

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA INFLUENCIA
DEL HETERODÍMERO DE LOS RECEPTORES
D₂ DE DOPAMINA Y 5-HT_{2A} DE SEROTONINA,
EN APLICACIÓN A LA
FARMACOTERAPIA
ANTIPSICÓTICA**



SONIA GÓMEZ FERNÁNDEZ

2017





UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA INFLUENCIA
DEL HETERODÍMERO DE LOS RECEPTORES
D₂ DE DOPAMINA Y 5-HT_{2A} DE SEROTONINA,
EN APLICACIÓN A LA FARMACOTERAPIA ANTIPSICÓTICA**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

SONIA GÓMEZ FERNÁNDEZ

Santiago de Compostela, 2017





FACULTAD DE FARMACIA
DPTO DE FARMACOLOGÍA
Edificio CIMUS – Av. Barcelona s/n. 15706
Santiago de Compostela

Dña. **María Isabel Loza García**, Catedrática en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela, y D. **José Manuel Brea Floriani**, Doctor en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “**Estudio *in vitro* de la influencia del heterodímero de los receptores D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina, en aplicación a la farmacoterapia antipsicótica**” que para optar al grado de Doctor presenta Dña. **Sonia Gómez Fernández**, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia y cumple los requisitos para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 9 de febrero de 2017.

Fdo: María Isabel Loza García

Fdo: José Manuel Brea Floriani





*No hay barrera, cerradura, ni cerrojo que
puedas imponer a la libertad de mi mente.*

Virginia Woolf



AGRADECIMIENTOS

Hay un proverbio chino que dice “cuando bebas agua, recuerda la fuente”. Para mí, la fuente son todas esas personas e instituciones que han allanado el camino para que este trabajo de investigación llegue a feliz término. Sin todos ellos, hoy no me dispondría en la difícil, aunque muy satisfactoria y placentera tarea de escribir estas líneas de agradecimiento.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero y absoluto agradecimiento a mis directores de tesis, María Isabel Loza y José Manuel Brea, por haberme abierto las puertas del mundo científico y guiarme en mi labor investigadora. Gracias Mabel, por haber confiado plenamente en mí y haberme dado la oportunidad de formar parte de uno de los mejores equipos de investigación en el mundo, Biofarma. Gracias Pepo, por haber compartido conmigo todo tu conocimiento científico, por tu astucia, por tu comprensión, por todos tus consejos y por las tantas veces que has alabado cada éxito mío en la poyata, por pequeño que fuera.

A Maribel Cadavid por todo su interés incondicional, su cercanía y su disponibilidad, y especialmente, por su participación activa que ha enriquecido enormemente mi trabajo de tesis.

A Juan Giménez-López por todas sus aportaciones científicas, por la premura con la que siempre ha respondido a mis vacilaciones en este trabajo, y sobretodo, por haberme cedido la línea celular que ha permitido el estudio del heterodímero D₂-5-HT_{2A}, en el que se fundamenta mi tesis doctoral.

A todos y cada uno de mis compañeros del grupo Biofarma, tanto a los que ya no están como a los aquí siguen (Carlos, Lucía, Amparo, Alex, Jose Ramos, Silvia, María Villar, Sonia Veiga, Lola, Javier, Inés), ha sido un verdadero placer compartir con vosotros esta etapa de mi vida.

A Andrea, Marta Cimadevila, Elia y Antón, por las muchas veces que me habéis ayudado y porque es un orgullo saber que las nuevas generaciones vienen pisando fuerte. A Uxía, por su amistad, por toda su valía y humildad, por su sosiego y la tranquilidad que siempre me has infundido. A Alba, por haber sido mi profe y haberme enseñado las técnicas que han impulsado el desarrollo de este trabajo científico. A

Ailim, David y Quique, por todos los momentos divertidos que hemos compartido, por todo lo que me habéis hecho reír y en definitiva, por vuestra complicidad. A María Varela, Isa y Sonia Lage, por toda la atención y apoyo que siempre me habéis mostrado. A Rocío Piña, por todas las conversaciones que hemos tenido, por tus consejos, por tus palabras de ánimo y aliento, y sobretodo, por lo divertido que es trabajar contigo. A Cristina, Ainhoa, Patricio, Eduardo Dominguez y Marian, por vuestras lecciones y consejos en el ámbito de la farmacología, la química y la biología molecular. A Jose Santamaría, Marta Solla, Oscar, Eduardo Santamaría, Manel y Begoña por las innumerables veces que habéis atendido y solucionado mis problemas burocráticos e informáticos.

A mis compañeras del máster de Neurociencia, Rocío y Pili, por haberme dejado formar parte de su simpático corrillo de media tarde, en el que mientras tomábamos nuestro té y pelábamos los frutos secos que con ansia comíamos, compartimos incontables momentos de risas y alegrías. A mi compañera Cris, del máster de Profesorado, por toda su generosidad, su comprensión y su inagotable energía.

A la Xunta de Galicia, por el sustento económico otorgado tras la concesión de una beca predoctoral de tres años para desempeñar mi actividad como investigadora en el grupo Biofarma.

A todos mis amigos, por haber estado siempre a mi lado, a pesar de que últimamente no he podido prestarles toda la atención que se merecen.

A Malaika y Silvia, porque no hay palabras suficientes con las que expresar lo afortunada que me siento por teneros en mi vida.

A mi familia, mi gran tesoro, sin el cual esto no hubiera sido posible. Por todo su entendimiento, su amor, por el orgullo que de mí tienen, y especialmente, por ser una constante de afecto y fuerza en mi vida. Gracias a mis tíos Victor y Miriam, por vuestro cariño, vuestros consejos, y por siempre haberme hecho seguir adelante. Gracias a mi pequeñina Vera, por haber colmado de ilusión, inocencia y magia esta familia. Gracias a mi hermano Migue, por todo lo bonachón que eres, la paciencia que conmigo tienes y por todo lo que te esmeras en hacerme sonreír. Gracias mamá y papá, por los valores que me habéis inculcado, por vuestra entrega y por haberme siempre dado todo, sin pedirme nunca nada.

Sonia



A mi familia



RESUMEN	45
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
INTRODUCCIÓN.....	53
I. ESQUIZOFRENIA	55
A) Aspectos generales.....	55
B) Sintomatología y fases de la enfermedad	53
C) Etiología	59
D) Diagnóstico	64
E) Neuropatología	66
F) Neurobiología.....	68
G) Tratamiento	73
II. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs).....	81
A) Estructura	81
B) Clasificación.....	82
C) Mecanismos de señalización.....	84
D) Desensibilización e internalización del receptor	87
E) Modelos de activación de los GPCRs	88
F) La dopamina y el receptor D ₂	93
G) La serotonina y el receptor 5-HT _{2A}	97
H) Oligomerización de los GPCRs	102
MATERIALES Y MÉTODOS.....	111
I. LÍNEA CELULAR	111
II. CULTIVO CELULAR	111
A) Mantenimiento de las células.....	111
B) Descongelación de las células	112
C) Expansión celular	113
D) Criogenización de las células.....	114
E) Siembra celular.....	114

III. ENSAYOS DE MICROSCOPIA DE ALTO RENDIMIENTO.....	116
IV. ENSAYOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS	117
Ensayos de unión de radioligandos en membranas.....	118
A) Preparación de membranas	118
B) Linealidad de proteína.....	119
1. Linealidad de proteína del receptor D ₂	120
2. Linealidad de proteína del receptor 5-HT _{2A}	121
C) Ensayos de saturación	122
1. Ensayos de saturación del receptor D ₂	123
2. Ensayos de saturación del receptor 5-HT _{2A}	123
D) Ensayos de competición	124
1. Ensayos de competición del receptor D ₂	125
2. Ensayos de competición del receptor 5-HT _{2A}	126
Ensayos de unión de radioligandos en células	128
V. ENSAYOS FUNCIONALES.....	128
A) Ensayos funcionales de medida de AMPc.....	129
1. Caracterización del receptor constitutivo D ₂	129
2. Caracterización del receptor endógeno 5-HT ₇	131
B) Ensayos funcionales de medida de IPs del receptor 5-HT _{2A}	132
VI. MÉTODO MULTIPLEX FUNCIONAL DE MEDIDA SIMULTÁNEA DUAL DE AMPc E IPs	135
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	137
VIII. REACTIVOS UTILIZADOS.....	138
A) Reactivos utilizados en la preparación de tampones	138
B) Reactivos farmacológicos empleados en los ensayos de unión de radioligandos y en los experimentos funcionales	138

RESULTADOS	141
CREACIÓN DE UNA HERRAMIENTA DIMÉRICA 5-HT _{2A} -D ₂	141
I. CONDICIONES DE INDUCCIÓN CON DOXICICLINA DEL RECEPTOR 5-HT _{2A} , EN LA LÍNEA HEK293 FLP-IN T-REX QUE EXPRESA EL RECEPTOR D ₂	141
1. La exposición de la línea celular HEK293 doble estable a 10 ng/ml de doxiciclina indujo la expresión del receptor 5-HT _{2A} -CFP.....	141
2. El tiempo óptimo de exposición a doxiciclina para la expresión del receptor 5-HT _{2A} fue de 24 horas	143
II. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES D ₂ CONSTITUTIVO Y 5-HT _{2A} INDUCIBLE POR DOXICICLINA, EN LA LÍNEA DE TRABAJO HEK293.....	144
1. Los ensayos de unión de radioligandos demostraron la presencia del receptor constitutivo D ₂	144
2. Los ensayos de unión de radioligandos confirmaron la presencia del receptor 5-HT _{2A} en membranas obtenidas de células HEK293 previamente expuestas a doxiciclina	148
3. El receptor D ₂ constitutivo reguló los niveles de AMPc en el interior celular vía proteína G _{i/o}	152
4. Los ensayos funcionales de IPs demostraron el funcionamiento del receptor 5-HT _{2A} inducible en células previamente expuestas a 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas, así como la ausencia de movilización de IPs en células no tratadas	154
III. CARACTERIZACIÓN DE INTERFERENCIAS EN LA SEÑALIZACIÓN DEL HETERODÍMERO 5-HT _{2A} -D ₂ , EN LA LÍNEA DE TRABAJO HEK293.....	158
1. Los ensayos funcionales de AMPc indicaron la existencia de un receptor endógeno acoplado a proteína G _s	158
2. El bloqueo de la vía de señalización de AMPc dependiente de proteína G _s por SB-269970 sugirió la expresión endógena del receptor 5-HT ₇	160

3. SB-269970 mostró un comportamiento como antagonista competitivo en la línea celular HEK293.....	162
4. Los ensayos de unión de radioligandos en célula entera confirmaron la presencia endógena del receptor 5-HT ₇	163
5. El bloqueo del receptor 5-HT ₇ por SB-269970 redujo la potencia del agonista dopamina en la vía de señalización dependiente de G _i del receptor D ₂	164
6. El bloqueo del receptor 5-HT ₇ por SB-269970 no afectó a la potencia de los antipsicóticos típicos y atípicos para antagonizar la vía de señalización dependiente de G _i del receptor D ₂	165
7. El bloqueo del receptor 5-HT ₇ por SB-269970 no alteró la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} al ser activado por los agonistas 5-HT y (±)DOI.....	170
8. El bloqueo del receptor 5-HT ₇ por SB-269970 no modificó la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} al ser antagonizado por los antipsicóticos clozapina, risperidona y aripiprazol.....	171
DESARROLLO DE UNA NUEVA NUEVA METODOLOGÍA	173
IV. MÉTODO MULTIPLEX DE MEDICIÓN SIMULTÁNEA DE AMPc E IPS PARA EL HETERODÍMERO D ₂ -5-HT _{2A}	173
INFLUENCIA DE LA HETERODIMERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES D ₂ Y 5-HT _{2A} EN SU FARMACOLOGÍA	176
V. INFLUENCIA DE LA HETERODIMERIZACIÓN D ₂ -5-HT _{2A} EN LA AFINIDAD DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS (ANTIPSIÓTICOS) POR AMBOS RECEPTORES	176
- Influencia de la expresión del receptor D ₂ en la afinidad de agonistas y antagonistas (antipsicóticos) por el receptor 5-HT _{2A}	176
1. La expresión del receptor D ₂ no alteró la unión de los agonistas 5-HT y (±)DOI al receptor 5-HT _{2A}	176
2. La expresión del receptor D ₂ no alteró la afinidad de antipsicóticos atípicos por el receptor 5-HT _{2A}	177

- Influencia de la expresión del receptor 5-HT _{2A} en la afinidad de agonistas y antagonistas (antipsicóticos) por el receptor D ₂	178
1. La expresión del receptor 5-HT _{2A} no alteró la afinidad de la dopamina por el receptor D ₂	178
2. La expresión del receptor 5-HT _{2A} no alteró la afinidad de antipsicóticos típicos por el receptor D ₂	180
3. La expresión del receptor 5-HT _{2A} no moduló la afinidad de los antipsicóticos atípicos por el receptor D ₂	181
4. La expresión del receptor 5-HT _{2A} aumentó la afinidad de la clozapina por el receptor D ₂	182
 VI. INFLUENCIA DE LA HETERODIMERIZACIÓN D ₂ -5-HT _{2A} EN LA POTENCIA Y EFICACIA DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS (ANTIPSICÓTICOS) SOBRE AMBOS RECEPTORES	183
- Influencia de la expresión y modulación del receptor D ₂ en la activación del receptor 5-HT _{2A} por agonistas	183
1. La expresión del receptor D ₂ no modificó la potencia y eficacia del agonista endógeno 5-HT para activar el receptor 5-HT _{2A}	183
2. La expresión del receptor D ₂ aumentó la eficacia del agonista alucinógeno (±)DOI para activar el receptor 5-HT _{2A}	184
3. La expresión del receptor D ₂ no modificó la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} activado por los agonistas no alucinógeno lisurida y alucinógeno LSD	185
4. La activación del receptor D ₂ no moduló la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} estimulado por 5-HT o (±)DOI.....	187
5. El bloqueo del receptor D ₂ por sulpirida no alteró la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} activado por 5-HT.....	189
6. El bloqueo del receptor D ₂ por sulpirida redujo la eficacia del agonista alucinógeno (±)DOI para activar el receptor 5-HT _{2A}	190
 - Influencia de la expresión y modulación del receptor D ₂ en la funcionalidad del receptor 5-HT _{2A} antagonizado por antipsicóticos.....	191

1. La expresión del receptor D ₂ redujo la potencia del aripiprazol para bloquear el receptor 5-HT _{2A} , pero no modificó la potencia de la clozapina, ni de la risperidona	191
2. La activación del receptor D ₂ por dopamina no moduló la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} antagonizado por antipsicóticos atípicos	193
3. El bloqueo del receptor D ₂ por sulpirida no alteró la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} antagonizado por antipsicóticos atípicos	195
- Influencia de la expresión y modulación del receptor 5-HT _{2A} en la activación del receptor D ₂ por agonistas	196
1. La expresión del receptor 5-HT _{2A} no reguló la vía de señalización dependiente de G _{i/o} del receptor D ₂ activado por dopamina	196
2. La activación del receptor 5-HT _{2A} por el agonista alucinógeno (±)DOI moduló la vía de señalización dependiente de G _{i/o} del receptor D ₂ estimulado por dopamina.....	197
3. Los efectos del (±)DOI mediados por el receptor 5-HT _{2A} sobre la funcionalidad del receptor D ₂ activado por dopamina no se debieron a una alteración de la afinidad del agonista endógeno por su receptor	202
4. El bloqueo del receptor 5-HT _{2A} por ketanserina moduló la vía de señalización dependiente de G _{i/o} del receptor D ₂ estimulado por dopamina.....	204
- Influencia de la expresión y modulación del receptor 5-HT _{2A} en la funcionalidad del receptor D ₂ antagonizado por antipsicóticos.....	206
1. La presencia del receptor 5-HT _{2A} no moduló la vía de señalización dependiente de G _{i/o} del receptor D ₂ antagonizado por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina	206
2. La presencia del receptor 5-HT _{2A} no moduló la vía de señalización dependiente de G _{i/o} del receptor D ₂ antagonizado por lo antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol	208

3. La activación del receptor 5-HT _{2A} por el agonista alucinógeno (±)DOI moduló la vía de señalización dependiente de G _{i/o} del receptor D ₂ bloqueado por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina.....	209
4. El efecto del (±)DOI mediado por el receptor 5-HT _{2A} sobre la funcionalidad del receptor D ₂ antagonizado por haloperidol no se debió a una alteración de la afinidad del antipsicótico típico.....	213
5. La activación del receptor 5-HT _{2A} por el agonista alucinógeno (±)DOI moduló el antagonismo de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol en la vía de señalización dependiente de G _{i/o} del receptor D ₂	214
6. El bloqueo del receptor 5-HT _{2A} por ketanserina no alteró la vía de señalización dependiente de G _{i/o} del receptor D ₂ antagonizado por antipsicóticos típicos.....	217
7. El bloqueo del receptor 5-HT _{2A} por ketanserina no modificó la potencia de los antipsicóticos atípicos para antagonizar el receptor D ₂	218
DISCUSIÓN.....	223
CONCLUSIONES.....	243
BIBLIOGRAFÍA.....	249

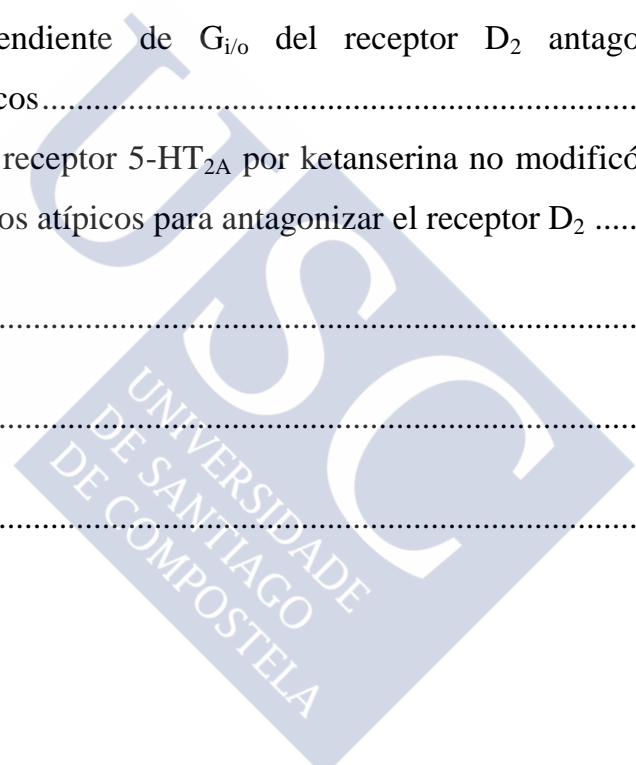




Figura 1:	Sintomatología de la esquizofrenia.....	57
Figura 2:	Fases de la esquizofrenia	59
Figura 3:	Interrelación de los distintos productos génicos asociados con esquizofrenia	62
Figura 4:	Dimensiones de clusterización de los distintos síntomas de desórdenes psicóticos	65
Figura 5:	Circuito cortical en esquizofrenia.....	67
Figura 6:	Vías dopaminérgicas y serotoninérgicas cerebrales	70
Figura 7:	Vías glutamatérgicas cerebrales: a (corticotroncoencefálicas), b (cortico-estriada), c (tálamo-corticales), d (córticotálámicas) y e (corticocorticales)	73
Figura 8:	Porcentaje de ocupación de los receptores D ₂ y 5-HT _{2A} por antipsicóticos a dosis clínicas	80
Figura 9:	Estructura representativa de los GPCRs	82
Figura 10:	Principales familias de GPCRs.....	83
Figura 11:	Ciclo funcional de actividad de proteínas G.....	84
Figura 12:	Vías de señalización dependientes de proteína G de los GPCRs	86
Figura 13:	Desensibilización, secuestro y tráfico intracelular de los GPCRs.....	88
Figura 14:	Modelos cinéticos de activación de los GPCRs	89
Figura 15:	Vías de señalización de los receptores de dopamina	94
Figura 16:	Vías de señalización del receptor D ₂	96
Figura 17:	Clasificación de los receptores 5-HT	99
Figura 18:	Señalización del receptor 5-HT _{2A} mediada por G _q	100
Figura 19:	Representación hipotética del comportamiento de los homodímeros 5-HT _{2A} y D ₂ y del heterocomplejo D ₂ -5-HT _{2A} en controles sanos y personas con esquizofrenia	107
Figura 20:	Contaje de células con el método manual de empleo de cámara de Neubauer	115
Figura 21:	Representación esquemática del proceso de FRET entre los reactivos d2 y Cryptate.....	131

Figura 22:	Influencia de distintas concentraciones de doxiciclina sobre la expresión del receptor de serotonina 5-HT _{2A}	142
Figura 23:	Influencia de distintos tiempos de exposición a doxiciclina 10 ng/ml sobre la expresión del receptor de serotonina 5-HT _{2A}	143
Figura 24:	Linealidad de proteína para el receptor de dopamina D ₂ en membranas obtenidas de células sin tratar y tratadas con doxiciclina	144
Figura 25:	Ensayos de saturación del receptor de dopamina D ₂ por el radioligando [³ H]-espiperona en membranas obtenidas de células sin tratar y tratadas con doxiciclina.....	145
Figura 26:	Curvas de competición del agonista dopamina y los antipsicóticos haloperidol y risperidona con el radioligando [³ H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D ₂ en membranas obtenidas de células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	147
Figura 27:	Linealidad de proteína para el receptor de serotonina 5-HT _{2A} en membranas obtenidas de células tratadas y sin tratar con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	149
Figura 28:	Ensayo de saturación del receptor de serotonina 5-HT _{2A} por el radioligando [³ H]-ketanserina, en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	150
Figura 29:	Curvas de competición del agonista 5-HT y los antipsicóticos haloperidol y risperidona con el radioligando [³ H]-ketanserina por la unión al receptor de serotonina 5-HT _{2A} en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	151
Figura 30:	Curvas concentración-respuesta del agonista dopamina y, en presencia de dopamina 1 μM, de los antagonistas antipsicóticos típico haloperidol y atípico risperidona, sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de	

	G_i del receptor de dopamina D_2 , en células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	153
Figura 31:	Curvas concentración-respuesta del agonista 5-HT en la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$, en células tratadas con diferentes concentraciones de doxiciclina y diferentes tiempos de exposición a la misma	155
Figura 32:	Curvas concentración-respuesta del agonista 5-HT y, en presencia de 5-HT 1 μ M, de los antipsicóticos atípicos clozapina y risperidona, en la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor $5-HT_{2A}$, en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas	157
Figura 33:	Curvas concentración-respuesta del agonista 5-HT y del antagonista antipsicótico atípico clozapina en presencia de 5-HT 1 μ M en la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μ M en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas.....	158
Figura 34:	Curvas concentración-respuesta del agonista 5-HT en la producción de AMPc asociada a proteína G_s en células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	159
Figura 35:	Curvas concentración-respuesta de antagonistas del receptor $5-HT_{2A}$ ketanserina, espiperona y haloperidol en presencia de 5-HT 1 μ M en la producción de AMPc en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	160
Figura 36:	Curvas concentración-respuesta de SB-203186, SB-271046A y SB-269970 en presencia de 5-HT 1 μ M en la producción de AMPc dependiente de G_s en células no tratadas con doxiciclina	161
Figura 37:	Representación de Schild para el compuesto SB-269970, antagonista del receptor de serotonina $5-HT_7$	162

- Figura 38:** Linealidad celular para el receptor de serotonina 5-HT₇ en células no tratadas con doxiciclina, utilizando como radioligando [³H]-SB269970.....163
- Figura 39:** Curvas concentración-respuesta del agonista dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G_i del receptor de dopamina D₂ en ausencia y presencia del antagonista selectivo del receptor 5-HT₇ SB-269970, en células no tratadas y tratadas previamente con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.164
- Figura 40:** Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina), en presencia de dopamina 1 μM, sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G_i del receptor de dopamina D₂ en ausencia y presencia de SB-269970, en células no tratadas y previamente tratadas con doxiciclina.166
- Figura 41:** Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol), en presencia de dopamina 1 μM, sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G_i del receptor de dopamina D₂, en ausencia y presencia de SB-269970, en células no tratadas y previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas168
- Figura 42:** Curvas concentración-respuesta de los agonistas 5-HT y (±)DOI sobre la acumulación de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, en ausencia y presencia de SB-269970, en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....170
- Figura 43:** Curvas concentración-respuesta de los antagonistas atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μM, sobre la acumulación de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, en ausencia y presencia de

- SB-269970, en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. 172
- Figura 44:** Curvas concentración-respuesta de 5-HT y dopamina sobre la acumulación de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} y sobre la producción de AMPc en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D₂, respectivamente, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas..... 174
- Figura 45:** Curvas de competición de los agonistas endógeno no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (\pm)DOI con el radioligando [³H]-ketanserina por la unión al receptor de serotonina 5-HT_{2A}, en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas..... 177
- Figura 46:** Curvas de competición de antipsicóticos atípicos con [³H]-ketanserina por la unión al receptor 5-HT_{2A}, en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas..... 178
- Figura 47:** Curvas de competición del agonista dopamina con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D₂, en membranas obtenidas de células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas 179
- Figura 48:** ...Curvas de competición de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D₂, en membranas obtenidas de células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas..... 180
- Figura 49:** Curvas de competición de los antipsicóticos atípicos risperidona y aripiprazol con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D₂, en membranas obtenidas de células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas..... 181
- Figura 50:** Curvas de competición del antipsicótico atípico clozapina con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina

	D ₂ , en membranas obtenidas de células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	182
Figura 51:	Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno 5-HT en la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} , en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas.....	183
Figura 52:	Curvas concentración-respuesta de los agonistas alucinógeno (±)DOI y no alucinógeno 5-HT en la producción de IPs dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} , en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas	185
Figura 53:	Curvas concentración-respuesta de los agonistas no alucinógeno lisurida y alucinógeno LSD y del agonista endógeno 5-HT en la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} , en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas	186
Figura 54:	Curva concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor D ₂ dopamina sobre la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μM dependiente de la proteína G _i , en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	187
Figura 55:	Curvas concentración-respuesta de los agonistas endógeno no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (±)DOI del receptor 5-HT _{2A} sobre la producción de IPs dependiente de G _q solos y en presencia del agonista del receptor D ₂ dopamina (1 μM), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	188
Figura 56:	Curvas concentración-respuesta del antagonista selectivo del receptor de dopamina D ₂ sulpirida sobre la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μM dependiente de la proteína G _i , en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	189
Figura 57:	Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor 5-HT _{2A} 5-HT sobre la producción de IPs dependiente de G _q solo y en presencia del antagonista del receptor D ₂ sulpirida	

	(100 nM), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	190
Figura 58:	Curvas concentración-respuesta del agonista alucinógeno del receptor 5-HT _{2A} (\pm)DOI sobre la producción de IPs dependiente de G _q solo y en presencia del antagonista del receptor D ₂ sulpirida (100 nM), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	191
Figura 59:	Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M, para inhibir la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} , en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas.....	192
Figura 60:	Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M, sobre la producción de IPs dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} solos y en presencia del agonista del receptor D ₂ dopamina (1 μ M), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	194
Figura 61:	Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M sobre la producción de IPs dependiente de G _q del receptor 5-HT _{2A} solos y en presencia del antagonista del receptor D ₂ sulpirida (100 nM), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	195
Figura 62:	Curvas concentración-respuesta del agonista dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G _i del receptor de dopamina D ₂ , en células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	197
Figura 63:	Curva concentración-respuesta del agonista alucinógeno del receptor de serotonina 5-HT _{2A} (\pm)DOI sobre la producción de	

	IPs dependiente de la proteína G_q en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	198
Figura 64:	Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor D_2 dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK (1 μ M) dependiente de G_i solo y en presencia del agonista alucinógeno del receptor 5-HT _{2A} (\pm)DOI (0.1 μ M), en células tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	199
Figura 65:	Curvas de competición del agonista alucinógeno del receptor 5-HT _{2A} (\pm)DOI con el radioligando [³ H]-espiperona por la unión al receptor D_2 , en membranas obtenidas de células no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	200
Figura 66:	Curvas concentración-respuesta del agonista alucinógeno del receptor 5-HT _{2A} (\pm)DOI sobre la acumulación de AMPc dependiente de proteína G_s del receptor 5-HT ₇ , en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	200
Figura 67:	Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor D_2 dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK (1 μ M) dependiente de G_i solo, en presencia de (\pm)DOI 0.1 μ M, (\pm)DOI y ketanserina 0.1 μ M, y (\pm)DOI y ketanserina 0.1 μ M, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	201
Figura 68:	Curvas de competición del agonista dopamina con el radioligando [³ H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D_2 en ausencia, y presencia de (\pm)DOI a diferentes concentraciones, 0.1, 1 y 10 μ M, en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	203
Figura 69:	Curvas concentración-respuesta del antagonista selectivo del receptor de serotonina 5-HT _{2A} ketanserina sobre la producción de IPs dependiente de la proteína G_q en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	205
Figura 70:	Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor D_2 dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK	

- (1 μM) dependiente de G_i solo y en presencia del antagonista del receptor 5-HT_{2A} ketanserina (100 nM), en células tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas 205
- Figura 71:** Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μM , sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G_i del receptor de dopamina D₂, en células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas..... 207
- Figura 72:** Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μM , sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G_i del receptor de dopamina D₂, en células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas..... 208
- Figura 73:** Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μM , sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G_i del receptor D₂, solos y en presencia del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI (100 nM), en células tratadas y sin tratar con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas..... 210
- Figura 74:** Curvas concentración-respuesta del antipsicótico típico haloperidol, en presencia de dopamina 1 μM , sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK (1 μM) dependiente de G_i del receptor D₂ solo, en presencia de (\pm)DOI 0.1 μM y (\pm)DOI y ketanserina 0.1 μM , en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas 212
- Figura 75:** Curvas de competición del antipsicótico típico haloperidol con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D₂ en ausencia, y presencia de (\pm)DOI a diferentes concentraciones,

0.1, 1 y 10 μM , en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas213

Figura 76: Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μM , sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G_i del receptor D_2 , solos y en presencia del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI (100 nM), en células tratadas y sin tratar con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas215

Figura 77: Curvas concentración-respuesta de haloperidol y clorpromazina en presencia de dopamina 1 μM sobre la acumulación de AMPc dependiente de G_i del receptor D_2 , solos y en presencia de ketanserina, en células tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas217

Figura 78: Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μM sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK (1 μM) dependiente de G_i del receptor D_2 , solos y en presencia de ketanserina, en células tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.219

Tabla 1:	Clasificación de los antipsicóticos típicos en base a su estructura química.	76
Tabla 2:	Clasificación de los antipsicóticos atípicos en base a su estructura química	77
Tabla 3:	Índice de Meltzer de los antipsicóticos típicos y atípicos	78
Tabla 4:	Tabla resumen del ensayo de linealidad de proteína del receptor dopamina D ₂ , en membranas obtenidas de células previamente tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	121
Tabla 5:	Tabla resumen del ensayo de linealidad de proteína del receptor serotonina 5-HT _{2A} , en membranas obtenidas de células previamente tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	122
Tabla 6:	Tabla resumen del ensayo de saturación del receptor dopamina D ₂ por el radioligando [³ H]-espiperona en membranas obtenidas de células previamente tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	123
Tabla 7:	Tabla resumen del ensayo de saturación del receptor serotonina 5-HT _{2A} por el radioligando [³ H]-ketanserina, en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	124
Tabla 8:	Tabla resumen de los ensayos de competición de distintos estándares con [³ H]-espiperona por la unión al receptor dopamina D ₂ , en membranas obtenidas de células previamente tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	125
Tabla 9:	Tabla resumen de los ensayos de competición de distintos estándares con [³ H]-ketanserina por la unión al receptor serotonina 5-HT _{2A} , en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	126
Tabla 10:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-espiperona al receptor de dopamina D ₂ , en membranas obtenidas de células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	146

