y, Oda K, et al. Low density of sigma1 receptors in early Alzheimer's disease. *Ann Nucl Med.* 2008 Apr;22(3):151-6. doi: 10.1007/s12149-007-0094-z. Epub 2008 May 23. PMID: 18498028.



130. Miller EK, Freedman DJ, Wallis JD. The prefrontal cortex: categories, concepts and cognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002 Aug 29;357(1424):1123-36. doi: 10.1098/rstb.2002.1099. PMID: 12217179; PMCID: PMC1693009.
131. Teffer K, Semendeferi K. Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. *Prog Brain Res.* 2012;195:191-218. doi: 10.1016/B978-0-444-53860-4.00009-X. PMID: 22230628.
132. Zhang J, Xiong B, Zhen X, Zhang A. Dopamine D1 receptor ligands: where are we now and where are we going. *Med Res Rev.* 2009 Mar;29(2):272-94. doi: 10.1002/med.20130. PMID: 18642350.
133. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci.* 2007 May;30(5):220-7. doi: 10.1016/j.tins.2007.03.003. Epub 2007 Apr 2. PMID: 17400299.
134. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998 Jan;78(1):189-225. doi: 10.1152/physrev.1998.78.1.189. PMID: 9457173.
135. Hall A, Provins L, Valade A. Novel Strategies To Activate the Dopamine D1 Receptor: Recent Advances in Orthosteric Agonism and Positive Allosteric Modulation. *J Med Chem.* 2019 Jan 10;62(1):128-140. doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b01767. Epub 2018 Dec 27. PMID: 30525590.
136. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011 Mar;63(1):182-217. doi: 10.1124/pr.110.002642. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21303898.
137. Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol.* 2015 Jan;172(1):1-23. doi: 10.1111/bph.12906. PMID: 25671228; PMCID: PMC4280963.
138. Franco R, Reyes-Resina I, Navarro G. Dopamine in Health and Disease: Much More Than a Neurotransmitter. *Biomedicines.* 2021 Jan 22;9(2):109. doi: 10.3390/biomedicines9020109. PMID: 33499192; PMCID: PMC7911410.
139. Wise RA, Robble MA. Dopamine and Addiction. *Annu Rev Psychol.* 2020 Jan 4;71:79-106. doi: 10.1146/annurev-psych-010418-103337. PMID: 31905114.
140. Hasbi A, Nguyen T, Rahal H, Manduca JD, Miksys S, Tyndale RF, et al. Sex difference in dopamine D1-D2 receptor complex expression and signaling affects depression- and anxiety-like behaviors. *Biol Sex Differ.* 2020 Feb 22;11(1):8. doi: 10.1186/s13293-020-00285-9. PMID: 32087746; PMCID: PMC7035642.
141. Navarro G, Moreno E, Aymerich M, Marcellino D, McCormick PJ, Mallol J, et al. Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Oct 26;107(43):18676-81. doi: 10.1073/pnas.1008911107. Epub 2010 Oct 18. PMID: 20956312; PMCID: PMC2972946.
142. Ferré S, Lluís C, Lanciego JL, Franco R. Prime time for G-protein-coupled receptor heteromers as therapeutic targets for CNS disorders: the dopamine D₁-D₃ receptor heteromer. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010 Nov;9(5):596-600. doi: 10.2174/187152710793361603. PMID: 20632968.
143. Fuenzalida J, Galaz P, Araya KA, Slater PG, Blanco EH, Campusano JM, et al. Dopamine D1 and corticotrophin-releasing hormone type-2 α receptors assemble into functionally interacting complexes in living cells. *Br J Pharmacol.* 2014 Dec;171(24):5650-64. doi: 10.1111/bph.12868. PMID: 25073922; PMCID: PMC4290708.
144. Moreno E, Moreno-Delgado D, Navarro G, Hoffmann HM, Fuentes S, Rosell-Vilar S, et al. Cocaine disrupts histamine H3 receptor modulation of dopamine D1 receptor signaling: σ 1-D1-H3 receptor complexes as key targets for reducing cocaine's effects. *J Neurosci.* 2014 Mar 5;34(10):3545-58. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4147-13.2014. PMID: 24599455; PMCID: PMC3942573.
145. Espay AJ, Kalia LV, Gan-Or Z, Williams-Gray CH, Bedard PL, Rowe SM, et al. Disease modification and biomarker development in Parkinson disease: Revision or reconstruction?

6. Bibliografia



- Neurology. 2020 Mar 17;94(11):481-494. doi: 10.1212/WNL.00000000000009107. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32102975; PMCID: PMC7220234.
146. Dickey AS, La Spada AR. Therapy development in Huntington disease: From current strategies to emerging opportunities. *Am J Med Genet A*. 2018 Apr;176(4):842-861. doi: 10.1002/ajmg.a.38494. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29218782; PMCID: PMC5975251.
 147. Nutt DJ, Lingford-Hughes A, Erritzoe D, Stokes PR. The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. *Nat Rev Neurosci*. 2015 May;16(5):305-12. doi: 10.1038/nrn3939. Epub 2015 Apr 15. PMID: 25873042.
 148. Colldén G, Tschöp MH, Müller TD. Therapeutic Potential of Targeting the Ghrelin Pathway. *Int J Mol Sci*. 2017 Apr 11;18(4):798. doi: 10.3390/ijms18040798. PMID: 28398233; PMCID: PMC5412382.
 149. Zhu X, Cao Y, Voogd K, Steiner DF. On the processing of proghrelin to ghrelin. *J Biol Chem*. 2006 Dec 15;281(50):38867-70. doi: 10.1074/jbc.M607955200. Epub 2006 Oct 18. Erratum in: *J Biol Chem*. 2007 Jan 19;282(3):2124. Voogd, Keith [corrected to Voogd, Keith]. PMID: 17050541.
 150. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. Ghrelin. *Mol Metab*. 2015 Mar 21;4(6):437-60. doi: 10.1016/j.molmet.2015.03.005. PMID: 26042199; PMCID: PMC4443295.
 151. Olszewski PK, Schiöth HB, Levine AS. Ghrelin in the CNS: from hunger to a rewarding and memorable meal? *Brain Res Rev*. 2008 Jun;58(1):160-70. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.01.004. Epub 2008 Feb 13. PMID: 18308399; PMCID: PMC2494866.
 152. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):495-522. doi: 10.1152/physrev.00012.2004. PMID: 15788704.
 153. Rhea EM, Salameh TS, Gray S, Niu J, Banks WA, Tong J. Ghrelin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the growth hormone secretagogue receptor. *Mol Metab*. 2018 Dec;18:88-96. doi: 10.1016/j.molmet.2018.09.007. Epub 2018 Sep 24. PMID: 30293893; PMCID: PMC6308033.
 154. Chow KB, Sun J, Chu KM, Tai Cheung W, Cheng CH, Wise H. The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jan 2;348(1):247-54. doi: 10.1016/j.mce.2011.08.034. Epub 2011 Aug 31. PMID: 21903149.
 155. Mary S, Fehrentz JA, Damian M, Gaibelet G, Orcel H, Verdié P, et al. Heterodimerization with Its splice variant blocks the ghrelin receptor 1a in a non-signaling conformation: a study with a purified heterodimer assembled into lipid discs. *J Biol Chem*. 2013 Aug 23;288(34):24656-65. doi: 10.1074/jbc.M113.453423. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23839942; PMCID: PMC3750163.
 156. Navarro G, Aguinaga D, Angelats E, Medrano M, Moreno E, Mallol J, et al. A Significant Role of the Truncated Ghrelin Receptor GHS-R1b in Ghrelin-induced Signaling in Neurons. *J Biol Chem*. 2016 Jun 17;291(25):13048-62. doi: 10.1074/jbc.M116.715144. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27129257; PMCID: PMC4933222.
 157. Shiimura Y, Horita S, Hamamoto A, Asada H, Hirata K, Tanaka M, et al. Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode. *Nat Commun*. 2020 Aug 19;11(1):4160. doi: 10.1038/s41467-020-17554-1. PMID: 32814772; PMCID: PMC7438500.
 158. Yin Y, Li Y, Zhang W. The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci*. 2014 Mar 19;15(3):4837-55. doi: 10.3390/ijms15034837. PMID: 24651458; PMCID: PMC3975427.
 159. Mason BL, Wang Q, Zigman JM. The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:519-33. doi: 10.1146/annurev-physiol-021113-170310. Epub 2013 Oct 2. PMID: 24111557; PMCID: PMC4019397.



160. Jiao Q, Du X, Li Y, Gong B, Shi L, Tang T, et al. The neurological effects of ghrelin in brain diseases: Beyond metabolic functions. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 Feb;73:98-111. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.12.010. Epub 2016 Dec 16. PMID: 27993602.
161. Cabral A, López Soto EJ, Epelbaum J, Perelló M. Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 15;18(3):638. doi: 10.3390/ijms18030638. PMID: 28294994; PMCID: PMC5372651.
162. Tucci S. Grelina en regulación del apetito y papel en obesidad y trastornos alimentarios: Abordajes terapéuticos. *Rev Venez Endocrinol y Metab.* 2008;6(2):15–23.
163. Skibicka KP, Hansson C, Alvarez-Crespo M, Friberg PA, Dickson SL. Ghrelin directly targets the ventral tegmental area to increase food motivation. *Neuroscience.* 2011 Apr 28;180:129-37. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.02.016. Epub 2011 Feb 16. PMID: 21335062.
164. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 6;95(1):322-7. doi: 10.1073/pnas.95.1.322. PMID: 9419374; PMCID: PMC18213.
165. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 1998 Feb 20;92(4):573-85. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80949-6. PMID: 9491897.
166. Wang C, Wang Q, Ji B, Pan Y, Xu C, Cheng B, et al. The Orexin/Receptor System: Molecular Mechanism and Therapeutic Potential for Neurological Diseases. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jun 28;11:220. doi: 10.3389/fnmol.2018.00220. PMID: 30002617; PMCID: PMC6031739.
167. Perrey DA, Zhang Y. Therapeutics development for addiction: Orexin-1 receptor antagonists. *Brain Res.* 2020 Mar 15;1731:145922. doi: 10.1016/j.brainres.2018.08.025. Epub 2018 Aug 24. PMID: 30148984; PMCID: PMC6387867.
168. Yin J, Babaoglu K, Brautigam CA, Clark L, Shao Z, Scheuermann TH, et al. Structure and ligand-binding mechanism of the human OX1 and OX2 orexin receptors. *Nat Struct Mol Biol.* 2016 Apr;23(4):293-9. doi: 10.1038/nsmb.3183. Epub 2016 Mar 7. PMID: 26950369.
169. Yin J, Mobarec JC, Kolb P, Rosenbaum DM. Crystal structure of the human OX2 orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant. *Nature.* 2015 Mar 12;519(7542):247-50. doi: 10.1038/nature14035. Epub 2014 Dec 22. PMID: 25533960.
170. Kukkonen JP, Leonard CS. Orexin/hypocretin receptor signalling cascades. *Br J Pharmacol.* 2014 Jan;171(2):314-31. doi: 10.1111/bph.12324. PMID: 23902572; PMCID: PMC3904254.
171. Han Y, Yuan K, Zheng Y, Lu L. Orexin Receptor Antagonists as Emerging Treatments for Psychiatric Disorders. *Neurosci Bull.* 2020 Apr;36(4):432-448. doi: 10.1007/s12264-019-00447-9. Epub 2019 Nov 28. PMID: 31782044; PMCID: PMC7142186.
172. Soya S, Sakurai T. Evolution of Orexin Neuropeptide System: Structure and Function. *Front Neurosci.* 2020 Jul 10;14:691. doi: 10.3389/fnins.2020.00691. PMID: 32754010; PMCID: PMC7365868.
173. Cole S, Mayer HS, Petrovich GD. Orexin/Hypocretin-1 Receptor Antagonism Selectively Reduces Cue-Induced Feeding in Sated Rats and Recruits Medial Prefrontal Cortex and Thalamus. *Sci Rep.* 2015 Nov 5;5:16143. doi: 10.1038/srep16143. PMID: 26536818; PMCID: PMC4633617.
174. Chow M, Cao M. The hypocretin/orexin system in sleep disorders: preclinical insights and clinical progress. *Nat Sci Sleep.* 2016 Mar 14;8:81-6. doi: 10.2147/NSS.S76711. PMID: 27051324; PMCID: PMC4803263.
175. Yoshida Y, Fujiki N, Nakajima T, Ripley B, Matsumura H, Yoneda H, et al. Fluctuation of extracellular hypocretin-1 (orexin A) levels in the rat in relation to the light-dark cycle and sleep-wake activities. *Eur J Neurosci.* 2001 Oct;14(7):1075-81. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01725.x. PMID: 11683899.
176. Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Mar;8(3):171-81. doi: 10.1038/nrn2092. Epub 2007 Feb 14. PMID: 17299454.
177. Risco S, Mediavilla C. Orexin A in the ventral tegmental area enhances saccharin-induced conditioned flavor preference: The role of D1 receptors in central nucleus of amygdala. *Behav*