Tabla 11:	Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de dopamina D_2 de diferentes compuestos estándares (dopamina, haloperidol y risperidona), en membranas obtenidas de células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	148
Tabla 12:	Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-ketanserina al receptor de serotonina $5-HT_{2A}$, en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	150
Tabla 13:	Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ de diferentes compuestos estándares (5-HT, haloperidol y risperidona), en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	151
Tabla 14:	Potencia del agonista dopamina (EC_{50}) y de los antipsicóticos típico haloperidol y atípico risperidona (IC_{50} y K_B), en presencia de dopamina $1\mu M$, para inhibir y activar respectivamente la producción de AMPc estimulada por FSK $1\mu M$ dependiente de proteína G_i del receptor de dopamina D_2 , en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	154
Tabla 15:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista 5-HT para activar la producción de IPs dependiente del receptor $5-HT_{2A}$, en células previamente tratadas con diferentes concentraciones de doxiciclina y distintos tiempos de exposición a la misma.	156
Tabla 16:	Potencia del agonista 5-HT (EC_{50}) y los antipsicóticos atípicos clozapina y risperidona (IC_{50} y K_B), en presencia de 5-HT $1\mu M$, para activar y bloquear respectivamente la producción de IPs dependiente de la vía G_q del receptor $5-HT_{2A}$, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	157
Tabla 17:	Potencia del agonista 5-HT (EC_{50}) y del antagonista clozapina en presencia de 5-HT $1\mu M$ (K_B) en la producción de AMPc dependiente de proteína G_s en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	158

Tabla 18:	Potencia (EC_{50}) del agonista 5-HT en la producción de AMPc dependiente de proteína G_s en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	159
Tabla 19:	Potencia (IC_{50} y K_B) del antagonista SB-269970, en presencia de 5-HT 1 μ M en la producción de AMPc dependiente de G_s del receptor 5-HT ₇	161
Tabla 20:	Parámetros de competitividad del compuesto SB-269970 en base a la ecuación de Schild.	163
Tabla 21:	Potencia del agonista dopamina (EC_{50}) en la inhibición de la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μ M dependiente del receptor D_2 , en ausencia y presencia de SB-269970 (1 μ M), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	165
Tabla 22:	Potencia (IC_{50}) de antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina), en presencia de dopamina 1 μ M, en el bloqueo del receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA y E_{min} DA), en ausencia y presencia de SB-269970 (1 μ M), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	167
Tabla 23:	Potencia (IC_{50}) de antipsicóticos atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol), en presencia de dopamina 1 μ M, en el bloqueo del receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA y E_{min} DA), en ausencia y presencia de SB-269970 (1 μ M), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	169
Tabla 24:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de los agonistas 5-HT y (\pm)DOI en la activación de la producción de IPs dependiente de la vía G_q del receptor 5-HT _{2A} , en ausencia y presencia de SB-269970 (1 μ M), en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	171

Tabla 25:	Potencia (IC ₅₀) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μM, del bloqueo del receptor 5-HT _{2A} , y su efecto en la modulación de la eficacia de 5-HT (E _{max} 5-HT), en ausencia y presencia de SB-269970 (1 μM), en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	172
Tabla 26:	Potencia de los agonistas dopamina y 5-HT (EC ₅₀) para inhibir la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μM dependiente de proteína G _{i/o} del receptor D ₂ y activar la producción de IPs dependiente de proteína G _q del receptor 5-HT _{2A} , respectivamente, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	175
Tabla 27:	Parámetros de afinidad (K _i) por el receptor de serotonina 5-HT _{2A} del agonista endógeno no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (±)DOI, en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	177
Tabla 28:	Parámetros de afinidad (K _i) por el receptor de serotonina 5-HT _{2A} de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	178
Tabla 29:	Parámetros de afinidad (K _i) de la dopamina por el receptor de dopamina D ₂ , en membranas no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	179
Tabla 30:	Parámetros de afinidad (K _i) de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina por el receptor de dopamina D ₂ , en membranas no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	180
Tabla 31:	Parámetros de afinidad (K _i) de los antipsicóticos atípicos risperidona y aripiprazol por el receptor de dopamina D ₂ , en membranas no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	181

Tabla 32:	Parámetros de afinidad (K_i) del antipsicótico atípico clozapina por el receptor de dopamina D_2 , en membranas no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	182
Tabla 33:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista endógeno 5-HT en la estimulación de la producción de IPs dependiente de la proteína G_q asociada al receptor 5-HT $_{2A}$, en células previamente expuestas a doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	184
Tabla 34:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista alucinógeno del receptor 5-HT $_{2A}$ (\pm)DOI en la producción de IPs dependiente de proteína G_q , en células previamente expuestas a doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	185
Tabla 35:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de los agonistas del receptor 5-HT $_{2A}$ no alucinógeno lisurida y alucinógeno LSD en la producción de IPs dependiente de proteína G_i , en células previamente expuestas a doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	186
Tabla 36:	Potencia (EC_{50}) del agonista endógeno dopamina para inhibir la producción de AMPc dependiente de la vía G_i del receptor D_2 , en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	187
Tabla 37:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de los agonistas no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (\pm)DOI para estimular la producción de IPs dependiente de G_q del receptor 5-HT $_{2A}$, en ausencia y presencia de dopamina 1 μ M, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	188
Tabla 38:	Potencia (EC_{50}) del antagonista sulpirida para estimular la producción de AMPc dependiente de la vía G_i del receptor D_2 , en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	189
Tabla 39:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista endógeno 5-HT para estimular la producción de IPs dependiente de G_q del receptor 5-HT $_{2A}$, en ausencia y presencia de sulpirida, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	190

Tabla 40:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista alucinógeno (\pm)DOI para estimular la producción de IPs dependiente de G_q del receptor 5-HT _{2A} , en ausencia y presencia de sulpirida, en células tratadas con doxiciclina.....	191
Tabla 41:	Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M, para antagonizar el receptor 5-HT _{2A} , y su efecto en la modulación de la eficacia de 5-HT 1 μ M (E_{max} 5-HT), en células previamente expuestas a doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	193
Tabla 42:	Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M, para bloquear el receptor 5-HT _{2A} , y su efecto en la modulación de la eficacia de 5-HT 1 μ M (E_{max} 5-HT), en ausencia y presencia de dopamina, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	194
Tabla 43:	Potencia (IC_{50}) de clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M, para antagonizar el receptor 5-HT _{2A} , y su efecto en la modulación de la eficacia de 5-HT 1 μ M (E_{max} 5-HT), en ausencia y presencia de sulpirida, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	196
Tabla 44:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista dopamina para inhibir la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μ M dependiente de la proteína $G_{i/o}$ asociada al receptor D ₂ , en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	197
Tabla 45:	Potencia (EC_{50}) del agonista alucinógeno (\pm)DOI para activar la producción de IPs dependiente de la vía G_q del receptor 5-HT _{2A} , en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	198
Tabla 46:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de la dopamina para inhibir la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μ M dependiente de G_i del receptor D ₂ en ausencia y presencia de (\pm)DOI, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	199

Tabla 47:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de la dopamina para inhibir la producción de AMPc dependiente de G_i del receptor D_2 sola, en presencia de (\pm)DOI 0.1 μ M, (\pm)DOI y ketanserina 0.1 μ M, y (\pm)DOI y ketanserina 1 μ M, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	202
Tabla 48:	Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de dopamina D_2 de la dopamina en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del agonista alucinógeno del receptor 5-HT _{2A} (\pm)DOI (0.1, 1 y 10 μ M) en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	203
Tabla 49:	Potencia (EC_{50}) del antagonista selectivo del receptor de serotonina 5-HT _{2A} ketanserina para inhibir la producción de IPs dependiente de la vía G_q , en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	204
Tabla 50:	Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de la dopamina para inhibir la producción de AMPc dependiente de G_i del receptor D_2 , en ausencia y presencia de ketanserina, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	206
Tabla 51:	Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μ M, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	207
Tabla 52:	Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μ M, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina 1 μ M (E_{max} DA), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	209
Tabla 53:	Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μ M, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la	

	dopamina (E_{\max} DA y E_{\min} DA), en ausencia y presencia de (\pm)DOI, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	211
Tabla 54:	Potencia (IC_{50}) del antipsicótico típico haloperidol, en presencia de dopamina 1 μ M, para antagonizar el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{\max} dop E_{\min} dop), solo, en presencia de (\pm)DOI 0.1 μ M y (\pm)DOI y ketanserina 0.1 μ M, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.....	212
Tabla 55:	Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de dopamina D_2 del antipsicótico típico haloperidol, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del agonista alucinógeno del receptor $5-HT_{2A}$ (\pm)DOI (0.1, 1 y 10 μ M), en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	214
Tabla 56:	...Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μ M, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{\max} DA E_{\min} DA), en ausencia y presencia de (\pm)DOI, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	216
Tabla 57:	Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μ M, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{\max} DA), en ausencia y presencia de ketanserina, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.	218
Tabla 58:	Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μ M, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{\max} DA), en ausencia y presencia de ketanserina, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas	220

µg:	Microgramo
µl:	Microlitro
µM:	Micromolar
5-HT:	5-Hidroxitriptamina
5-HT_{1(A,B,D,E,F)}:	Receptores de serotonina de los subtipos 1A, 1B, 1D, 1E y 1F
5-HT_{2(A,B,C)}:	Receptores de serotonina de los subtipos 2A, 2B y 2C
5-HT₃:	Receptor de serotonina del subtipo 3
5-HT₄:	Receptor de serotonina del subtipo 4
5-HT_{5(A,B)}:	Receptores de serotonina de los subtipos 5A y 5B
5-HT₆:	Receptor de serotonina del subtipo 6
5-HT₇:	Receptor de serotonina del subtipo 7
A_{2A}:	Receptor de Adenosina del subtipo A2
AA:	Araquidónico
AC:	Adenilato Ciclasa
ACTH:	Hormona adrenacorticotropa
AFM:	Microscopía de Fuerza Atómica
Akt1:	Serina-treonina quinasa 1
AMPC:	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
B_{max}:	Número o densidad máxima de sitios de unión
BRET:	Transferencia de Energía de Resonancia Bioluminiscente
BSA:	Albúmina de Suero Bovino
Ca⁺²:	Ion calcio
CaCl₂:	Cloruro de calcio
CamKII:	Calmodulina proteína quinasa II
CB₁:	Receptor Canabinoide del subtipo 1
CDPPB:	3-ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il)benzamida
CFP:	Proteína Fluorescente Cian
Ci:	Curio
cm:	Centímetro
CNV:	Variación en el número de copias

Relación de abreviaturas

CO₂:	Dióxido de carbono
COMT:	Catecol-O-Metiltransferasa
CREB:	Elemento de respuesta a AMPc
D_{1,2,3,4,5}:	Receptor de dopamina de los subtipos 1, 2, 3, 4 y 5
D₂L:	Isoforma larga del receptor D ₂
D₂S:	Isoforma corta del receptor D ₂
DA:	Dopamina
DAG:	Diacilglicerol
DARPP-32:	Fosfoproteína neuronal regulada por dopamina y AMPc
DISC1:	Disruptivo in schizophrenia 1
DMEM:	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DOI:	(±)-2,5-Dimetoxi-4-yodoanfetamina
DSM:	Manual de diagnóstico y estadística de enfermedades mentales de la <i>American Psychiatric Association</i>
e1, e2 y e3:	Lazos extracelulares
E_{basal}:	Efecto basal
EC₅₀:	Concentración efectiva media de un agonista
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético
eem:	Error estándar de la media
E_{max}:	Efecto máximo
ErbB:	Factor de crecimiento epidérmico
ERK:	Quinasa regulada por señal extracelular
FBS:	Suero Fetal Bovino
Fd:	Factor de dilución
fmol:	Fentomol
FRAP:	Recuperación de Fluorescencia Posterior al Fotoblanqueamiento
FRET:	Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia
FSK:	Forskolina
g:	Gramos

g:	Unidad de medida relativa de aceleración
GABA:	Ácido gamma-aminobutírico
GABA_{A,B,C}:	Receptores GABA de los subtipos A (ionotrópico) y B y C (metabotrópicos)
GABA_{B(1,2)}:	Receptores GABA de los subtipos B1 y B2
GAD₆₇:	Descarboxilasa del ácido glutámico de 67 kDa
GAP:	Proteína aceleradora de la actividad GTPasa
GDP:	Guanosín difosfato
GEF:	Factor intercambiador de nucleótido de guanina
GluA:	Receptor ionotrópico de glutamato AMPA
GluA₁:	Subunidades 1 de los receptores AMPA
GluN:	Receptor ionotrópico de glutamato NMDA
GluN_{2B}:	Subunidad 2B de los receptores NMDA
GPCR:	Receptor acoplado a proteína G
GRK1-7:	Quinasas Receptoras de proteínas G
GSK3:	Glucógeno sintasa quinasa 3
GTP:	Guanosín trifosfato
GTPasa:	Guanosín trifosfatasa
h:	Hora
HBSS:	Solución salina balanceada de Hank
HCl:	Ácido clorhídrico
HEK293:	Células embrionarios de riñón humano 293
HEPES:	4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HTRF:	Fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo
i1, i2, i3:	Lazos intracelulares 1, 2 y 3
IBMX:	3-Isobutil-1-metilxantina
IC₅₀:	Concentración efectiva media de un antagonista o agonista inverso
IC₅₀:	Concentración inhibitoria del 50%
ICD:	Clasificación Internacional de Enfermedades
IP3:	Inositol 1,4,5-trifosfato

Relación de abreviaturas

IP₄:	Inositol tetrafosfato
IPs:	Inositol fosfatos
JNK:	Quinasas c-Jun N-terminal
K_B:	Constante de disociación
KCl:	Cloruro potásico
K_D:	Constante de disociación en el equilibrio
kDa:	Kilodalton
KH₂PO₄:	Fosfato de potasio
K_i alta:	Constante de inhibición de alta afinidad
K_i baja:	Constante de inhibición de baja afinidad
K_i:	Constante de inhibición
KO:	Knockout
L:	Litros
LiCl:	Cloruro de litio
LSD:	Dietilamida de ácido lisérgico
MAPK:	Proteína Quinasa Activada por Mitógeno
mg:	Miligramo
MgCl₂:	Cloruro de magnesio
mGluR_{2,3,5}:	Receptor metabotrópicos de glutamato de los subtipos 2, 3 y 5
ml:	Mililitro
mmol:	Milimol
MPEP:	2-Metil-6-(feniletinil)piridina
NaCl:	Cloruro sódico
NaH₂PO₄:	Fosfato de sodio
NAM:	Modulador Alostérico Negativo
ng:	Nanogramo
ng:	Nanogramo
nM:	Nanomolar
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NRG1:	Neuroregulina 1
NSB:	Binding no específico

OBD:	Dominio de unión ortostérico
°C:	Grados Celsius
p:	Probabilidad
PAM:	Modulador Alostérico Positivo
PCP:	Fenciclidina
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCβ:	Fosfolipasa Cβ
PDE:	Fosfodiesterasa
PDZ:	Acrónimo que combina la letra inicial de tres proteínas: <i>Post synaptic density protein</i> (PSD95), <i>Drosophila disc large tumor supresor</i> (DlgA) y <i>zonula occludens-1 protein</i> (zo-1)
PET:	Tomografía por Emisión de Positrones
PFC:	corteza prefrontal
PI3K:	Fosfatidil-inositol-3-quinasa
PIP₂:	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA:	Proteína Quinasa A
PKC:	Proteína Quinasa A
PLA:	Técnica de ligación por proximidad
PLA₂:	Fosfolipasa A ₂
PLD:	Fosfolipasa D
PP1:	Proteína fosfatasa 1
PP2A:	Proteína fosfatasa 2 ^a
PPI:	Inhibición del prepulso
PRODH:	Prolina deshidrogenasa
RNA:	Ácido ribonucleico
rpm:	Revoluciones por minuto
SB:	Binding específico
SNC:	Sistema Nervioso Central
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido
SNP:	Sistema Nervioso Periférico
SPECT:	Tomografía computarizada de emisión monofotónica

Relación de abreviaturas

TAC:	Tratamiento Asertivo Comunitario
TB:	<i>Binding</i> Total (Unión total)
TM:	Transmembrana
UV:	Luz ultravioleta
VCFS:	Síndrome velo-cardio-facial
VTA:	Área tegmental ventral
YFP:	Proteína Fluorescente Amarilla
βArr2:	Proteína adaptadora multifuncional β-arrestina 2



La esquizofrenia es un trastorno mental crónico que padece el 1% de la población mundial, con múltiples y variados síntomas (psicosis, retraimiento social, anhedonia, déficit de atención y memoria, etc.), cuya etiología se fundamenta en la confluencia de diversas causas de índole genética y ambiental. Durante la investigación de esta enfermedad, se ha descrito un gran abanico de GPCRs que guardan relación con su desarrollo y tratamiento, siendo los receptores de dopamina D_2 y de serotonina $5-HT_{2A}$ los que tienen una mayor relevancia, al constituir las principales dianas de los antipsicóticos de primera y segunda generación. El tipo de célula y el entorno en el que está ubicada condicionan la expresión génica de los GPCRs, su presencia en la membrana y en último término, los estados conformacionales que pueden adquirir, así como los procesos de mono y oligomerización entre unidades iguales o distintas. Tras el hallazgo del heterodímero D_2-5-HT_{2A} *in vitro* y su identificación *in vivo*, concretamente en regiones cerebrales asociadas a desórdenes psicóticos, varios autores han defendido su implicación en la patología de la esquizofrenia, pudiendo conformar una posible diana terapéutica en su tratamiento. Recientemente, se estableció que la expresión del receptor $5-HT_{2A}$ es necesaria para que el haloperidol tenga un efecto antipsicótico completo. En la presente tesis doctoral, se ha estudiado *in vitro* el *cross-talk* funcional existente en el heterocomplejo D_2-5-HT_{2A} , en relación a los mecanismos de señalización específicos de compuestos alucinógenos, así como en la farmacología antipsicótica. El principal hallazgo de esta investigación se ha fundamentado en la descripción de múltiples fenómenos de alosterismo entre los receptores del heterodímero D_2-5-HT_{2A} . Por un lado, se observó que la expresión y bloqueo del receptor D_2 desencadenan, respectivamente, procesos de cooperatividad positiva y negativa, en la eficacia de activación del receptor $5-HT_{2A}$ por el alucinógeno (\pm)DOI. Por otro lado, se observó que la estimulación del receptor $5-HT_{2A}$ por (\pm)DOI generó una modulación funcional de la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 activado por dopamina y antagonizado por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, y atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol. En resumen, estos resultados han establecido la existencia de una regulación interfuncional entre los receptores del heterodímero D_2-5-HT_{2A} , en rutas de señalización dirigidas por agonistas alucinógenos y fármacos antipsicóticos.





JUSTIFICACIÓN,

HIPÓTESIS Y

OBJETIVOS



JUSTIFICACIÓN

La esquizofrenia es un desorden mental severo con una prevalencia del 1% en la población mundial, caracterizada por psicosis (delirios y alucinaciones), apatía y retraimiento social, así como por daño cognitivo que afecta a la atención, concentración y memoria (Meyer y McCabe, 2012). Esta enfermedad se manifiesta en la edad adulta temprana y frecuentemente sigue un curso crónico. La esquizofrenia no tiene una causa única y definida, pero existen numerosas evidencias que sugieren que influencias ambientales (por ejemplo, complicaciones obstétricas o abuso de drogas), factores genéticos y elementos sociales como la pobreza contribuyen a su desarrollo (Mueser y McGurk, 2004). Su diagnóstico se basa fundamentalmente en el examen de los síntomas psicóticos que el paciente presenta, así como en la evaluación de alteraciones neurocerebrales características de esta enfermedad (agrandamiento de los ventrículos tercero y laterales, reducción del volumen del neuropilo cortical e hipocampal, etc.) (Harrison J., 1999; Lewis y Lieberman, 2000; Os y Kapur, 2009).

Existen diversas hipótesis que intentan explicar la fisiopatología de la esquizofrenia, como la alteración de los principales sistemas de neurotransmisión cerebrales (hipótesis dopaminérgica, serotoninérgica y glutamatérgica, entre otras). Mientras la hipótesis dopaminérgica establece que el desarrollo de síntomas psicóticos viene dado por una hiperactivación de receptores de dopamina D₂ asociada a una hiperestimulación de la vía dopaminérgica mesolímbica, la hipótesis serotoninérgica defiende el papel del receptor de serotonina 5-HT_{2A} en el desencadenamiento de síntomas positivos, alegando que sustancias alucinógenas como LSD y DOI son agonistas de dicho receptor y su efecto psicotrópico es dependiente del mismo (Gonzalez-Maeso y cols., 2007; Bartolomeis y cols., 2013). Sin embargo, estas hipótesis no son excluyentes, pues los sistemas de neurotransmisión cerebrales están perfectamente integrados, de tal manera que alteraciones en uno de ellos modifican el funcionamiento de otros.

Tanto los antipsicóticos típicos como los atípicos antagonizan el receptor de dopamina D_2 , pero según Meltzer, la atipicidad de los antipsicóticos de segunda generación reflejada en la menor incidencia de síntomas extrapiramidales y buena eficacia en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos, podría atender a un mayor bloqueo del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ con respecto al receptor de dopamina D_2 (Meltzer y cols., 1989). Por otro lado, el perfil atípico de los antipsicóticos de segunda generación se ha explicado durante años por una liberación de dopamina en las vías dopaminérgicas nigroestriatal (ausencia de síntomas extrapiramidales), mesocortical (eficiencia en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos) y tuberinfundibular (ausencia de hiperprolactemia) inducida tras el bloqueo del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ (Westerink, 2002). No obstante, actualmente algunos autores fundamentan la atipicidad de los antipsicóticos de segunda generación en la existencia del heterodímero formado por los receptores de dopamina D_2 y de serotonina $5-HT_{2A}$. Investigaciones anteriores han concluido el requerimiento de la expresión del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ para el desencadenamiento de una respuesta antipsicótica eficaz de neurolépticos convencionales como el haloperidol (Albizu y cols., 2011), cuya eficacia terapéutica ha sido tradicionalmente asociada al bloqueo del receptor de dopamina D_2 .

Los receptores de dopamina D_2 y de serotonina $5-HT_{2A}$ pertenecen a la familia A de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), que recientemente se ha demostrado que pueden formar complejos constituidos por dos o más monómeros de igual o distinto tipo, habiéndose descrito, entre otros, los homodímeros de receptores $5-HT_{2A}$ (Brea y cols., 2009), receptores D_2 (Fonseca y Lambert, 2009), receptores $5-HT_{2C}$ (Harrick-Davis y cols., 2005), receptores $5-HT_7$ (Teitler y cols., 2010), y los heterodímeros D_2-5-HT_{2A} (Lukasiewicz y cols., 2010; Borroto-Escuela y cols., 2010) y $mGluR_2-5-HT_{2A}$ (González-Maeso y cols., 2008), todos ellos implicados en desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia. El hallazgo de la existencia de la oligomerización añadió un mayor nivel de complejidad a los mecanismos de señalización mediados por la activación, bloqueo o inhibición de los GPCRs, que adicionalmente son modulados por las distintas conformaciones que pueden adoptar

los receptores, cada una de las cuales es estabilizada por ligandos diferentes, proceso conocido con el nombre de señalización dirigida por agonista o selectividad funcional.

La importancia del estudio del heterodímero D₂-5-HT_{2A} recae en el hecho de que ambos receptores constituyen las principales dianas de los fármacos antipsicóticos, además de estar presentes en sistemas de neurotransmisión alterados en esquizofrenia. Tras su hallazgo *in vitro*, en células HEK293 transfectadas transitoriamente (Borroto-Escuela y cols., 2010; Lukasiewicz y cols., 2010), el heterodímero D₂-5-HT_{2A} se identificó *in vivo* (concretamente, en cerebro de rata), en regiones involucradas en la patología de desórdenes psicóticos, como el estriado dorsal y ventral, el núcleo accumbens y regiones corticales (Borroto-Escuela y cols., 2014). Por otro lado, investigaciones recientes demostraron la existencia de un *crossstalk* funcional en el heterocomplejo D₂-5-HT_{2A} (Borroto-Escuela y cols., 2010; Albizu y cols., 2011; Borroto-Escuela y cols., 2014), que establecieron que tras la formación del mismo, se produce una modulación de las vías de señalización de ambos receptores, estimulados o bloqueados por determinados fármacos. En relación a ello, se observó que los agonistas alucinógenos del receptor 5-HT_{2A} activan vías de señalización específicas mediadas por el heterodímero D₂-5-HT_{2A} (Albizu y cols., 2011; Borroto-Escuela y cols., 2014). El desarrollo de nuevas herramientas, como los sistemas de expresión heterólogos *on/off*, siendo un ejemplo la línea celular HEK293 Flp-In T-REx empleada en este trabajo de investigación, han permitido estudiar las regulaciones interfuncionales en el heterodímero D₂-5-HT_{2A}, posibilitando el control de la expresión del receptor 5-HT_{2A} inducible por doxiciclina.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente tesis doctoral se ha considerado de interés el estudio del heterodímero D₂-5-HT_{2A} en relación a la farmacología antipsicótica *in vitro*. Dilucidar nuevos aspectos en los mecanismos de señalización asociados al heterodímero D₂-5-HT_{2A} podría abrir nuevas vías de investigación en el desarrollo de fármacos antipsicóticos más eficaces en el tratamiento del conjunto de los síntomas positivos, negativos y cognitivos con ausencia de efectos secundarios.

HIPÓTESIS

El heterodímero D_2-5-HT_{2A} podría influir en los mecanismos de señalización implicados en la farmacología de la esquizofrenia.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la influencia del heterodímero D_2-5-HT_{2A} en la farmacología de los antipsicóticos, mediante el desarrollo de nuevas herramientas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Creación de una herramienta dimérica D_2-5-HT_{2A} .**
 - 1) Definir, mediante microscopía de fluorescencia, las condiciones de inducción con doxiciclina del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$, en la línea celular HEK293 Flp-In T-REx que expresa el receptor de dopamina D_2 .
 - 2) Caracterizar la expresión y función de los receptores D_2 constitutivo y $5-HT_{2A}$ inducible por doxiciclina, en la línea de trabajo HEK293.
 - 3) Caracterizar las posibles interferencias en la señalización del heterodímero D_2-5-HT_{2A} , en la línea de trabajo HEK293.
- **Desarrollo de una nueva metodología.**
 - 4) Desarrollar un método multiplex de medición simultánea de AMPc e IPs para el heterodímero D_2-5-HT_{2A} .
- **Influencia de la heterodimerización D_2-5-HT_{2A} en la farmacología de los antipsicóticos.**
 - 5) Evaluar la influencia de la heterodimerización D_2-5-HT_{2A} en la afinidad de agonistas y antagonistas (antipsicóticos) por ambos receptores.
 - 6) Evaluar la influencia de la heterodimerización D_2-5-HT_{2A} en la potencia y eficacia de agonistas y antagonistas (antipsicóticos) sobre ambos receptores.



INTRODUCCIÓN



I. ESQUIZOFRENIA

A) ASPECTOS GENERALES

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica que afecta aproximadamente al 1 % de la población mundial (Sawa y Snyder, 2002; Ross y cols., 2006; González-Maeso y Sealfon 2009). Se caracteriza por la pérdida del sentido de la realidad (psicosis), acompañada de delirios y alucinaciones, que evoluciona a un deterioro insidioso del afecto emocional y de la cognición. Constituye una de las principales causas de discapacidad en el mundo, siendo la séptima enfermedad con mayor coste médico para nuestra sociedad (Freedman, 2003; Ross y cols. 2006). Asimismo, se ha reportado una tasa de mortalidad de los pacientes con esquizofrenia cuatro veces superior a la de la población general, debido a que el 10% mueren prematuramente por suicidio (Lewis y Lieberman, 2000; Karam y cols., 2010). Se desconocen las causas precisas que generan este trastorno mental, pero los estudios epidemiológicos destacan la asociación entre factores genéticos y ambientales en la base de su desarrollo (Stefansson y cols., 2008; International Schizophrenia Consortium, 2008; González-Maeso y Sealfon 2009). El progreso en su estudio ha sido lento y limitado debido a varios factores, como su elevada heterogeneidad fenotípica y la carencia de lesiones patológicas claras, a diferencia de otros desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Ross y cols. 2006).

B) SINTOMATOLOGÍA Y FASES DE LA ENFERMEDAD

La esquizofrenia se presenta al final de la adolescencia o edad adulta temprana. Los individuos afectados experimentan un amplio espectro de síntomas agrupados en varias dimensiones (Figura 1):

❖ **SINTOMAS POSITIVOS:** representan un exceso de las funciones normales y una evaluación distorsionada y dañada de la realidad. Incluyen:

◆ **Delirios:** interpretación errónea de las percepciones o de la experiencia. Existen diferentes tipos de delirios, aunque el más habitual es el persecutorio.

- **Delirio de persecución:** el individuo cree constantemente que está siendo perseguido, de tal manera que su correspondencia siempre es revisada, se hacen registros en su habitación u oficina, su teléfono es intervenido, etc.

- **Delirio de culpa o pecado:** el individuo tiene la creencia de que ha cometido un pecado terrible, a veces sintiéndose responsable de un accidente o desastre con el cual no tiene ningún tipo de conexión.

- **Delirio de grandeza:** el individuo tiene la percepción de poseer poderes o habilidades especiales. Cree que es un personaje famoso, un mesías, etc., o cree estar desarrollando un libro, composición musical o invento maravilloso.

- **Delirio religioso:** el individuo está preocupado por creencias de naturaleza religiosa, como la posesión por el demonio, la reencarnación o el nirvana.

- **Delirios somáticos:** el individuo cree que su cuerpo o alguna parte de él es anormal o ha cambiado.

- **Delirios de referencia:** el individuo cree que detalles, frases o acontecimientos sin importancia están referidos a él.

- **Delirio de control:** el individuo cree firmemente que sus sentimientos o acciones están controladas por una fuerza exterior.

◆ **Alucinaciones:** percepción ilusoria no correspondida a un estímulo exterior. Las alucinaciones pueden ocurrir en cualquiera de las cinco modalidades sensoriales, aunque las auditivas son las más comunes.

◆ **Habla o discurso desorganizado:** dificultad para comunicarse de manera lógica y coherente.

◆ **Conducta desorganizada:** realización de gestos o movimientos repetitivos y ritualistas, expresión de un afecto incongruente, vestimenta inapropiada, etc.

- ❖ **SINTOMAS NEGATIVOS:** representan una pérdida o reducción de las funciones normales. Incluyen:
 - ◆ **Abulia:** carencia de voluntad y de motivación.
 - ◆ **Alogia:** restricciones en la fluidez verbal, lenguaje escaso y empobrecimiento del pensamiento y del contenido del discurso.
 - ◆ **Anhedonia:** incapacidad de experimentar placer o disfrute, ante estímulos habitualmente positivos.
 - ◆ **Apatía:** falta de interés.
 - ◆ **Embotamiento o aplanamiento afectivo:** dificultad para sentir y expresar emociones.
 - ◆ **Otros:** retraimiento emocional y social, escasa capacidad de contacto, falta de espontaneidad.
- ❖ **SINTOMAS COGNITIVOS:** incluyen déficit de memoria (especialmente, memoria de trabajo), falta de atención y concentración, alteración de la capacidad ejecutiva y planificadora, incapacidad en el establecimiento de prioridades y en la modulación de la conducta en base a señales sociales.

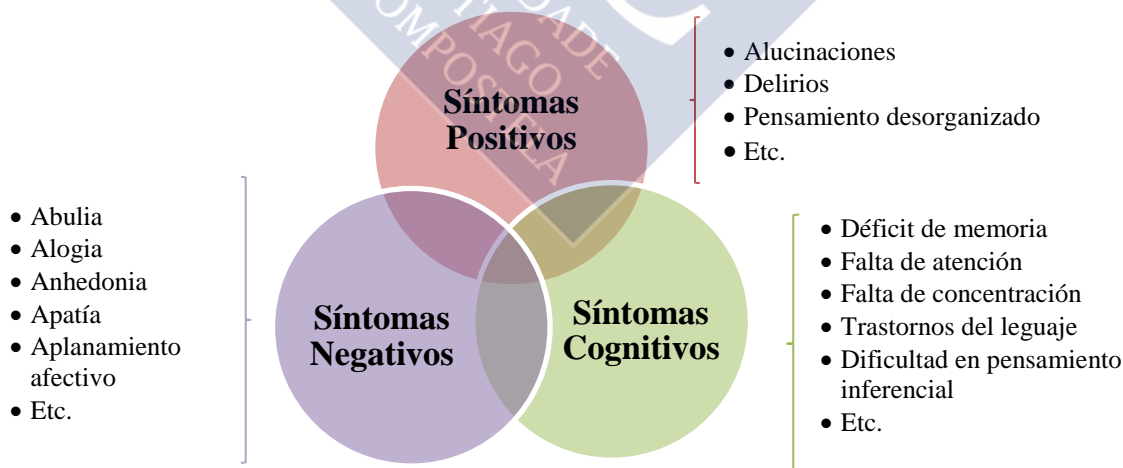


Figura 1. Sintomatología de la esquizofrenia.