6. Bibliografia

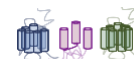


- Brain Res. 2018 Aug 1;348:192-200. doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.010. Epub 2018 Apr 21. PMID: 29684475.
178. Chieffi S, Carotenuto M, Monda V, Valenzano A, Villano I, Precenzano F, et al. Orexin System: The Key for a Healthy Life. *Front Physiol.* 2017 May 31;8:357. doi: 10.3389/fphys.2017.00357. PMID: 28620314; PMCID: PMC5450021.
179. Adamantidis AR, Schmidt MH, Carter ME, Burdakov D, Peyron C, Scammell TE. A circuit perspective on narcolepsy. *Sleep.* 2020 May 12;43(5):zsz296. doi: 10.1093/sleep/zsz296. PMID: 31919524; PMCID: PMC7215265.
180. Sargin D. The role of the orexin system in stress response. *Neuropharmacology.* 2019 Aug;154:68-78. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.09.034. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30266600.
181. Sakurai T. The role of orexin in motivated behaviours. *Nat Rev Neurosci.* 2014 Nov;15(11):719-31. doi: 10.1038/nrn3837. Epub 2014 Oct 10. PMID: 25301357.
182. Baimel C, Bartlett SE, Chiou LC, Lawrence AJ, Muschamp JW, Patkar O, et al. Orexin/hypocretin role in reward: implications for opioid and other addictions. *Br J Pharmacol.* 2015 Jan;172(2):334-48. doi: 10.1111/bph.12639. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24641197; PMCID: PMC4292951.
183. James MH, Campbell EJ, Dayas CV. Role of the Orexin/Hypocretin System in Stress-Related Psychiatric Disorders. *Curr Top Behav Neurosci.* 2017;33:197-219. doi: 10.1007/7854_2016_56. PMID: 28083790.
184. Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, Martin-Fardon R, Markou A, Koob GF, et al. Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 27;102(52):19168-73. doi: 10.1073/pnas.0507480102. Epub 2005 Dec 15. PMID: 16357203; PMCID: PMC1323172.
185. James MH, Mahler SV, Moorman DE, Aston-Jones G. A Decade of Orexin/Hypocretin and Addiction: Where Are We Now? *Curr Top Behav Neurosci.* 2017;33:247-281. doi: 10.1007/7854_2016_57. PMID: 28012090; PMCID: PMC5799809.
186. Grafe LA, Bhatnagar S. Orexins and stress. *Front Neuroendocrinol.* 2018 Oct;51:132-145. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.06.003. Epub 2018 Jun 19. PMID: 29932958; PMCID: PMC6345253.
187. Bonaventure P, Yun S, Johnson PL, Shekhar A, Fitz SD, Shireman BT, et al. A selective orexin-1 receptor antagonist attenuates stress-induced hyperarousal without hypnotic effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015 Mar;352(3):590-601. doi: 10.1124/jpet.114.220392. Epub 2015 Jan 12. PMID: 25583879; PMCID: PMC4352589.
188. Takefuji M, Murohara T. Corticotropin-Releasing Hormone Family and Their Receptors in the Cardiovascular System. *Circ J.* 2019 Jan 25;83(2):261-266. doi: 10.1253/circj.CJ-18-0428. Epub 2018 Dec 22. PMID: 30584229.
189. Peng J, Long B, Yuan J, Peng X, Ni H, Li X, et al. A Quantitative Analysis of the Distribution of CRH Neurons in Whole Mouse Brain. *Front Neuroanat.* 2017 Jul 25;11:63. doi: 10.3389/fnana.2017.00063. PMID: 28790896; PMCID: PMC5524767.
190. Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:525-57. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410. PMID: 14744257.
191. Ma S, Shen Q, Zhao LH, Mao C, Zhou XE, Shen DD, et al. Molecular Basis for Hormone Recognition and Activation of Corticotropin-Releasing Factor Receptors. *Mol Cell.* 2020 Feb 6;77(3):669-680.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2020.01.013. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32004470.
192. Vasconcelos M, Stein DJ, Gallas-Lopes M, Landau L, de Almeida RMM. Corticotropin-releasing factor receptor signaling and modulation: implications for stress response and resilience. *Trends Psychiatry Psychother.* 2020 Jun;42(2):195-206. doi: 10.1590/2237-6089-2018-0027. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32696892.
193. Perrin M, Donaldson C, Chen R, Blount A, Berggren T, Bilezikjian L, et al. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 28;92(7):2969-73. doi: 10.1073/pnas.92.7.2969. PMID: 7708757; PMCID: PMC42340.



194. Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev.* 2006 May;27(3):260-86. doi: 10.1210/er.2005-0034. Epub 2006 Feb 16. PMID: 16484629.
195. Vuppaladhiam L, Ehsan C, Akkati M, Bhargava A. Corticotropin-Releasing Factor Family: A Stress Hormone-Receptor System's Emerging Role in Mediating Sex-Specific Signaling. *Cells.* 2020 Mar 31;9(4):839. doi: 10.3390/cells9040839. PMID: 32244319; PMCID: PMC7226788.
196. Deussing JM, Chen A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. *Physiol Rev.* 2018 Oct 1;98(4):2225-2286. doi: 10.1152/physrev.00042.2017. PMID: 30109816.
197. Hauger RL, Risbrough V, Brauns O, Dautzenberg FM. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006 Aug;5(4):453-79. doi: 10.2174/187152706777950684. PMID: 16918397; PMCID: PMC1925123.
198. Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF. Corticotropin releasing factor: a key role in the neurobiology of addiction. *Front Neuroendocrinol.* 2014 Apr;35(2):234-44. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.01.001. Epub 2014 Jan 20. PMID: 24456850; PMCID: PMC4213066.
199. Tsuda T, Takefuji M, Wettschureck N, Kotani K, Morimoto R, Okumura T, et al. Corticotropin releasing hormone receptor 2 exacerbates chronic cardiac dysfunction. *J Exp Med.* 2017 Jul 3;214(7):1877-1888. doi: 10.1084/jem.20161924. Epub 2017 May 26. PMID: 28550160; PMCID: PMC5502432.
200. Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol.* 2000 Dec 11;428(2):191-212. doi: 10.1002/1096-9861(20001211)428:2<191::aid-cne1>3.0.co;2-u. PMID: 11064361.
201. Culhane KJ, Liu Y, Cai Y, Yan EC. Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors. *Front Pharmacol.* 2015 Nov 5;6:264. doi: 10.3389/fphar.2015.00264. PMID: 26594176; PMCID: PMC4633518.
202. Henckens MJ, Deussing JM, Chen A. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Oct;17(10):636-51. doi: 10.1038/nrn.2016.94. Epub 2016 Sep 2. PMID: 27586075.
203. Inda C, Armando NG, Dos Santos Claro PA, Silberstein S. Endocrinology and the brain: corticotropin-releasing hormone signaling. *Endocr Connect.* 2017 Aug;6(6):R99-R120. doi: 10.1530/EC-17-0111. Epub 2017 Jul 14. PMID: 28710078; PMCID: PMC5551434.
204. Wootten D, Miller LJ, Koole C, Christopoulos A, Sexton PM. Allosterism and Biased Agonism at Class B G Protein-Coupled Receptors. *Chem Rev.* 2017 Jan 11;117(1):111-138. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00049. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27040440.
205. O'Connor DB, Thayer JF, Vedhara K. Stress and Health: A Review of Psychobiological Processes. *Annu Rev Psychol.* 2021 Jan 4;72:663-688. doi: 10.1146/annurev-psych-062520-122331. Epub 2020 Sep 4. PMID: 32886587.
206. Ketchesin KD, Stinnett GS, Seasholtz AF. Corticotropin-releasing hormone-binding protein and stress: from invertebrates to humans. *Stress.* 2017 Sep;20(5):449-464. doi: 10.1080/10253890.2017.1322575. Epub 2017 May 18. PMID: 28436309; PMCID: PMC7885796.
207. de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jun;6(6):463-75. doi: 10.1038/nrn1683. PMID: 15891777.
208. Schreiber AL, Gilpin NW. Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Neurocircuitry and Neuropharmacology in Alcohol Drinking. *Handb Exp Pharmacol.* 2018;248:435-471. doi: 10.1007/164_2017_86. PMID: 29374836; PMCID: PMC6064393.
209. Sanders J, Nemeroff C. The CRF System as a Therapeutic Target for Neuropsychiatric Disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Dec;37(12):1045-1054. doi: 10.1016/j.tips.2016.09.004. Epub 2016 Oct 4. PMID: 27717506; PMCID: PMC5121012.

6. Bibliografia



210. Qi J, Zhang X, Li Y, Xu S, Wang M, Chen H, et al. The suppression effects of feeding and mechanisms in CRF system of animals. *Gene*. 2020 Apr 5;733:144363. doi: 10.1016/j.gene.2020.144363. Epub 2020 Jan 11. PMID: 31935510.
211. Maillot C, Million M, Wei JY, Gauthier A, Taché Y. Peripheral corticotropin-releasing factor and stress-stimulated colonic motor activity involve type 1 receptor in rats. *Gastroenterology*. 2000 Dec;119(6):1569-79. doi: 10.1053/gast.2000.20251. PMID: 11113078.
212. Okosi A, Brar BK, Chan M, D'Souza L, Smith E, Stephanou A, et al. Expression and protective effects of urocortin in cardiac myocytes. *Neuropeptides*. 1998 Apr;32(2):167-71. doi: 10.1016/s0143-4179(98)90033-6. PMID: 9639256.
213. Pilbrow AP, Lewis KA, Perrin MH, Sweet WE, Moravec CS, Tang WH, et al. Cardiac CRFR1 Expression Is Elevated in Human Heart Failure and Modulated by Genetic Variation and Alternative Splicing. *Endocrinology*. 2016 Dec;157(12):4865-4874. doi: 10.1210/en.2016-1448. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27754786; PMCID: PMC5133347.
214. Koob GF, Schulkin J. Addiction and stress: An allostatic view. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019 Nov;106:245-262. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.09.008. Epub 2018 Sep 15. PMID: 30227143.
215. Ruisoto P, Contador I. The role of stress in drug addiction. An integrative review. *Physiol Behav*. 2019 Apr 1;202:62-68. doi: 10.1016/j.physbeh.2019.01.022. Epub 2019 Jan 31. PMID: 30711532.
216. Bryce CA, Adalbert AJ, Claes MM, van Holstein M, Floresco SB. Differential effects of corticotropin-releasing factor and acute stress on different forms of risk/reward decision-making. *Neurobiol Learn Mem*. 2020 Mar;169:107167. doi: 10.1016/j.nlm.2020.107167. Epub 2020 Jan 17. PMID: 31958501.
217. Kelly EA, Fudge JL. The neuroanatomic complexity of the CRF and DA systems and their interface: What we still don't know. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018 Jul;90:247-259. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.04.014. Epub 2018 Apr 25. PMID: 29704516; PMCID: PMC5993645.
218. Yarur HE, González MP, Verbel-Vergara D, Andrés ME, Gysling K. Cross-talk between dopamine D1 and corticotropin releasing factor type 2 receptors leads to occlusion of their ERK1/2 signaling. *J Neurochem*. 2020 Nov;155(3):264-273. doi: 10.1111/jnc.15016. Epub 2020 Apr 13. PMID: 32215915.
219. Leonard MZ, DeBold JF, Miczek KA. Escalated cocaine "binges" in rats: enduring effects of social defeat stress or intra-VTA CRF. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017 Sep;234(18):2823-2836. doi: 10.1007/s00213-017-4677-7. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28725939; PMCID: PMC5709163.
220. Erb S, Shaham Y, Stewart J. Stress reinstates cocaine-seeking behavior after prolonged extinction and a drug-free period. *Psychopharmacology (Berl)*. 1996 Dec;128(4):408-12. doi: 10.1007/s002130050150. PMID: 8986011.
221. García-Carmona JA, Georgiou P, Zanos P, Bailey A, Laorden ML. Methamphetamine withdrawal induces activation of CRF neurons in the brain stress system in parallel with an increased activity of cardiac sympathetic pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2018 Apr;391(4):423-434. doi: 10.1007/s00210-018-1470-z. Epub 2018 Jan 30. PMID: 29383398.
222. Benitez-López Y, Redolar-Ripoll D, Ruvalcaba-Delgadillo Y, Jáuregui-Huerta F. Inhibitory control failures and blunted cortisol response to psychosocial stress in amphetamine consumers after 6 months of abstinence. *J Res Med Sci*. 2019 Mar 25;24:20. doi: 10.4103/jrms.JRMS_1148_17. PMID: 31007690; PMCID: PMC6450134.
223. Borea PA, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K. Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiol Rev*. 2018 Jul 1;98(3):1591-1625. doi: 10.1152/physrev.00049.2017. PMID: 29848236.
224. Al-Attraqchi OHA, Attimarad M, Venugopala KN, Nair A, Al-Attraqchi NHA. Adenosine A2A Receptor as a Potential Drug Target - Current Status and Future Perspectives. *Curr Pharm Des*. 2019;25(25):2716-2740. doi: 10.2174/1381612825666190716113444. PMID: 31333093.



225. Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000 Nov;362(4-5):364-74. doi: 10.1007/s002100000313. PMID: 11111830.
226. Effendi WI, Nagano T, Kobayashi K, Nishimura Y. Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells.* 2020 Mar 24;9(3):785. doi: 10.3390/cells9030785. PMID: 32213945; PMCID: PMC7140859.
227. Golzar Y, Doukky R. Regadenoson use in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the state of current knowledge. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2014 Jan 22;9:129-37. doi: 10.2147/COPD.S56879. PMID: 24489466; PMCID: PMC3904829.
228. de Lera Ruiz M, Lim YH, Zheng J. Adenosine A2A receptor as a drug discovery target. *J Med Chem.* 2014 May 8;57(9):3623-50. doi: 10.1021/jm4011669. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24164628.
229. Koos BJ. Adenosine A_{2a} receptors and O₂ sensing in development. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011 Sep;301(3):R601-22. doi: 10.1152/ajpregu.00664.2010. Epub 2011 Jun 15. PMID: 21677265; PMCID: PMC3174752.
230. Ballesteros-Yáñez I, Castillo CA, Merighi S, Gessi S. The Role of Adenosine Receptors in Psychostimulant Addiction. *Front Pharmacol.* 2018 Jan 10;8:985. doi: 10.3389/fphar.2017.00985. PMID: 29375384; PMCID: PMC5767594.
231. Cunha RA, Ferré S, Vaugeois JM, Chen JF. Potential therapeutic interest of adenosine A_{2A} receptors in psychiatric disorders. *Curr Pharm Des.* 2008;14(15):1512-24. doi: 10.2174/138161208784480090. PMID: 18537674; PMCID: PMC2423946.
232. Knapp CM, Foye MM, Cottam N, Ciraulo DA, Kornetsky C. Adenosine agonists CGS 21680 and NECA inhibit the initiation of cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001 Apr;68(4):797-803. doi: 10.1016/s0091-3057(01)00486-5. PMID: 11526979.
233. Chen JF, Beilstein M, Xu YH, Turner TJ, Moratalla R, Standaert DG, et al. Selective attenuation of psychostimulant-induced behavioral responses in mice lacking A(2A) adenosine receptors. *Neuroscience.* 2000;97(1):195-204. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00604-1. PMID: 10771351.
234. Kavanagh KA, Schreiner DC, Levis SC, O'Neill CE, Bachtell RK. Role of adenosine receptor subtypes in methamphetamine reward and reinforcement. *Neuropharmacology.* 2015 Feb;89:265-73. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.09.030. Epub 2014 Oct 6. PMID: 25301277; PMCID: PMC4250385.
235. Zou S, Kumar U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 13;19(3):833. doi: 10.3390/ijms19030833. PMID: 29533978; PMCID: PMC5877694.
236. Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging.* 2021 Jun;6(6):607-615. doi: 10.1016/j.bpsc.2020.07.016. Epub 2020 Aug 1. PMID: 32980261; PMCID: PMC7855189.
237. Cristino L, Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2020 Jan;16(1):9-29. doi: 10.1038/s41582-019-0284-z. Epub 2019 Dec 12. PMID: 31831863.
238. Turner SE, Williams CM, Iversen L, Whalley BJ. Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids. *Prog Chem Org Nat Prod.* 2017;103:61-101. doi: 10.1007/978-3-319-45541-9_3. PMID: 28120231.
239. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990 Aug 9;346(6284):561-4. doi: 10.1038/346561a0. PMID: 2165569.
240. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993 Sep 2;365(6441):61-5. doi: 10.1038/365061a0. PMID: 7689702.
241. Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, et al. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Mar 27;98(7):3662-5. doi: 10.1073/pnas.061029898. Epub 2001 Mar 20. PMID: 11259648; PMCID: PMC311108.

6. Bibliografia



242. Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, et al. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Jun;301(3):1020-4. doi: 10.1124/jpet.301.3.1020. PMID: 12023533.
243. Huang SM, Walker JM. Enhancement of spontaneous and heat-evoked activity in spinal nociceptive neurons by the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyldopamine (NADA). *J Neurophysiol.* 2006 Feb;95(2):1207-12. doi: 10.1152/jn.00395.2005. Epub 2005 Nov 2. PMID: 16267120.
244. Hua T, Vemuri K, Pu M, Qu L, Han GW, Wu Y, et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell.* 2016 Oct 20;167(3):750-762.e14. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.004. PMID: 27768894; PMCID: PMC5322940.
245. Hua T, Li X, Wu L, Iliopoulos-Tsoutsouvas C, Wang Y, Wu M, et al. Activation and Signaling Mechanism Revealed by Cannabinoid Receptor-Gi Complex Structures. *Cell.* 2020 Feb 20;180(4):655-665.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.01.008. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32004463; PMCID: PMC7898353.
246. Turu G, Hunyady L. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol.* 2010 Feb;44(2):75-85. doi: 10.1677/JME-08-0190. Epub 2009 Jul 20. PMID: 19620237.
247. Hu SS, Mackie K. Distribution of the Endocannabinoid System in the Central Nervous System. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;231:59-93. doi: 10.1007/978-3-319-20825-1_3. PMID: 26408158.
248. Glass M, Felder CC. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci.* 1997 Jul 15;17(14):5327-33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-14-05327.1997. PMID: 9204917; PMCID: PMC6793808.
249. Eldeeb K, Leone-Kabler S, Howlett AC. CB1 cannabinoid receptor-mediated increases in cyclic AMP accumulation are correlated with reduced Gi/o function. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2016 May 1;27(3):311-22. doi: 10.1515/jbcpp-2015-0096. PMID: 27089415; PMCID: PMC5497837.
250. Lauckner JE, Hille B, Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 27;102(52):19144-9. doi: 10.1073/pnas.0509588102. Epub 2005 Dec 19. PMID: 16365309; PMCID: PMC1323208.
251. Donvito G, Nass SR, Wilkerson JL, Curry ZA, Schurman LD, Kinsey SG, et al. The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. *Neuropsychopharmacology.* 2018 Jan;43(1):52-79. doi: 10.1038/npp.2017.204. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28857069; PMCID: PMC5719110.
252. Novotna A, Mares J, Ratcliffe S, Novakova I, Vachova M, Zapletalova O, et al; Sativex Spasticity Study Group. A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols* (Sativex®), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. *Eur J Neurol.* 2011 Sep;18(9):1122-31. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03328.x. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21362108.
253. Basavarajappa BS, Shivakumar M, Joshi V, Subbanna S. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *J Neurochem.* 2017 Sep;142(5):624-648. doi: 10.1111/jnc.14098. Epub 2017 Jul 5. PMID: 28608560; PMCID: PMC5669051.
254. Chagas MH, Zuardi AW, Tumas V, Pena-Pereira MA, Sobreira ET, Bergamaschi MM, et al. Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *J Psychopharmacol.* 2014 Nov;28(11):1088-98. doi: 10.1177/0269881114550355. Epub 2014 Sep 18. PMID: 25237116.
255. Sieradzan KA, Fox SH, Hill M, Dick JP, Crossman AR, Brotchie JM. Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. *Neurology.* 2001 Dec 11;57(11):2108-11. doi: 10.1212/wnl.57.11.2108. PMID: 11739835.
256. Smith TH, Sim-Selley LJ, Selley DE. Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins: novel targets for central nervous system drug discovery? *Br J Pharmacol.* 2010 Jun;160(3):454-66. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00777.x. PMID: 20590557; PMCID: PMC2931548.



257. Jing L, Qiu Y, Zhang Y, Li JX. Effects of the cannabinoid CB₁ receptor allosteric modulator ORG 27569 on reinstatement of cocaine- and methamphetamine-seeking behavior in rats. *Drug Alcohol Depend.* 2014 Oct 1;143:251-6. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.08.004. Epub 2014 Aug 17. PMID: 25169627; PMCID: PMC4161648.
258. Hay GL, Baracz SJ, Everett NA, Roberts J, Costa PA, Arnold JC, et al. Cannabidiol treatment reduces the motivation to self-administer methamphetamine and methamphetamine-primed relapse in rats. *J Psychopharmacol.* 2018 Dec;32(12):1369-1378. doi: 10.1177/0269881118799954. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30260267.
259. Ferré S, Lluís C, Justinova Z, Quiroz C, Orru M, Navarro G, et al. Adenosine-cannabinoid receptor interactions. Implications for striatal function. *Br J Pharmacol.* 2010 Jun;160(3):443-53. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00723.x. PMID: 20590556; PMCID: PMC2931547.
260. Tebano MT, Martire A, Popoli P. Adenosine A(2A)-cannabinoid CB(1) receptor interaction: an integrative mechanism in striatal glutamatergic neurotransmission. *Brain Res.* 2012 Oct 2;1476:108-18. doi: 10.1016/j.brainres.2012.04.051. Epub 2012 May 4. PMID: 22565012.
261. Franco R, Ferré S, Agnati L, Torvinen M, Ginés S, Hillion J, et al. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology.* 2000 Oct;23(4 Suppl):S50-9. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00144-5. PMID: 11008067.
262. Ferreira SG, Gonçalves FQ, Marques JM, Tomé ÂR, Rodrigues RJ, Nunes-Correia I, et al. Presynaptic adenosine A2A receptors dampen cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of corticostriatal glutamatergic transmission. *Br J Pharmacol.* 2015 Feb;172(4):1074-86. doi: 10.1111/bph.12970. Epub 2015 Jan 12. PMID: 25296982; PMCID: PMC4314196.
263. Carriba P, Ortiz O, Patkar K, Justinova Z, Stroik J, Themann A, et al. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology.* 2007 Nov;32(11):2249-59. doi: 10.1038/sj.npp.1301375. Epub 2007 Mar 14. PMID: 17356572.
264. Chiodi V, Ferrante A, Ferraro L, Potenza RL, Armida M, Beggiato S, et al. Striatal adenosine-cannabinoid receptor interactions in rats over-expressing adenosine A2A receptors. *J Neurochem.* 2016 Mar;136(5):907-17. doi: 10.1111/jnc.13421. Epub 2015 Nov 24. PMID: 26526685.
265. Tebano MT, Martire A, Chiodi V, Peponi R, Ferrante A, Domenici MR, et al. Adenosine A2A receptors enable the synaptic effects of cannabinoid CB1 receptors in the rodent striatum. *J Neurochem.* 2009 Sep;110(6):1921-30. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06282.x. Epub 2009 Jul 17. PMID: 19627447.
266. Andersson M, Usiello A, Borgkvist A, Pozzi L, Dominguez C, Fienberg AA, et al. Cannabinoid action depends on phosphorylation of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa at the protein kinase A site in striatal projection neurons. *J Neurosci.* 2005 Sep 14;25(37):8432-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1289-05.2005. PMID: 16162925; PMCID: PMC6725667.
267. Soria G, Castañé A, Berrendero F, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, et al. Adenosine A2A receptors are involved in physical dependence and place conditioning induced by THC. *Eur J Neurosci.* 2004 Oct;20(8):2203-13. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03682.x. PMID: 15450100.
268. Köfalvi A, Moreno E, Cordoní A, Cai NS, Fernández-Dueñas V, Ferreira SG, et al. Control of glutamate release by complexes of adenosine and cannabinoid receptors. *BMC Biol.* 2020 Jan 23;18(1):9. doi: 10.1186/s12915-020-0739-0. PMID: 31973708; PMCID: PMC6979073.
269. Tozzi A, de Iure A, Marsili V, Romano R, Tantucci M, Di Filippo M, et al. A2A adenosine receptor antagonism enhances synaptic and motor effects of cocaine via CB1 cannabinoid receptor activation. *PLoS One.* 2012;7(6):e38312. doi: 10.1371/journal.pone.0038312. Epub 2012 Jun 8. PMID: 22715379; PMCID: PMC3371006.
270. Kampman KM. The treatment of cocaine use disorder. *Sci Adv.* 2019 Oct 16;5(10):eaax1532. doi: 10.1126/sciadv.aax1532. PMID: 31663022; PMCID: PMC6795516.

6. Bibliografía

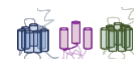


271. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Jan;35(1):217-38. doi: 10.1038/npp.2009.110. Erratum in: *Neuropsychopharmacology*. 2010 Mar;35(4):1051. PMID: 19710631; PMCID: PMC2805560.
272. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry*. 2016 Aug;3(8):760-773. doi: 10.1016/S2215-0366(16)00104-8. PMID: 27475769; PMCID: PMC6135092.
273. Volkow ND, Michaelides M, Baler R. The Neuroscience of Drug Reward and Addiction. *Physiol Rev*. 2019 Oct 1;99(4):2115-2140. doi: 10.1152/physrev.00014.2018. PMID: 31507244; PMCID: PMC6890985.
274. NIDA. "Las drogas y el cerebro." *National Institute on Drug Abuse*, 2 Sep. 2020, <https://www.drugabuse.gov/es/publicaciones/las-drogas-el-cerebro-y-la-conducta-la-ciencia-de-la-adiccion/las-drogas-y-el-cerebro> Accedido 11 Jun. 2021.
275. Diana M. The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Front Psychiatry*. 2011 Nov 29;2:64. doi: 10.3389/fpsyt.2011.00064. PMID: 22144966; PMCID: PMC3225760.
276. Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*. 2004 Aug 13;305(5686):1014-7. doi: 10.1126/science.1099020. PMID: 15310906.
277. Solinas M, Belujon P, Fernagut PO, Jaber M, Thiriet N. Dopamine and addiction: what have we learned from 40 years of research. *J Neural Transm (Vienna)*. 2019 Apr;126(4):481-516. doi: 10.1007/s00702-018-1957-2. Epub 2018 Dec 19. PMID: 30569209.
278. Ministerio de Sanidad. Informe 2020 sobre Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España.
279. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *European Drug Report 2020. Trends and Developments*. 2020. doi: 10.2810/420678.
280. El-Bassel N, Shaw SA, Dasgupta A, Strathdee SA. Drug use as a driver of HIV risks: re-emerging and emerging issues. *Curr Opin HIV AIDS*. 2014 Mar;9(2):150-5. doi: 10.1097/COH.000000000000035. PMID: 24406532; PMCID: PMC4112554.
281. Chen CY, Storr CL, Anthony JC. Early-onset drug use and risk for drug dependence problems. *Addict Behav*. 2009 Mar;34(3):319-22. doi: 10.1016/j.addbeh.2008.10.021. Epub 2008 Nov 1. PMID: 19022584; PMCID: PMC2677076.
282. Zou Z, Wang H, d'Oleire Uquillas F, Wang X, Ding J, Chen H. Definition of Substance and Non-substance Addiction. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1010:21-41. doi: 10.1007/978-981-10-5562-1_2. PMID: 29098666.
283. Jain S, Srivastava AS, Verma RP, Maggu G. Caffeine addiction: Need for awareness and research and regulatory measures. *Asian J Psychiatr*. 2019 Mar;41:73-75. doi: 10.1016/j.ajp.2017.01.008. Epub 2017 Feb 4. PMID: 28174076.
284. Prochaska JJ, Benowitz NL. Current advances in research in treatment and recovery: Nicotine addiction. *Sci Adv*. 2019 Oct 16;5(10):eaay9763. doi: 10.1126/sciadv.aay9763. PMID: 31663029; PMCID: PMC6795520.
285. Maxwell AL, Gardiner E, Loxton NJ. Investigating the relationship between reward sensitivity, impulsivity, and food addiction: A systematic review. *Eur Eat Disord Rev*. 2020 Jul;28(4):368-384. doi: 10.1002/erv.2732. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32142199.
286. Pettorruso M, Zoratto F, Miuli A, De Risio L, Santorelli M, Pierotti A, et al. Exploring dopaminergic transmission in gambling addiction: A systematic translational review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2020 Dec;119:481-511. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.09.034. Epub 2020 Oct 6. PMID: 33035523.
287. Wang Y, Qin Y, Li H, Yao D, Sun B, Li Z, et al. The Modulation of Reward and Habit Systems by Acupuncture in Adolescents with Internet Addiction. *Neural Plast*. 2020 Mar 13;2020:7409417. doi: 10.1155/2020/7409417. PMID: 32256558; PMCID: PMC7094193.
288. Urbán R, Kun B, Mózes T, Soltész P, Paksi B, Farkas J, et al. A Four-Factor Model of Work Addiction: The Development of the Work Addiction Risk Test Revised. *Eur Addict Res*. 2019;25(3):145-160. doi: 10.1159/000499672. Epub 2019 Apr 12. PMID: 30982051.
289. Carnes S, Love T. Separating Models Obscures the Scientific Underpinnings of Sex Addiction as a Disorder. *Arch Sex Behav*. 2017 Nov;46(8):2253-2256. doi: 10.1007/s10508-017-1072-8. Epub 2017 Sep 25. PMID: 28948394.



290. Organization mundial de la salud y Ministerio de Salud. Glosario de términos de alcohol y drogas. 2008;
291. Scully C. Substance dependence. In: Scully C, editor. Scully's Medical Promens in Dentistry. Seventh Ed. 2014. p. 749–73. ISBN: 97807020065767.
292. Johnson MW, Hendricks PS, Barrett FS, Griffiths RR. Classic psychedelics: An integrative review of epidemiology, therapeutics, mystical experience, and brain network function. *Pharmacol Ther.* 2019 May;197:83-102. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.11.010. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30521880.
293. Chesworth R, Brown RM, Kim JH, Ledent C, Lawrence AJ. Adenosine 2A receptors modulate reward behaviours for methamphetamine. *Addict Biol.* 2016 Mar;21(2):407-21. doi: 10.1111/adb.12225. Epub 2015 Jan 22. PMID: 25612195.
294. Goode TD, Maren S. Common neurocircuitry mediating drug and fear relapse in preclinical models. *Psychopharmacology (Berl).* 2019 Jan;236(1):415-437. doi: 10.1007/s00213-018-5024-3. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30255379; PMCID: PMC6373193.
295. Goldstein RA, DesLauriers C, Burda A, Johnson-Arbor K. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. *Semin Diagn Pathol.* 2009 Feb;26(1):10-7. doi: 10.1053/j.semmp.2008.12.001. PMID: 19292024.
296. Calatayud J, González A. History of the development and evolution of local anesthesia since the coca leaf. *Anesthesiology.* 2003 Jun;98(6):1503-8. doi: 10.1097/0000542-200306000-00031. PMID: 12766665.
297. Spronk DB, van Wel JH, Ramaekers JG, Verkes RJ. Characterizing the cognitive effects of cocaine: a comprehensive review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013 Sep;37(8):1838-59. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.07.003. Epub 2013 Jul 20. PMID: 23876288.
298. Riezzo I, Fiore C, De Carlo D, Pascale N, Neri M, Turillazzi E, et al. Side effects of cocaine abuse: multiorgan toxicity and pathological consequences. *Curr Med Chem.* 2012;19(33):5624-46. doi: 10.2174/092986712803988893. PMID: 22934772.
299. UNODC. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Terminología e información sobre drogas. Tercera edición. 2018. ISBN:978-92-1-0045775-0.
300. Lee MR. The history of Ephedra (ma-huang). *J R Coll Physicians Edinb.* 2011 Mar;41(1):78-84. doi: 10.4997/JRCPE.2011.116. PMID: 21365072.
301. Rasmussen N. Amphetamine-Type Stimulants: The Early History of Their Medical and Non-Medical Uses. *Int Rev Neurobiol.* 2015;120:9-25. doi: 10.1016/bs.irn.2015.02.001. Epub 2015 Mar 17. PMID: 26070751.
302. Chomchai C, Chomchai S. Global patterns of methamphetamine use. *Curr Opin Psychiatry.* 2015 Jul;28(4):269-74. doi: 10.1097/YCO.000000000000168. PMID: 26001916.
303. Heal DJ, Smith SL, Gosden J, Nutt DJ. Amphetamine, past and present--a pharmacological and clinical perspective. *J Psychopharmacol.* 2013 Jun;27(6):479-96. doi: 10.1177/0269881113482532. Epub 2013 Mar 28. PMID: 23539642; PMCID: PMC3666194.
304. Kish SJ. Pharmacologic mechanisms of crystal meth. *CMAJ.* 2008 Jun 17;178(13):1679-82. doi: 10.1503/cmaj.071675. PMID: 18559805; PMCID: PMC2413312.
305. National Institute on Drug Abuse (NIDA). Methamphetamine Research Report [Internet]. NIH Publication. 2019. Available from: <https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/methrrs.pdf>
306. Chiu VM, Schenk JO. Mechanism of action of methamphetamine within the catecholamine and serotonin areas of the central nervous system. *Curr Drug Abuse Rev.* 2012 Sep;5(3):227-42. doi: 10.2174/1874473711205030227. PMID: 22998621.
307. Panenka WJ, Procyshyn RM, Lecomte T, MacEwan GW, Flynn SW, Honer WG, et al. Methamphetamine use: a comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. *Drug Alcohol Depend.* 2013 May 1;129(3):167-79. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2012.11.016. Epub 2012 Dec 27. PMID: 23273775.
308. Glasner-Edwards S, Mooney LJ. Methamphetamine psychosis: epidemiology and management. *CNS Drugs.* 2014 Dec;28(12):1115-26. doi: 10.1007/s40263-014-0209-8. PMID: 25373627; PMCID: PMC5027896.

6. Bibliografía

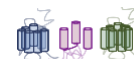


309. McKetin R, Dean OM, Baker AL, Carter G, Turner A, Kelly PJ, et al. A potential role for N-acetylcysteine in the management of methamphetamine dependence. *Drug Alcohol Rev.* 2017 Mar;36(2):153-159. doi: 10.1111/dar.12414. Epub 2016 May 30. PMID: 27241765.
310. Courtney KE, Ray LA. Methamphetamine: an update on epidemiology, pharmacology, clinical phenomenology, and treatment literature. *Drug Alcohol Depend.* 2014 Oct 1;143:11-21. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.08.003. Epub 2014 Aug 17. PMID: 25176528; PMCID: PMC4164186.
311. Büttner A. Review: The neuropathology of drug abuse. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011 Feb;37(2):118-34. doi: 10.1111/j.1365-2990.2010.01131.x. PMID: 20946118.
312. MacNicol B. The biology of addiction. *Can J Anaesth.* 2017 Feb;64(2):141-148. English. doi: 10.1007/s12630-016-0771-2. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27837404.
313. Huang X, Gu HH, Zhan CG. Mechanism for cocaine blocking the transport of dopamine: insights from molecular modeling and dynamics simulations. *J Phys Chem B.* 2009 Nov 12;113(45):15057-66. doi: 10.1021/jp900963n. PMID: 19831380; PMCID: PMC2774931.
314. Sambo DO, Lebowitz JJ, Khoshbouei H. The sigma-1 receptor as a regulator of dopamine neurotransmission: A potential therapeutic target for methamphetamine addiction. *Pharmacol Ther.* 2018 Jun;186:152-167. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.01.009. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29360540; PMCID: PMC5962385.
315. Nguyen EC, McCracken KA, Liu Y, Pouw B, Matsumoto RR. Involvement of sigma (sigma) receptors in the acute actions of methamphetamine: receptor binding and behavioral studies. *Neuropharmacology.* 2005 Oct;49(5):638-45. doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.04.016. PMID: 15939443.
316. Navarro G, Moreno E, Bonaventura J, Brugarolas M, Farré D, Aguinaga D, et al. Cocaine inhibits dopamine D2 receptor signaling via sigma-1-D2 receptor heteromers. *PLoS One.* 2013 Apr 18;8(4):e61245. doi: 10.1371/journal.pone.0061245. PMID: 23637801; PMCID: PMC3630156.
317. Moreno E, Hoffmann H, Gonzalez-Sepúlveda M, Navarro G, Casadó V, Cortés A, et al. Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J Biol Chem.* 2011 Feb 18;286(7):5846-54. doi: 10.1074/jbc.M110.161489. Epub 2010 Dec 20. PMID: 21173143; PMCID: PMC3037697.
318. Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther.* 1976 Jun;197(3):517-32. PMID: 945347.
319. Su TP. Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 1982 Nov;223(2):284-90. PMID: 6290634.
320. Hellewell SB, Bowen WD. A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain. *Brain Res.* 1990 Sep 17;527(2):244-53. doi: 10.1016/0006-8993(90)91143-5. PMID: 2174717.
321. Schmidt HR, Kruse AC. The Molecular Function of σ Receptors: Past, Present, and Future. *Trends Pharmacol Sci.* 2019 Sep;40(9):636-654. doi: 10.1016/j.tips.2019.07.006. Epub 2019 Aug 3. PMID: 31387763; PMCID: PMC6748033.
322. Schmidt HR, Betz RM, Dror RO, Kruse AC. Structural basis for σ 1 receptor ligand recognition. *Nat Struct Mol Biol.* 2018 Oct;25(10):981-987. doi: 10.1038/s41594-018-0137-2. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30291362; PMCID: PMC6261271.
323. Pohl P, Zhou GZ. Steroid binding at c-"Opioid" receptors. *Science.* 1989 Dec; 246: 1635-1637.
324. Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB, Ruoho AE. The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator. *Science.* 2009 Feb 13;323(5916):934-7. doi: 10.1126/science.1166127. PMID: 19213917; PMCID: PMC2947205.



325. Nichols DE. N,N-dimethyltryptamine and the pineal gland: Separating fact from myth. *J Psychopharmacol.* 2018 Jan;32(1):30-36. doi: 10.1177/0269881117736919. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29095071.
326. Brailoiu E, Chakraborty S, Brailoiu GC, Zhao P, Barr JL, Ilies MA, et al. Choline Is an Intracellular Messenger Linking Extracellular Stimuli to IP3-Evoked Ca²⁺ Signals through Sigma-1 Receptors. *Cell Rep.* 2019 Jan 8;26(2):330-337.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.051. PMID: 30625315; PMCID: PMC6326163.
327. Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee SA, Cavendish JZ, Robson MJ, Scandinaro AL, et al. Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci.* 2015 Jan;127(1):17-29. doi: 10.1016/j.jphs.2014.12.005. Epub 2014 Dec 11. PMID: 25704014.
328. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell.* 2007 Nov 2;131(3):596-610. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.036. PMID: 17981125.
329. Su TP, Wu XZ, Cone EJ, Shukla K, Gund TM, Dodge AL, et al. Sigma compounds derived from phencyclidine: identification of PRE-084, a new, selective sigma ligand. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991 Nov;259(2):543-50. PMID: 1658302.
330. Motawe ZY, Abdelmaboud SS, Cuevas J, Breslin JW. PRE-084 as a tool to uncover potential therapeutic applications for selective sigma-1 receptor activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2020 Sep;126:105803. doi: 10.1016/j.biocel.2020.105803. Epub 2020 Jul 12. PMID: 32668330; PMCID: PMC7484451.
331. Akunne HC, Whetzel SZ, Wiley JN, Corbin AE, Ninteman FW, Teclé H, et al. The pharmacology of the novel and selective sigma ligand, PD 144418. *Neuropharmacology.* 1997 Jan;36(1):51-62. doi: 10.1016/s0028-3908(96)00161-x. PMID: 9144641.
332. Tapia MA, Lee JR, Gereau GB, Moore JM, Weise VN, Mason KL, et al. Sigma-1 receptor antagonist PD144418 suppresses food reinforced operant responding in rats. *Behav Brain Res.* 2019 Apr 19;362:71-76. doi: 10.1016/j.bbr.2019.01.011. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30639509.
333. Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, et al. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 23;93(15):8072-7. doi: 10.1073/pnas.93.15.8072. PMID: 8755605; PMCID: PMC38877.
334. Schmidt HR, Zheng S, Gurpinar E, Koehl A, Manglik A, Kruse AC. Crystal structure of the human σ_1 receptor. *Nature.* 2016 Apr 28;532(7600):527-30. doi: 10.1038/nature17391. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27042935; PMCID: PMC5550834.
335. Langa F, Codony X, Tovar V, Lavado A, Giménez E, Cozar P, et al. Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma 1) knockout mice. *Eur J Neurosci.* 2003 Oct;18(8):2188-96. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02950.x. PMID: 14622179.
336. Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendán CM, Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr Neuropharmacol.* 2008 Dec;6(4):344-66. doi: 10.2174/157015908787386113. PMID: 19587856; PMCID: PMC2701284.
337. Weng TY, Tsai SA, Su TP. Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases. *J Biomed Sci.* 2017 Sep 16;24(1):74. doi: 10.1186/s12929-017-0380-6. PMID: 28917260; PMCID: PMC5603014.
338. Su TP, Su TC, Nakamura Y, Tsai SY. The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Apr;37(4):262-278. doi: 10.1016/j.tips.2016.01.003. Epub 2016 Feb 9. PMID: 26869505; PMCID: PMC4811735.
339. Srivats S, Balasuriya D, Pasche M, Vistal G, Edwardson JM, Taylor CW, et al. Sigma1 receptors inhibit store-operated Ca²⁺ entry by attenuating coupling of STIM1 to Orai1. *J Cell Biol.* 2016 Apr 11;213(1):65-79. doi: 10.1083/jcb.201506022. PMID: 27069021; PMCID: PMC4828687.
340. Tsai SY, Pokrass MJ, Klauer NR, De Credico NE, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Expert Opin Ther Targets.* 2014 Dec;18(12):1461-76. doi: 10.1517/14728222.2014.972939. Epub 2014 Oct 21. PMID: 25331742; PMCID: PMC5518923.