La esquizofrenia se caracteriza por un curso secuencial de varias fases (Figura 2), aunque la demarcación entre las mismas es imprecisa (Tandon y cols., 2009):

- ❖ **FASE PREMÓRBIDA:** alberga disfunciones cognitivas, sociales y/o motoras no específicas (Schenkel and Silverstein, 2004) que constituyen factores de riesgo en el desarrollo de la enfermedad (Tandon y cols., 2009).
- ❖ **FASE PRODRÓMICA:** incluye síntomas positivos atenuados, así como síntomas negativos y cognitivos, considerados en su conjunto como manifestaciones tempranas de la enfermedad (Cornblatt y cols., 1999). Esta fase puede durar desde meses hasta años, con una media de 5 años (Hafner y an der Heiden, 1999; Klosterkötter y cols., 2008). Se estima que la mitad de los individuos con estas manifestaciones clínicas no llegan a desarrollar la enfermedad (Tandon y cols. 2009).
- ❖ **FASE PSICÓTICA:** comienza con el primer episodio psicótico, que marca el inicio de la esquizofrenia, y típicamente ocurre a la edad de entre 15-45 años, aunque raramente se da antes de la pubertad o después de los 50 años (Gross, 1997). Un comienzo muy temprano de la enfermedad (edades inferiores a 13-20 años) se asocia con una manifestación más severa de síntomas negativos y cognitivos (DeLisi, 1992; Luoma y cols., 2008). La primera década de la enfermedad está marcada por episodios psicóticos recurrentes progresivamente menos intensos alternados con remisiones inter-episódicas en las que se exhiben síntomas negativos y cognitivos.
- ❖ **FASE ESTABLE:** los síntomas positivos son menos prominentes, en contraste con la cronicidad de los síntomas negativos y cognitivos característicos de esta fase.

Aunque no se produce una recuperación total del paciente, tras el tratamiento con antipsicóticos, una proporción significativa de individuos con esquizofrenia exhiben una mejora sustancial.

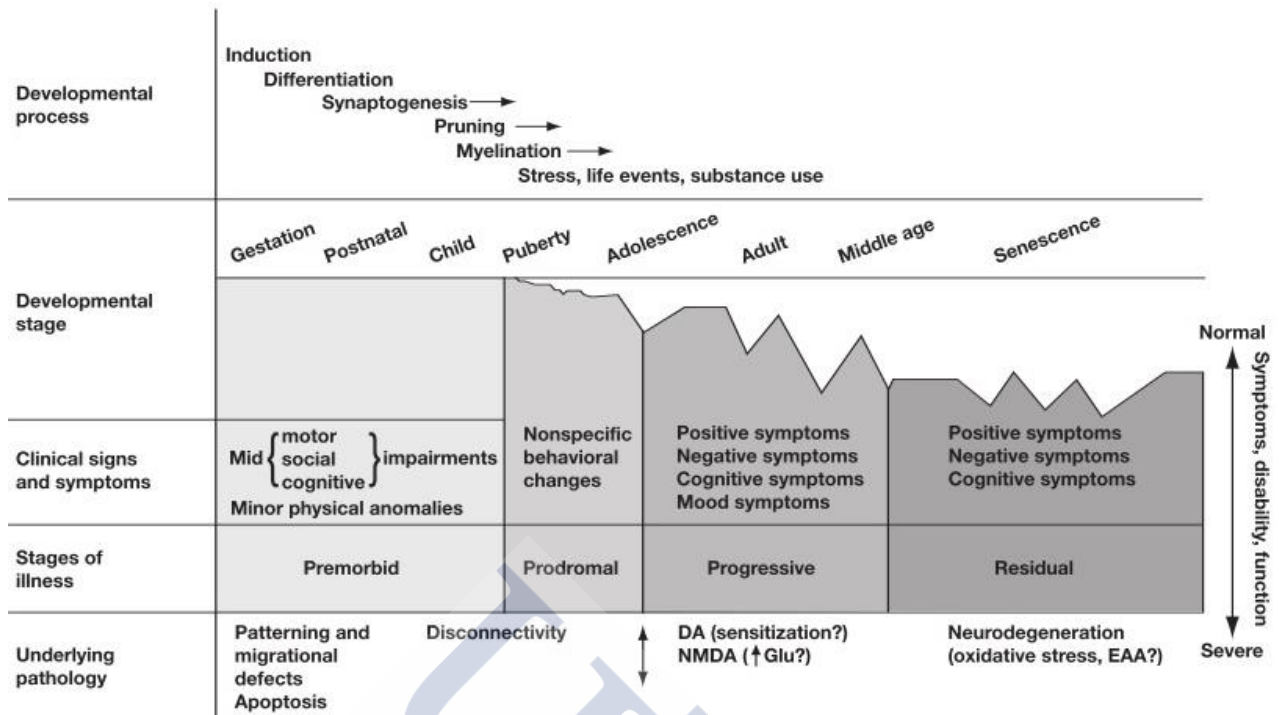


Figura 2. Fases de la esquizofrenia (Winlow y cols., 2006).

C) ETIOLOGÍA

La esquizofrenia es una enfermedad de causa desconocida y naturaleza multifactorial. La hipótesis más aceptada sobre su etiología defiende que su origen está en la confluencia de múltiples factores genéticos y ambientales (Andreasen, 1999).

❖ FACTORES GENÉTICOS:

La esquizofrenia tiene un componente genético sustancial y se estima que su heredabilidad es de aproximadamente el 80% (González-Maeso y Sealfon, 2009; Bray y cols., 2010). Estudios en familias, gemelos y adopciones indican que el riesgo de desarrollar la enfermedad en parientes se correlaciona con el grado de genes compartidos. En contraste al 1% de su incidencia en la población general, este parámetro es de aproximadamente 2% en familiares de tercer grado (por ej., primos), 2-6% en parientes de segundo grado (por ej., sobrinos) y 6-17% en familiares de primer grado (padres, hermanos o hijos). En gemelos, la incidencia de la esquizofrenia

es alrededor de 17% en dicigóticos y cerca de 50% en monocigóticos (Lewis y Liberman, 2000).

La esquizofrenia es un desorden poligenético, que implica variantes en múltiples genes que individualmente son insuficientes para causar la enfermedad. No obstante, la susceptibilidad genética ligada a determinados factores ambientales incrementa el riesgo de desarrollo de esta patología (Bray y cols., 2010).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) causan solamente un ligero incremento en el riesgo de padecer esquizofrenia. Sin embargo, estudios de asociación del genoma completo han identificado variaciones en el número de copias (CNVs) que parecen estar fuertemente asociadas a desórdenes psiquiátricos (Sebat y cols., 2009; Karam y cols., 2010).

Se han realizado múltiples estudios sobre genes candidatos asociados a esquizofrenia, y su relación con las vías de señalización que subyacen a esta enfermedad (Figura 3). Entre ellos, cabe destacar:

- ◆ Neuroregulina 1 (NRG1): esta proteína, vía receptores del factor de crecimiento epidérmico (ErbB) y N-Metil-D-Aspartato (NMDA), está implicada en la diferenciación y migración neuronal. Asimismo, también juega un papel importante en los procesos de mielinización, desarrollo de células gliales e interneuronas GABAérgicas, formación de espinas dendríticas y expresión de receptores de serotonina y dopamina y transportadores de monoaminas (Mei y Xiong, 2005; Ross y cols., 2006; Karam y cols., 2010).
- ◆ Disruptivo en esquizofrenia 1 (DISC 1): este gen fue identificado en una familia escocesa con un fuerte historial de esquizofrenia y trastornos relacionados. Se trata de una proteína localizada a nivel sináptico implicada en la migración y plasticidad neuronal, el crecimiento de neuritas, modulación funcional del citoesqueleto y transmisión sináptica (Ross y cols., 2006; Karam y cols., 2010).
- ◆ Serina-Treonina Quinasa Akt1 / Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (Akt1/GSK3): la Akt es una proteína quinasa implicada en metabolismo, estrés celular y regulación del ciclo celular, así como en tamaño y supervivencia neuronal y plasticidad psináptica. Tiene 3 isoformas (Akt1, Akt2 y Akt3) y el haplotipo Akt1 co-segrega con esquizofrenia. Se han encontrado niveles significativamente bajos de Akt1 en

linfocitos de individuos con esquizofrenia. Al ser activada por la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), la proteína Akt inactiva por fosforilación a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), también implicada en la regulación de la plasticidad psinática. Asimismo, Akt es inactivada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) en un complejo dependiente de arrestina promovido por la activación del receptor D₂ (Emamian y cols., 2004; Karam y cols., 2010).

◆ Genes candidatos en el cromosoma 22: se ha establecido una fuerte asociación genética entre esquizofrenia y la microdelección en el cromosoma 22 (22q11) del síndrome velo-cardio-facial (VCFS) (Karayiorgou y cols., 2010). El VCFS ocurre en uno de cada 2000-4000 nacimientos y el 25-30% de los niños desarrollan esquizofrenia (Karayiorgou y Gogos, 2004). Los ratones Knockout (KO) portadores de la delección 22q11 padecen una disminución de la densidad de espinas dendríticas y sinapsis glutamatérgicas y tienen dañado el crecimiento dendrítico y la conectividad funcional entre el córtex prefrontal y el hipocampo. La región 22q11 incluye al menos 27 genes, de los cuales hay varios asociados a esquizofrenia:

- Prolina deshidrogenasa (PRODH): una actividad disminuida de esta oxidorreductasa altera la función neuronal, ya que está implicada en el inicio de la apoptosis y su sustrato (L-prolina) funciona como un modulador de la transmisión glutamatérgica en el cerebro (Gogos y cols., 1999; Karam y cols. 2010).
- COMT: la catecol-*O*-metiltransferasa metaboliza las catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina) y se ha observado que tanto un aumento como una disminución en su actividad podrían implicar una mayor vulnerabilidad a desarrollar esquizofrenia. Esta enzima interacciona con la PRODH y se ha hipotizado que su aumento podría ser un mecanismo compensatorio de la señalización dopaminérgica potenciada inducida por una deficiencia en PRODH en el córtex prefrontal (Ross y cols., 2006; Karam y cols. 2010).

◆ **Reelina:** la reelina es una proteína de la matriz extracelular que juega un papel clave en la migración neuronal durante el desarrollo del cerebro. Asimismo, la reelina está implicada en la expresión de otras proteínas en las espinas dendríticas, donde se establecen la gran mayoría de las conexiones sinápticas. En cerebros post-mortem de individuos que habían padecido esquizofrenia, se han detectado niveles disminuidos de reelina y ARNm codificante de esta proteína (Ross y cols., 2006; Varela y cols., 2015).

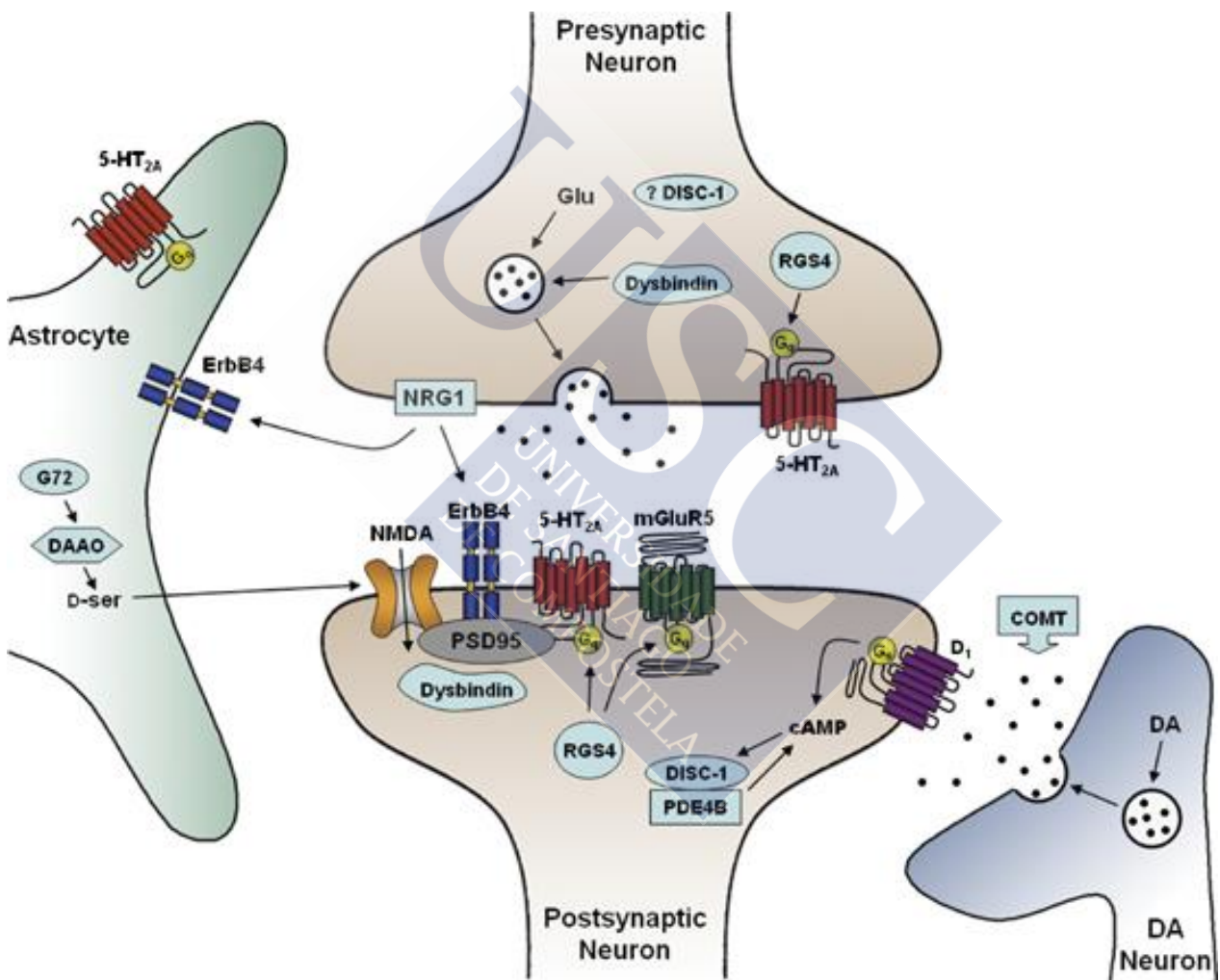


Figura 3. Interrelación de distintos productos génicos asociados con esquizofrenia (Gray y Roth, 2007).

❖ FACTORES AMBIENTALES:

- ❖ Complicaciones prenatales y perinatales: las complicaciones obstétricas tales como nacimiento prematuro, bajo peso al nacer, cesárea de emergencia, incompatibilidad Rh, hipoxia o deficiencia nutricional prenatal constituyen factores de riesgo para esquizofrenia (Cannon y cols., 2002; St Clair y cols., 2005; Ross y cols., 2006). Asimismo, se han asociado infecciones de la madre gestante por el virus de la rubeola, Influenzavirus, herpes simple tipo 1 y 2, citomegalovirus, poliovirus y *Toxoplasma gondii* con mayor susceptibilidad del individuo a padecer esta patología (Brown y Susser, 2002; Ross y cols., 2006). Estas infecciones podrían afectar al desarrollo cerebral del feto al inducir la liberación de hormonas del estrés, hipoxia, hipertermia, malnutrición o respuesta inflamatoria por citoquinas (Gilmore y Jarskog, 1997; Verdoux, 2004; Ross y cols., 2006).
- ❖ Abuso de sustancias: la mayoría de las drogas de abuso incrementan la neurotransmisión dopaminérgica por diferentes mecanismos que pueden precipitar o exacerbar la psicosis. La cocaína bloquea la recaptación de dopamina; las anfetaminas y posiblemente el éxtasis pueden actuar reduciendo el número de recaptadores de este neurotransmisor; los opiáceos aumentan indirectamente los niveles de dopamina al eliminar el control inhibitorio gabaérgico (Frangou, 2008). Investigaciones recientes subrayan el hecho de que el consumo de cannabis a edades tempranas genera un incremento dosis-dependiente en el riesgo de desarrollar esquizofrenia (Frangou, 2008; Meyer y MacCabe, 2012).
- ❖ Urbanidad: una enorme cantidad de evidencias sugiere que una tercera parte de los individuos con esquizofrenia puede estar relacionada con el impacto de ambientes urbanos en su desarrollo cerebral (Lewis y Liberman, 2000; Frangou, 2008).
- ❖ Inmigración: las poblaciones de inmigrantes exhiben una prevalencia de esquizofrenia ligeramente incrementada. Aunque las razones no han sido completamente esclarecidas, es muy probable que la causa se fundamente en el estrés social asociado a la migración como un factor precipitante de la psicosis (Lewis y Liberman, 2000; Frangou, 2008).

- ◆ Diferencia de género: aunque esta enfermedad afecta igualmente a hombres y mujeres, algunos datos sugieren que el género masculino exhibe manifestaciones de este desorden más severas, desarrolla más tempranamente la enfermedad (2-4 años antes), tiene anormalidades neuropatológicas más marcadas y responde peor al tratamiento antipsicótico (Szymanski y cols., 1995; Hafner y cols., 1999; Lewis y Liberman, 2000).
- ◆ Época del año (invierno y primavera): los individuos nacidos en los meses de invierno y primavera tienen un riesgo ligeramente superior de desarrollar esta patología (Torrey y cols., 1997; Bembenek, 2005).

D) DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la esquizofrenia se realiza en base al examen y seguimiento del estado mental del paciente a lo largo de un determinado periodo de tiempo (1-6 meses). No hay test de diagnóstico, ni biomarcadores disponibles para esta enfermedad. En la actualidad, hay dos sistemas de diagnóstico principales para la esquizofrenia: el Manual de Diagnóstico y Estadística de Enfermedades Mentales (DSM-V), editado por la Asociación Americana de Psiquiatría (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-V; American Psychiatric Association; 2013), y la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD-10), realizado por la Organización Mundial de la Salud (International Classification of Mental and Behavioural Disorders, ICD-10; World Health Organization; 1992). Aunque el DSM es más ampliamente usado (Frangou, 2008), ambos sistemas definen objetivamente los síntomas y daños característicos de la esquizofrenia, habiendo permitido una mejora de la fiabilidad de diagnóstico de este desorden mental. Las principales diferencias entre ambos son: el DSM tiene en cuenta la disfunción ocupacional y social (no incluida en la ICD-10) y considera una duración mínima de 6 meses de la enfermedad (versus 1 mes para la ICD-10) (Mueser y McGurk, 2004).

La esquizofrenia comparte algunos de sus síntomas con otros desórdenes mentales, como por ejemplo la psicosis, también característica del trastorno bipolar o el desorden esquizoafectivo. Los sistemas de diagnóstico tradicionales presentan ciertas limitaciones a la hora de determinar endofenotipos (o fenotipos intermedios) y establecer barreras entre las diferentes enfermedades psicóticas. En este sentido, se ha planteado un sistema alternativo de clusterización de los síntomas de los principales desórdenes psicóticos en cinco dimensiones principales (Figura 4): psicosis (síntomas positivos), síntomas negativos, daño cognitivo, manía y depresión. Mientras la esquizofrenia es establecida como un desorden no afectivo, con síntomas positivos, negativos y cognitivos, el trastorno bipolar se caracteriza fundamentalmente por psicosis y manía, siendo el desorden esquizoafectivo el que alberga una mayor heterogeneidad de síntomas de las cinco dimensiones (van Os y Kapur, 2009).

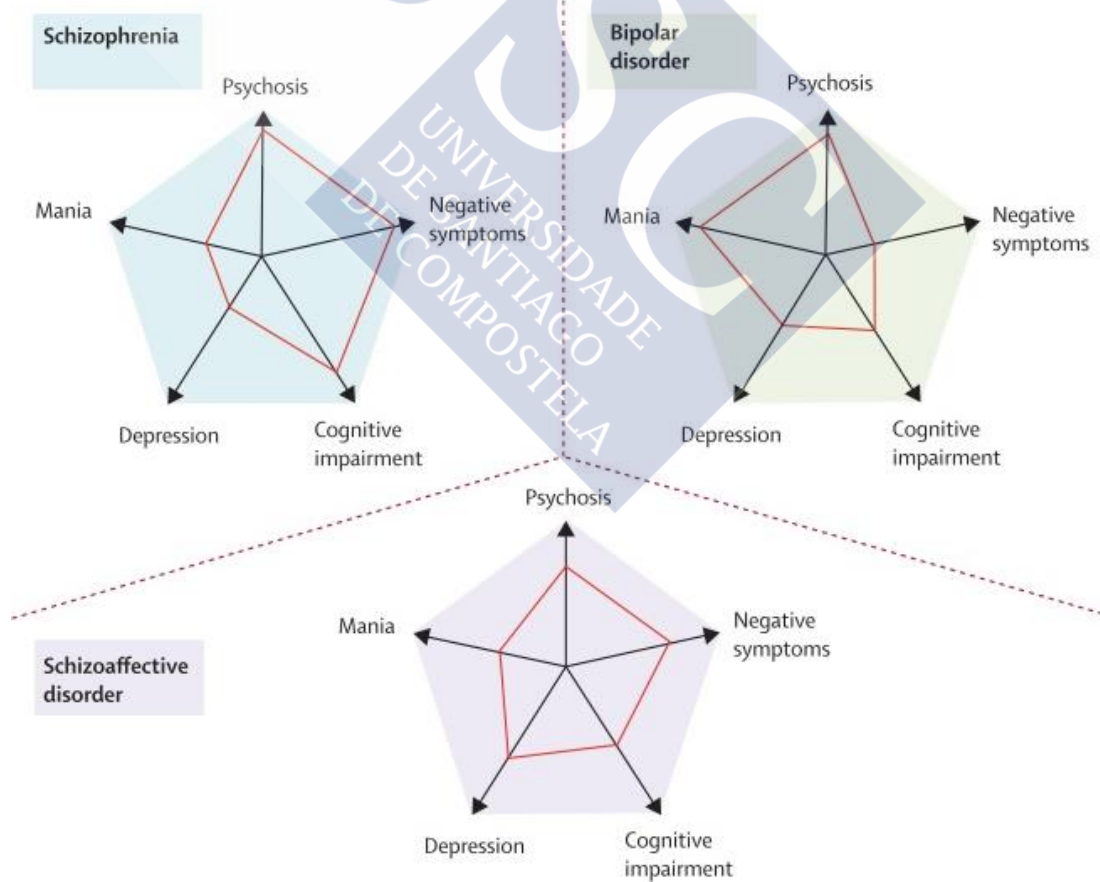


Figura 4. Dimensiones de clusterización de los distintos síntomas de desórdenes psicóticas (van Os y Kapur, 2009).

E) NEUROPATOLOGÍA

Existen numerosos estudios que establecen anomalías en la estructura y conectividad cerebral en diferentes etapas del neurodesarrollo en individuos con esquizofrenia (McCarley y cols., 1999). En este sentido, una lesión neuronal temprana (pre o perinatal) podría incrementar la vulnerabilidad del cerebro a anomalías en procesos de neurodesarrollo tardíos (particularmente, postpubertales), que acompañadas de ciertos factores ambientales (por ejemplo, estrés o abuso de sustancias) conducirían al comienzo de la psicosis y al inicio de la enfermedad (Ross y cols., 2006).

La detección de anomalías cerebrales asociadas a esquizofrenia antes del comienzo de la enfermedad ha permitido excluir la posibilidad de que sean secundarias a su cronicidad o tratamiento (Ross y cols., 2006). En efecto, adolescentes y jóvenes adultos con alto riesgo a desarrollar esquizofrenia por virtud de su historia familiar muestran tales anomalías neuronales (Harrison, 1999).

Estas anomalías neuronales, agravadas en el género masculino (Flaum y cols., 1990; Harrison, 1999), incluyen agrandamiento de los ventrículos tercero y laterales y reducción del volumen del lóbulo temporal medial (formación hipocampal, subiculum, giro parahipocampal), del giro temporal superior (particularmente, en la izquierda) y del tálamo. Asimismo, varios estudios han establecido reducciones en el lóbulo frontal, concretamente en las regiones prefrontal y orbitofrontal (Goldstein y cols., 1999; Lewis y Lieberman, 2000; Ross y cols., 2006). Algunas investigaciones también han registrado un agrandamiento del *cavum septi pellucidum* y anomalías en los ganglios basales, cuerpo caloso y cerebelo (Antonova y cols., 2004; Ross y cols., 2006).

Estudios postmortem y de neuroimagen han documentado una ligera reducción bilateral en el volumen de la formación hipocampal (Harrison, 1999; McCarley y cols., 1999). Asimismo, estudios de tomografía por emisión de positrones han proporcionado evidencias de disfunción hipocampal durante ejercicios de memoria episódica en individuos con esquizofrenia (Heckers y cols., 1998). La reducción del volumen de la formación hipocampal no es atribuible a un decremento en el número de neuronas, sino más bien a una disminución del tamaño del soma (Benes y cols., 1991; Zaidel y cols., 1997), lo que sería consistente con bajos niveles de sinaptofisinas y de

marcadores presinápticos y dendríticos en ciertas subdivisiones del hipocampo (Weinberger, 1999; Lewis and Lieberman, 2000).

La reducción de la materia gris en la corteza prefrontal (PFC) no es tan acusada como en la formación hipocampal. Sin embargo, múltiples estudios del PFC han sido motivados y desarrollados a raíz de la observación de que muchos individuos con esquizofrenia muestran cierta incapacidad en determinadas tareas cognitivas, tales como aquellas que hacen uso de la memoria de trabajo. Muchos estudios postmortem en el PFC dorsal de sujetos con esquizofrenia han notificado una reducción del 5-10% en el espesor cortical, lo que se corresponde con una disminución del tamaño del soma y un incremento en la densidad celular, pero no con cambios en el número de neuronas (Selemon y Goldman-Rakic, 1999; Lewis and Lieberman, 2000) (Figura 5). Asimismo, se han encontrado bajos niveles de sinaptofisinas en el PFC de personas con esquizofrenia (Glantz y Lewis, 1997; Karson y cols., 1999).

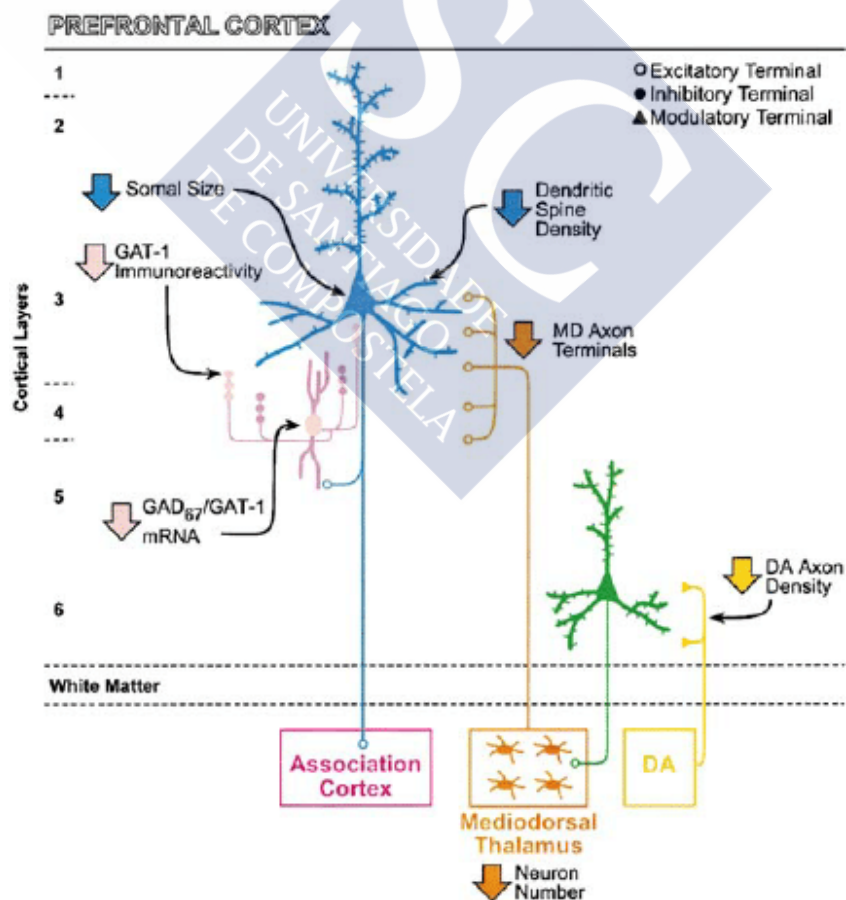


Figura 5. Circuito cortical en esquizofrenia (Ross y cols., 2006).

El agrandamiento del tercer ventrículo parece reflejar una reducción en el tamaño del tálamo, lo que está asociado a un menor número de proyecciones talámicas al PFC (Andreasen y cols., 1994). Estudios postmortem han revelado una reducción del 30% en el número de neuronas en el núcleo talámico mediodorsal, principal fuente de proyecciones talámicas al PFC. La eliminación de terminales axónicos presinápticos procedentes del tálamo podría ser la causa de la resorción de espinas dendríticas postsinápticas en el PFC de individuos con esquizofrenia (Lewis and Lieberman, 2000).

Las investigaciones neuropatológicas de esquizofrenia no han encontrado características típicas de enfermedades neurodegenerativas, como cuerpos de inclusión, neuritas distróficas o gliosis reactiva. Sin embargo, evidencias de anomalías citoarquitectónicas en la corteza entorrinal y otras regiones corticolímbicas, así como una elevada frecuencia de neuronas aberrantes en la materia blanca subyacente al córtex prefrontal y regiones parahipocámpal y temporal sugieren una migración neuronal cortical desordenada en esquizofrenia (Akbarian y cols., 1996; Arnold y cols., 1997; Arnold y cols., 2005; Ross y cols., 2006).

F) NEUROBIOLOGÍA

Existen diferentes hipótesis neuroquímicas que tratan de explicar la desregulación de distintos sistemas de neurotransmisores asociada a esquizofrenia:

❖ HIPÓTESIS DOPAMINÉRGICA:

Esta hipótesis establece una relación entre la desregulación en la transmisión dopaminérgica cerebral y la esquizofrenia (Carlsson, 1978; Carlsson y Carlsson, 2006; Keshavan y cols., 2008). Las principales vías dopaminérgicas cerebrales son (Figura 6):

- ❖ Mesolímbica: proyecta desde el área tegmental ventral del mesencéfalo al núcleo accumbens, una región del sistema límbico implicada en el circuito de recompensa y las sensaciones placenteras. La hipótesis dopaminérgica mesolímbica defiende que la hiperactividad de esta vía, que resulta en una hiperestimulación de los

receptores D₂ (Saiz Ruiz y cols., 2010), constituye la base de generación de los síntomas positivos en esquizofrenia. Esta hipótesis se fundamenta en la observación de dos hechos importantes (Carlsson, 1978; Davis y cols., 1991; Laruelle y cols., 1999; Guillin y cols., 2007):

- Los agentes potenciadores de la transmisión de catecolaminas (por ejemplo, cocaína y anfetaminas) reproducen los síntomas positivos de la esquizofrenia.
- Todos los fármacos antipsicóticos conocidos son antagonistas de receptores dopaminérgicos, particularmente los receptores D₂.

◆ **Mesocortical:** proyecta desde el área tegmental ventral al córtex prefrontal ventromedial y dorsolateral, y está implicada en la regulación de las emociones y el afecto, así como en funciones cognitivas. Algunos investigadores consideran que los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia podrían deberse a una hipoactividad de la vía dopaminérgica mesocortical (Davis y cols., 1991; Keshavan y cols., 2008) que resulta en una hipoestimulación de receptores D₁ (Okubo y cols. 1997; Saiz Ruiz y cols., 2010). Sin embargo, otros autores defienden que esta deficiencia dopaminérgica podría ser secundaria al tratamiento de fármacos antipsicóticos (Lidow y cols., 1997).