6. Bibliografia



341. Alon A, Schmidt HR, Wood MD, Sahn JJ, Martin SF, Kruse AC. Identification of the gene that codes for the σ_2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jul 3;114(27):7160-7165. doi: 10.1073/pnas.1705154114. Epub 2017 May 30. PMID: 28559337; PMCID: PMC5502638.
342. Kim FJ. Introduction to Sigma Proteins: Evolution of the Concept of Sigma Receptors. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;244:1-11. doi: 10.1007/164_2017_41. PMID: 28871306.
343. Zeng C, Riad A, Mach RH. The Biological Function of Sigma-2 Receptor/TMEM97 and Its Utility in PET Imaging Studies in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 13;12(7):1877. doi: 10.3390/cancers12071877. PMID: 32668577; PMCID: PMC7409002.
344. Xu J, Zeng C, Chu W, Pan F, Rothfuss JM, Zhang F, et al. Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site. *Nat Commun*. 2011 Jul 5;2:380. doi: 10.1038/ncomms1386. PMID: 21730960; PMCID: PMC3624020.
345. van Waarde A, Rybczynska AA, Ramakrishnan NK, Ishiwata K, Elsinga PH, Dierckx RA. Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Oct;1848(10 Pt B):2703-14. doi: 10.1016/j.bbame.2014.08.022. Epub 2014 Aug 27. PMID: 25173780.
346. Chu UB, Mavlyutov TA, Chu ML, Yang H, Schulman A, Mesangeau C, et al. The Sigma-2 Receptor and Progesterone Receptor Membrane Component 1 are Different Binding Sites Derived From Independent Genes. *EBioMedicine*. 2015 Oct 19;2(11):1806-13. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.10.017. PMID: 26870805; PMCID: PMC4740303.
347. Blass BE, Rogers JP. The sigma-2 (σ_2) receptor: a review of recent patent applications: 2013-2018. *Expert Opin Ther Pat*. 2018 Sep;28(9):655-663. doi: 10.1080/13543776.2018.1519024. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30185082.
348. Kim FJ, Maher CM. Sigma1 Pharmacology in the Context of Cancer. *Handb Exp Pharmacol*. 2017;244:237-308. doi: 10.1007/164_2017_38. PMID: 28744586.
349. Shen YC, Wang YH, Chou YC, Liou KT, Yen JC, Wang WY, et al. Dimemorfan protects rats against ischemic stroke through activation of sigma-1 receptor-mediated mechanisms by decreasing glutamate accumulation. *J Neurochem*. 2008 Jan;104(2):558-72. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05058.x. PMID: 18173806.
350. Zamanillo D, Romero L, Merlos M, Vela JM. Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain. *Eur J Pharmacol*. 2013 Sep 15;716(1-3):78-93. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.068. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23500210.
351. Vavers E, Svalbe B, Lauberte L, Stonans I, Misane I, Dambrova M, et al. The activity of selective sigma-1 receptor ligands in seizure models in vivo. *Behav Brain Res*. 2017 Jun 15;328:13-18. doi: 10.1016/j.bbr.2017.04.008. Epub 2017 Apr 4. PMID: 28389336.
352. Sabino V, Cottone P, Parylak SL, Steardo L, Zorrilla EP. Sigma-1 receptor knockout mice display a depressive-like phenotype. *Behav Brain Res*. 2009 Mar 17;198(2):472-6. doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.036. Epub 2008 Nov 30. PMID: 19100292; PMCID: PMC2667953.
353. Herrando-Grabulosa M, Gaja-Capdevila N, Vela JM, Navarro X. Sigma 1 receptor as a therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis. *Br J Pharmacol*. 2021 Mar;178(6):1336-1352. doi: 10.1111/bph.15224. Epub 2020 Sep 1. PMID: 32761823.
354. Francardo V, Bez F, Wieloch T, Nissbrandt H, Ruscher K, Cenci MA. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain*. 2014 Jul;137(Pt 7):1998-2014. doi: 10.1093/brain/awu107. Epub 2014 Apr 22. PMID: 24755275.
355. Hyrskyluoto A, Pulli I, Törnqvist K, Ho TH, Korhonen L, Lindholm D. Sigma-1 receptor agonist PRE084 is protective against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of calpastatin and the NF- κ B pathway. *Cell Death Dis*. 2013 May 23;4(5):e646. doi: 10.1038/cddis.2013.170. PMID: 23703391; PMCID: PMC3674377.
356. Zeng C, Mach RH. The Evolution of the Sigma-2 (σ_2) Receptor from Obscure Binding Site to Bona Fide Therapeutic Target. *Adv Exp Med Biol*. 2017;964:49-61. doi: 10.1007/978-3-319-50174-1_5. PMID: 28315264.
357. Liu CC, Yu CF, Wang SC, Li HY, Lin CM, Wang HH, et al. Sigma-2 receptor/TMEM97 agonist PB221 as an alternative drug for brain tumor. *BMC Cancer*. 2019 May 20;19(1):473. doi: 10.1186/s12885-019-5700-7. PMID: 31109310; PMCID: PMC6528305.



358. Wang L, Zhang Y, Wang C, Zhang X, Wang Z, Liang X, et al. A Natural Product with High Affinity to Sigma and 5-HT₇ Receptors as Novel Therapeutic Drug for Negative and Cognitive Symptoms of Schizophrenia. *Neurochem Res.* 2019 Nov;44(11):2536-2545. doi: 10.1007/s11064-019-02873-7. Epub 2019 Sep 16. PMID: 31529334.
359. Cai Y, Yang L, Niu F, Liao K, Buch S. Role of Sigma-1 Receptor in Cocaine Abuse and Neurodegenerative Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2017;964:163-175. doi: 10.1007/978-3-319-50174-1_12. PMID: 28315271.
360. Tapia MA, Sage AS, Fullerton EI, Judd JM, Hildebrandt PC, Will MJ, et al. The sigma receptor ligand N-phenylpropyl-N'-(4-methoxyphenethyl)3piperazine (YZ-067) enhances the cocaine conditioned-rewarding properties while inhibiting the development of sensitization of cocaine in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2020 Mar;237(3):723-734. doi: 10.1007/s00213-019-05411-z. Epub 2019 Dec 10. PMID: 31822924.
361. Klawonn AM, Nilsson A, Rådberg CF, Lindström SH, Ericson M, Granseth B, et al. The Sigma-2 Receptor Selective Agonist Siramesine (Lu 28-179) Decreases Cocaine-Reinforced Pavlovian Learning and Alters Glutamatergic and Dopaminergic Input to the Striatum. *Front Pharmacol.* 2017 Oct 10;8:714. doi: 10.3389/fphar.2017.00714. PMID: 29066971; PMCID: PMC5641388.
362. Tapia MA, Lever JR, Lever SZ, Will MJ, Park ES, Miller DK. Sigma-1 receptor ligand PD144418 and sigma-2 receptor ligand YUN-252 attenuate the stimulant effects of methamphetamine in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2019 Nov;236(11):3147-3158. doi: 10.1007/s00213-019-05268-2. Epub 2019 May 28. PMID: 31139878.
363. Matsumoto RR, McCracken KA, Pouw B, Miller J, Bowen WD, Williams W, et al. N-alkyl substituted analogs of the sigma receptor ligand BD1008 and traditional sigma receptor ligands affect cocaine-induced convulsions and lethality in mice. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jan 12;411(3):261-73. doi: 10.1016/s0014-2999(00)00917-1. PMID: 11164383.
364. Matsumoto RR, Liu Y, Lerner M, Howard EW, Brackett DJ. Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur J Pharmacol.* 2003 May 23;469(1-3):1-12. doi: 10.1016/s0014-2999(03)01723-0. PMID: 12782179.
365. Nuwayhid SJ, Werling LL. Sigma2 (sigma2) receptors as a target for cocaine action in the rat striatum. *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 27;535(1-3):98-103. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.12.077. Epub 2006 Feb 15. PMID: 16480713.
366. Matsumoto RR, Hewett KL, Pouw B, Bowen WD, Husbands SM, Cao JJ, et al. Rimcazole analogs attenuate the convulsive effects of cocaine: correlation with binding to sigma receptors rather than dopamine transporters. *Neuropharmacology.* 2001 Dec;41(7):878-86. doi: 10.1016/s0028-3908(01)00116-2. PMID: 11684152.
367. Lever JR, Miller DK, Green CL, Ferguson-Cantrell EA, Watkinson LD, Carmack TL, et al. A selective sigma-2 receptor ligand antagonizes cocaine-induced hyperlocomotion in mice. *Synapse.* 2014 Feb;68(2):73-84. doi: 10.1002/syn.21717. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24123353.
368. Hedges DM, Obray JD, Yorgason JT, Jang EY, Weerasekara VK, Uys JD, et al. Methamphetamine Induces Dopamine Release in the Nucleus Accumbens Through a Sigma Receptor-Mediated Pathway. *Neuropsychopharmacology.* 2018 May;43(6):1405-1414. doi: 10.1038/npp.2017.291. Epub 2017 Nov 29. PMID: 29185481; PMCID: PMC5916361.
369. Kaushal N, Matsumoto RR. Role of sigma receptors in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Curr Neuropharmacol.* 2011 Mar;9(1):54-7. doi: 10.2174/157015911795016930. PMID: 21886562; PMCID: PMC3137201.
370. Chao J, Zhang Y, Du L, Zhou R, Wu X, Shen K, et al. Molecular mechanisms underlying the involvement of the sigma-1 receptor in methamphetamine-mediated microglial polarization. *Sci Rep.* 2017 Sep 14;7(1):11540. doi: 10.1038/s41598-017-11065-8. Erratum in: *Sci Rep.* 2021 Mar 11;11(1):6142. PMID: 28912535; PMCID: PMC5599501.
371. Matsumoto RR, Nguyen L, Kaushal N, Robson MJ. Sigma (σ) receptors as potential therapeutic targets to mitigate psychostimulant effects. *Adv Pharmacol.* 2014;69:323-86. doi: 10.1016/B978-0-12-420118-7.00009-3. PMID: 24484982.



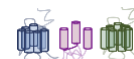
6. Bibliografia

372. Yasui Y, Su TP. Potential Molecular Mechanisms on the Role of the Sigma-1 Receptor in the Action of Cocaine and Methamphetamine. *J Drug Alcohol Res.* 2016 Feb 20;5:235970. doi: 10.4303/jdar/235970. PMID: 27088037; PMCID: PMC4830437.
373. Liu JF, Li JX. Drug addiction: a curable mental disorder? *Acta Pharmacol Sin.* 2018 Dec;39(12):1823-1829. doi: 10.1038/s41401-018-0180-x. Epub 2018 Oct 31. PMID: 30382181; PMCID: PMC6289334.
374. Chan B, Freeman M, Kondo K, Ayers C, Montgomery J, Paynter R, et al. Pharmacotherapy for methamphetamine/amphetamine use disorder-a systematic review and meta-analysis. *Addiction.* 2019 Dec;114(12):2122-2136. doi: 10.1111/add.14755. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31328345.
375. Liu JF, Tian J, Li JX. Modulating reconsolidation and extinction to regulate drug reward memory. *Eur J Neurosci.* 2019 Aug;50(3):2503-2512. doi: 10.1111/ejn.14072. Epub 2018 Aug 16. PMID: 30113098; PMCID: PMC6377866.
376. Jordan CJ, Cao J, Newman AH, Xi ZX. Progress in agonist therapy for substance use disorders: Lessons learned from methadone and buprenorphine. *Neuropharmacology.* 2019 Nov 1;158:107609. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.04.015. Epub 2019 Apr 19. PMID: 31009632; PMCID: PMC6745247.
377. Brandt L, Chao T, Comer SD, Levin FR. Pharmacotherapeutic strategies for treating cocaine use disorder-what do we have to offer? *Addiction.* 2021 Apr;116(4):694-710. doi: 10.1111/add.15242. Epub 2020 Sep 28. PMID: 32888245; PMCID: PMC7930140.
378. Petry NM. Contingency management: what it is and why psychiatrists should want to use it. *Psychiatrist.* 2011 May;35(5):161-163. doi: 10.1192/pb.bp.110.031831. PMID: 22558006; PMCID: PMC3083448.
379. De Crescenzo F, Ciabattini M, D'Alò GL, De Giorgi R, Del Giovane C, Cassar C, et al. Comparative efficacy and acceptability of psychosocial interventions for individuals with cocaine and amphetamine addiction: A systematic review and network meta-analysis. *PLoS Med.* 2018 Dec 26;15(12):e1002715. doi: 10.1371/journal.pmed.1002715. PMID: 30586362; PMCID: PMC6306153.
380. Petry NM, Barry D, Alessi SM, Rounsaville BJ, Carroll KM. A randomized trial adapting contingency management targets based on initial abstinence status of cocaine-dependent patients. *J Consult Clin Psychol.* 2012 Apr;80(2):276-85. doi: 10.1037/a0026883. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22229758; PMCID: PMC3668312.
381. Higgins ST, Wong CJ, Badger GJ, Ogden DE, Dantona RL. Contingent reinforcement increases cocaine abstinence during outpatient treatment and 1 year of follow-up. *J Consult Clin Psychol.* 2000 Feb;68(1):64-72. doi: 10.1037//0022-006x.68.1.64. PMID: 10710841.
382. Rawson RA, McCann MJ, Flammino F, Shoptaw S, Miotto K, Reiber C, et al. A comparison of contingency management and cognitive-behavioral approaches for stimulant-dependent individuals. *Addiction.* 2006 Feb;101(2):267-74. doi: 10.1111/j.1360-0443.2006.01312.x. PMID: 16445555.
383. Carroll KM, Onken LS. Behavioral therapies for drug abuse. *Am J Psychiatry.* 2005 Aug;162(8):1452-60. doi: 10.1176/appi.ajp.162.8.1452. PMID: 16055766; PMCID: PMC3633201.
384. Rohsenow DJ, Monti PM, Martin RA, Michalec E, Abrams DB. Brief coping skills treatment for cocaine abuse: 12-month substance use outcomes. *J Consult Clin Psychol.* 2000 Jun;68(3):515-20. doi: 10.1037//0022-006x.68.3.515. PMID: 10883569.
385. Carroll KM, Rounsaville BJ, Nich C, Gordon LT, Wirtz PW, Gawin F. One-year follow-up of psychotherapy and pharmacotherapy for cocaine dependence. Delayed emergence of psychotherapy effects. *Arch Gen Psychiatry.* 1994 Dec;51(12):989-97. doi: 10.1001/archpsyc.1994.03950120061010. PMID: 7979888.
386. Grabowski J, Shearer J, Merrill J, Negus SS. Agonist-like, replacement pharmacotherapy for stimulant abuse and dependence. *Addict Behav.* 2004 Sep;29(7):1439-64. doi: 10.1016/j.addbeh.2004.06.018. PMID: 15345275
387. Wang XF, Zhao TY, Su RB, Wu N, Li J. Agmatine Prevents Adaptation of the Hippocampal Glutamate System in Chronic Morphine-Treated Rats. *Neurosci Bull.* 2016 Dec;32(6):523-