◆ **Nigroestriada:** proyecta desde la sustancia negra del troncoencéfalo al estriado. Esta vía forma parte del sistema extrapiramidal y desempeña un papel clave en el control de los movimientos motores. En individuos con esquizofrenia no tratada, esta vía puede estar relativamente preservada. Sin embargo, pacientes que han sido tratados con antipsicóticos, especialmente los de primera generación, suelen evidenciar un déficit dopaminérgico de esta vía, que está ligado a trastornos del movimiento, como parkinsonismo, acatisia y distonía (síntomas extrapiramidales).

◆ **Tuberinfundibular:** esta vía proyecta desde el hipotálamo a la hipófisis anterior. Normalmente, en individuos sanos y pacientes no tratados, esta vía está activa e inhibe la liberación de prolactina a la circulación. El bloqueo de receptores D₂ en esta vía por antipsicóticos implica un aumento de la secreción y liberación de prolactina en sangre, asociado a síntomas secundarios como galactorrea, amenorrea y disfunción sexual.

❖ **HIPÓTESIS SEROTONINÉRGICA:**

La serotonina es producida en el SNC principalmente por los núcleos de rafe, ubicados en el tallo encefálico, que proyectan múltiples eferencias a diversas zonas del cerebro (corteza cerebral, septo, núcleo accumbens, etc.) (Figura 6), así como a la médula espinal. Este neurotransmisor tiene un efecto modulador en las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral implicadas en esquizofrenia, lo que podría justificar su importancia en la fisiopatología de este desorden mental (Alex y Pehek, 2007).

La hipótesis serotoninérgica tiene su origen en el hallazgo de que determinadas sustancias alucinógenas que causan efectos psicóticos, tales como el LSD, son agonistas del receptor de serotonina 5-HT_{2A}. Asimismo, los antipsicóticos atípicos o de segunda generación empleados en el tratamiento de la esquizofrenia, se caracterizan por su antagonismo de los receptores 5-HT_{2A}, al que se atribuye la ausencia de efectos extrapiramidales e hiperprolactinemia, así como su mayor eficacia en la supresión de los síntomas negativos y cognitivos.

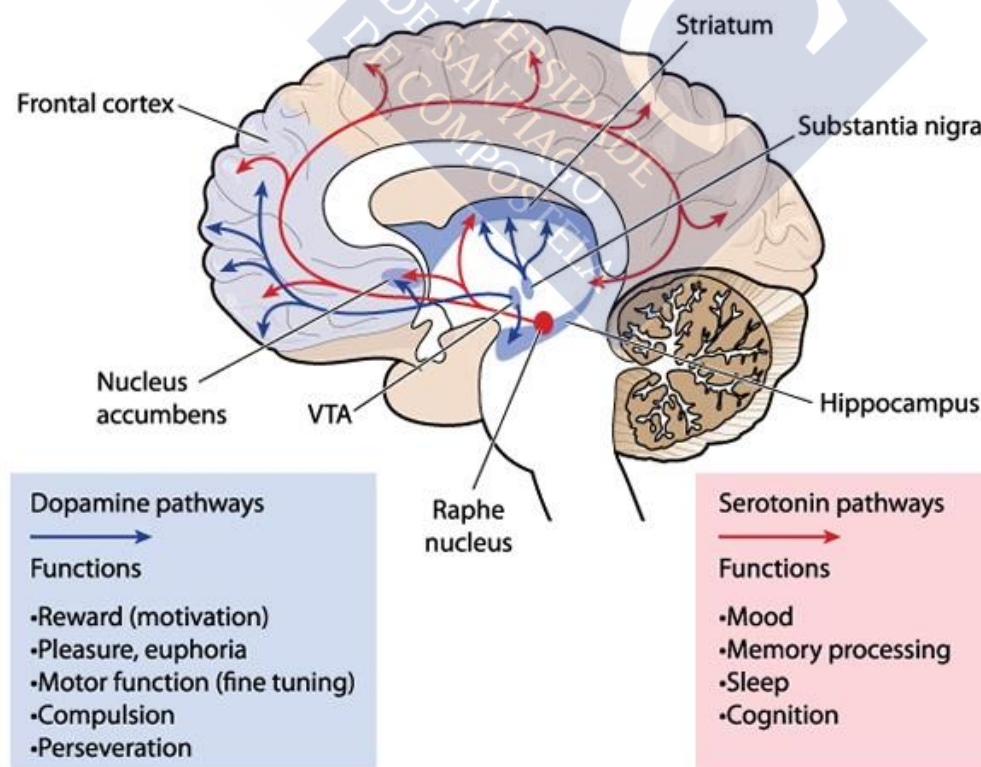


Figura 6. Vías dopaminérgicas y serotoninérgicas cerebrales (Robertson, 2006).

❖ **HIPÓTESIS GLUTAMATÉRGICA:**

Esta hipótesis sugiere que la fisiopatología de la esquizofrenia está relacionada con una hipofunción de neuronas glutamatérgicas corticales capaces de regular los sistemas de neurotransmisión cerebrales restantes. Existen cinco vías glutamatérgicas específicas con relevancia en la fisiopatología de la esquizofrenia (Saiz Ruiz y cols., 2010) (Figura 7):

❖ **Corticotroncoencefálicas:** proyecta desde las neuronas piramidales del córtex prefrontal a centros del troncoencéfalo, que son los núcleos de rafe (responsables de la neurotransmisión serotoninérgica), *Locus coeruleus* (encargado de la neurotransmisión noradrenérgica), sustancia negra y área tegmental ventral (con neurotransmisión dopaminérgica).

La hipótesis glutamatérgica defiende una hipofunción de los receptores NMDA en la vía corticotroncoencefálica que proyecta indirectamente a través de interneuronas inhibitorias gabaérgicas al área tegmental ventral del tracto mesolímbico. Ello resulta en una hiperactividad de la vía dopaminérgica mesolímbica, responsable de la generación de síntomas positivos en esquizofrenia. Esta hipótesis está sustentada por el hecho de que la fenciclidina (PCP) y la ketamina, antagonistas del receptor NMDA, mimetizan los síntomas positivos de la esquizofrenia (Carlsson y cols., 2000; Keshavan y cols., 2008; Karam y cols., 2010). Asimismo, se ha observado que estas drogas reproducen los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia. Esto es debido a que las neuronas corticales glutamatérgicas actúan como acelerador activando directamente las neuronas dopaminérgicas mesocorticales. En consecuencia, el bloqueo del receptor NMDA en las mismas conllevaría una hipoactividad en la vía mesocortical dopaminérgica (Saiz Ruiz y cols., 2010).

❖ **Córtico-estriado y tálamo-cortical:** estas vías actúan como moduladores del filtro sensorial talámico. Las proyecciones glutamatérgicas descienden del córtex al estriado donde activan neuronas inhibitorias gabaérgicas, que a su vez proyectan al tálamo, el cual finalmente envía eferencias glutamatérgicas al córtex. La hipofunción del receptor NMDA en esta vía reduce la inhibición de las neuronas glutamatérgicas tálamo-corticales, lo que conlleva un exceso de información

sensorial al córtex y la aparición de síntomas positivos en esquizofrenia (Carlsson y cols., 2000; Saiz Ruiz y cols., 2010).

- ◆ Córtico-talámicas y córtico-corticales: se ha descrito que la desregulación de estas vías por hipofunción de receptores NMDA también guarda relación con esquizofrenia, aunque su estudio no ha sido tan exhaustivo.

Además de los receptores NMDA, hay otros receptores de glutamato que se propone que desempeñan un papel importante en esquizofrenia (Karam y cols., 2010), como mGluR₂ y mGluR₅. Se ha demostrado que agonistas de receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) revierten la hiperactividad motora inducida por PCP (Moghaddam y cols., 1998). Asimismo, estudios clínicos preliminares establecen una mejora de los síntomas positivos y negativos tras la administración de agonistas mGluR_{2/3} (Moghaddam y cols., 2004). Por otro lado, se ha observado una posible implicación de mGluR₅ en la neurobiología de la esquizofrenia, ya que ratas KO para mGluR₅ muestran un déficit en inhibición prepulso (PPI: respuesta de sobresalto reducida a un estímulo sensorial fuerte cuando éste es precedido por un estímulo escasamente detectable; este proceso de inhibición preatencional se utiliza para medir la capacidad de procesamiento de información sensorial del cerebro), similar al causado por PCP (Kinney y cols., 2003). Igualmente, ratas pretratadas con MPEP (antagonista selectivo de mGluR₅) muestran un agravamiento de los síntomas cognitivos y motores, en comparación con aquellas a las que únicamente se les ha administrado PCP (Conn y cols., 2009). Adicionalmente, CDPPB (modulador alostérico positivo específico de mGluR₅) bloquea la actividad locomotora inducida por anfetaminas en ratas (Kinney y cols., 2005).

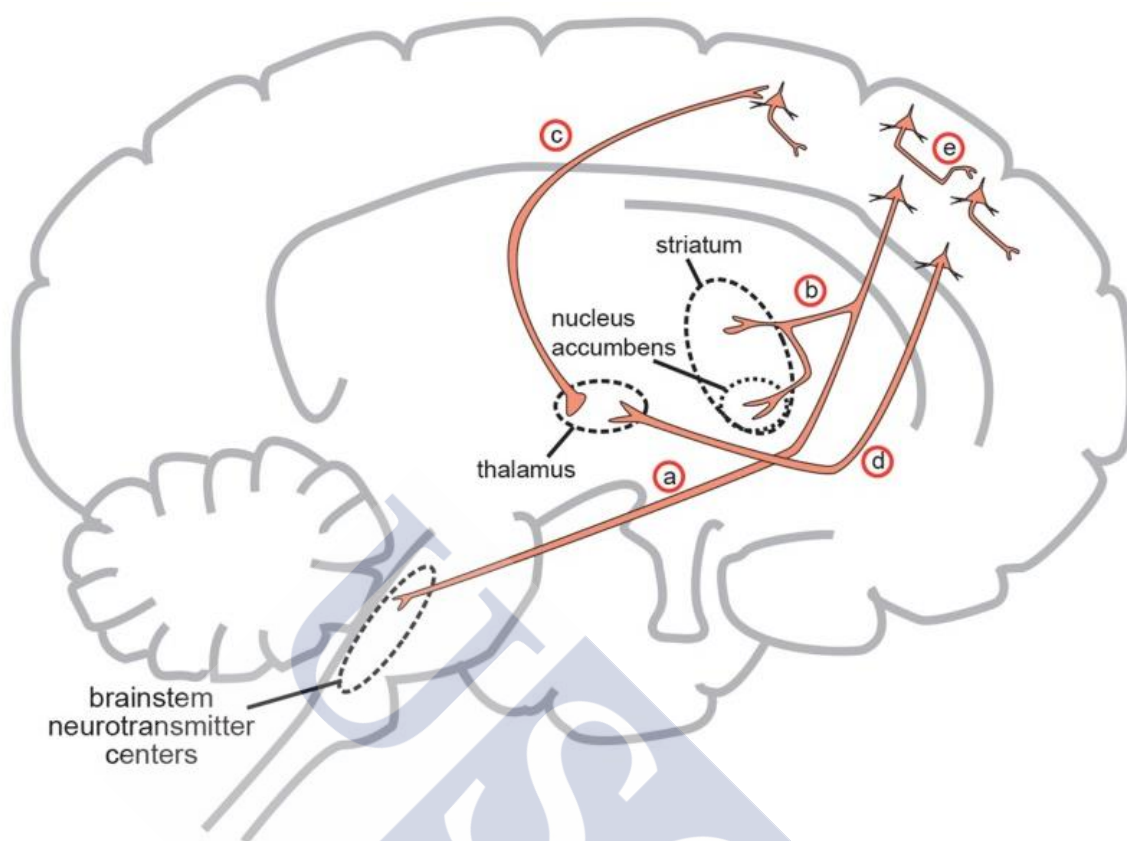


Figura 7. Vías glutamatergicas cerebrales: a (corticotroncocefálicas), b (cortico-estriada), c (tálamo-corticales), d (córticotálámicas) y e (corticocorticales) (Schwartz, 2012).

G) TRATAMIENTO

❖ PSICOSOCIAL

Las intervenciones psicosociales pretenden mejorar el manejo de la esquizofrenia (esto es, enfrentarse a los síntomas, prevenir recaídas, etc.) y potenciar la autosuficiencia del individuo, sus relaciones sociales, así como la búsqueda de trabajo (Mueser y McGurk, 2004).

- ❖ Tratamiento asertivo comunitario (TAC): los pacientes con esquizofrenia severa a menudo fracasan en la toma continua de la medicación, lo que conduce a recaídas, rehospitalizaciones e inestabilidad en el lugar de residencia. Con la intención de dar solución a este problema, el TAC lleva a cabo un cuidado continuo de los pacientes

en su domicilio y entorno social por un equipo multidisciplinar, consiguiendo una reducción de los síntomas y las recaídas y mejorando el nivel de integración social, y en definitiva la calidad de vida de los pacientes (Stein y Santos, 1998).

- ◆ Intervención familiar: muchos pacientes con esquizofrenia viven con su familia o mantienen un contacto continuo y estrecho con la misma. El objetivo de los programas psicoeducacionales es explicar a pacientes y familiares los principios de la esquizofrenia y su tratamiento, con el fin de reducir su estigma y mejorar la habilidad para conseguir objetivos individuales y compartidos. Algunas investigaciones establecen que estos programas son efectivos a largo plazo, reduciendo los ratios de recaídas y rehospitalizaciones del 60% a menos del 30% (Pitschel-Walz y cols., 2001).
- ◆ Empleo apoyado: las tasas de empleo competitivo entre pacientes con esquizofrenia es baja (10-20%), aunque la mayoría de ellos quieren trabajar. Para dar solución a este problema, se han desarrollado programas que enfatizan en la búsqueda rápida de un empleo competitivo al paciente, teniendo en cuenta sus preferencias vocacionales (Becker y cols., 2003).
- ◆ Entrenamiento en habilidades sociales: estrategias de aprendizaje social, como por ejemplo el desempeño de roles, enseñan a los pacientes a mejorar sus habilidades interpersonales. El resultado en la aplicación de las mismas indica una mejora en el funcionamiento social y de ocio de estas personas (Bellack y cols., 2004).
- ◆ Aprendizaje de técnicas de gestión de la enfermedad: es importante que los pacientes conozcan y entiendan la esquizofrenia, sus síntomas y tratamiento, de tal manera que ellos mismos puedan hacer un seguimiento de la enfermedad y advertir signos previos a recaídas anticipándose así a las mismas.
- ◆ Terapia Cognitivo-Conductual: el 25-40% de los pacientes experimentan síntomas psicóticos persistentes, a pesar de estar recibiendo un tratamiento farmacológico óptimo (Curson y cols., 1988). La terapia cognitivo-conductual enseña una serie de técnicas y estrategias psicológicas para que el individuo afronte y explore las creencias y alucinaciones y les dé una interpretación menos dañina y más adaptativa, lo que resulta en una menor ansiedad y sufrimiento. Con esta terapia, se

consigue reducir la severidad de los síntomas psicóticos persistentes y negativos, así como las recaídas (Gould y cols., 2001).

❖ FARMACOLÓGICO

Antes de la introducción de los fármacos antipsicóticos, el tratamiento estándar de la esquizofrenia consistía en proporcionar a los pacientes un ambiente seguro y cuidados de apoyo en hospitales psiquiátricos durante el acaecimiento de brotes psicóticos y hasta la remisión espontánea de los mismos (Tandon y cols., 2010). No obstante, ocasionalmente se han utilizados prácticas de terapia electroconvulsiva, así como terapia de coma insulínico y leucotomía prefrontal (Shibley y Kant, 1940; Swayze, 1995).

En los años 50, el descubrimiento fortuito de la clorpromazina como neuroléptico impulsó el nacimiento de la farmacología antipsicótica. Desde entonces, los fármacos antipsicóticos se han clasificado en dos grandes grupos, en función de su efecto farmacológico y de su mecanismo de acción:

❖ Antipsicóticos típicos o convencionales (de primera generación):

A principios de la década de los 50, se produjo el descubrimiento accidental del primer fármaco con eficacia terapéutica sobre la esquizofrenia, la clorpromazina. Sintetizada como antihistamínico, el cirujano francés Henri Laborit, observó que la clorpromazina reducía la psicosis tras ser administrada en el preoperatorio a pacientes con esquizofrenia (Tandon y cols., 2010). Seguidamente, se elucidó que este compuesto mejoraba los síntomas positivos mediante el bloqueo de receptores de dopamina D_2 , lo que dio lugar a la búsqueda y síntesis de antagonistas de dicho receptor (Carlsson y Lindqvist, 1963; Van Rossum, 1966; Westerink, 2002; Freedman, 2003).

Los antipsicóticos de primera generación tienen en común el tratamiento de los síntomas positivos de la esquizofrenia por antagonismo de receptores de dopamina D_2 y pueden ser clasificados en base a su estructura química (Tabla 1) y a su potencia (alta: haloperidol; intermedia: perfenazina y baja: clorpromazina). Sin embargo, el 25-60% de los pacientes son resistentes al tratamiento o responden parcialmente, por lo

que mantienen síntomas psicóticos persistentes. Asimismo, los antipsicóticos convencionales son ineficaces en la reducción de síntomas negativos y cognitivos. Adicionalmente, su administración implica el bloqueo de receptores D₂ en la vía nigroestriada, lo que está ligado a efectos adversos extrapiramidales (parkinsonismo - rigidez, temblores, acinesia y bradicinesia-, distonía aguda, acatisia y discinesia tardía, entre otros) en aproximadamente el 20% de los pacientes (Westerink., 2002). Por otro lado, el antagonismo de receptores D₂ en la vía tuberoinfundibular induce un aumento de los niveles de prolactina en sangre asociado a efectos secundarios como galactorrea, amenorrea y disfunción sexual.

Tabla 1. Clasificación de los antipsicóticos típicos en base a su estructura química (Adaptado de Tandon y cols., 2010).

ANTIPSIÓTICOS TÍPICOS, CONVENCIONALES O DE PRIMERA GENERACIÓN		
Fenotiazinas	De Cadena Alifática	Clorpromazina, Clorproetazina, Ciamemazina, Levomepromazina, Promazina, Triflupromazina
	De Cadena de Piperidina	Mesoridazina, Piperacetazina, Pipotiazina, Propericiazina, Sulforidazina, Tioridazina.
	De Cadena de Piperazina	Flufenazina, Acetofenazina, Butaperizina, Dixirazina, Perazina, Perfenazina, Proclorperazina, Tiopropazato, Tioproperazina, Trifluoperazina
Butirofenonas	Haloperidol, Benperidol, Blonanserina, Bromperidol, Droperidol, Fluanisona, Melperona, Moperona, Pipamperona, Timiperona, Trifluperidol	
Tioxantenos	Tiotixeno, Clorprotixeno, Clopentixol, Flupentixol, Zuclopentixol	
Dihidroindolonas	Molindona, Oxipertina	
Dibenzoxazepinas	Loxapina, Clotiapina	
Difenilbutilpiperidinas	Pimozida, Fluspirileno, Penfluridol	
Benzamidas	Sulpirida, Nemonaprida, Sultoprida, Tiaprida	
Iminodibenzil	Clocapramina, Mosapramina	

♦ Antipsicóticos atípicos (de segunda generación):

Antes de los 80, los únicos antipsicóticos disponibles eran los típicos, convencionales o de primera generación, a excepción de la clozapina, que fue introducida en la práctica clínica en 1958 (Mueser y McGurk, 2004). La clozapina es un antipsicótico atípico o de segunda generación que trata el conjunto de síntomas positivos, negativos y cognitivos de la esquizofrenia, sin generar efectos secundarios extrapiramidales, ni síntomas asociados a hiperprolactinemia (Gross y Langner, 1966; Westerink., 2002). Sin embargo, su utilización ha sido sustancialmente limitada debido a que en algunos casos induce agranulocitosis (Tandon y cols., 2010).

En los últimos 30 años, se han realizado múltiples esfuerzos en el desarrollo de “una clozapina segura”, lo que ha conducido a la introducción de varios antipsicóticos adicionales de segunda generación (Tabla 2). No obstante, su administración aunque exenta de generar agranulocitosis, está ligada a efectos secundarios metabólicos (síndrome metabólico o síndrome X), que incluyen: ganancia de peso, hiperglicemia, hipertensión y dislipidemia. Asimismo, los antipsicóticos atípicos incrementan el riesgo de desarrollo de enfermedad cardio-vascular y diabetes (Frangou, 2008).

Tabla 2. Clasificación de los antipsicóticos atípicos en base a su estructura química (Adaptado de Tandon y cols., 2010).

ANTIPSICÓTICOS ATÍPICOS O DE SEGUNDA GENERACIÓN	
Benzo (diazepina o tiazepina) pinas	Clozapina, Asenapina, Olanzapina, Quetiapina, Zotepina
Indolonas y Dionas	Aripiprazol, Iloperidona, Paliperidona, Perospirona, Risperidona, Sertindol, Ziprasidona
Benzamidas	Amisulprida

La gran mayoría de los antipsicóticos atípicos comparten la característica común de tener una mayor afinidad por receptores 5-HT_{2A}, que por receptores D₂ (Westerink., 2002). En este sentido, Meltzer y colaboradores han propuesto la relación pK_i 5-HT_{2A}/D₂ (índice de Meltzer) como valor predictivo de la atipicidad antipsicótica. Así, todos los compuestos con un ratio pK_i 5-HT_{2A}/D₂ menor a 1.12 se comportarán como clásicos, mientras que aquellos que presenten una relación mayor a 1.12 tendrán un perfil atípico (Tabla 3) (Meltzer y cols., 1989; Kuroki y cols., 2008).

Tabla 3. Índice de Meltzer de los antipsicóticos típicos y atípicos (Adaptado de Kuroki y cols., 2008).

ANTIPSICÓTICOS	pK _i 5-HT _{2A}	pK _i D ₂	pK _i 5-HT _{2A} / D ₂
ATÍPICOS			
Clozapina	8.3	7.0	1.3
Risperidona	10.1	8.9	1.2
Olanzapina	8.7	7.8	0.9
Quetiapina	6.8	5.9	0.9
Ziprasidona	9.5	8.0	1.5
Zotepina	9.0	7.9	1.1
Aripiprazol^a	8.1	9.1	-1.0
TÍPICOS			
Haloperidol	7.7	9.0	-1.3
Clorpromazina	8.7	8.5	0.2
Perfenazina	8.6	9.2	-0.6
Tioridazina	8.2	8.1	0.1
Sulpirida	4.5	6.4	-1.9
Pipamperona^b	8.9	7.0	1.9

a. Agonista parcial del receptor D₂

b. Antipsicótico típico con baja incidencia de una baja incidencia de síntomas extrapiramidales.

Como excepción a la clasificación de Meltzer, las benzamidas (sulpirida y amisulprida) son antipsicóticos que, aunque apenas tienen afinidad por el receptor 5-HT_{2A}, presentan un perfil atípico, ya que mejoran los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia, con una mínima incidencia de síntomas extrapiramidales (Leucht y cols., 2002). Se ha barajado la idea de que su atipicidad sea debida al potente bloqueo de receptores D₃ en combinación con su moderado antagonismo de receptores D₂ (Sokoloff y cols., 1990; Kuroki y cols., 2008).

Estudios de microdiálisis mostraron que los antipsicóticos atípicos inducen la liberación de dopamina en las vías mesocortical, nigroestriatal y tuberinfundibular. Así, la dopamina liberada competiría con el antagonismo D₂ de los antipsicóticos, revirtiendo el bloqueo de estos receptores. Este mecanismo explicaría el tratamiento de los síntomas negativos y cognitivos, así como la ausencia o atenuación de efectos extrapiramidales y síntomas asociados a hiperprolactinemia de los antipsicóticos atípicos (Westerink, 2002). Actualmente, algunos autores explican la atipicidad de los antipsicóticos de segunda generación por la existencia demostrada del heterodímero de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} (Lukasiewicz y cols., 2010; Borroto-Escuela y cols., 2010; Albizu y cols., 2011; Borroto-Escuela y cols., 2013).

Estudios de PET (Tomografía por Emisión de Positrones) y SPECT (Tomografía computarizada de emisión monofotónica) establecen que los antipsicóticos típicos ocupan una alta proporción de receptores D₂ (70-90%) en cerebro humano, mientras que los atípicos muestran valores de ocupación más bajos (clozapina y la quetiapina: 20-60%; olanzapina y risperidona: 60-75%) (Farde y cols., 1988, 1994; Kapur y cols., 1995; Westerink., 2002). Asimismo, varios autores establecen que la respuesta clínica antipsicótica a los neurolépticos convencionales es obtenida con un porcentaje de ocupación de receptores D₂ de 65-75%, observándose síntomas extrapiramidales en un porcentaje de ocupación superior al 75% (Farde y cols., 1992; Nordstrom y cols., 1993; Knable y cols., 1997; Kapur y cols., 2000; Westerink., 2002) (Figura 8).

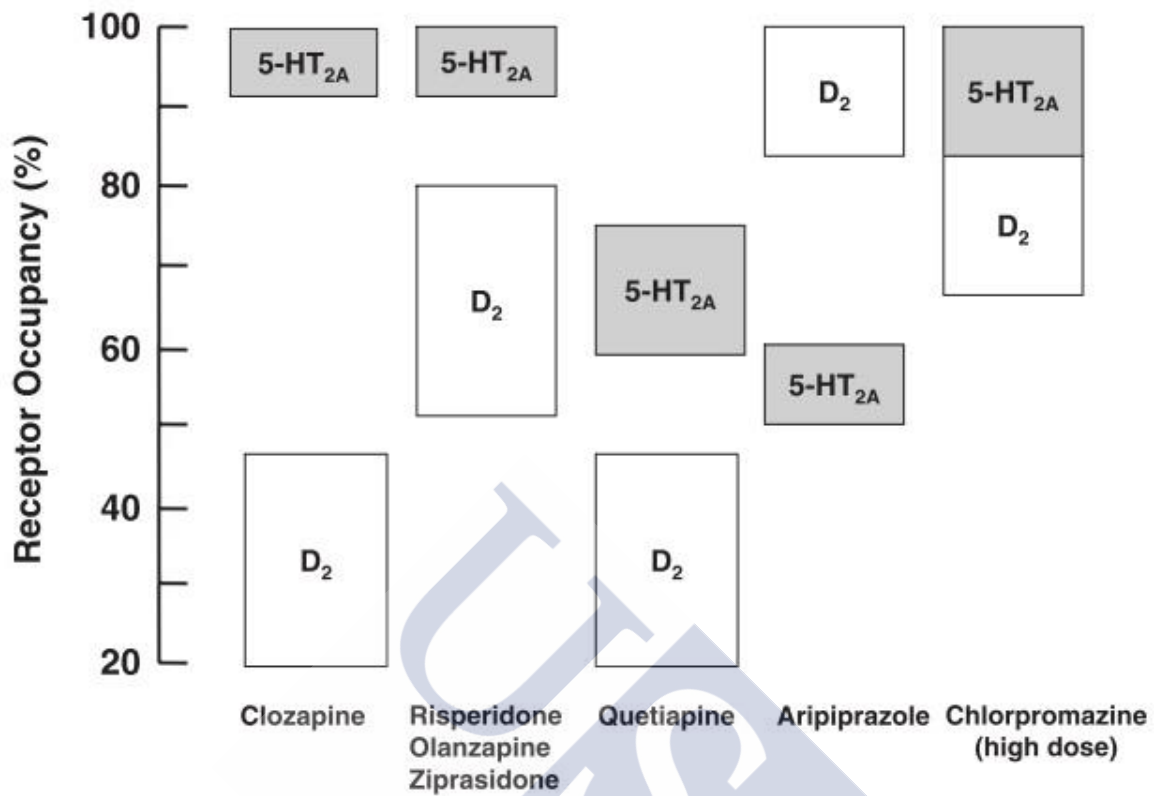


Figura 8. Porcentaje de ocupación de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} por antipsicóticos a dosis clínicas (Kuroki y cols., 2008).

El tratamiento crónico con haloperidol, pero no con clozapina, incrementa el número de receptores de dopamina D₂ en el estriado. Asimismo, tanto los antipsicóticos convencionales, como los atípicos, aumentan la unión de receptores D₂ en el córtex frontal. Esta alza de receptores D₂ podría constituir un mecanismo compensatorio de bloqueo de los mismos por los antipsicóticos (Westerink, 2002).

II. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)

Los GPCRs conforman la familia más grande y versátil de receptores de membrana y representan aproximadamente el 1% del genoma humano (Luttrell, 2008). Los GPCRs median los efectos intracelulares de un gran número de estímulos extracelulares, que incluyen hormonas, neurotransmisores, citoquinas, lípidos, pequeñas moléculas y varias señales sensoriales como luz u odorantes (Bridges y Lindsley, 2008; Panetta y Greenwood, 2008). Así, los GPCRs están implicados en la señalización y regulación de múltiples procesos fisiológicos, como el metabolismo, la neurotransmisión y la proliferación, diferenciación y muerte celular. Ello explica que mutaciones en genes que codifican para los mismos se asocien a diversas enfermedades cardiovasculares, inmunológicas, neurodegenerativas y cáncer (Luttrell, 2008). En este sentido, los GPCRs son de especial relevancia terapéutica, constituyendo importantes dianas farmacológicas, ya que el 25-40% de los fármacos comercialmente disponibles actúan sobre los mismos (Weis y Kobika, 2008).

A) ESTRUCTURA

Los GPCRs también son denominados receptores de 7 dominios transmembrana (7 TM), ya que todos ellos comparten una estructura básica común que consiste en una única cadena polipeptídica plegada en siete segmentos hidrofóbicos α -hélice transmembrana (TMI – TMVII) unidos por tres lazos extracelulares (e1, e2 y e3) y tres lazos intracelulares (i1, i2 e i3), con un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular (Figura 9). Los dominios transmembrana son altamente homólogos y disponen de un elevado grado de conservación entre los diferentes tipos de GPCRs, observándose una gran variabilidad en el extremo N-terminal y en menor medida en la cola C-terminal y los *loops* intra y extracelulares. Asimismo, las hélices transmembrana se componen de aproximadamente 24 aminoácidos, mientras que las colas C y N terminal, así como los *loops* intra y extracelulares pueden variar ampliamente en su longitud hasta cientos de aminoácidos (Bridges y Lindsley, 2008). La región transmembrana, así como el extremo N-terminal extracelular están

implicados en la unión del ligando, mientras que los dominios intracelulares son importantes en la transducción de la señal y la modulación funcional del receptor (Luttrell, 2008).

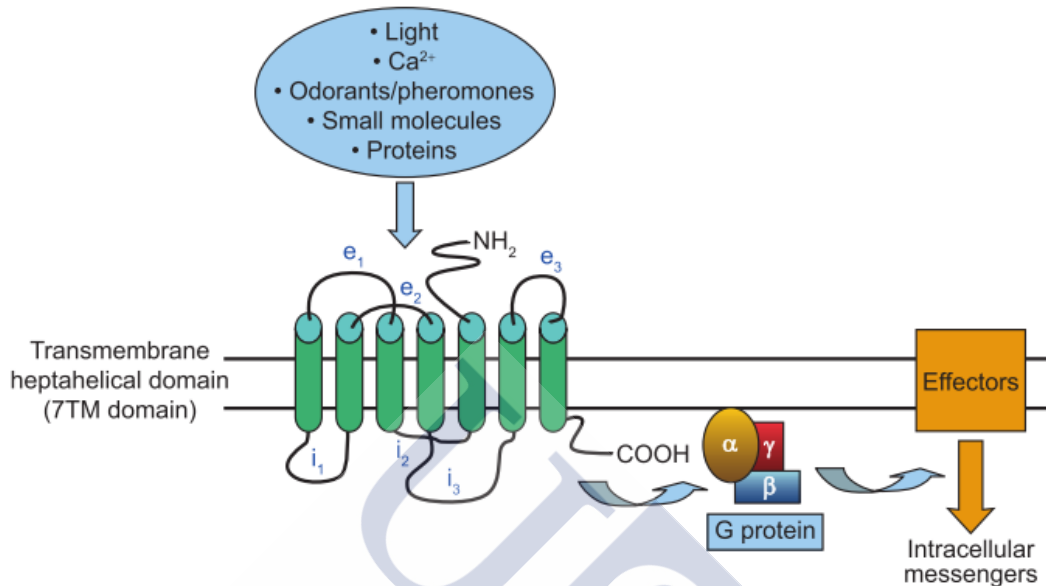


Figura 9. Estructura representativa de los GPCRs (Bridges y Lindsley, 2008).

B) CLASIFICACIÓN

Existen varios sistemas de clasificación de los GPCRs, en base a sus ligandos o similitudes de secuencia. Sin embargo, el sistema de Kolakowski es el más ampliamente usado y agrupa los GPCRs en seis familias (A-F), siendo tres las que concentran la mayoría de los receptores humanos conocidos (Luttrell, 2008) (Figura 10):

- ♦ **Familia A:** alberga el 90% de los GPCRs, entre los cuales están los receptores de rodopsina, adrenérgicos, de neurotransmisores (dopamina, serotonina, acetilcolina, etc.), de quimioquinas, trombina y otros.
- ♦ **Familia B:** se caracteriza por la presencia de un gran loop extracelular e incluye aproximadamente 20 receptores diferentes para una variedad de hormonas peptídicas de alto peso molecular, tales como el glucagón, la calcitonina o la hormona paratiroidea.

♦ **Familia C:** constituye el grupo más pequeño y contiene los receptores metabotrópicos de glutamato, el receptor GABA_B y los receptores de feromonas y del gusto. Todos ellos presentan un dominio extracelular bilobulado a modo de *Venus flytrap*.

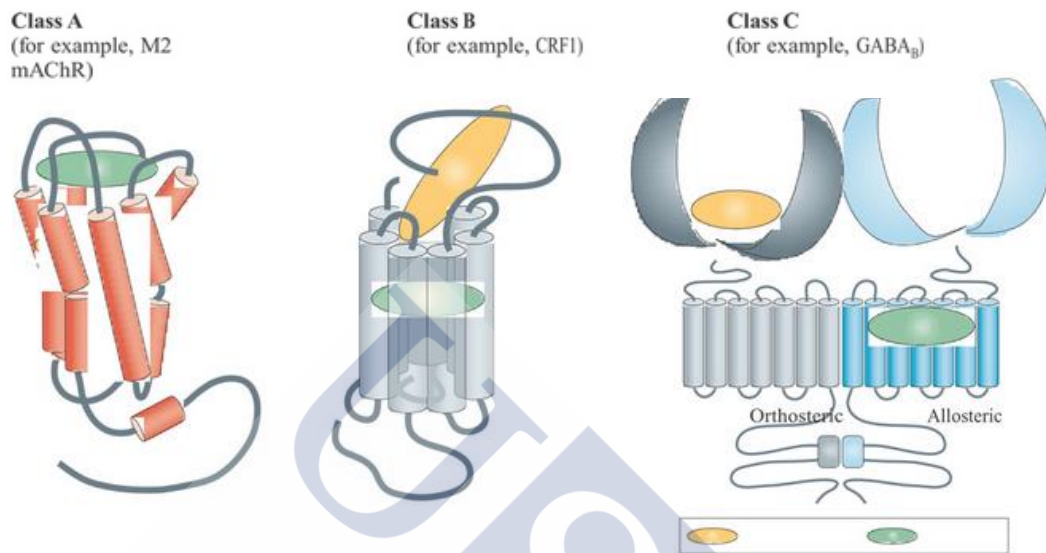


Figura 10. Principales familias de GPCRs (Conn y cols., 2009).

Las distintas familias se distinguen primordialmente en base a su secuencia aminoacídica. Sin embargo, la segunda mayor diferencia entre las familias concierne la localización del dominio de unión ortostérico (OBD) y la naturaleza del ligando ortostérico. Por tanto, como se muestra en la figura 9, el OBD de la familia A se localiza en el dominio 7TM, mientras que en las familia B y C se sitúa en el loop extracelular (Bridges y Lindsley, 2008).

Posteriormente, en base a la secuenciación del genoma de un amplio número de especies, se ha desarrollado un sistema filogenético de clasificación de los GPCRs (sistema GRAFS) en cinco familias: Glutamato, Rodopsina, Adhesión, Frizzled/taste 2 y Secretina (Fredriksson y cols., 2003).

C) MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN

❖ SEÑALIZACIÓN DEPENDIENTE DE PROTEÍNA G:

Tras la unión del agonista, el GPCR sufre un cambio conformacional y actúa como un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF), induciendo el intercambio de GDP unido a la proteína G acoplada por GTP, y en consecuencia la activación de la misma. Las proteínas G son proteínas heterotriméricas constituidas por 3 subunidades: α , β y γ . En su forma inactiva, la subunidad α que posee actividad GTPasa intrínseca, está unida a GDP y al heterodímero $\beta\gamma$. La estimulación del GPCR y en defecto el intercambio de GDP por GTP en la proteína G conduce a su activación y a la disociación de subunidad α /complejo $\beta\gamma$, interaccionando éstos con diversos sistemas efectores (adenilil ciclasas, fosfodiesterasas, fosfolipasas, canales iónicos, etc.) que ponen en marcha múltiples vías de señalización. La desactivación de éstas ocurre por medio de la hidrólisis de GTP a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α , proceso que resulta potenciado por la acción de proteínas acelerantes de GTPasa (GAPs). La subunidad α en su forma inactiva unida a GDP, adquiere alta afinidad por el complejo $\beta\gamma$, lo que induce la reasociación de las tres subunidades y la terminación del ciclo de activación (Bridges y Lindsley, 2008) (Figura 11).

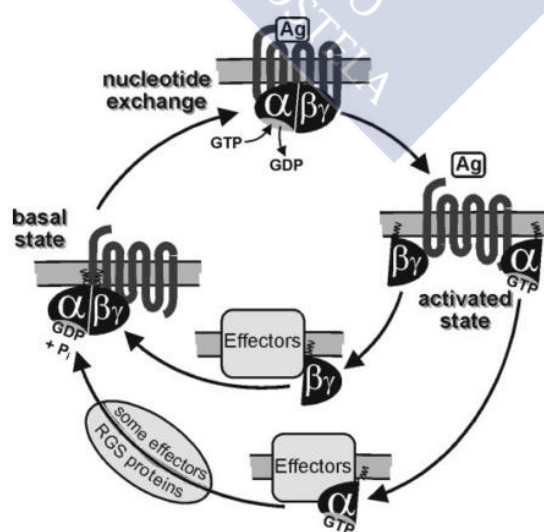


Figura 11. Ciclo funcional de actividad de proteínas G (Wettschureck y Offermanns., 2005).

Los GPCRs tienen la capacidad de acoplarse a una o más proteínas G, permitiendo así una modulación selectiva de diferentes rutas de señalización (Figura 12). Existen distintas proteínas G en función del tipo de subunidades que las conforman. Hasta el momento, se han identificado 21 subunidades α codificadas por 16 genes, 6 subunidades β codificadas por 5 genes y 12 subunidades γ , que permiten múltiples construcciones de proteínas G, clasificadas en cuatro clases principales en base a la subunidad $G\alpha$: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12/13}$. Las proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_i$ activan e inhiben respectivamente a la adenilato ciclasa (AC), lo que da lugar a un aumento o disminución de AMPc en el interior celular. La proteína $G\alpha_q$ activa a la fosfolipasa C β (PC β), que cataliza la reacción de conversión del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP $_2$) en diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$), teniendo este último un efecto positivo en los canales de calcio del retículo endoplasmático, lo que se asocia a un aumento de Ca $^{+2}$ citosólico. Por otro lado, las proteínas $G\alpha_{12/13}$ están implicadas en la regulación de pequeñas GTPasas como la proteína Rho, que juega un rol importante en una amplia variedad de funciones de la célula, como el tráfico vesicular, la dinámica transcripcional y la polaridad y el ciclo celular. Adicionalmente, el complejo $\beta\gamma$ también actúa sobre múltiples sistemas efectores, especialmente en el caso de receptores acoplados a proteínas $G\alpha_i$ (Dorsam y Gutkind, 2007).

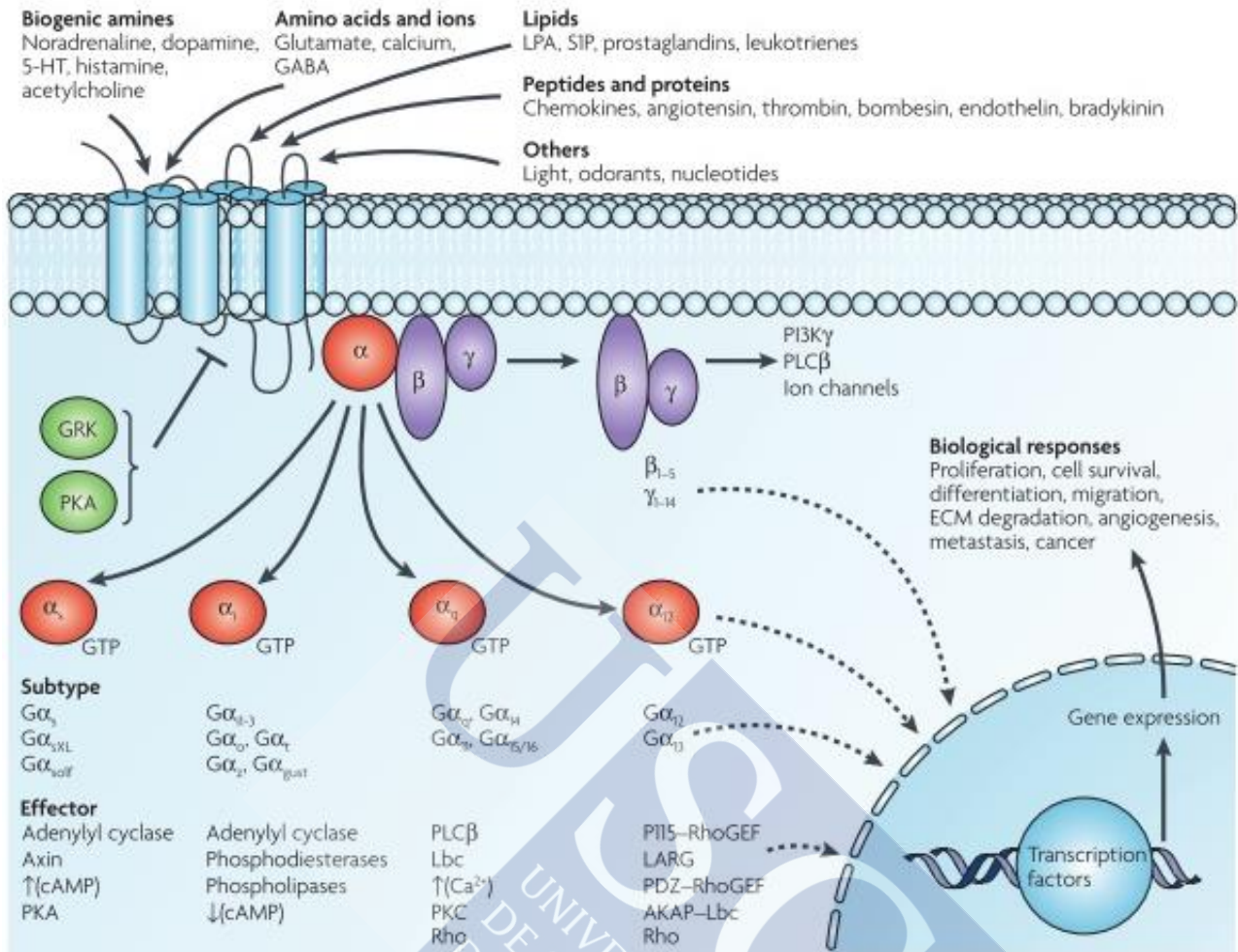


Figura 12. Vías de señalización dependientes de proteína G de los GPCRs (Dorsam y Gutkind, 2007).

❖ **SEÑALIZACIÓN INDEPENDIENTE DE PROTEÍNA G:**

Los GPCRs pueden activar mecanismos de señalización independientes de proteínas G, que requieren la unión de proteínas de andamiaje (*scaffolding proteins* o *scaffolds*), entre las cuales cabe destacar las β -arrestinas, las tirosin quinasas (por ejemplo, c-Src) y las proteínas con dominios PDZ (PSD-95, Homer, etc.). La función de las proteínas *scaffolds* se basa en facilitar la interacción de los receptores con sus sistemas efectores, muchos de los cuales son componentes de cascadas clásicas de segundos mensajeros (proteínas G, PKA, PKC, etc.), siendo otros elementos de rutas de señalización alternativas (ERK, Akt, JNK, p38, Fus3/Kss1, etc.).

D) DESENSIBILIZACIÓN E INTERNALIZACIÓN DEL RECEPTOR

Tras la activación del GPCR y sus vías de señalización efectoras, se produce una atenuación de la respuesta (*down-regulation*), proceso conocido con el nombre de desensibilización (Figura 13), que puede ser:

- ◆ Homóloga: es un mecanismo dependiente de la unión de ligando, que consiste en la fosforilación del receptor por quinasas receptoras de proteínas G (GRK1-7).
- ◆ Heteróloga: es un proceso independiente de la unión de ligando, siendo el GPCR en este caso fosforilado por quinasas alternativas a las GRKs, como por ejemplo, PKA o PKC. De este modo, la activación de un GPCR puede concluir en la desensibilización de otro receptor.

El proceso de fosforilación del receptor determina el reclutamiento de β -arrestinas, que desempeñan un papel esencial en la terminación de la señal, al interrumpir la unión entre el GPCR y la proteína G acoplada (Bridges y Lindsley, 2008). Adicionalmente, las β -arrestinas están implicadas en la internalización del receptor vía vesículas revestidas de clatrina, que tras la acción de la dinamina, se desprenden de la membrana y dan lugar a endosomas, los cuales pueden ser devueltos a la superficie celular permitiendo el reciclaje del receptor o fusionarse con lisosomas donde tiene lugar la degradación del mismo. No obstante, existen otros mecanismos de secuestro e endocitosis del receptor independientes de β -arrestinas, como su internalización mediada por caveolas o incluso por vesículas no revestidas.

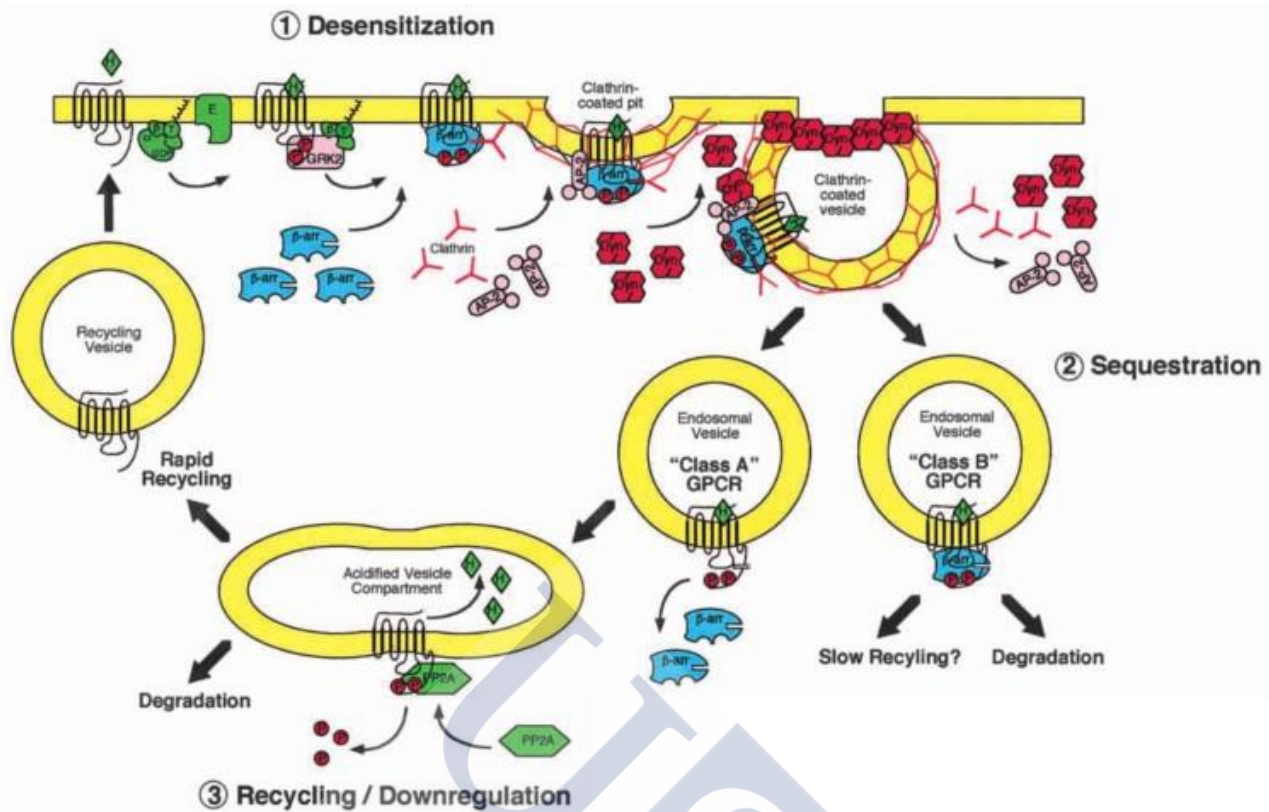


Figura 13. Desensibilización, secuestro y tráfico intracelular de los GPCR (Luttrell y Lefkowitz, 2002).

E) MODELOS DE ACTIVACIÓN DE LOS GPCRs

En base a la información sustraída de la estructura cristalina de diversos receptores, la afinidad de sus ligandos, así como la funcionalidad de sus proteínas G y/o sistemas efectoras, se han desarrollado diversos modelos cinéticos que explican la activación de los GPCR (Figura 14). El **modelo farmacológico clásico o simple** describe la activación del GPCR a partir de la unión del agonista (A) a su estado inactivo (R), generando así el complejo (AR), que dirige un cambio conformacional en el receptor, el cual adquiere un estado activo (AR*). El **modelo del complejo ternario** se presenta como una extensión del modelo clásico, ya que no solamente tiene en cuenta la interacción entre el agonista y el GPCR, sino también la conexión entre el receptor en su conformación activa y la proteína G, lo que da lugar al complejo AR*G. El descubrimiento de la actividad espontánea del receptor sin requerimiento de la unión del agonista (actividad constitutiva) dio origen al **modelo del complejo ternario extendido**, que establece la existencia del receptor en dos estados

interconvertibles que son propiedad intrínseca del mismo, estado inactivo (R) y activo (R*), a los cuales se une el agonista con baja y alta afinidad, respectivamente. Por tanto, este modelo implica que el receptor, en su estado activo generado de manera espontánea, se puede acoplar a su proteína G, independientemente de la unión del agonista (R*G). Adicionalmente, el **modelo del complejo ternario cúbico** abarca la consideración termodinámicamente requerida (aunque fisiológicamente no relevante) de la interacción del receptor en su estado inactivo (R) con la proteína G correspondiente, sin generar ninguna respuesta. Finalmente, el **modelo del complejo ternario alostérico** da cabida a la modulación alostérica de los GPCRs y permite explicar la interacción entre dos ligandos (ligando ortostérico y modulador alostérico) y el receptor (Bridges y Lindsley, 2008; Casado y cols., 2007).

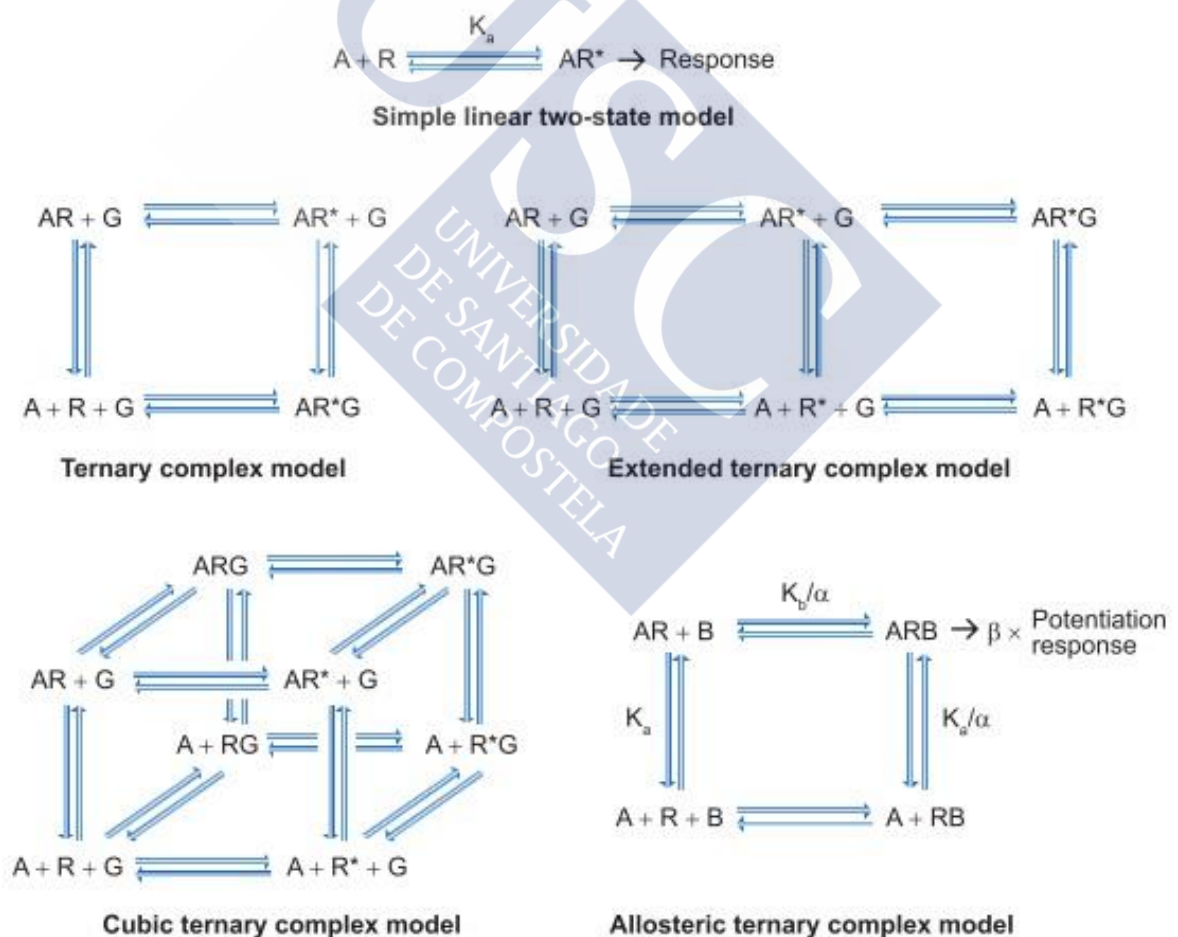


Figura 14. Modelos cinéticos de activación de los GPCRs (Bridges y Lindsley, 2008).

❖ MODULACIÓN ORTOSTÉRICA

Los ligandos ortostéricos son aquellos que interaccionan con el receptor a través del sitio de unión natural de sus ligando endógenos (sitio ortostérico). Se clasifican en base a sus efectos funcionales sobre el receptor, los cuales son gobernados por dos parámetros, afinidad (fuerza de unión del ligando al receptor) y eficacia intrínseca (capacidad de estimular una respuesta intracelular dada mediada por su interacción con el receptor). En función de su eficacia intrínseca, los ligandos ortostéricos pueden ser:

- ❖ Agonistas: son aquellos ligandos que tienen una mayor afinidad por el estado activo del receptor (R^*) que por el inactivo (R), de tal manera que las moléculas que se unen al estado inactivo del GPCR, inducen un cambio conformacional en el mismo a su estado activo, enriqueciendo así la población de receptores R^* . Existen dos tipos de agonistas:
 - Agonistas totales: generan una activación total del receptor, dando lugar a una respuesta máxima del sistema.
 - Agonistas parciales: activan al receptor en distintos grados, generando una respuesta no total del sistema.
- ❖ Agonistas inversos: son ligandos que tienen mayor afinidad por el estado inactivo (R) del receptor que por el activo (R^*), estimulando así el equilibrio a favor del estado R del GPCR y disminuyendo la actividad constitutiva del sistema.
 - Agonistas inversos totales: generan una inactivación total del receptor.
 - Agonistas inversos parciales: inactivan el receptor en distintos grados, siempre inferiores a la inactivación total.
- ❖ Antagonistas: se trata de ligandos que tienen igual afinidad por los estados activo (R^*) e inactivo (R) del receptor, de tal manera que no alteran el equilibrio entre ambos, pero ocupan el lugar ortostérico de los receptores, compitiendo y dificultando la unión de agonistas y agonistas inversos.

Sin embargo, aunque los modelos farmacológicos basados en dos estados fundamentan el comportamiento funcional de los receptores, su actividad constitutiva y el amplio rango de respuestas a ligandos de distinta afinidad y eficacia, no pueden explicar las evidencias experimentales que establecen la existencia de múltiples estados conformacionales de los GPCRs, cada uno de los cuales tiene un efecto preferencial hacia una/s vía/s de señalización determinada. En este contexto, surge el concepto de **señalización dirigida por agonista** (*agonist trafficking of receptor stimulus*), también denominado **eficacia colateral** (*colateral efficacy*), **agonismo sesgado** (*biased agonism*) o **selectividad funcional** (*functional selectivity*), en base al cual cada ligando es capaz de estabilizar un estado conformacional determinado del receptor, dando lugar a la activación/inactivación diferencial de cascadas de transducción de señales específicas. Adicionalmente, el concepto de selectividad funcional incluye el hecho de que un ligando puede tener un efecto diferente sobre el mismo receptor en entornos celulares y tisulares distintos (Kenakin, 1995; Urban y cols., 2007).

❖ ALOSTERISMO

El alosterismo clásico se basa en la interacción de ligandos alostéricos con el receptor mediante un sitio de unión espacial y a menudo funcionalmente distinto al sitio ortostérico (sitio alostérico), con el fin de modular la afinidad y/o eficacia intrínseca del ligando ortostérico en el GPCR. Por tanto, el incremento o disminución de la señal del receptor ocurre exclusivamente en presencia del ligando ortostérico. Aquellos ligandos alostéricos que incrementan la respuesta del GPCR se denominan **moduladores alostéricos positivos** (PAMs), mientras que aquellos que la reducen, reciben el nombre de **moduladores alostéricos negativos** (NAMs). Se alcanza un mayor grado de complejidad en el caso de moduladores alostéricos que, en ausencia de ligando ortostérico, se comportan como agonistas (**moduladores ago-alostéricos**) (Schwartz y Holst, 2007). Las ventajas de los moduladores alostéricos son las siguientes:

1. **Saturabilidad de efecto** (*ceiling effect*): el efecto modulador del compuesto alostérico depende de la presencia del ligando ortostérico que regula. Es decir, el primero carece de efecto ante la ausencia del segundo, de tal modo que concentraciones extramadamente altas del modulador alostérico (como es en el caso de una sobredosis) no se traslada a un incremento de la activación del receptor más allá de cierto límite (*ceiling*) (Christopoulos y Kenakin, 2002). El mejor ejemplo de esta ventaja son las benzodiazepinas, moduladores alostéricos positivos de receptores GABA_A, que a diferencia de los barbitúricos, proporcionan un tratamiento efectivo y seguro de la ansiedad y de los desórdenes del sueño, sin inducir efectos potencialmente letales (Gaudreault y cols., 1991).
2. La modulación alostérica de la señalización del receptor se mantiene en el tiempo fisiológicamente relevante, evitando generar tolerancia al fármaco. Esto es, la falta de activación crónica del receptor puede causar menos sensibilización e internalización del mismo, sorteando así el problema de disminución de eficacia terapéutica.
3. El sitio ortostérico comparte una elevada homología entre los distintos subtipos de GPCRs. Sin embargo, el sitio alostérico están menos conservados entre los distintos subtipos de receptores, lo que permite el diseño de fármacos altamente selectivos.

En el modelo del complejo ternario alostérico, se incluye el factor de cooperatividad (α), que denota el efecto de un modulador alostérico sobre la afinidad de un ligando ortostérico por el receptor, de tal manera que si $\alpha > 1$ hay una cooperatividad positiva, si $\alpha < 1$ la cooperatividad es negativa, indicando $\alpha = 1$ cooperatividad neutral o silencio farmacológico (estos ligandos no activan o inactivan el GPCR en presencia o ausencia del ligando ortostérico, pero bloquean la acción de PAMs y NAMs mediante la ocupación del sitio alostérico). Adicionalmente, el parámetro β define el efecto de un ligando alostérico en la eficacia intrínseca de un compuesto ortostérico sobre el receptor (Bridges y Lindsley, 2008).

F) LA DOPAMINA Y EL RECEPTOR D₂

La dopamina es el principal neurotransmisor catecolaminérgico del SNC, involucrado en una gran variedad de funciones, que incluyen actividad locomotora, emoción y afecto, reforzamiento positivo, sueño, ingesta de comida secreción neuroendocrina y cognición (atención, memoria de trabajo y aprendizaje) (Missale y cols., 1998; Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica están implicadas directa o indirectamente en varias disfunciones cerebrales. El desequilibrio en las vías dopaminérgicas límbicas y mesocorticales contribuye al desarrollo de desórdenes psiquiátricos como la esquizofrenia. Asimismo, la degeneración de neuronas en la sustancia negra constituye la base fisiológica de la enfermedad de Parkinson. Adicionalmente, se ha establecido la existencia de una desregulación dopaminérgica en el síndrome de Tourette, en la enfermedad de Huntington, adicción y abuso de drogas, desorden bipolar y depresión mayor (Jaber y cols., 1996).

La dopamina es sintetizada a partir del aminoácido tirosina por las neuronas mesencefálicas de la sustancia negra y del área tegmental ventral y por las neuronas de los núcleos arcuato y periventricular del hipotálamo, desde donde se originan las cuatro vías dopaminérgicas principales: nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical y tuberoinfundibular. Como se ha comentado anteriormente, la teoría dopaminérgica postula un exceso de dopamina en la vía mesolímbica implicada en la función emocional (hiperdopaminergia mesolímbica) y una deficiencia de este neurotransmisor en el tracto mesocortical involucrado en tareas cognitivas (hipodopaminergia mesocortical).

Las acciones fisiológicas de la dopamina son mediadas por cinco subtipos de receptores pertenecientes a la familia A de GPCRs, divididos en dos grandes grupos en base a la modulación que ejercen sobre la producción de AMPc y sus propiedades farmacológicas (Figura 15):

- ◆ **Clase D₁**: alberga los receptores de dopamina D₁ y D₅, que activan a la proteína G_s, estimulando la producción de AMPc por la AC. Se localizan exclusivamente a nivel postsináptico en neuronas sobre las cuales actúa la dopamina.
- ◆ **Clase D₂**: pertenecen a esta clase los receptores de dopamina D₂, D₃ y D₄, los cuales están acoplados a la proteína G_{i/o}, lo que conlleva una reducción de los niveles de AMPc por inhibición de la AC. Se ubican tanto a nivel postsináptico en neuronas receptoras de la dopamina, como a nivel presináptico en neuronas productoras de este neurotransmisor.