530. doi: 10.1007/s12264-016-0031-z. Epub 2016 May 9. PMID: 27161447; PMCID: PMC5563829.
388. Müller CP, Homberg JR. The role of serotonin in drug use and addiction. *Behav Brain Res.* 2015 Jan 15;277:146-92. doi: 10.1016/j.bbr.2014.04.007. Epub 2014 Apr 25. PMID: 24769172.
389. Aragona BJ, Cleaveland NA, Stuber GD, Day JJ, Carelli RM, Wightman RM. Preferential enhancement of dopamine transmission within the nucleus accumbens shell by cocaine is attributable to a direct increase in phasic dopamine release events. *J Neurosci.* 2008 Aug 27;28(35):8821-31. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2225-08.2008. PMID: 18753384; PMCID: PMC2584805.
390. Ballester J, Valentine G, Sofuoglu M. Pharmacological treatments for methamphetamine addiction: current status and future directions. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2017 Mar;10(3):305-314. doi: 10.1080/17512433.2017.1268916. Epub 2016 Dec 20. PMID: 27927042.
391. Volkow ND, Fowler JS, Logan J, Alexoff D, Zhu W, Telang F, et al. Effects of modafinil on dopamine and dopamine transporters in the male human brain: clinical implications. *JAMA.* 2009 Mar 18;301(11):1148-54. doi: 10.1001/jama.2009.351. PMID: 19293415; PMCID: PMC2696807.
392. Shearer J, Wodak A, van Beek I, Mattick RP, Lewis J. Pilot randomized double blind placebo-controlled study of dexamphetamine for cocaine dependence. *Addiction.* 2003 Aug;98(8):1137-41. doi: 10.1046/j.1360-0443.2003.00447.x. PMID: 12873248.
393. Grabowski J, Rhoades H, Schmitz J, Stotts A, Daruzska LA, Creson D, et al. Dextroamphetamine for cocaine-dependence treatment: a double-blind randomized clinical trial. *J Clin Psychopharmacol.* 2001 Oct;21(5):522-6. doi: 10.1097/00004714-200110000-00010. PMID: 11593078.
394. Hart CL, Haney M, Vosburg SK, Rubin E, Foltin RW. Smoked cocaine self-administration is decreased by modafinil. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Mar;33(4):761-8. doi: 10.1038/sj.npp.1301472. Epub 2007 Jun 13. PMID: 17568397.
395. Verrico CD, Haile CN, Mahoney JJ 3rd, Thompson-Lake DG, Newton TF, De La Garza R 2nd. Treatment with modafinil and escitalopram, alone and in combination, on cocaine-induced effects: a randomized, double blind, placebo-controlled human laboratory study. *Drug Alcohol Depend.* 2014 Aug 1;141:72-8. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.05.008. Epub 2014 May 28. PMID: 24928479; PMCID: PMC4120836.
396. Kampman KM, Lynch KG, Pettinati HM, Spratt K, Wierzbicki MR, Dackis C, et al. A double blind, placebo controlled trial of modafinil for the treatment of cocaine dependence without co-morbid alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2015 Oct 1;155:105-10. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.08.005. Epub 2015 Aug 14. PMID: 26320827; PMCID: PMC4582003.
397. Kampman KM. What's new in the treatment of cocaine addiction? *Curr Psychiatry Rep.* 2010 Oct;12(5):441-7. doi: 10.1007/s11920-010-0143-5. PMID: 20697850.
398. Nocito Echevarria MA, Andrade Reis T, Ruffo Capatti G, Siciliano Soares V, da Silveira DX, Fidalgo TM. N-acetylcysteine for treating cocaine addiction - A systematic review. *Psychiatry Res.* 2017 May;251:197-203. doi: 10.1016/j.psychres.2017.02.024. Epub 2017 Feb 11. PMID: 28213190.
399. Orson FM, Kinsey BM, Singh RA, Wu Y, Kosten TR. Vaccines for cocaine abuse. *Hum Vaccin.* 2009 Apr;5(4):194-9. doi: 10.4161/hv.5.4.7457. Epub 2009 Apr 20. PMID: 19276665; PMCID: PMC2878138.
400. Kampangkaew JP, Spellicy CJ, Nielsen EM, Harding MJ, Ye A, Hamon SC, et al. Pharmacogenetic role of dopamine transporter (SLC6A3) variation on response to disulfiram treatment for cocaine addiction. *Am J Addict.* 2019 Jul;28(4):311-317. doi: 10.1111/ajad.12891. Epub 2019 May 14. PMID: 31087723; PMCID: PMC6591035.
401. Kosten TR, Wu G, Huang W, Harding MJ, Hamon SC, Lappalainen J, et al. Pharmacogenetic randomized trial for cocaine abuse: disulfiram and dopamine β -hydroxylase. *Biol Psychiatry.*

6. Bibliografia

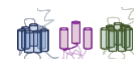


- 2013 Feb 1;73(3):219-24. doi: 10.1016/j.biopsycho.2012.07.011. Epub 2012 Aug 18. PMID: 22906516; PMCID: PMC3514624.
402. Haney M, Ward AS, Foltin RW, Fischman MW. Effects of ecopipam, a selective dopamine D1 antagonist, on smoked cocaine self-administration by humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001 Jun;155(4):330-7. doi: 10.1007/s002130100725. PMID: 11441422.
403. Shorter D, Domingo CB, Kosten TR. Emerging drugs for the treatment of cocaine use disorder: a review of neurobiological targets and pharmacotherapy. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2015 Mar;20(1):15-29. doi: 10.1517/14728214.2015.985203. Epub 2014 Nov 26. PMID: 25425416.
404. Scofield MD, Heinsbroek JA, Gipson CD, Kupchik YM, Spencer S, Smith AC, et al. The Nucleus Accumbens: Mechanisms of Addiction across Drug Classes Reflect the Importance of Glutamate Homeostasis. *Pharmacol Rev*. 2016 Jul;68(3):816-71. doi: 10.1124/pr.116.012484. PMID: 27363441; PMCID: PMC4931870.
405. Schmidt HD, Pierce RC. Cocaine-induced neuroadaptations in glutamate transmission: potential therapeutic targets for craving and addiction. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Feb;1187:35-75. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05144.x. PMID: 20201846; PMCID: PMC5413205.
406. Kampman KM, Pettinati HM, Lynch KG, Spratt K, Wierzbicki MR, O'Brien CP. A double-blind, placebo-controlled trial of topiramate for the treatment of comorbid cocaine and alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend*. 2013 Nov 1;133(1):94-9. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2013.05.026. Epub 2013 Jun 28. PMID: 23810644; PMCID: PMC3786029.
407. Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Dackis C, Sparkman T, Weigley C, et al. A pilot trial of topiramate for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend*. 2004 Sep 6;75(3):233-40. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2004.03.008. PMID: 15283944.
408. Baldaçara L, Cogo-Moreira H, Parreira BL, Diniz TA, Milhomem JJ, Fernandes CC, et al. Efficacy of topiramate in the treatment of crack cocaine dependence: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*. 2016 Mar;77(3):398-406. doi: 10.4088/JCP.14m09377. PMID: 27046312.
409. Umbricht A, DeFulio A, Winstanley EL, Tompkins DA, Peirce J, Mintzer MZ, et al. Topiramate for cocaine dependence during methadone maintenance treatment: a randomized controlled trial. *Drug Alcohol Depend*. 2014 Jul 1;140:92-100. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.03.033. Epub 2014 Apr 16. PMID: 24814607; PMCID: PMC4431633.
410. P Pirnia B, Soleimani AA, Malekanmehr P, Pirnia K, Zahiroddin A. Topiramate for the Treatment of Dually Dependent on Opiates and Cocaine: A Single-center Placebo-controlled Trial. *Iran J Public Health*. 2018 Sep;47(9):1345-1353. PMID: 30320009; PMCID: PMC6174034.
411. Nuijten M, Blanken P, van den Brink W, Hendriks V. Treatment of crack-cocaine dependence with topiramate: a randomized controlled feasibility trial in The Netherlands. *Drug Alcohol Depend*. 2014 May 1;138:177-84. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.02.024. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24629631.
412. Carroll KM, Fenton LR, Ball SA, Nich C, Frankforter TL, Shi J, et al. Efficacy of disulfiram and cognitive behavior therapy in cocaine-dependent outpatients: a randomized placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Mar;61(3):264-72. doi: 10.1001/archpsyc.61.3.264. PMID: 14993114; PMCID: PMC3675448.
413. Weinshenker D. Cocaine sobers up. *Nat Med*. 2010 Sep;16(9):969-70. doi: 10.1038/nm0910-969. PMID: 20823878.
414. Jones JL, Mateus CF, Malcolm RJ, Brady KT, Back SE. Efficacy of Ketamine in the Treatment of Substance Use Disorders: A Systematic Review. *Front Psychiatry*. 2018 Jul 24;9:277. doi: 10.3389/fpsy.2018.00277. PMID: 30140240; PMCID: PMC6094990.
415. Dakwar E, Nunes EV, Hart CL, Foltin RW, Mathew SJ, Carpenter KM, et al. A Single Ketamine Infusion Combined With Mindfulness-Based Behavioral Modification to Treat Cocaine Dependence: A Randomized Clinical Trial. *Am J Psychiatry*. 2019 Nov



- 1;176(11):923-930. doi: 10.1176/appi.ajp.2019.18101123. Epub 2019 Jun 24. PMID: 31230464.
416. Stoops WW, Rush CR. Combination pharmacotherapies for stimulant use disorder: a review of clinical findings and recommendations for future research. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2014 May;7(3):363-74. doi: 10.1586/17512433.2014.909283. Epub 2014 Apr 9. PMID: 24716825; PMCID: PMC4017926.
417. Kablinger AS, Lindner MA, Casso S, Hefti F, DeMuth G, Fox BS, et al. Effects of the combination of metyrapone and oxazepam on cocaine craving and cocaine taking: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *J Psychopharmacol*. 2012 Jul;26(7):973-81. doi: 10.1177/0269881111430745. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22236504.
418. Pettinati HM, Kampman KM, Lynch KG, Xie H, Dackis C, Rabinowitz AR, et al. A double blind, placebo-controlled trial that combines disulfiram and naltrexone for treating co-occurring cocaine and alcohol dependence. *Addict Behav*. 2008 May;33(5):651-67. doi: 10.1016/j.addbeh.2007.11.011. Epub 2007 Nov 17. PMID: 18079068; PMCID: PMC2374760.
419. Levin FR, Mariani JJ, Pavlicova M, Choi CJ, Mahony AL, Brooks DJ, et al. Extended release mixed amphetamine salts and topiramate for cocaine dependence: A randomized clinical replication trial with frequent users. *Drug Alcohol Depend*. 2020 Jan 1;206:107700. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2019.107700. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31753736; PMCID: PMC6980777.
420. Kosten T, Oliveto A, Feingold A, Poling J, Sevarino K, McCance-Katz E, et al. Desipramine and contingency management for cocaine and opiate dependence in buprenorphine maintained patients. *Drug Alcohol Depend*. 2003 Jun 5;70(3):315-25. doi: 10.1016/s0376-8716(03)00032-2. PMID: 12757969.
421. Lee NK, Jenner L, Harney A, Cameron J. Pharmacotherapy for amphetamine dependence: A systematic review. *Drug Alcohol Depend*. 2018 Oct 1;191:309-337. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.06.038. Epub 2018 Aug 22. Erratum in: *Drug Alcohol Depend*. 2018 Nov 1;192:238. PMID: 30173086.
422. Brown HD, DeFulio A. Contingency management for the treatment of methamphetamine use disorder: A systematic review. *Drug Alcohol Depend*. 2020 Nov 1;216:108307. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2020.108307. Epub 2020 Sep 21. PMID: 33007699.
423. Siefried KJ, Acheson LS, Lintzeris N, Ezard N. Pharmacological Treatment of Methamphetamine/Amphetamine Dependence: A Systematic Review. *CNS Drugs*. 2020 Apr;34(4):337-365. doi: 10.1007/s40263-020-00711-x. PMID: 32185696; PMCID: PMC7125061.
424. Ling W, Chang L, Hillhouse M, Ang A, Striebel J, Jenkins J, et al. Sustained-release methylphenidate in a randomized trial of treatment of methamphetamine use disorder. *Addiction*. 2014 Sep;109(9):1489-500. doi: 10.1111/add.12608. Epub 2014 Jul 8. PMID: 24825486; PMCID: PMC4127124.
425. Tiihonen J, Kuoppasalmi K, Föhr J, Tuomola P, Kuikanmäki O, Vormaa H, et al. A comparison of aripiprazole, methylphenidate, and placebo for amphetamine dependence. *Am J Psychiatry*. 2007 Jan;164(1):160-2. doi: 10.1176/appi.2007.164.1.160. PMID: 17202560.
426. Galloway GP, Buscemi R, Coyle JR, Flower K, Siegrist JD, Fiske LA, et al. A randomized, placebo-controlled trial of sustained-release dextroamphetamine for treatment of methamphetamine addiction. *Clin Pharmacol Ther*. 2011 Feb;89(2):276-82. doi: 10.1038/clpt.2010.307. Epub 2010 Dec 22. PMID: 21178989; PMCID: PMC3514554.
427. Mousavi SG, Sharbafchi MR, Salehi M, Peykanpour M, Karimian Sichani N, Maracy M. The efficacy of N-acetylcysteine in the treatment of methamphetamine dependence: a double-blind controlled, crossover study. *Arch Iran Med*. 2015 Jan;18(1):28-33. PMID: 25556383.
428. Elkashef A, Kahn R, Yu E, Iturriaga E, Li SH, Anderson A, et al. Topiramate for the treatment of methamphetamine addiction: a multi-center placebo-controlled trial. *Addiction*. 2012 Jul;107(7):1297-306. doi: 10.1111/j.1360-0443.2011.03771.x. Epub 2012 Feb 28. Erratum in: *Addiction*. 2012 Sep;107(9):1718. Dosage error in published abstract; MEDLINE/PubMed abstract corrected. PMID: 22221594; PMCID: PMC3331916.

6. Bibliografia



429. Anderson AL, Li SH, Biswas K, McSherry F, Holmes T, Iturriaga E, et al. Modafinil for the treatment of methamphetamine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2012 Jan 1;120(1-3):135-41. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2011.07.007. Epub 2011 Aug 12. PMID: 21840138; PMCID: PMC3227772.
430. Heinzerling KG, Swanson AN, Kim S, Cederblom L, Moe A, Ling W, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for the treatment of methamphetamine dependence. *Drug Alcohol Depend.* 2010 Jun 1;109(1-3):20-9. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2009.11.023. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20092966; PMCID: PMC2875545.
431. Shearer J, Darke S, Rodgers C, Slade T, van Beek I, Lewis J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil (200 mg/day) for methamphetamine dependence. *Addiction.* 2009 Feb;104(2):224-33. doi: 10.1111/j.1360-0443.2008.02437.x. PMID: 19149817.
432. Hossain MK, Hassanzadeganroudsari M, Nurgali K, Apostolopoulos V. Vaccine development against methamphetamine drug addiction. *Expert Rev Vaccines.* 2020 Dec;19(12):1105-1114. doi: 10.1080/14760584.2020.1857738. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33251859.
433. Collins KC, Schlosburg JE, Bremer PT, Janda KD. Methamphetamine Vaccines: Improvement through Hapten Design. *J Med Chem.* 2016 Apr 28;59(8):3878-85. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00084. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27054372; PMCID: PMC5895457.
434. Arora R, Haile CN, Kosten TA, Wu Y, Ramakrishnan M, Hawkins LD, et al. Preclinical efficacy of an anti-methamphetamine vaccine using E6020 adjuvant. *Am J Addict.* 2019 Feb;28(2):119-126. doi: 10.1111/ajad.12867. Epub 2019 Jan 31. PMID: 30701618.
435. Lacagnina MJ, Rivera PD, Bilbo SD. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. *Neuropsychopharmacology.* 2017 Jan;42(1):156-177. doi: 10.1038/npp.2016.121. Epub 2016 Jul 11. PMID: 27402494; PMCID: PMC5143481.
436. Thomas DM, Walker PD, Benjamins JA, Geddes TJ, Kuhn DM. Methamphetamine neurotoxicity in dopamine nerve endings of the striatum is associated with microglial activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Oct;311(1):1-7. doi: 10.1124/jpet.104.070961. Epub 2004 May 26. PMID: 15163680.
437. Shaerzadeh F, Streit WJ, Heysieattalab S, Khoshbouei H. Methamphetamine neurotoxicity, microglia, and neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2018 Dec 12;15(1):341. doi: 10.1186/s12974-018-1385-0. PMID: 30541633; PMCID: PMC6292109.
438. Xu E, Liu J, Liu H, Wang X, Xiong H. Role of microglia in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2017 Jun 15;9(3):84-100. PMID: 28694920; PMCID: PMC5498881.
439. Worley MJ, Swanson AN, Heinzerling KG, Roache DJO, Shoptaw S. Corrigendum to "Ibudilast attenuates subjective effects of methamphetamine in a placebo-controlled inpatient study" [*Drug Alcohol Depend.* 162 (2016) 245-250]. *Drug Alcohol Depend.* 2018 Sep 1;190:120. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.06.002. Epub 2018 Jul 13. Erratum for: *Drug Alcohol Depend.* 2016 May 1;162:245-50. PMID: 30014886; PMCID: PMC6078784.
440. Li MJ, Briones MS, Heinzerling KG, Kalmin MM, Shoptaw SJ. Ibudilast attenuates peripheral inflammatory effects of methamphetamine in patients with methamphetamine use disorder. *Drug Alcohol Depend.* 2020 Jan 1;206:107776. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2019.107776. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31812878; PMCID: PMC7012103.
441. Tahvilian R, Amini K, Zhaleh H. Signal Transduction of Improving Effects of Ibudilast on Methamphetamine Induced Cell Death. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019 Sep 1;20(9):2763-2774. doi: 10.31557/APJCP.2019.20.9.2763. PMID: 31554375; PMCID: PMC6976860.
442. Segat HJ, Metz VG, Rosa HZ, Dias VT, Barcelos RCS, Dolci GS, et al. Substitution therapy with amphetamine-isotherapeutic attenuates amphetamine toxicological aspects of addiction. *Neurosci Lett.* 2019 Jan 18;690:138-144. doi: 10.1016/j.neulet.2018.10.007. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30296508.
443. Trivedi MH, Walker R, Ling W, Dela Cruz A, Sharma G, Carmody T, et al. Bupropion and Naltrexone in Methamphetamine Use Disorder. *N Engl J Med.* 2021 Jan 14;384(2):140-153. doi: 10.1056/NEJMoa2020214. PMID: 33497547; PMCID: PMC8111570.



444. Degenhardt L, Baxter AJ, Lee YY, Hall W, Sara GE, Johns N, et al. The global epidemiology and burden of psychostimulant dependence: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Drug Alcohol Depend.* 2014 Apr 1;137:36-47. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2013.12.025. Epub 2014 Jan 27. PMID: 24559607.
445. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, In P. Spain Drug Report 2018. 2018;2016:1–27.
446. Abate C, Niso M, Berardi F. Sigma-2 receptor: past, present and perspectives on multiple therapeutic exploitations. *Future Med Chem.* 2018 Aug 1;10(16):1997-2018. doi: 10.4155/fmc-2018-0072. Epub 2018 Jul 3. PMID: 29966437.
447. Insel PA, Tang CM, Hahntow I, Michel MC. Impact of GPCRs in clinical medicine: monogenic diseases, genetic variants and drug targets. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Apr;1768(4):994-1005. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.09.029. Epub 2006 Oct 5. PMID: 17081496; PMCID: PMC2169201.
448. Ferré S, Franco R. Oligomerization of G-protein-coupled receptors: a reality. *Curr Opin Pharmacol.* 2010 Feb;10(1):1-5. doi: 10.1016/j.coph.2009.11.002. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20015687; PMCID: PMC2825689.
449. Franco R, Martínez-Pinilla E, Lanciego JL, Navarro G. Basic Pharmacological and Structural Evidence for Class A G-Protein-Coupled Receptor Heteromerization. *Front Pharmacol.* 2016 Mar 31;7:76. doi: 10.3389/fphar.2016.00076. PMID: 27065866; PMCID: PMC4815248.
450. Botta J, Appelhans J, McCormick PJ. Continuing challenges in targeting oligomeric GPCR-based drugs. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2020;169:213-245. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.11.009. Epub 2020 Jan 3. PMID: 31952687.
451. Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow GV, et al. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D437-D451. doi: 10.1093/nar/gkaa1038. PMID: 33211854; PMCID: PMC7779003.
452. Aguinaga D, Casanovas M, Rivas-Santisteban R, Reyes-Resina I, Navarro G, Franco R. The sigma-1 receptor as key common factor in cocaine and food-seeking behaviors. *J Mol Endocrinol.* 2019 Nov;63(4):R81-R92. doi: 10.1530/JME-19-0138. PMID: 31539876.
453. Cottone P, Wang X, Park JW, Valenza M, Blasio A, Kwak J, et al. Antagonism of sigma-1 receptors blocks compulsive-like eating. *Neuropsychopharmacology.* 2012 Nov;37(12):2593-604. doi: 10.1038/npp.2012.89. Epub 2012 Jun 20. PMID: 22713906; PMCID: PMC3473342.
454. Cifani C, Micioni Di Bonaventura E, Botticelli L, Del Bello F, Giorgioni G, et al. Novel Highly Potent and Selective Sigma-1 Receptor Antagonists Effectively Block the Binge Eating Episode in Female Rats. *ACS Chem Neurosci.* 2020 Oct 7;11(19):3107-3116. doi: 10.1021/acschemneuro.0c00456. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32886484; PMCID: PMC8011929.
455. Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, et al. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3229-39. doi: 10.1172/JCI29867. Epub 2006 Oct 19. PMID: 17060947; PMCID: PMC1618869.
456. Egecioglu E, Jerlhag E, Salomé N, Skibicka KP, Haage D, Bohlooly-Y M, et al. Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict Biol.* 2010 Jul;15(3):304-11. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00216.x. Epub 2010 May 6. PMID: 20477752; PMCID: PMC2901520.
457. Aguinaga D, Medrano M, Cordero A, Jiménez-Rosés M, Angelats E, Casanovas M, et al. Cocaine Blocks Effects of Hunger Hormone, Ghrelin, Via Interaction with Neuronal Sigma-1 Receptors. *Mol Neurobiol.* 2019 Feb;56(2):1196-1210. doi: 10.1007/s12035-018-1140-7. Epub 2018 Jun 7. PMID: 29876881.
458. Hayashi T, Su T. The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology. *Curr Neuropharmacol.* 2005 Oct;3(4):267-80. doi: 10.2174/157015905774322516. PMID: 18369400; PMCID: PMC2268997.

6. Bibliografia



459. Hong WC, Yano H, Hiranita T, Chin FT, McCurdy CR, Su TP, et al. The sigma-1 receptor modulates dopamine transporter conformation and cocaine binding and may thereby potentiate cocaine self-administration in rats. *J Biol Chem.* 2017 Jul 7;292(27):11250-11261. doi: 10.1074/jbc.M116.774075. Epub 2017 May 11. PMID: 28495886; PMCID: PMC5500793.
460. Panagopoulos VN, Ralevski E. The role of ghrelin in addiction: a review. *Psychopharmacology (Berl).* 2014 Jul;231(14):2725-40. doi: 10.1007/s00213-014-3640-0. Epub 2014 Jun 20. PMID: 24947976.
461. Zallar LJ, Farokhnia M, Tunstall BJ, Vendruscolo LF, Leggio L. The Role of the Ghrelin System in Drug Addiction. *Int Rev Neurobiol.* 2017;136:89-119. doi: 10.1016/bs.irn.2017.08.002. Epub 2017 Sep 18. PMID: 29056157.
462. Farokhnia M, Faulkner ML, Piacentino D, Lee MR, Leggio L. Ghrelin: From a gut hormone to a potential therapeutic target for alcohol use disorder. *Physiol Behav.* 2019 May 15;204:49-57. doi: 10.1016/j.physbeh.2019.02.008. Epub 2019 Feb 7. PMID: 30738971.
463. Dunn DP, Bastacky JMR, Gray CC, Abtahi S, Currie PJ. Role of mesolimbic ghrelin in the acquisition of cocaine reward. *Neurosci Lett.* 2019 Sep 14;709:134367. doi: 10.1016/j.neulet.2019.134367. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31278962.
464. Reyes-Resina I, Navarro G, Aguinaga D, Canela EI, Schoeder CT, Załuski M, et al. Molecular and functional interaction between GPR18 and cannabinoid CB2 G-protein-coupled receptors. Relevance in neurodegenerative diseases. *Biochem Pharmacol.* 2018 Nov;157:169-179. doi: 10.1016/j.bcp.2018.06.001. Epub 2018 Jun 2. PMID: 29870711.
465. Jia W, Kawahata I, Cheng A, Fukunaga K. The Role of CaMKII and ERK Signaling in Addiction. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 20;22(6):3189. doi: 10.3390/ijms22063189. PMID: 33804804; PMCID: PMC8004038.
466. Valjent E, Pagès C, Hervé D, Girault JA, Caboche J. Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur J Neurosci.* 2004 Apr;19(7):1826-36. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03278.x. PMID: 15078556.
467. Borroto-Escuela DO, Narváez M, Romero-Fernández W, Pinton L, Wydra K, Filip M, et al. Acute Cocaine Enhances Dopamine D2R Recognition and Signaling and Counteracts D2R Internalization in Sigma1R-D2R Heteroreceptor Complexes. *Mol Neurobiol.* 2019 Oct;56(10):7045-7055. doi: 10.1007/s12035-019-1580-8. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30972626; PMCID: PMC6728299.
468. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science.* 1999 Sep 3;285(5433):1569-72. doi: 10.1126/science.285.5433.1569. PMID: 10477521.
469. Howick K, Griffin BT, Cryan JF, Schellekens H. From Belly to Brain: Targeting the Ghrelin Receptor in Appetite and Food Intake Regulation. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 27;18(2):273. doi: 10.3390/ijms18020273. PMID: 28134808; PMCID: PMC5343809.
470. Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Taking two to tango: a role for ghrelin receptor heterodimerization in stress and reward. *Front Neurosci.* 2013 Aug 30;7:148. doi: 10.3389/fnins.2013.00148. PMID: 24009547; PMCID: PMC3757321.
471. Schellekens H, van Oeffelen WE, Dinan TG, Cryan JF. Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signaling. *J Biol Chem.* 2013 Jan 4;288(1):181-91. doi: 10.1074/jbc.M112.382473. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23161547; PMCID: PMC3537012.
472. Jiang H, Betancourt L, Smith RG. Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol.* 2006 Aug;20(8):1772-85. doi: 10.1210/me.2005-0084. Epub 2006 Apr 6. PMID: 16601073.
473. Volkow ND, Wise RA, Baler R. The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2017 Nov 16;18(12):741-752. doi: 10.1038/nrn.2017.130. PMID: 29142296.
474. Hikida T, Morita M, Macpherson T. Neural mechanisms of the nucleus accumbens circuit in reward and aversive learning. *Neurosci Res.* 2016 Jul;108:1-5. doi: 10.1016/j.neures.2016.01.004. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26827817.