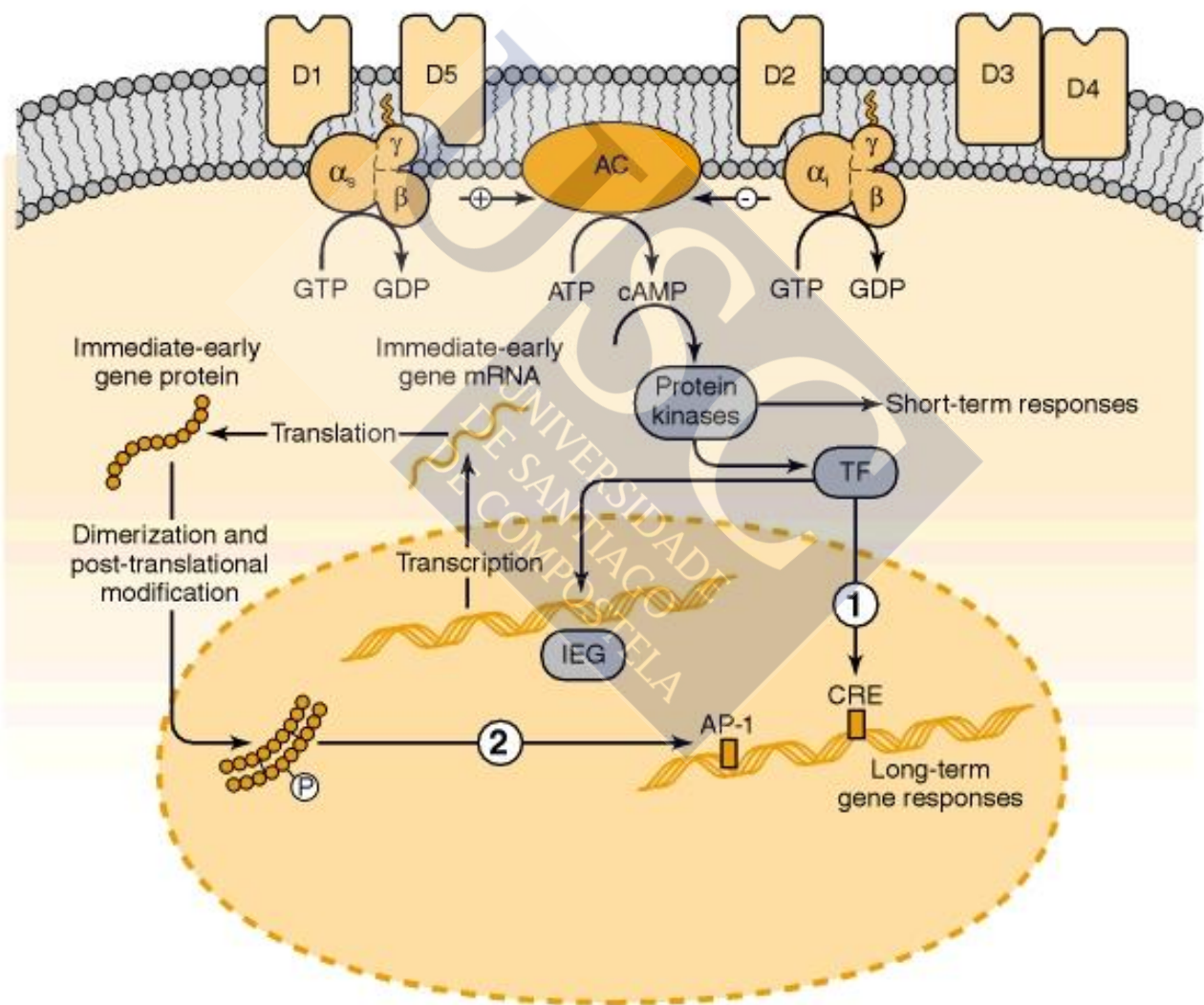


Figura 15. Vías de señalización de los receptores de dopamina (Lippincott-Raven, 1999).

❖ EL RECEPTOR D₂:

El receptor de dopamina D₂ está codificado por un gen localizado en el cromosoma 11 y presenta dos isoformas (D₂S o D₂-short y D₂L o D₂-long), que surgen como resultado del proceso de *splicing* alternativo de un exón constituido por 87 pares de bases entre los intrones 4 y 5. Las isoformas del receptor D₂ difieren en la presencia de 29 aminoácidos en el tercer *loop* intracelular. Mientras la isoforma D₂S se expresa mayoritariamente a nivel presináptico y funciona como autorreceptor, la isoforma D₂L se localiza principalmente en la región postsináptica. Por otro lado, D₂S se activa a bajas concentraciones de agonista causando una disminución de la liberación de dopamina, mientras que la activación de D₂L ocurre a altos niveles de agonista. No obstante, en líneas generales ambas isoformas del receptor D₂ poseen las mismas propiedades farmacológicas (Missale y cols., 1998).

Como se comentó anteriormente, el receptor de dopamina D₂ pertenece a la clase D₂, por lo que está acoplado a la proteína G_{i/o}, induciendo una reducción de los niveles de AMPc por inactivación de la AC. Por consiguiente, ocurre una menor activación de PKA y consecuentemente una reducción en la fosforilación de DARPP-32 (fosfoproteína neuronal regulada por dopamina y AMPc) en el residuo Thr³⁴, lo que resulta en una desinhibición de la proteína fosfatasa 1 (PP1) (Beaulieu y cols., 2015). Varias evidencias sugieren la activación de la PLC mediada por Gβγ tras la estimulación del receptor D₂, lo que está ligado a un incremento de los niveles de calcio en el interior celular y en efecto la activación de la calmodulina proteína quinasa II (CamKII) (Hernando-López y cols., 2000). Investigaciones recientes indican que estas cascadas de señalización intracelulares convergen en la fosforilación y activación de dos subunidades de receptores de glutamato ionotrópicos, GluA₁ y GluN_{2B}, implicados en la transmisión glutamatérgica, entre otras dianas (Jenkins y Traynelis, 2012; Murphy y cols., 2014). Adicionalmente, existen fuertes evidencias de que el receptor D₂ puede activar *in vivo* mecanismos de señalización independientes de proteína G, en los que están implicados la proteína adaptadora multifuncional β-arrestina 2 (βArr2) (Beaulieu y cols., 2005; Urs y cols., 2012) (Figura 16).

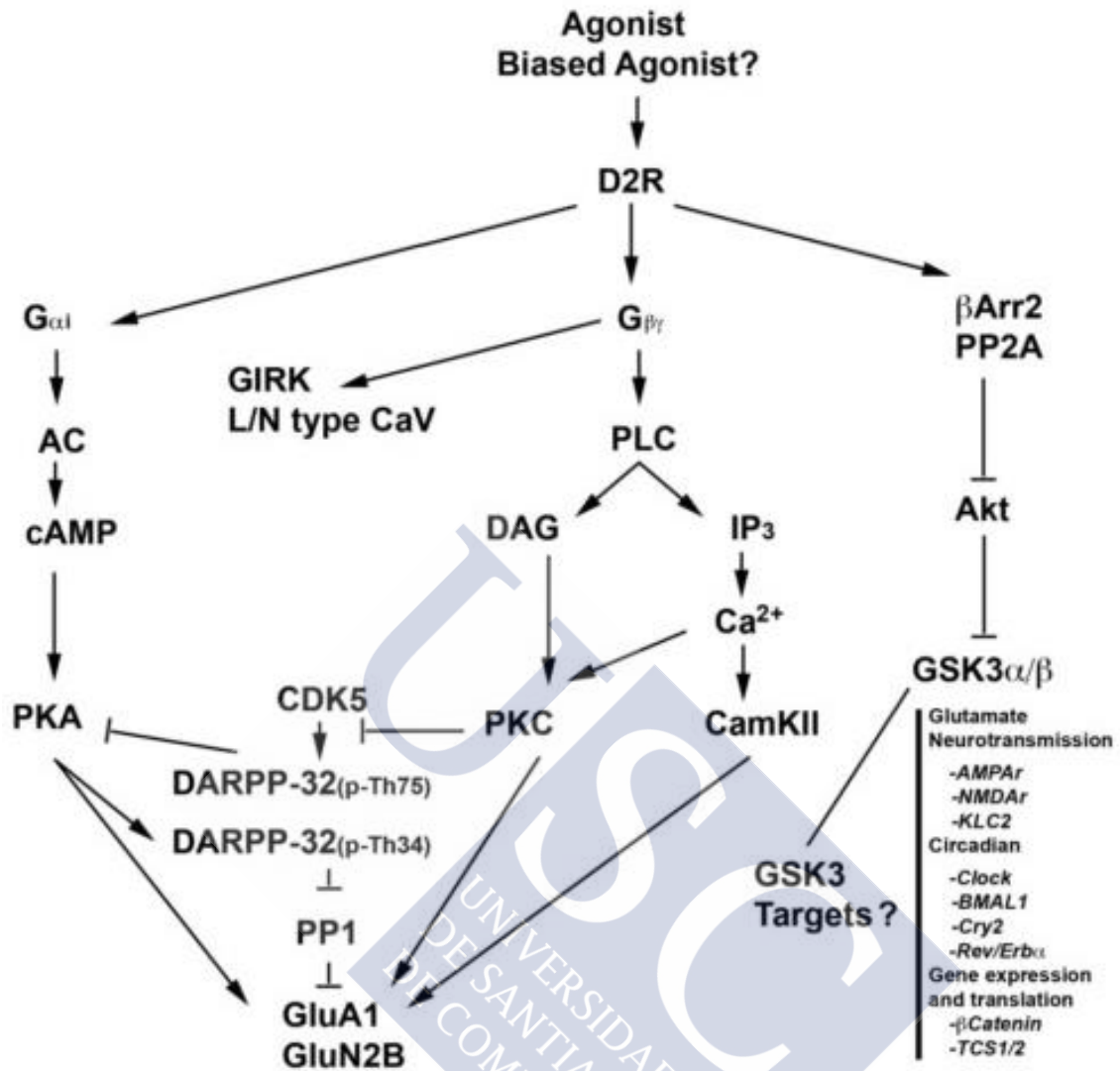


Figura 16. Vías de señalización del receptor D₂ (Beaulieu y cols., 2015).

El receptor de dopamina D₂ se expresa en gran medida en el estriado, en el núcleo accumbens y en el tubérculo olfatorio. En menor medida, este receptor también se localiza en la sustancia negra, área tegmental ventral, hipotálamo, áreas corticales, septum, amígdala e hipocampo (Missale y cols., 1998; Seeman, 2006; Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

El receptor de dopamina D₂ está involucrado en la fisiopatología de múltiples desórdenes mentales, tales como la esquizofrenia. Numerosos estudios señalan una potenciación de la sensibilidad de los receptores D₂ postsinápticos en esquizofrenia (Seeman y cols., 2007; Seeman y Seeman, 2014), tal vez debida a un incremento en la proporción de receptores D₂ en un estado constitutivo de alta afinidad.

Adicionalmente, muchos autores subrayan un incremento en la densidad de receptores D_2 en los ganglios basales de pacientes con esquizofrenia, en comparación a controles sanos (Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

La importancia del receptor D_2 en esquizofrenia está ligada al hecho de que todos los antipsicóticos, típicos y atípicos, constituyen antagonistas del mismo, a excepción del aripiprazol, que a bajas concentraciones de dopamina se comporta como agonista parcial. Los antipsicóticos ejercen un bloqueo de los receptores D_2 a nivel límbico, lo que conlleva una atenuación de los síntomas positivos. Como se ha comentado anteriormente, los antipsicóticos convencionales tienen efectos secundarios asociados, síntomas extrapiramidales e hiperprolactinemia vinculados al bloqueo de receptores D_2 en las vías nigroestriatal y tuberoinfundibular, respectivamente. En este sentido, los antipsicóticos de segunda generación aventajan a los convencionales, pues el bloqueo del receptor $5-HT_{2A}$ estimula la liberación de dopamina en dichas vías, lo que conduce a una reversión de los síntomas mencionados.

G) LA SEROTONINA Y EL RECEPTOR $5-HT_{2A}$

La serotonina es una monoamina biógena que actúa como neurotransmisor vía receptores de membrana en los sistemas nervioso central (SNC) y periférico (SNP), y en tejidos no neuronales (fundamentalmente, sangre, sistema gastro-intestinal, endocrino y cardiovascular) (Hoyer y cols, 2002). La primera vez que fue aislada, en 1930 por Erspamer y Vialli, se le acuñó el término enteramina, al haber sido obtenida de las células enterocromafines de la mucosa gastrointestinal (Erspamer y Vialli, 1937). La enteramina fue redescubierta en 1940 por el grupo de Irvin Page en el sistema circulatorio, habiendo sido éste el momento en el que se le llamó serotonina, en base a sus capacidades vasoconstrictoras (Rapport y cols., 1948). Más tarde, Maurice Rapport, quien purificó, cristalizó y caracterizó la molécula a partir de muestras de sangre, encontró que enteramina y serotonina constituyen la misma entidad, habiéndole asignado el nombre de 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Rapport, 1949). Aunque en esta época Page y sus colaboradores propusieron la presencia de serotonina en extractos de cerebro (Twarog y Page, 1953), pasaron varios años hasta que

Dahlstrom y Fuxe identificaron neuronas cerebrales que producen este neurotransmisor (Dahlström y Fuxe, 1964).

En el SNC, la serotonina se produce en las neuronas de los núcleos de rafe, ubicados en la línea media del tronco cerebral, a partir del aminoácido esencial triptófano y por la acción secuencial de dos enzimas (triptófano hidroxilasa y L-aminoácido aromático descarboxilasa). Mientras el núcleo de rafe caudal inerva la médula espinal, el medial y el dorsal proyectan múltiples y difusas eferencias a prácticamente todas las estructuras cerebrales. En el SNC, la serotonina tiene un papel fundamental en una amplia variedad de funciones que incluyen desarrollo neuronal, regulación de la temperatura, control motor, sueño, apetito, adicción, regulación de las emociones y del estado del ánimo, control conductual y cognición. Por ello, alteraciones en su función así como en los receptores sobre los cuales actúa se han asociado con varios desórdenes psiquiátricos como esquizofrenia, depresión, ansiedad, desórdenes de la alimentación, trastorno obsesivo-compulsivo y suicidio (Cools y cols., 2008; Nichols D. y Nichols C. 2008; Hannon y Hoyer, 2008).

La acción biológica de la serotonina está mediada por una gran variedad de receptores clasificados en base a su estructura, farmacología y transducción de señales en siete clases pertenecientes a dos grandes grupos (Barnes y Sharp, 1999; Hoyer y cols, 2002) (Figura 17):

◆ Los GPCRs pertenecientes a la familia A:

- 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}): acoplados a la proteína G_{i/o}, que inhibe la producción de AMPc al inactivar a la AC.
- 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}): acoplados a la proteína G_q para incrementar la hidrólisis de PIP₂ y elevar los niveles de Ca⁺² citosólico.
- 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇: se acoplan positivamente a la AC, por lo que su acción es mediada por la proteína G_s.
- 5-HT₅ (5-HT_{5A} y 5-HT_{2B}): la proteína G a la cual se acoplan preferencialmente no ha sido todavía establecida, pudiendo ser G_{i/o} o posiblemente G_s.

◆ Receptor ionotrópico: 5-HT₃.

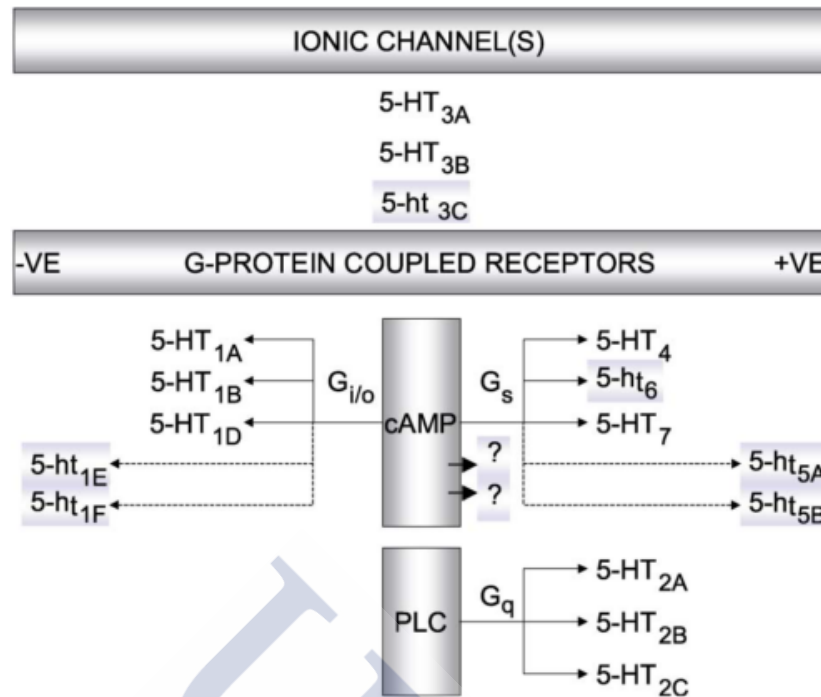


Figura 17. Clasificación de los receptores 5-HT (Hoyer y cols., 2002).

❖ **EL RECEPTOR 5-HT_{2A}:**

El receptor 5-HT_{2A} está codificado por un gen localizado en el cromosoma humano 13 y comprende 471 aminoácidos en ratones, ratas y humanos. Es uno de los receptores de serotonina más estudiados y se encuentra altamente conservado en las distintas especies. Este receptor está ampliamente distribuido por los distintos tejidos nerviosos y no neuronales (Hoyer y cols, 2002; Hannon y Hoyer, 2008).

Al igual que los restantes receptores pertenecientes a la familia 5-HT₂, el receptor 5-HT_{2A} se acopla fundamentalmente a la proteína G_{αq}, lo que conlleva una activación de la PLC, que cataliza la degradación de PIP₂ a IP₃ y DAG. El IP₃ activa los canales de calcio del retículo endoplasmático, generando así un incremento de los niveles de Ca⁺² citosólico y en definitiva la estimulación de la calmodulina y otras proteínas citosólicas. El DAG está implicado en la activación de la protein kinasa C, lo que conduce a la estimulación de la proteína kinasa activada por mitógeno (MAPK) y factores de transcripción tales como CREB (Barnes y Sharp, 1999; Nichols y Elaine, 2001) (Figura 18). Asimismo, la activación del receptor 5-HT_{2A} se asocia a la estimulación de otras fosfolipasas, como la fosfolipasa D (PLD) y la fosfolipasa A₂

(PLA₂) (Felder y cols., 1990; Berg y cols., 1998). Por otro lado, hay evidencias de que el receptor 5-HT_{2A} pueda regular vías de señalización dependientes de la proteína G_i al ser activado por drogas alucinógenas (LSD y DOI) (González Maeso y cols., 2007). En contraste con la mayoría de los GPCRs, el receptor 5-HT_{2A} entra en un proceso de desensibilización, no sólo en respuesta a la unión de agonistas, sino también de antagonistas (Nichols E. y Nichols D., 2008).

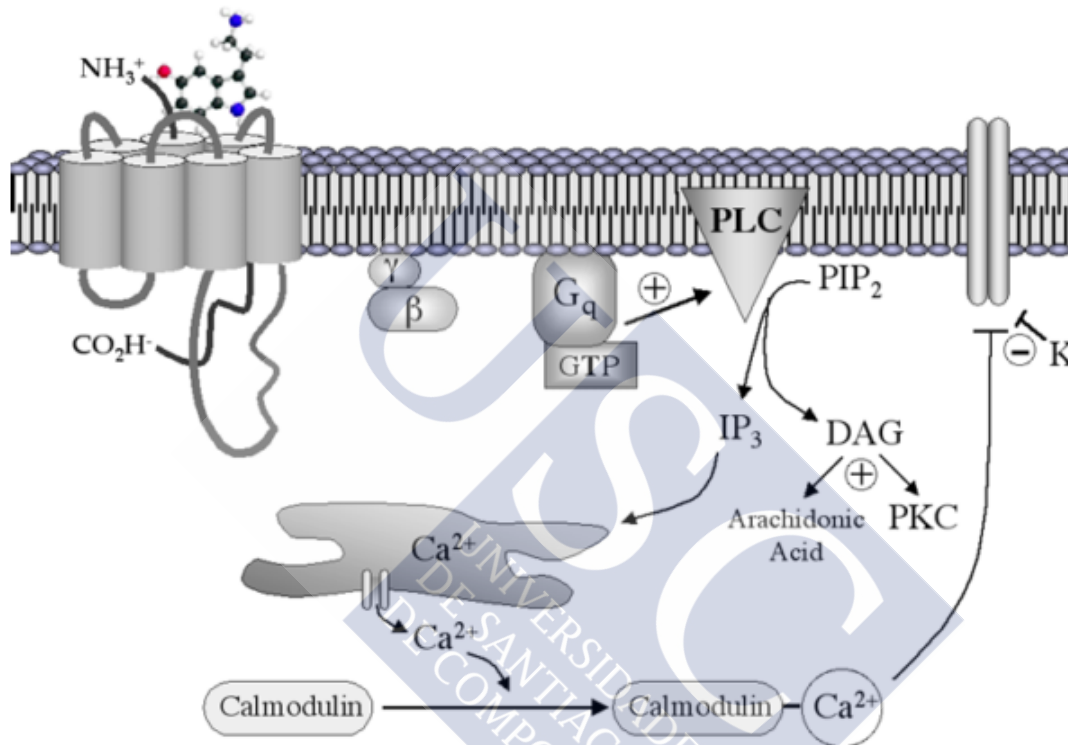


Figura 18. Señalización del receptor 5-HT_{2A} mediada por G_q (Nichols y Bush, 2001)

Los estudios de unión de radioligandos, inmunohistoquímicos e hibridación *in situ* han permitido determinar la localización del receptor 5-HT_{2A} en el SNC de ratón, rata, humanos y otras especies. Así, el receptor 5-HT_{2A} se expresa principalmente en el córtex cerebral, especialmente en las láminas I y IV-Va, en el córtex piriforme y entorrinal, así como en el claustrum, núcleo endopiriforme y bulbo olfatorio. Algunos núcleos del tronco cerebral también muestran altas señales de este receptor: pontino, facial e hipoglosal. Asimismo, se han observado niveles intermedios del receptor 5-HT_{2A} en el sistema límbico y en los ganglios basales, esto es, núcleo accumbens y caudado. Sin embargo, su expresión en el hipocampo es baja, estando ausente en el cerebelo y núcleo talámico (Hoyer y cols., 2002; Hannon y Hoyer, 2008).

En el SNC, se ha demostrado que el receptor 5-HT_{2A} está implicado en esquizofrenia. Se ha observado que drogas alucinógenas como LSD, DOI y psilocibina, que reproducen los síntomas positivos de dicho desorden mental, son agonistas del receptor 5-HT_{2A}. Asimismo, la respuesta *head-twitch* de ratones generada por estas drogas es dependiente del receptor 5-HT_{2A}, pues no se observa en ratones KO para el mismo (González-Maeso y cols., 2007), ni se detecta cuando el animal *Wild-type* ha sido tratado con antagonistas selectivos, como ketanserina o MDL 100907 (Green y Heal, 1985; Barnes y Sharp, 1999).

Adicionalmente, varias investigaciones confirman que el receptor 5-HT_{2A} desempeña un papel importante en la acción antipsicótica. En cuanto al tratamiento antipsicótico típico, se ha observado que este receptor podría ser necesario en la efectividad del mismo, habiendo sido demostrada una reducción de la respuesta a haloperidol en ratones KO del receptor 5-HT_{2A} con hiperlocomoción inducida por MK-801. Por otro lado, se ha establecido que este receptor parece ser esencial en la ausencia de síntomas extrapiramidales y en el tratamiento de los síntomas negativos y cognitivos asociados a la medicación antipsicótica atípica. Así, la gran mayoría de los antipsicóticos de segunda generación se diferencian de los convencionales por tener mayor afinidad por el receptor 5-HT_{2A} en comparación al receptor D₂.

Otros procesos neuronales en los que está implicado el receptor 5-HT_{2A} son: regulación de la temperatura y del sueño, respuesta neuroendocrina tales como incremento de la secreción de cortisol, ACTH, renina y prolactina.

En tejidos periféricos no nerviosos, el receptor 5-HT_{2A} se expresa principalmente en los vasos sanguíneos, pero también en intestino, desempeñando un papel importante en la respuesta contráctil de los vasos sanguíneos, así como del músculo liso intestinal, bronquial, uterino y urinario. Adicionalmente, el receptor 5-HT_{2A} participa en la agregación plaquetaria, así como en el incremento de la permeabilidad de los capilares.

H) OLIGOMERIZACIÓN DE LOS GPCRs

Históricamente, se consideraba que los GPCRs funcionan como entidades monoméricas acopladas a una única proteína G con una estequiometría 1:1. Sin embargo, aunque no se excluye la existencia de monómeros y su posible función fisiológica, desde los años 1980s, se han recogido numerosas evidencias que confirman el hecho de que los GPCRs pueden constituir complejos funcionales que incluyen más de una unidad monomérica (dímeros y oligómeros de mayor orden). Se han utilizado diversas herramientas metodológicas que sustentan y evidencian la oligomerización de GPCRs: ensayos de unión de radioligandos, de coimmunoprecipitación, de transferencia de energía de fluorescencia (FRET) y de bioluminiscencia (BRET), así como el desarrollo de sistemas de expresión heterólogos en líneas celulares permanentes, estudios de co-internalización y de microscopía de fuerza atómica (AFM).

La dimerización puede producirse entre monómeros idénticos (homodimerización), como por el ejemplo los homodímeros de los receptores 5-HT_{2A} (Brea y cols., 2009), 5-HT₇ (Teitler y cols., 2010) o 5-HT_{2C} (Herrick-Davis y cols., 2004), o entre unidades distintas (heterodimerización), como sería el caso de los heterodímeros D₂-5-HT_{2A} (Lukasiewicz y cols., 2010; Borroto-Escuela y cols., 2010) y mGluR₂-5-HT_{2A} (González-Maeso y cols., 2008). En general, los GPCRs de la familia A (receptores de dopamina, serotonina, etc.) funcionan tanto como entidades monoméricas, como homo/heteroméricas que alcanzan un equilibrio definido por el tipo celular que los contiene, el entorno donde se ubican y la presencia/ausencia de ligandos que los modulan. Sin embargo, numerosos estudios han establecido que los GPCRs de la familia C (receptores metabotrópicos de glutamato, receptores GABA, etc.), en oposición a los de la familia A, existen y funcionan estrictamente como dímeros. El receptor GABA_B solamente es funcional cuando se encuentra como heterodímero, constituido por GABA_{B1} y GABA_{B2} (Marshall y cols., 1999; Galvez y cols., 2001). Investigaciones recientes también sugieren que los receptores mGlu se expresan en la membrana plasmática como dímeros constitutivos (Kniazeff y cols., 2004), que pueden interactuar con otros subtipos de receptores (por ejemplo, el receptor 5-HT_{2A}) formando oligómeros de mayor orden. Adicionalmente, estudios de BRET y

FRET han determinado la expresión de receptores de dopamina D_2 como oligómeros (Guo y cols., 2003 y 2008). Otra cuestión importante relativa a la estructura y función de los GPCRs concierne la estabilidad estado dimérico/oligomérico (Vilardaga y cols., 2010). La técnica de recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP) ha demostrado que mientras los homodímeros del receptor β_1 -adrenérgico existen de manera transitoria, los receptores β_2 -adrenérgico se expresan como oligómeros estables en células HEK (Dorsch y cols., 2009). Asimismo, esta técnica también ha puesto recientemente de relieve la existencia de un equilibrio dinámico entre monómeros y homodímeros/oligómeros de receptores D_2 en células HEK293 (Fonseca y Lambert, 2009).

La dimerización/oligomerización de los GPCRs puede afectar a los perfiles de unión de los ligandos, al acoplamiento de proteínas G y otros mecanismos de señalización independientes de éstas, así como a la expresión y localización de los receptores, lo que añade un mayor nivel de complejidad a los mecanismos que desencadenan las respuestas fisiológicas de múltiples enfermedades. Por ello, se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de diversos heterómeros y oligómeros que podrían tener cierta relevancia en la comprensión de la patología de desórdenes psiquiátricos tales como la esquizofrenia y aportar nuevos targets en el diseño de fármacos para su tratamiento (Moreno y cols., 2013). Algunos de los heterodiméricos que tienen mayor repercusión en esquizofrenia se describen a continuación:

❖ **HETERODÍMERO A_{2A} - D_2 :**

Tras la demostración de la existencia del heterómero de los receptores de adenosina A_{2A} y de dopamina D_2 *in vitro* e *in vivo* (Ferre y cols., 1994; Canals y cols., 2003), se comprobó que tenía lugar una modulación funcional (*crosstalk*) con implicación en la farmacología antipsicótica entre ambos receptores. En concreto, se observó que el agonista CGS21680 del receptor A_{2A} reduce la actividad hiperlocomotora inducida por anfetamina o PCP (Rimondini y cols., 1997; Stills y cols., 2001). Paralelamente, se han descrito evidencias que sugirieron que el efecto antipsicótico a través del heterodímero A_{2A} - D_2 podría ser mediado por la inhibición de

la señalización del receptor de dopamina D_2 en neuronas GABAérgicas estriatopalidales (Ferre, 1997).

❖ HETERÓMERO A_{2A} - D_2 - CB_1 :

Diversos estudios de coimmunoprecipitación, BRET y FRET sugirieron la heterodimerización de receptores coexpresados en estructuras cerebrales implicadas en desórdenes psicóticos: el heterodímero de los receptores canabinoide CB_1 y de adenosina A_{2A} en terminales glutamatérgicas corticoestriatales (Carriba y cols., 2007; Tebano y cols 2009) y el heterodímero de los receptores canabinoide CB_1 y de dopamina D_2 en neuronas GABAérgicas estriatopalidales ventrales (Ferre, 1997; Julian y cols., 2003; Yin y cols., 2006; Pickel y cols., 2006; Moreno y cols., 2013).

Estudios bioquímicos y de señalización celular indicaron que los efectos inducidos por la activación del receptor CB_1 en estriado son dependientes del receptor A_{2A} (Carriba y cols., 2007; Tebano y cols 2009). Asimismo, varios estudios reportaron interacciones antagonistas entre los receptores CB_1 y D_2 (Marcellino y cols., 2008), habiéndose sugerido la implicación del receptor A_{2A} en las mismas (Navarro y cols., 2008), lo que fue sustentado por el hecho de que este receptor interactúa directamente tanto con receptores CB_1 (Carriba y cols., 2007) como con receptores D_2 (Canals y cols, 2003; Moreno y cols., 2013).

❖ HETERODÍMERO D_1 - D_2 :

El heterodímero de los receptores de dopamina D_1 y D_2 constituye un ejemplo de heterocomplejo implicado en enfermedades psicóticas asociado a vías de señalización distintas a las desencadenadas cuando los receptores funcionan como monómeros. En este sentido, se determinó que la estimulación por agonista de los receptores coexpresados D_1 y D_2 resulta en un incremento de los niveles de calcio intracelulares vía señalización dependiente de proteína G_q , la cual es activada cuando los receptores se expresan como monómeros o cuando uno de los receptores colocalizados es activado por agonistas selectivos (Lee y cols., 2004; Moreno y cols., 2013). Asimismo, varios autores observaron un incremento en la sensibilidad y actividad del heterodímero D_1 - D_2 en desórdenes psiquiátricos, concretamente en el globo pálido de pacientes con

esquizofrenia y en el estriado de ratas tratadas crónicamente con anfetaminas (Perreault y cols., 2010; Szafran y cols., 2013).

❖ **HETERODÍMERO mGluR₂-5-HT_{2A}:**

Se demostró la existencia del heterodímero mGluR₂-5-HT_{2A} en células HEK293 y la colocalización de ambos receptores en neuronas piramidales corticales de ratón (González-Maeso y cols., 2008). Como se ha comentado anteriormente, varios estudios establecieron que determinadas drogas alucinógenas (LSD, DOI, mescalina y psilocibina) constituyen agonistas del receptor 5-HT_{2A} y tienen la capacidad de inducir una conducta *head-twitch* en ratones, extrapolable a los síntomas positivos en esquizofrenia (González-Maeso y cols., 2003 y 2007). Asimismo, se observó que esta respuesta psicótica a sustancias alucinógenas no aparece en ratones KO 5-HT_{2A} y también está significativamente reducida en ratones KO mGluR₂ (Moreno y cols., 2011). Adicionalmente, se estableció la recuperación de la conducta *head-twitch* tras el rescate de la expresión del receptor mGluR₂ en el córtex frontal de ratones KO mGluR₂ (Moreno y cols., 2012). También, se observó que los agonistas alucinógenos del receptor 5-HT_{2A}, a diferencia de los no alucinógenos, inducen no solamente vías de señalización dependientes de G_q, sino también de G_{i/o}, además de estimular la expresión de genes específicos (*egr-1* y *egr-2*) (González-Maeso y cols., 2003). Por otro lado, se determinó que la co-expresión del receptor mGluR₂ potencia la vía de señalización G_{i/o} estimulada por el receptor 5-HT_{2A} al ser activado por agonistas alucinógenos. Sin embargo, se estableció que este mecanismo de señalización y la expresión de genes específicos de drogas psicoestimulantes desaparece tras la activación de mGluR₂ (González-Maeso y cols., 2008). Otro hecho que podría sustentar la desregulación del heterodímero mGluR₂-5-HT_{2A} en esquizofrenia es el incremento de receptores 5-HT_{2A} y la disminución de receptores mGluR₂ en cerebro humano postmortem de individuos con esta patología no tratada (Moreno y cols., 2013).