475. Casanovas M, Jiménez-Rosés M, Cordoní A, Lillo A, Vega-Quiroga I, Izquierdo J, et al. Discovery of a macromolecular complex mediating the hunger suppressive actions of cocaine: Structural and functional properties. *Addict Biol.* 2021 Feb 8:e13017. doi: 10.1111/adb.13017. Epub ahead of print. PMID: 33559278.
476. Kern A, Mavrikaki M, Ullrich C, Albarran-Zeckler R, Brantley AF, Smith RG. Hippocampal Dopamine/DRD1 Signaling Dependent on the Ghrelin Receptor. *Cell.* 2015 Nov 19;163(5):1176-1190. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.062. PMID: 26590421; PMCID: PMC4937825.
477. Navarro G, Cordoní A, Brugarolas M, Moreno E, Aguinaga D, Pérez-Benito L, et al. Cross-communication between Gi and Gs in a G-protein-coupled receptor heterotetramer guided by a receptor C-terminal domain. *BMC Biol.* 2018 Feb 28;16(1):24. doi: 10.1186/s12915-018-0491-x. PMID: 29486745; PMCID: PMC6389107.
478. Damian M, Pons V, Renault P, M'Kadmi C, Delort B, Hartmann L, et al. GHSR-D2R heteromerization modulates dopamine signaling through an effect on G protein conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Apr 24;115(17):4501-4506. doi: 10.1073/pnas.1712725115. Epub 2018 Apr 9. PMID: 29632174; PMCID: PMC5924877.
479. Alexander SPH, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Mathie A, Peters JA, et al; CGTP Collaborators. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol.* 2019 Dec;176 Suppl 1(Suppl 1):S21-S141. doi: 10.1111/bph.14748. PMID: 31710717; PMCID: PMC6844580.
480. García-Recio A, Navarro G, Franco R, Olivella M, Guixà-González R, Cordoní A. DIMERBOW: exploring possible GPCR dimer interfaces. *Bioinformatics.* 2020 May 1;36(10):3271-3272. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa117. PMID: 32096817.
481. Leonard CS, Kukkonen JP. Orexin/hypocretin receptor signalling: a functional perspective. *Br J Pharmacol.* 2014 Jan;171(2):294-313. doi: 10.1111/bph.12296. PMID: 23848055; PMCID: PMC3904253.
482. Aston-Jones G, Smith RJ, Sartor GC, Moorman DE, Massi L, Tahsili-Fahadan P, et al. Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction. *Brain Res.* 2010 Feb 16;1314:74-90. doi: 10.1016/j.brainres.2009.09.106. Epub 2009 Oct 6. PMID: 19815001; PMCID: PMC2819557.
483. Matzeu A, Martin-Fardon R. Drug Seeking and Relapse: New Evidence of a Role for Orexin and Dynorphin Co-transmission in the Paraventricular Nucleus of the Thalamus. *Front Neurol.* 2018 Aug 28;9:720. doi: 10.3389/fneur.2018.00720. PMID: 30210441; PMCID: PMC6121102.
484. Morisot N, Monier R, Le Moine C, Millan MJ, Contarino A. Corticotropin-releasing factor receptor 2-deficiency eliminates social behaviour deficits and vulnerability induced by cocaine. *Br J Pharmacol.* 2018 May;175(9):1504-1518. doi: 10.1111/bph.14159. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29406581; PMCID: PMC5900993.
485. Sinha R. Role of addiction and stress neurobiology on food intake and obesity. *Biol Psychol.* 2018 Jan;131:5-13. doi: 10.1016/j.biopsycho.2017.05.001. Epub 2017 May 4. PMID: 28479142; PMCID: PMC6784832.
486. Summers CH, Yaeger JDW, Staton CD, Arendt DH, Summers TR. Orexin/hypocretin receptor modulation of anxiolytic and antidepressive responses during social stress and decision-making: Potential for therapy. *Brain Res.* 2020 Mar 15;1731:146085. doi: 10.1016/j.brainres.2018.12.036. Epub 2018 Dec 24. PMID: 30590027; PMCID: PMC6591110.
487. Mahler SV, Smith RJ, Moorman DE, Sartor GC, Aston-Jones G. Multiple roles for orexin/hypocretin in addiction. *Prog Brain Res.* 2012;198:79-121. doi: 10.1016/B978-0-444-59489-1.00007-0. PMID: 22813971; PMCID: PMC3643893.
488. Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, et al. Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci.* 2004 Dec 15;24(50):11439-48. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3459-04.2004. PMID: 15601950; PMCID: PMC6730356.

6. Bibliografía



489. Navarro G, Quiroz C, Moreno-Delgado D, Sierakowiak A, McDowell K, Moreno E, et al. Orexin-corticotropin-releasing factor receptor heteromers in the ventral tegmental area as targets for cocaine. *J Neurosci.* 2015 Apr 29;35(17):6639-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4364-14.2015. PMID: 25926444; PMCID: PMC4412889.
490. Steiner MA, Sciarretta C, Brisbare-Roch C, Strasser DS, Studer R, Jenck F. Examining the role of endogenous orexins in hypothalamus-pituitary-adrenal axis endocrine function using transient dual orexin receptor antagonism in the rat. *Psychoneuroendocrinology.* 2013 Apr;38(4):560-71. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.07.016. Epub 2012 Aug 20. PMID: 22917622.
491. Slater PG, Noches V, Gysling K. Corticotropin-releasing factor type-2 receptor and corticotropin-releasing factor-binding protein coexist in rat ventral tegmental area nerve terminals originated in the lateral hypothalamic area. *Eur J Neurosci.* 2016 Jan;43(2):220-9. doi: 10.1111/ejn.13113. Epub 2015 Nov 28. PMID: 26503565.
492. Gerbier R, Ndiaye-Lobry D, Martinez de Morentin PB, Cecon E, Heisler LK, Delagrangé P, et al. Pharmacological evidence for transactivation within melatonin MT2 and serotonin 5-HT2C receptor heteromers in mouse brain. *FASEB J.* 2021 Jan;35(1):e21161. doi: 10.1096/fj.202000305R. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33156577.
493. Cadet JL, Krasnova IN. Molecular bases of methamphetamine-induced neurodegeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2009;88:101-19. doi: 10.1016/S0074-7742(09)88005-7. PMID: 19897076.
494. Sepéhr A, Taheri F, Heidarian S, Motaghinejad M, Safari S. Neuroprotective and neuro-survival properties of safinamide against methamphetamine-induced neurodegeneration: Hypothetic possible role of BDNF/TrkB/PGC-1 α signaling pathway and mitochondrial uncoupling protein -2(UCP-2). *Med Hypotheses.* 2020 Oct;143:110094. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110094. Epub 2020 Jul 11. PMID: 32682215.
495. Lu HC, Mackie K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry.* 2016 Apr 1;79(7):516-25. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.07.028. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26698193; PMCID: PMC4789136.
496. Liu YJ, Chen J, Li X, Zhou X, Hu YM, Chu SF, et al. Research progress on adenosine in central nervous system diseases. *CNS Neurosci Ther.* 2019 Sep;25(9):899-910. doi: 10.1111/cns.13190. Epub 2019 Jul 23. PMID: 31334608; PMCID: PMC6698970.
497. Diniz C, Borges F, Santana L, Uriarte E, Oliveira JM, Gonçalves J, et al. Ligands and therapeutic perspectives of adenosine A_{2A} receptors. *Curr Pharm Des.* 2008;14(17):1698-722. doi: 10.2174/138161208784746842. PMID: 18673194.
498. Faivre E, Coelho JE, Zornbach K, Malik E, Baqi Y, Schneider M, et al. Beneficial Effect of a Selective Adenosine A_{2A} Receptor Antagonist in the APP^{swe}/PS1^{dE9} Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci.* 2018 Jul 12;11:235. doi: 10.3389/fnmol.2018.00235. PMID: 30050407; PMCID: PMC6052540.
499. Justinová Z, Ferré S, Redhi GH, Mascia P, Stroik J, Quarta D, et al. Reinforcing and neurochemical effects of cannabinoid CB₁ receptor agonists, but not cocaine, are altered by an adenosine A_{2A} receptor antagonist. *Addict Biol.* 2011 Jul;16(3):405-15. doi: 10.1111/j.1369-1600.2010.00258.x. Epub 2010 Nov 4. PMID: 21054689; PMCID: PMC3115444.
500. Casanovas M, Reyes-Resina I, Lillo A, Lillo J, López-Arnau R, Camarasa J, et al. Methamphetamine Blocks Adenosine A_{2A} Receptor Activation via Sigma 1 and Cannabinoid CB₁ Receptors. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 9;22(5):2743. doi: 10.3390/ijms22052743. PMID: 33803075; PMCID: PMC7963146.
501. Itzhak Y. Repeated methamphetamine-treatment alters brain sigma receptors. *Eur J Pharmacol.* 1993 Jan 12;230(2):243-4. doi: 10.1016/0014-2999(93)90810-5. PMID: 8422906.
502. Sánchez-Blázquez P, Rodríguez-Muñoz M, Herrero-Labrador R, Burgueño J, Zamanillo D, Garzón J. The calcium-sensitive Sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: implications in antinociception and psychotic diseases. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014 Dec;17(12):1943-55. doi: 10.1017/S1461145714000029. Epub 2014 Jan 31. PMID: 24485144.



503. Constant A, Moirand R, Thibault R, Val-Laillet D. Meeting of Minds around Food Addiction: Insights from Addiction Medicine, Nutrition, Psychology, and Neurosciences. *Nutrients*. 2020 Nov 20;12(11):3564. doi: 10.3390/nu12113564. PMID: 33233694; PMCID: PMC7699750.
504. Leigh SJ, Morris MJ. The role of reward circuitry and food addiction in the obesity epidemic: An update. *Biol Psychol*. 2018 Jan;131:31-42. doi: 10.1016/j.biopsycho.2016.12.013. Epub 2016 Dec 21. PMID: 28011401.
505. Dore AS, Bortolato A, Hollenstein K, Cheng RKY, Read RJ, Marshall FH. Decoding Corticotropin-Releasing Factor Receptor Type 1 Crystal Structures. *Curr Mol Pharmacol*. 2017;10(4):334-344. doi: 10.2174/1874467210666170110114727. PMID: 28183242; PMCID: PMC5684783.
506. Lebon G, Bennett K, Jazayeri A, Tate CG. Thermostabilisation of an agonist-bound conformation of the human adenosine A(2A) receptor. *J Mol Biol*. 2011 Jun 10;409(3):298-310. doi: 10.1016/j.jmb.2011.03.075. Epub 2011 Apr 9. PMID: 21501622; PMCID: PMC3145977



7. ANEXOS



En el transcurso de la elaboración de la presente Tesis doctoral se ha colabora en los siguientes manuscritos:

- 7.1.** Franco R, Rivas-Santisteban R, **Casanovas M**, Lillo A, Saura CA, Navarro G. **Adenosine A_{2A}Receptor Antagonists Affects NMDA Glutamate Receptor Function. Potential to Address Neurodegeneration in Alzheimer's Disease.** Cells. 2020 Apr 26;9(5):1075. doi: 10.3390/cells9051075. PMID: 32357548; PMCID: PMC7290564.
- 7.2** Franco R, Rivas-Santisteban R, Reyes-Resina I, **Casanovas M**, Pérez-Olives C, Ferreiro-Vera C, Navarro G, Sánchez de Medina V, Nadal X. **Pharmacological potential of varinic, minor-, and acidic phytocannabinoids.** Pharmacol Res. 2020 May 13;158:104801. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104801. Epub ahead of print. PMID: 32416215.
- 7.3** Aguinaga D, **Casanovas M**, Rivas-Santisteban R, Reyes-Resina I, Navarro G, Franco R. **The sigma-1 receptor as key common factor in cocaine and food-seeking behaviors.** J Mol Endocrinol. 2019 Nov;63(4):R81-R92. doi: 10.1530/JME-19-0138. PMID: 31539876.

Mireia Casanovas Ferrero

Universitat de Barcelona
Departament de Bioquímica i Biomedicina molecular
Grup de Neurobiologia Molecular

Barcelona, 2021