❖ **HETERODÍMERO D₂-5-HT_{2A}**:

Recientemente, mediante técnicas de BRET y FRET, se demostró la existencia de heterocomplejos D₂-5-HT_{2A} en células HEK293 que sobreexpresan sendos receptores (Lukasiewicz y cols., 2010; Borroto-Escuela y cols., 2010). Años más tarde, mediante la técnica de ligación por proximidad (PLA), se estableció la existencia del heterodímero D₂-5-HT_{2A} *in vivo*, concretamente en determinadas regiones de cerebro de rata: estriado dorsal y núcleo accumbens (Borroto-Escuela y cols., 2013).

Adicionalmente, numerosos estudios han manifestado un *crossstalk* entre los receptores del heterodímero D₂-5-HT_{2A} (Figura 19). En células HEK293, se observó que la activación de la PLC mediada por el receptor 5-HT_{2A} es sinérgicamente potenciada por la activación concomitante del receptor D₂. Sin embargo, la activación del receptor 5-HT_{2A} por 5-HT y TCB2 causa una inhibición del funcionamiento del receptor D₂ (Borroto-Escuela y cols., 2010). Posteriormente, este grupo estableció que agonistas alucinógenos de 5-HT_{2A} (DOI y LSD) potencian la inhibición de la AC cuando el receptor D₂ es activado por quinpirol, efecto bloqueado por la presencia de haloperidol (Borroto-Escuela y cols., 2014). En el 2011, Albizu y colaboradores determinaron *in vitro* que la presencia de receptores D₂ incrementa la señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} activado por DOI. Sin embargo, este efecto es eliminado cuando el receptor D₂ es activado por quinpirol. Asimismo, se ha demostrado *in vivo* que la expresión del receptor 5-HT_{2A} es necesaria para que el haloperidol tenga un efecto antipsicótico completo en ratones cuya actividad locomotora ha sido estimulada (hiperlocomoción) por la acción de MK-801 (antagonista de receptores de glutamato NMDA) (Albizu y cols., 2011). Todas estas investigaciones confluyen en el hecho de que los heterocomplejos D₂-5-HT_{2A} podrían tener un papel determinante en la selectividad conformacional de ambos receptores (Bartolomeis y cols., 2013).

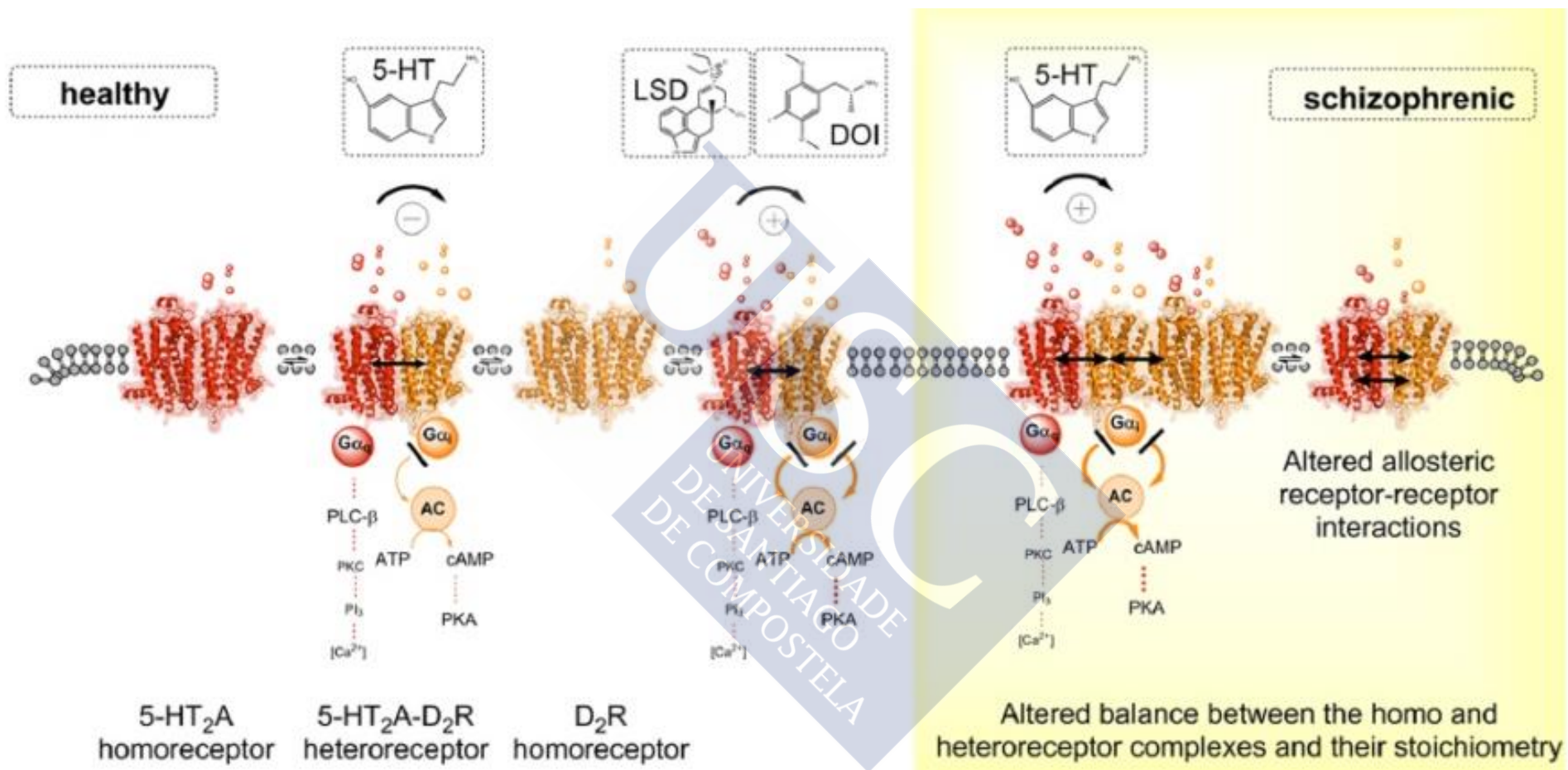
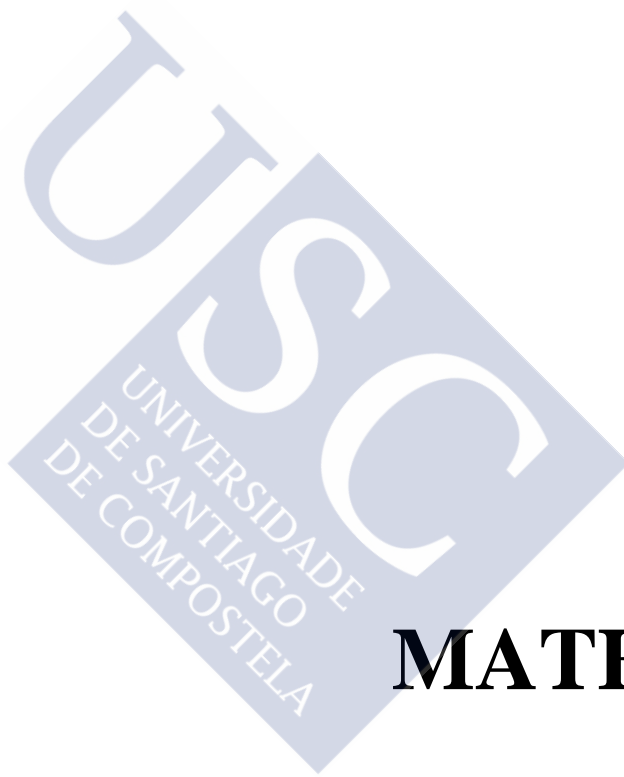


Figura 19. Representación hipotética del comportamiento de los homodímeros 5-HT_{2A} y D₂ y del heterocomplejo D₂-5-HT_{2A} en controles sanos y personas con esquizofrenia (Borrito-Escuela y cols., 2016).





MATERIAL
Y MÉTODOS



I. LÍNEA CELULAR

En el presente trabajo, se ha utilizado una línea celular generada en los laboratorios del Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), por el grupo del doctor Juan F. López Giménez. Esta línea celular procede de riñón de embrión humano (HEK293) y sobreexpresa constitutivamente el receptor de dopamina D₂ y de manera inducible por doxiciclina el receptor de serotonina 5-HT_{2A}.

En la generación de esta línea, primeramente se llevó a cabo la transfección de la línea parental HEK293 con un vector que contiene el producto génico que codifica el receptor de dopamina D₂ ligado por su extremo carboxilo terminal a la proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein o YFP). Mediante ensayos de amplificación por PCR, el epitopo c-Myc fue añadido al extremo amino terminal del receptor 5-HT_{2A} y seguidamente el producto c-Myc-5-HT_{2A} fue marcado en su extremo carboxilo terminal por la proteína fluorescente cian (Cyan Fluorescent Protein o CFP), también conocida con el nombre de Cerulean. El último paso en la obtención de la línea celular HEK293 Flp-In T-Rex capaz de sobreexpresar de forma inducible por doxiciclina el receptor de serotonina 5-HT_{2A} consistió en su transfección con una mezcla de dos vectores, el primero que contiene el producto génico c-Myc-5-HT_{2A}-CFP y el segundo que alberga el gen de la recombinasa Flp, cuya función es mediar la integración del gen de interés contenido en el primer vector en sitios de recombinación Flp en el genoma.

II. CULTIVO CELULAR

A) MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS

Las células se cultivaron y mantuvieron a una temperatura de 37 °C, en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% de humedad relativa en un incubador, empleando un medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) de alta concentración de glucosa (4.5 g/L) y con L-glutamina (*Thermo-Fisher*), privado de

proteínas, lípidos o factores de crecimiento, por lo que requiere ser suplementado con 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) dializado (*Thermo-Fisher*) libre de trazas de tetraciclina y 5-HT que podrían generar una alteración de los resultados por estimulación no deseada del receptor de serotonina 5-HT_{2A}. Adicionalmente, se le añadió geneticina G418 1 mg/ml (*Invivogen*) al medio con el objetivo de seleccionar solamente aquellas células que contuviesen su gen de resistencia, que son aquellas que fueron transfectadas exitosamente con el gen que codifica para el receptor de dopamina D₂ unido a la proteína amarilla fluorescente o YFP. Por otro lado, también se adicionó al medio blasticidina 1 mg/ml (*Invivogen*), con el fin de seleccionar exclusivamente las células que expresan el receptor c-Myc-5-HT_{2A} marcado con la proteína cian fluorescente o CFP, que son las que contienen el gen de resistencia a dicho antibiótico. Por último, el medio de cultivo fue enriquecido con penicilina-estreptomicina (*Sigma Aldrich*) 1% e higromicina B 100 mg/ml (*Invivogen*), para evitar una posible contaminación bacteriana.

B) DESCONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS

El proceso de descongelación se realizó a partir de criotubos de células congeladas en nitrógeno líquido o en congeladores de -80 °C. Estos viales de células se descongelaron en un baño a 37 °C, del modo más rápido posible para evitar la acción nociva del DMSO, y seguidamente se resuspendieron en 8-10 mL de medio completo en tubos de centrifuga de 15 ml. A continuación, se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, proceso tras el cual se retiró el sobrenadante. Consecutivamente, el pellet fue resuspendido en 1-2 ml de medio completo y se sembró en un “flask” de 75 cm² o en una placa de 150 cm², en el/la que previamente se habían adicionado 15-20 ml de medio completo. Es conveniente siempre indicar en el “flask” o placa el tipo de línea celular que se siembra (en este caso, HEK293), el receptor que sobreexpresa (en este caso, de manera constitutiva el receptor de dopamina D₂), el pase (indicativo del número de veces que las células han sido tripsinizadas y por tanto, de la edad celular), la fecha y el nombre de la persona que realiza el proceso. Finalmente, las células

sembradas se mantuvieron en un incubador a una temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

C) EXPANSIÓN CELULAR

Cuando la confluencia celular llega a ser del 80% en el “flask”, es conveniente expandir el cultivo a 1 o más “flasks” o placas de cultivo de 150 mm, a los que previamente se les ha añadido 15-20 ml de medio, diluyendo así las células entre 5 y 10 veces. No es recomendable que la placa alcance una confluencia superior al 80%, ya que este tipo de células suelen crecer en grupos y superpuestas, lo que conllevaría una inhibición de su crecimiento o incluso muerte de las que quedan en capas inferiores. Por otro lado, el sobrecrecimiento celular puede afectar a la expresión del receptor de interés.

El primer paso en el proceso de expansión celular consistió en aspirar el medio de la placa madre. A continuación, se llevó a cabo un lavado de las células con 8-10 ml de PBS, que constituye un tampón fosfato salino (NaCl 136 mM; KH₂PO₄ 1.47 mM; NaH₂PO₄ 8 mM, KCl 2.68 mM). Una vez retirado el PBS, se adicionaron 2.5 ml de tripsina (*Sigma Aldrich*), una enzima proteolítica cuya función consiste en romper la unión entre las células, así como la adherencia entre éstas y la base del “flask” o placa. Transcurrido un tiempo de aproximadamente 2 minutos de incubación celular con tripsina, se añadieron 8-10 ml de medio con el fin de frenar la reacción enzimática de tripsinización y homogeneizar y recoger la suspensión celular para transferirla a otro/a/os/as “flask/s” o placa/s en el/la/los/las que anteriormente se había añadido 15-20 ml de medio completo, aumentando así el número de pase de las células. Finalmente, el/los “flask/s” o placa/s se mantuvieron en un incubador a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

D) CRIOGENIZACIÓN DE LAS CÉLULAS

La criogenización de las células es necesaria para hacer un stock de las mismas y poder trabajar con ellas cuando sea necesario. Así, la congelación de las células se realiza cuando el “flask” o placa alcanza una confluencia del 80%, debido a los motivos indicados anteriormente.

Tras haber aspirado el medio de cultivo y tripsinizado las células, se añadió medio nuevo y se recogió la suspensión celular en un tubo Falcon® de 15 ml que se centrifugó a 1000 rpm durante 8 minutos. Una vez retirado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 1 ml de medio de congelación (medio de cultivo completo suplementado con 10% de DMSO) y se transfirió a un criotubo que se congeló gradualmente utilizando dos posibles métodos alternativos, un contenedor de congelación (Mr Frosty®; *Nalgene, Rochester, USA*) con un compartimento intermedio de isopropanol que permite reducir progresivamente la temperatura de las células en un congelador de -80°C (-1°C/minuto) o congelar el criovial durante 4 horas en un congelador de -20°C para finalmente pasarlo a uno de -80°C.

E) SIEMBRA CELULAR

Previamente a la realización de la siembra celular, se llevó a cabo el tratamiento de la placa (96 o 384 pocillos) con poli-D-lisina (*Sigma Aldrich*), un compuesto sintético que mejora la adherencia de las células a la superficie basal de la misma. La poli-D-lisina se comercializa en forma sólida, por lo que anteriormente a su utilización fue necesario reconstituirla en 50 ml de agua destilada esterilizada por filtración. Seguidamente, se realizó una dilución 1:5 en PBS, que se añadió a todos los pocillos de las placas en los que se sembraría células (25-50 µl/pocillo, en función del tamaño del pocillo). El tratamiento de la placa con poli-D-lisina es de 15-30 minutos, tiempo tras el cual se aspiró la solución, dejando ligeramente abierta la placa para permitir que su base se secase por completo.

Una vez tripsinizadas y centrifugadas las células como se ha hecho en los procesos de descongelación, expansión y congelación celular, el pellet se resuspendió en 1.1-5.1

ml de medio completo y consecutivamente se preparó la disolución de contaje (0.1 ml de Trypan blue, 0.3 ml de medio y 0.1 suspensión celular). El Trypan blue (*Sigma Aldrich*) o azul de tripano es un colorante que se utiliza para teñir las células y estudiar su viabilidad, pudiendo así diferenciar las que están vivas de las que están muertas. En las células vivas, la membrana plasmática impide la incorporación del azul de tripano al interior celular, por lo que éstas no se tiñen. Sin embargo, la membrana plasmática de las células muertas es permeable al azul de tripano, por lo que este colorante penetra al medio intracelular, tiñendo por completo las células no viables. El contaje celular se realizó empleando una cámara de Neubauer contando los cuatro campos y calculando la media de éstos (Figura 20). A continuación, el recuento de células se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$N = c \times Fd \times A$$

siendo **N** el número total de células/ml, **c** la media de recuento de los campos, **Fd** el factor de dilución del pellet (1-5) y **A** el factor de corrección de la cámara (en cámara de Neubauer, 10000).

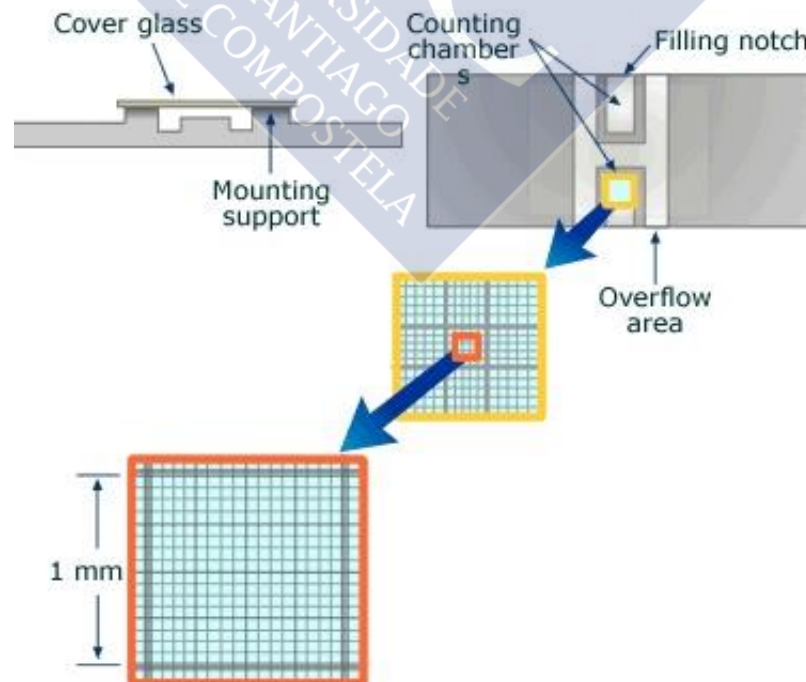


Figura 20. Contaje de células con el método manual de empleo de cámara de Neubauer (Besoiu S., 2010).

Una vez conocida la concentración de células, se llevó a cabo la dilución necesaria para poder sembrar el número de células por pocillo requerido en función del tipo de ensayo y del tamaño del pocillo en cada caso (en los ensayos de microscopía, 8000 células/pocillo; en los ensayos funcionales de AMPc, 30000 células/pocillo en placa *half-area* de 96; en los ensayos funcionales de IPs, 65000 células/pocillo en placa estándar de 96; en los ensayos de binding en célula entera, desde 25000 hasta 200000 en placa estándar de 96; en el método multiplex AMPc/IPs, 65000 células/pocillo en placa estándar de 96).

III. ENSAYOS DE MICROSCOPIA DE ALTO RENDIMIENTO

Los ensayos de microscopía fluorescente tuvieron por objetivo determinar las condiciones óptimas de inducción del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, es decir, qué concentración y durante cuánto tiempo deben estar las células expuestas a doxiciclina para expresar adecuadamente dicho receptor inducible.

Primeramente, se llevó a cabo la siembra de 8000 células/pocillo en una placa previamente tratada con poli-D-lisina de 386 pocillos válida para realizar ensayos de fluorescencia, en este caso, Cell carrierTM 384 negra de fondo transparente estéril (*Perkin Elmer*). Adicionalmente, en el día de la siembra las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de doxiciclina (10, 30, 60 y 100 ng/ml) (*Sigma Aldrich*). Tras haber determinado en el primer ensayo de microscopía de fluorescencia que la concentración óptima para inducir el receptor de serotonina 5-HT_{2A} es 10 ng/ml, se realizó otro ensayo en el que se expusieron las células a diferentes tiempos de doxiciclina 10 ng/ml (24, 48 y 72 horas), habiéndose establecido que el tiempo adecuado de tratamiento son 24 horas.

En el ensayo de microscopía, se ha empleado el microscopio de fluorescencia de alto rendimiento Operetta (*Perkin Elmer*), con un objetivo 60x NA. Los canales de lectura utilizados fueron el de campo claro, el de YFP (Yellow Fluorescence Protein) y el de CFP (Cerulean Fluorescence Protein). La proteína fluorescente YFP tiene su pico de excitación a una longitud de onda de 514 nm y su pico de emisión a 527 nm. Por

otro lado, la proteína fluorescente CFP presenta su pico de excitación a 433 nm y el de emisión a 475 nm. Así, en la detección de estos campos, se empleó para la proteína YFP una longitud de onda de excitación de 500 nm y de emisión de 540 nm, y para la proteína CFP 428 y 480 nm respectivamente. En los diferentes ensayos, se optimizó el tiempo de exposición de cada canal de lectura, así como la altura de medición en función de la intensidad de la señal celular, siendo la intensidad de la lámpara del 100%. Se seleccionaron todos los pocillos en los que se había sembrado células y dentro de cada pocillo tres campos de diferentes zonas. Las imágenes se procesaron de modo remoto mediante el software Columbus (*Perkin Elmer*), obteniendo los valores medios de todos los campos para cada pocillo de cada uno de los parámetros cuantificados.

IV. ENSAYOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS

Los ensayos de unión de radioligando constituyen una importante herramienta en la caracterización farmacológica de los receptores, posibilitando la cuantificación de los distintos receptores implicados en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, así como la definición de la selectividad y afinidad que el radioligando y otros compuestos de interés tienen por el receptor objeto de estudio. Los principales parámetros determinados en las técnicas de *binding* son los siguientes: densidad del receptor (es una medida que nos indica la cantidad de receptor en la muestra de estudio), saturación del receptor por el radioligando (definida por la constante de disociación del radioligando o K_D) y afinidad de distintos ligandos por el receptor (establecida por la constante de afinidad o K_i de cada compuesto).

Las técnicas de unión de radioligando se basan en reacciones químicas reversibles entre un compuesto (fármaco, neurotransmisor, etc.) marcado por un radioisótopo (^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I , etc.) y un receptor o lugar específico de unión situado en un sistema celular, derivados de células (como las membranas celulares) o tejidos purificados. El radioligando, cuyo marcaje radiactivo no altera las características del ligando, se caracteriza por ser fácilmente detectable gracias a la técnica de conteo por centelleo

líquido, y especialmente por su alta selectividad por el receptor objeto de estudio, permitiendo así la discriminación entre éste y otros receptores que se encuentren en el sistema celular o tejido. Estas reacciones tienen lugar en un medio en el que se han fijado previamente determinados valores como la concentración del radioligando y la suspensión proteica, pH, temperatura, concentración de iones, etc.

En este trabajo, se ha hecho uso de las técnicas de *binding* con el fin de definir la saturación del receptor por el radioligando, así como las propiedades de afinidad de agonistas y antipsicóticos típicos y atípicos por el receptor de dopamina D₂ constitutivo y de serotonina 5-HT_{2A} inducible por doxiciclina, pudiendo valorar si los parámetros obtenidos se corresponden con los establecidos en la literatura científica. Por otro lado, los ensayos de unión de radioligando en nuestra línea celular nos han permitido corroborar la presencia del receptor endógeno 5-HT₇, cuyo vía de señalización principal es mediada por la proteína G_s y por tanto por AMPc, motivo por el cual su bloqueo es necesario para evitar interferencias en la medición de este segundo mensajero.

ENSAYOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS EN MEMBRANAS

A) PREPARACIÓN DE MEMBRANAS

Previamente a la realización de los ensayos de unión de radioligando, se llevó a cabo una preparación de homogenados de membranas a partir de dos tipos celulares:

- Células HEK293 que expresan constitutivamente el receptor D₂.
- Células HEK293 que expresan constitutivamente el receptor D₂ y de forma inducible por exposición a doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas el receptor 5-HT_{2A}.

Las células fueron sembradas, crecidas y expandidas en placas de cultivo de tamaño 150 x 25 mm. El día previo a la preparación de membranas, se llevó a cabo un cambio de medio de cultivo de las placas por medio de igual composición, pero en el

caso de las placas con células en las que se debía inducir el receptor 5-HT_{2A}, se añadió doxiciclina a una concentración de 10 ng/ml.

El día de la preparación de membranas, tras retirar el medio de cultivo de las placas y realizar un lavado de las mismas con PBS a 4 °C, se procedió a su raspado celular con la misma solución salina. Seguidamente, la suspensión celular fue centrifugada a 800 x g a 4 °C durante 15 minutos. A continuación, el pellet obtenido fue resuspendido en PBS y centrifugado en las mismas condiciones. Después de haber retirado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.4 y se rompieron las células en el polytrón PT 10-35 GT a 30,000 rpm, en hielo. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 48,000 x g durante 40 minutos a 4°C, siendo resuspendido el pellet en el mismo buffer y obtenida finalmente la preparación de membranas. Por último, se determinó la concentración de proteínas de la misma por triplicado empleando el método de Bradford (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad)*). La absorbancia de la reacción colorimétrica se estableció a 595 nm, haciendo uso de una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA), en un espectrofotómetro Ultrospec 4000 UV/Visible Spectrophotometer (*Pharmacia Biotech*).

B) LINEALIDAD DE PROTEÍNA

Los ensayos de linealidad de proteína se basan en la utilización de diferentes concentraciones de proteína para poder seleccionar la cantidad óptima de la misma a utilizar en experimentos consecutivos, en base al ratio más adecuado ventana / concentración de proteína.

Para conocer la especificidad del radioligando por el receptor objeto de estudio, se utiliza un compuesto muy selectivo de dicho receptor, que compite con la molécula marcada radiactivamente por la unión al mismo, definiendo así la unión específica (SB). La señal radiactiva que permanece tras el desplazamiento del radioligando por el compuesto específico determina la unión no específica (NSB).

$$\mathbf{SB} \text{ (Specific Binding)} = \mathbf{TB} \text{ (Total Binding)} - \mathbf{NSB} \text{ (Non- Specific Binding)}$$

La concentración de radioligando que se utiliza en los ensayos de linealidad de proteína es equivalente al valor de la constante de disociación (K_D) obtenida de la bibliografía científica (*IUPHAR database*).

1. LINEALIDAD DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR DE DOPAMINA D_2

El primer paso en la optimización de los ensayos de unión de radioligando ha sido determinar la concentración de membrana a utilizar en posteriores experimentos. Así, se incubaron dos tipos de membranas (aquellas que expresan exclusivamente el receptor D_2 y las que expresan adicionalmente el receptor 5-HT_{2A}) en diferentes cantidades (10, 20, 40 y 80 μ g/pocillo). Se utilizó como radioligando ³H-Espiperona (73 Ci/mmol, *Perkin-Elmer, Massachusetts, USA*) a una concentración de 0.2 nM, correspondiéndose ésta al valor de la constante de disociación (K_D) obtenida de la literatura científica (*IUPHAR database*). La determinación de la inespecificidad se llevó a cabo en presencia de sulpirida 10 μ M. Los ensayos se realizaron por triplicado en una placa de polipropileno de 96 pocillos con un volumen final de 250 μ l, habiéndose utilizado como tampón de incubación una solución compuesta por 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂ y 1 mM EDTA pH 7.4 (Tabla 4). Tras un tiempo de incubación de 2 horas a 25 °C y 1200 rpm, se traspasaron 200 μ l de la placa de incubación a una placa Multiscreen_{HTS} con filtros GF/C (*Merck Millipore, Billerica, USA*) pretratada con polietilenimina al 0.5% y 15 minutos antes del filtrado con tampón de incubación (250 μ l/pocillo). Tras filtrar el contenido del ensayo, se realizaron 4 lavados de 250 μ l/punto con tampón de filtración (50 mM Tris-HCl; 0.9% NaCl; pH 7.4). Los filtros se secaron en una estufa durante 1 hora a 60°C y fueron tratados con 30 μ l de líquido de centelleo Universol (*MP Biomedicals, Santa Ana, USA*) para poder ser así cuantificada la radiactividad de las reacciones en un contador Microbeta Trilux (*Perkin-Elmer*).

Tabla 4. Tabla resumen del ensayo de linealidad de proteína del receptor dopamina D₂ en membranas obtenidas de células previamente tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.

	Tampón Incubación	Sulpirida (10 µM)	[³ H]-Espiperona (0.2 nM)	Membranas
Unión Total (TB)	125 µl	-	25 µl	100 µl
Unión No Específica (NSB)	100 µl	25 µl	25 µl	100 µl

2. LINEALIDAD DE PROTEÍNA DEL RECEPTOR 5-HT_{2A}

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de membrana que expresa el receptor de serotonina 5-HT_{2A} a utilizar en ensayos de *binding* consecutivos, se incubaron diferentes cantidades de la misma (10, 20, 40 y 80 µg/pocillo) en una placa de polipropileno de 96 pocillos y en un tampón de incubación 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Como radioligando, se empleó [³H]-ketanserina (50.3 Ci/mmol, *Perkin-Elmer, Massachusetts, USA*) a una concentración 1 nM correspondiente al valor de la constante de disociación (K_D) de dicho radioligando por el receptor 5-HT_{2A} registrado en bases de datos científicas (*IUPHAR database*). Las reacciones se realizaron por triplicado, con un volumen final de 250 µl, siendo la unión no específica determinada en presencia de metisergida 1 µM (Tabla 5). Las mismas fueron incubadas durante 30 minutos, a una temperatura de 37 °C y agitación de 1200 rpm, tiempo tras el cual se traspasó y filtró un volumen de 200 µl en una placa Multiscreen_{HTS} con filtros GF/B (*Merck Millipore, Billerica, USA*) pretratada con polietilenimina al 0.5% y con tampón de incubación 15 minutos antes del filtrado (250 µl/pocillo). Seguidamente, se realizaron 6 lavados de 250 µl/pocillo con tampón de filtración (50 mM Tris-HCl; pH 6.6). Tras el secado de los filtros en una estufa durante hora y media a una temperatura de 60°C, se añadió 30 µl/pocillo de líquido de centelleo Universol (*MP Biomedicals, Santa Ana, USA*). Finalmente, se procedió al conteo de la radiactividad de las reacciones en un contador Microbeta Trilux (*Perkin-Elmer*).

Tabla 5. Tabla resumen del ensayo de linealidad de proteína del receptor serotonina 5-HT_{2A} en membranas obtenidas de células previamente tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.

	Tampón Incubación	Metisergida (1 μM)	[³ H]-Ketanserina (1 nM)	Membranas
Unión Total (TB)	125 μl	-	25 μl	100 μl
Unión No Específica (NSB)	100 μl	25 μl	25 μl	100 μl

◆ Analisis de Datos

Se calculó la ventana a cada concentración de proteína, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Ventana} = \frac{\text{TB} - \text{NSB}}{\text{TB}} \times 100$$

La menor concentración de proteína con un porcentaje de ventana de al menos el 90% es la adecuada a utilizar en los ensayos consecutivos de saturación del receptor y de competición con el radioligando por la unión al mismo.

C) ENSAYOS DE SATURACIÓN

Los ensayos de saturación tienen el objetivo de determinar la unión específica en el equilibrio, probando diferentes concentraciones de radioligando. Los parámetros obtenidos en este tipo de ensayo son el número o densidad de sitios de unión (B_{max}), así como la afinidad del radioligando por el receptor, esto es, la llamada constante de disociación (K_D), definida como la concentración de radioligando que ocupa el 50% de los receptores.

1. ENSAYOS DE SATURACIÓN DEL RECEPTOR D₂

Tras haber sido elegida una cantidad de 10 µg proteína de membrana / pocillo, se ha procedido a la incubación de la misma con concentraciones graduales de radioligando [³H]-espiperona (2.5 – 0.002 nM) (73 Ci/mmol, *Perkin-Elmer, Massachusetts, USA*). Las reacciones se realizaron por triplicado y se incubaron durante 2 horas a 25 °C y 1200 rpm en un volumen final de 250 µl y en el mismo tampón de incubación utilizado en el ensayo de linealidad de proteína. La unión no específica se determinó con sulpirida 10 µM y transcurrido el tiempo de incubación, se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el ensayo de linealidad de proteína descrito previamente (Tabla 6).

Tabla 6. Tabla resumen del ensayo de saturación del receptor dopamina D₂ por el radioligando [³H]-espiperona en membranas obtenidas de células previamente tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.

	Tampón Incubación	Sulpirida (10 µM)	[³ H]-Espiperona (0.002-2.5 nM)	Membranas
Unión Total (TB)	125 µl	-	25 µl	100 µl
Unión No Específica (NSB)	100 µl	25 µl	25 µl	100 µl

2. ENSAYOS DE SATURACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A}

En el ensayo previo de linealidad de proteína, se observó que la concentración óptima de membrana a utilizar en los ensayos de unión de radioligando por el receptor 5-HT_{2A} es 80 µg/punto. Así, se incubaron membranas que expresan los receptor D₂ y 5-HT_{2A} (80 µg/punto) con diferentes concentraciones graduales de radioligando [³H]-ketanserina (0.004-10 nM) (50.3 Ci/mmol, *Perkin-Elmer, Massachusetts, USA*), con el fin de conocer su constante de disociación (K_D) por el receptor 5-HT_{2A} en nuestra línea celular. Las reacciones se realizaron por triplicado y fueron incubadas durante 30 minutos, 37 °C y 1200 rpm, siendo la inespecificidad establecida por metisergida 1 µM

(Tabla 7). Tras el tiempo de incubación, las reacciones se filtraron de igual modo que en el ensayo de linealidad de proteína descrito previamente.

Tabla 7. Tabla resumen del ensayo de saturación del receptor serotonina 5-HT_{2A} por el radioligando [³H]-ketanserina en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.

	Tampón Incubación	Metisergida (1 μM)	[³ H]-Ketanserina (0.004-10 nM)	Membranas
Unión Total (TB)	125 μl	-	25 μl	100 μl
Unión No Específica (NSB)	100 μl	25 μl	25 μl	100 μl

◆ Analisis de Datos

El ajuste de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.00 (*GraphPad Software Inc.*), seleccionando el mejor ajuste de regresión no lineal.

En los ensayos de saturación, la ecuación estándar que define la unión específica del radioligando al receptor describe una hipérbola rectangular:

$$Y = \frac{B_{\max} \cdot X}{K_D + X},$$

donde X es la concentración de radioligando libre, B_{max} es la máxima densidad de sitios de unión y K_D es la constante de disociación del radioligando en el equilibrio. Un valor de K_D bajo indica una alta afinidad del radioligando por el receptor, de tal manera que el receptor es saturado por una baja concentración de radioligando.

D) ENSAYOS DE COMPETICIÓN

Este tipo de ensayos se basan en la competición de un compuesto de interés, generalmente a concentraciones gradualmente distintas, con el radioligando por la ocupación o unión al receptor. La concentración de radioligando que se emplea en los ensayos de competición es aproximadamente su valor de K_D, obtenida en los ensayos

de saturación previamente realizados. Los parámetros derivados de los ensayos de competición son la concentración inhibitoria 50% (IC_{50} : *Inhibitory Concentration 50%*), definida como la concentración del fármaco que causa un 50% del desplazamiento del radioligando, y la constante de inhibición del ligando competidor (K_i), indicativa de la afinidad del compuesto por el receptor.

1. ENSAYOS DE COMPETICIÓN DEL RECEPTOR D_2

Los dos tipos de membranas (aquellas que contienen únicamente el receptor D_2 constitutivo y aquellas que expresan adicionalmente el receptor 5-HT_{2A} inducible por doxiciclina) se incubaron con 0.2 nM de [³H]-espiperona (73 Ci/mmol, *Perkin-Elmer*, Massachusetts, USA) y diferentes concentraciones de antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina) y atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol). La concentración de radioligando utilizada se seleccionó en base al valor de la constante de disociación (K_D) obtenida en los ensayos de saturación. La unión inespecífica fue determinada por sulpirida 10 μ M. El volumen final de las reacciones fue 250 μ l en el mismo tampón de incubación empleado en los ensayos previos de linealidad de proteína y de saturación (Tabla 8). Las condiciones de incubación, así como los pasos consecutivos de filtración son semejantes a los experimentos de unión de radioligando del receptor D_2 ya realizados.

Tabla 8. Tabla resumen de los ensayos de competición de distintos estándares con [³H]-espiperona por la unión al receptor dopamina D_2 en membranas obtenidas de células previamente tratadas y no tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.

	Tampón Incubación	Sulpirida (10 μ M)	Ligando Competidor	[³ H]-Espiperona (0.2 nM)	Membranas
TB	125 μ l	-		25 μ l	100 μ l
NSB	100 μ l	25 μ l		25 μ l	100 μ l
Ligando	100 μ l	-	25 μ l	25 μ l	100 μ l

2. ENSAYOS DE COMPETICIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A}

Las membranas celulares que albergan el receptor constitutivo D₂ e inducible por doxiciclina 5-HT_{2A} se incubaron con [³H]-ketanserina 0.5 nM y diferentes concentraciones graduales de antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina) y atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol). La concentración de radioligando empleada se determinó en base al valor de la constante de disociación (K_D) obtenida del ensayo de saturación previamente realizado. La inespecificidad se estableció en presencia de metisergida 1 μM. El volumen final de las soluciones fue 250 μl y el tampón de incubación, así como las condiciones de incubación y procedimiento de filtrado fueron semejantes a los establecidos en ensayos de linealidad y de saturación anteriormente realizados (Tabla 9).

Tabla 9. Tabla resumen de los ensayos de competición de distintos estándares con [³H]-ketanserina por la unión al receptor serotonina 5-HT_{2A} en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.

	Tampón Incubación	Metisergida (1 μM)	Ligando Competidor	[³ H]-Ketanserina (0.3 nM)	Membranas
TB	125 μl	-		25 μl	100 μl
NSB	100 μl	25 μl		25 μl	100 μl
Ligando	100 μl	-	25 μl	25 μl	100 μl

◆ Analisis de Datos

El ajuste de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5.00 (*GraphPad Software Inc.*), seleccionando el mejor ajuste de regresión no lineal.

En los ensayos de competición, la ecuación que define la competición establecida entre radioligando y compuesto competidor por la ocupación de un único sitio de unión describe una curva sigmoidea:

$$Y = \text{NSB} + \frac{\text{TB} - \text{NSB}}{1 + 10^{X - \log \text{IC}_{50}}},$$

donde Y es la unión medida en presencia de diferentes concentraciones de ligando competidor, X es la concentración de ligando competidor, IC₅₀ es la concentración de ligando competidor necesaria para inhibir el 50% de unión específica del radioligando al receptor, TB es la unión total en ausencia de ligando competidor y NSB es la unión no específica.

En el caso de compuestos que compiten por dos sitios de unión al receptor, el ajuste viene dado por la siguiente ecuación:

$$Y = \text{NSB} + (\text{TB} - \text{NSB}) \cdot \left[\frac{\text{fracción1}}{1 + 10^{(X - \text{LogIC}_{50}2)}} + \frac{1 - \text{fracción1}}{1 + 10^{(X - \text{LogIC}_{50}1)}} \right],$$

donde la fracción 1 representa la fracción de receptores que tienen una afinidad descrita por IC₅₀1 y el resto de receptores (1 – fracción 1) tienen una afinidad descrita por IC₅₀2. Si la IC₅₀1 es menor que la IC₅₀2, la fracción 1 es la de alta afinidad.

La K_i se calcula a partir de la IC₅₀2, utilizando la ecuación de Cheng y Prussoff:

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{X}{K_D}},$$

donde IC₅₀ es la concentración de ligando requerida para inhibir el 50% de la unión específica, X es la concentración de ligando competidor, K_D es la constante de disociación del radioligando y K_i es la concentración de ligando competidor que se unirá a la mitad de sitios de unión en el equilibrio en ausencia de radioligando u otros ligando competidores. Si la K_i es baja, la afinidad del receptor por el ligando competidor será alta.

ENSAYOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS EN CÉLULAS

24 horas antes del día del ensayo, se llevó a cabo la siembra de células HEK293 sin tratar con doxiciclina en medio de cultivo a diferentes densidades (25000, 50000, 100000 y 200000 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos estándar transparente y estéril. Tras finalizar la siembra de células, éstas se mantuvieron en un incubador en condiciones de 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

En el día del ensayo, primeramente se volteó la placa con el fin de retirar el medio de cultivo. Como buffer de ensayo, se empleó medio de cultivo comercial libre, es decir, sin suplementar con FBS dializado ni antibióticos, siendo el volumen final de las soluciones en placa 200 µl/pocillo. Se añadió el radioligando [³H]-SB269970 (45.8 Ci/mmol, *Perkin-Elmer, Massachusetts, USA*) a una concentración de 2 nM, correspondiéndose ésta al valor de la constante de disociación (K_D) obtenida de la literatura científica (*IUPHAR database*). La inespecificidad se determinó mediante SB-269970 1 µM. Seguidamente, las células se incubaron durante 60 minutos a una temperatura de 37°C. Pasado el tiempo de incubación, se lavó la placa 3 veces con NaCl 0.9% frío y a continuación se llevó a cabo la lisis celular, para lo cual se probaron dos productos de igual efectividad: etanol absoluto frío y tritón (100 µl/pocillo). 20 minutos después, se recogió una alícuota de 20 µl/pocillo de la placa y se pasó a una flexiplate, en la que seguidamente se añadieron 100 µl/pocillo de Optiphase. Finalmente, se puso la placa a agitar y se realizó el contaje de radiactividad en el contador de placa Microbeta Trilux (*Perkin Elmer*).

V. ENSAYOS FUNCIONALES

Estos ensayos tienen el objetivo de estudiar la funcionalidad de los receptores, esto es, evaluar las principales vías de señalización que activan los mismos.

En la presente tesis doctoral, se realizó un estudio de la funcionalidad de los receptores de dopamina D₂ constitutivo y de serotonina 5-HT_{2A} inducible por

doxiciclina, dependientes de las proteínas $G_{i/o}$ y G_q , respectivamente. Adicionalmente, se evaluó la influencia de la heterodimerización D_2 -5-HT_{2A} en la farmacología de agonistas y antagonistas (antipsicóticos típicos y atípicos).

A) ENSAYOS FUNCIONALES DE MEDIDA DE AMPc

En este trabajo, los ensayos funcionales de medida de AMPc han tenido la finalidad de estudiar las vías de señalización dependientes de las proteínas G_i y/o G_s , que inhiben y estimulan la adenilato ciclasa respectivamente, reduciendo o aumentando los niveles de este segundo mensajero.

1. CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR CONSTITUTIVO D_2

El receptor de dopamina D_2 está acoplado a la proteína $G_{i/o}$, de tal manera que su activación implica la inhibición de la adenilato ciclasa y en definitiva una reducción de los niveles de AMPc. La caracterización funcional del receptor de dopamina D_2 exige la medida del segundo mensajero al cual está asociado, es decir, la medición de los niveles de AMPc, que en este trabajo, se llevó a cabo haciendo uso del kit AMPc Cisbio (*Bioassays, Codolet, France*), basado en la tecnología HTRF (*Homogenous Time-Resolved Fluorescence*) y siguiendo las indicaciones especificadas por el protocolo asociado.

24 horas antes del ensayo, se realizó una siembra de células HEK293 tratadas y/o no tratadas con doxiciclina, a una densidad de 30000 células/pocillo en medio Opti-MEM (*Invitrogen, Life Technologies S.A.*) en una placa de 96 pocillos half-area (*Sigma Aldrich*) pretratada con poli-D-lisina (*Sigma Aldrich*). Tras la siembra, las células se mantuvieron en un incubador hasta el día siguiente (37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa).

En el día del ensayo, primeramente las células fueron incubadas durante 5 minutos a 37 °C en el buffer de ensayo de AMPc: Opti-MEM en el que previamente se disolvió mediante sonicación de 30 minutos 3-isobutil-1-metilxantina 500 μ M (IBMX) (*Sigma Aldrich*), un inhibidor de fosfodiesterasas (PDEs) que previene la degradación de

AMPC. Debido a que el receptor de dopamina D₂ inhibe la enzima adenilato ciclasa, fue necesario el tratamiento de las células con forskolina (FSK) a una concentración 1 μ M para incrementar los niveles de AMPC en el citosol y así poder contabilizar este segundo mensajero tras la activación o bloqueo del receptor. Los niveles basales de AMPC fueron evaluados en ausencia de FSK. Seguidamente, se incubaron las células a 37 °C con los compuestos a evaluar:

- Curvas de antagonistas (antipsicóticos típicos y atípicos): concentraciones gradualmente crecientes de antagonistas a los que se expusieron las células durante 5 minutos, tiempo tras el cual se añadió el agonista competidor durante 20 minutos.
- Curvas de agonistas (dopamina y quinpirol): concentraciones gradualmente mayores de agonistas, con un tiempo de incubación de 20 minutos.

Consecutivamente, las células fueron incubadas durante 60 minutos con los fluoróforos d2 (ligado a AMPC comercial) y Cryptate (marcado con anti-AMPC) disueltos en el buffer lisis del kit, a una concentración 1/20 del stock almacenado en un congelador a -80 °C. Finalmente, se midió el ratio de intensidad de emisión fluorescente 665/662 nm de longitud de onda en el lector de microplacas Ultra Evolution (*TECAN, Männedorf, Switzerland*).

Este método consiste en un inmunoensayo competitivo entre el AMPC nativo producido por las células y el AMPC ligado al fluoróforo d2 por la unión al anti-AMPC unido a Cryptate (Figura 21). Cuando los niveles de AMPC intracelulares son elevados, la mayor parte de AMPC que se une al Cryptate no está ligado a d2, de tal manera que la señal de fluorescencia es baja. Por el contrario, cuando hay poca cantidad de AMPC en el interior celular, la mayor parte del AMPC que se une al anti-AMPC del Cryptate está marcado con d2, produciéndose FRET entre d2 y Cryptate, y detectándose por tanto una elevada señal de fluorescencia. En definitiva, la señal específica o señal de transferencia entre d2 y Cryptate es inversamente proporcional a la concentración de AMPC en el citoplasma de las células.

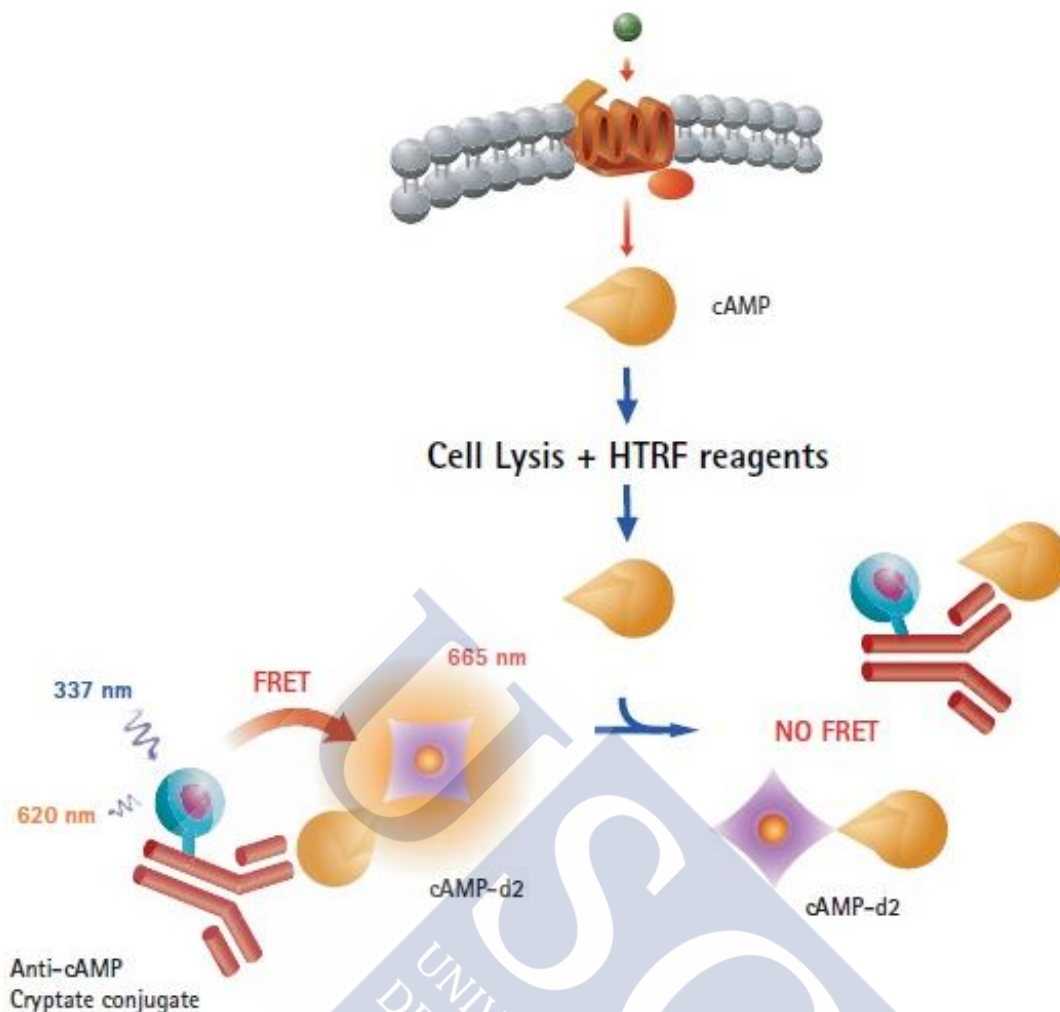


Figura 21. Representación esquemática del proceso de FRET entre los reactivos d2 y Cryptate (<http://www.cisbio.com/usa/drug-discovery/product-insert-camp-dynamic-2-kit-20000-tests>)

2. CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR ENDÓGENO 5-HT₇

En la caracterización funcional de los receptores de dopamina D₂ y de serotonina 5-HT_{2A} que es potencialmente capaz de expresar la línea de trabajo HEK293, se encontró una interferencia en los ensayos funcionales de medición de AMPc. Tras la detección de curvas dosis-respuesta de 5-HT y clozapina en ausencia de forskolina, se dedujo que dicha interferencia consistía en la presencia de un receptor endógeno de serotonina acoplado a proteína G_s (5-HT₄R, 5-HT₆R o 5-HT₇R). Se realizaron ensayos de AMPc con ligandos selectivos para los tres receptores de serotonina acoplados a proteína G_s (SB-203186, SB-271046A y SB-269970, respectivamente), que

permitieron confirmar la expresión en la membrana plasmática de un receptor endógeno adicional, el receptor 5-HT₇.

◆ **Análisis de datos**

Los niveles de AMPc se calcularon a partir de la relación de fluorescencia 665/620 nm, expresada como ratio de las distintas muestras y el control negativo (blanco del ensayo):

$$\text{Ratio} = \frac{A_{665 \text{ nm}}}{B_{620 \text{ nm}}} \times 10^4 ,$$
$$\text{Delta F} = \frac{\text{Ratio} - \text{Ratio}_{\text{neg}}}{\text{Ratio}_{\text{neg}}} \times 100 ,$$

Una vez obtenida la curva estándar del ensayo tras haber representado los valores de Delta F frente a concentraciones gradualmente mayores de AMPc, se llevó a cabo la extrapolación de los valores de Delta F de las distintas muestras en la curva de calibración, pudiendo así haberse obtenido los niveles de AMPc de las mismas.

B) ENSAYOS FUNCIONALES DE MEDIDA DE IPs DEL RECEPTOR 5-HT_{2A}

Como se desarrolla en la introducción de la tesis doctoral, el receptor de serotonina 5-HT_{2A} está acoplado principalmente a la proteína G_q, de modo que la activación de ésta supone la estimulación de la PLC que cataliza la reacción de escisión del fosfolípico PIP₂, ubicado en la cara interna de la membrana plasmática, en DAG e IP₃. Este último difunde hacia el citosol y activa los canales de calcio del retículo endoplasmático, produciendo un aumento de los niveles de Ca⁺² en el interior celular y en última estancia la estimulación de la calmodulina y otras proteínas citosólicas. El DAG, debido a su carácter hidrofóbico, queda retenido en la membrana plasmática, donde actúa como un activador fisiológico de la PKC.

En este trabajo, se ha realizado la caracterización funcional del receptor de serotonina 5-HT_{2A} mediante la medición de los niveles de IPs tras su activación por los agonistas 5-HT, DOI, LSD o lisurida o bloqueo por los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol.

En primer lugar, se realizó una siembra de células HEK293 tratadas y no tratadas con doxiciclina (control), a una densidad de 65000 células/pocillo en medio de cultivo en una placa estándar de 96 pocillos transparente estéril. Seguidamente, las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Al día siguiente, se aspiró el medio de cultivo de la placa y se reemplazó por medio de cultivo libre con 10 µCi/mL [³H]myo-inositol (15-20 Ci/mmol, *Perkin Elmer*) durante 24 horas.

En el día del ensayo, se llevó a cabo un lavado de las células a 37 °C con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; *Sigma Aldrich*) suplementado con HEPES 20 mM, LiCl 20 mM y BSA (Bovine Serum Albumine; *Sigma Aldrich*) libre de ácidos grasos al 2% con un pH de 7.55, con el fin de retirar el [³H]myo-inositol que no fue incorporado en el ciclo de los inositoles fosfatos. Mientras el HEPES es requerido como regulador del pH en el buffer de ensayo, el LiCl es necesario en el bloqueo del ciclo de los inositoles fosfatos que permite la acumulación y posterior contaje de IP₃ e IP₄ marcados radiactivamente. Adicionalmente, también se añadió BSA libre de ácidos grasos al 2% con el objetivo de no modificar las condiciones iniciales del ensayo, puesto que en un principio también se estudiaba la vía de señalización acoplada a la proteína G_{α11} asociada a la fosfolipasa A (PLA). En este caso, se aprovecha la capacidad de la BSA libre de ácidos grasos para arrastrar al exterior celular el ácido araquidónico (AA) liberado en el citosol tras la acción de la PLA, el cual atraviesa la membrana plasmática por ósmosis.

Después del lavado, las células fueron incubadas a 37 °C durante 20 minutos con los compuestos a ensayar, concentraciones gradualmente crecientes de agonistas o antagonistas (en el caso de estos últimos, fue necesario la adición de un agonista competidor), a excepción de aquellas que actúan como controles para estudiar la concentración basal de IPs. Seguidamente, se retiraron los compuestos diluidos en el buffer experimental, tras lo cual las células fueron tratadas con ácido fórmico 100 mM

durante 30 °C a 4 °C, con el fin de generar su lisis y desprotonar o acidificar los grupos fosfatos de los IP₃ e IP₄. A continuación, se transfirió una alícuota de 20 µl/pocillo de la placa de ensayo a una placa flexiplate, en la que consecutivamente se añadieron 80 µl/pocillo de una dilución 1:16 de *RNA binding YSi SPA beads* (Sigma Aldrich), que al estar cargadas positivamente atraen los fosfatos de ³H-IP₃ e ³H-IP₄ cargados negativamente, cuya radiactividad causa la excitación del líquido de centelleo contenido en el interior de las mismas. La radiactividad y en definitiva los niveles de ³H-IPs fueron cuantificados haciendo uso del contador Microbeta Trilux (Perkin Elmer).

◆ Análisis de datos

Se construyeron curvas concentración-respuesta de los distintos compuestos y se utilizó el programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc.) para analizar los datos, seleccionando en el mismo el mejor ajuste de regresión no lineal.

La medida de la potencia se realizó en base a la siguiente ecuación:

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

En estos experimentos, los datos se normalizaron y se consideró el 100% la respuesta E_{max} obtenida de diferentes valores en función del tipo de ensayo funcional y del ligando:

➤ **Ensayos de AMPc:**

Receptor de dopamina D₂

- Curvas dosis-respuesta de agonistas: se consideró el 100% el valor de AMPc correspondiente a FSK 1 µM y el 0% los niveles basales de AMPc.
- Curvas dosis-respuesta de antagonistas: se fijó el 100% en el valor de AMPc correspondiente a FSK 1 µM y el 0% los niveles de AMPc obtenidos por la exposición al agonista endógeno competitivo dopamina 1 µM.

Receptor de serotonina 5-HT₇

- Curva dosis-respuesta de agonistas: se determinó que el 100% era el valor de AMPc correspondiente a 5-HT 100 μ M y el 0% la concentración basal de AMPc.
- Curva dosis-respuesta de antagonistas: se estableció que el 100% era el valor de AMPc obtenido de 5-HT 1 μ M y el 0% los niveles basales de AMPc.

➤ Ensayos de IPs:

Receptor de serotonina 5-HT_{2A}

- Curva dosis-respuesta de agonistas: se consideró el 100% el valor de IPs correspondiente a 5-HT 100 μ M y el 0% la concentración basal de IPs.
- Curva dosis-respuesta de antagonistas: se fijó el 100% en el valor de IPs obtenido de 5-HT 1 μ M y el 0% los niveles basales de IPs.

VI. MÉTODO MULTIPLEX FUNCIONAL DE MEDIDA SIMULTÁNEA DUAL DE AMPc E IPs

En este trabajo, se ha desarrollado una técnica de medición simultánea de las principales vías de señalización de los receptores de dopamina D₂ constitutivo y de serotonina 5-HT_{2A} inducible por doxiciclina asociadas a AMPc dependiente de proteína G_{i/o} e IPs dependiente de proteína G_q, respectivamente. Así, se ha conseguido integrar en una única técnica dos tipos ensayos funcionales diferentes, de tal manera que además de economizar recursos y tiempo, se han podido homogenizar las condiciones para dos experimentos distintos en cuanto a material y pase de la línea celular se refiere. Adicionalmente, esta técnica dual de medida de AMPc e IPs ha permitido corroborar el bloqueo del receptor de serotonina 5-HT₇ en los ensayos funcionales de estudio del receptor 5-HT_{2A} activado por serotonina y antagonizado por clozapina, risperidona y aripiprazol, al ratificar paralelamente ausencia de señal de AMPc tras el tratamiento con SB-269970.

48 horas antes del ensayo, se realizó la siembra de células HEK293 tratadas y/o no tratadas con doxiciclina en medio de cultivo en una placa de 96 pocillos estéril transparente con una densidad de 65.000 células/pocillo. A continuación, las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, hasta el día siguiente.

24 horas antes del ensayo, se reemplazó el medio de cultivo de la placa sembrada de 96 pocillos por medio libre con 10 µCi/mL [³H]myo-inositol (15-20 Ci/mmol, *Perkin Elmer*), al cual fueron expuestas las células hasta el día siguiente (24 horas).

En el día del ensayo, se realizó un lavado de las células a 37°C con el buffer empleado en el método estándar de medición de IPs (HBSS, HEPES 20 mM, LiCl mM y BSA 2%; pH 7.55), pudiendo así eliminar todos los IPs marcados radiactivamente que no fuesen incorporados en el ciclo de los inositoles fosfato. A continuación, las células fueron incubadas con los distintos compuestos durante 20 minutos y a 37 °C, tiempo tras el cual se retiró el medio en el que estaban disueltos los fármacos y se añadió un buffer que provocase la lisis celular. Primeramente, se probó ácido fórmico 100 mM para lisar las células. No obstante, tras comprobar ausencia de señal de AMPc, se dedujo que el ácido fórmico generaba su destrucción y descartamos su empleo en el método multiplex. Así, se decidió utilizar como medio de lisado de las células el buffer lisis incorporado en el kit de AMPc CISBIO, que definitivamente fue útil, ya que permitía no solo medir AMPc, sino también IPs, sin provocar la degradación o alterar los niveles de este último. Por tanto, tras retirar el medio con los compuestos, se añadió 100 µl/pocillo de buffer lisis y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 60 minutos. Seguidamente, se trasvasó una alícuota de 50 µl/pocillos de la placa de ensayo a una placa half área, a la que finalmente se le añadieron los trazadores d2 y Cryptate disueltos en buffer lisis, pudiendo realizarse la lectura del ratio de intensidad de emisión fluorescente 665/662 nm tras una hora de incubación.

Por otro lado, a los 50 µl/pocillo restantes de la placa de ensayo se les añadió ácido fórmico 133 mM, con el fin de reducir el pH del medio, consiguiendo así que los grupos fosfato de los IPs quedasen cargados negativamente. Por último, se transfirió una alícuota de 20 µl a una placa flexiplate, a la cual se añadieron seguidamente 80 µl de RNA SPA beads 1:16 por pocillo, cuya carga positiva provocaba la unión de IPs

cargados negativamente por la acción del ácido fórmico. La excitación del líquido de centelleo albergado en el interior de las SPA beads por efecto de la radiación de los ^3H -IPs permitió el conteo de estos últimos en el contador Microbeta Trilux (*Perkin Elmer*).

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de los ensayos de unión de radioligando, así como de los experimentos funcionales, fueron expresados como la media \pm eem. El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático IBM SPSS *Statistics Versión 23* (SPSS software Inc., Chicago, USA).

Las comparaciones entre la afinidad, potencia o eficiencia de 5-HT para activar el receptor de serotonina inducible 5-HT_{2A} ante distintas concentraciones y tiempos de exposición de las células al antibiótico inductor doxiciclina, se realizaron aplicando el test estadístico ANOVA de un factor. Adicionalmente, también se recurrió al test ANOVA de un factor para realizar una comparativa entre la afinidad de la dopamina y el haloperidol por el receptor de dopamina D₂ en presencia de diferentes concentraciones del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} DOI. En todos los casos, se fijó un nivel de significación de $p < 0.05$.

Sin embargo, en el estudio de la co-expresión de los receptores de dopamina D₂ y de serotonina 5-HT_{2A} y en la evaluación de la influencia de la heterodimerización D₂-5-HT_{2A} en la señalización de ambos receptores activados por sus respectivos agonistas o antagonizados por antipsicóticos típicos y atípicos, se empleó el test estadístico t de *Student*, ya que éste es el adecuado para comparar únicamente dos grupos de muestras. En general, se fijó un nivel de significación de $p < 0.05$, de modo que cuando se estableció un nivel de significación distinto, se hizo constar en el texto.

VIII. REACTIVOS UTILIZADOS

A continuación, se detallan las casas comerciales que suministraron los reactivos utilizados en la preparación de los distintos tampones de ensayo, así como de los reactivos farmacológicos empleados en los ensayos de unión de radioligando y en los experimentos funcionales.

A) REACTIVOS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE TAMPONES

Los reactivos BSA (albúmina de suero bovino), doxiciclina, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), HEPES (ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperacil-etanosulfónico), KCl, LiCl, MgCl₂, NaH₂PO₄, Tritón X-100 y Trizma base fueron suministrados por *Sigma Aldrich*.

Los reactivos NaCl y KH₂PO₄ fueron proporcionados por *Panreac*.

B) REACTIVOS FARMACOLÓGICOS EMPLEADOS EN LOS ENSAYOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS Y EN LOS EXPERIMENTOS FUNCIONALES

Los reactivos farmacológicos clorpromazina, clozapina, DOI (2,5-dimetoxi-yodo-anfetamina), dopamina, haloperidol, ketanserina, risperidona, serotonina y sulpirida fueron suministrados por *Sigma Aldrich*.

El reactivo farmacológico aripiprazol fue aportado por Santa Cruz Biotech.

A partir de estos reactivos, se preparó una solución stock de 1 mM con DMSO (Dimetil sulfóxido) (*Sigma Aldrich*).



RESULTADOS



CREACIÓN DE UNA HERRAMIENTA DIMÉRICA 5-HT_{2A}-D₂

I. CONDICIONES DE INDUCCIÓN CON DOXICICLINA DEL RECEPTOR 5-HT_{2A}, EN LA LÍNEA HEK293 FLP-IN T-REX QUE EXPRESA EL RECEPTOR D₂.

El objetivo de los ensayos de microscopía de fluorescencia ha sido establecer las condiciones óptimas de inducción del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, mediante la exposición de la línea celular HEK293 doble estable transfectada con vectores que contienen los genes del receptor de dopamina D₂ y de serotonina 5-HT_{2A} a diferentes concentraciones (10, 30, 60 y 100 ng/ml) y tiempos (24, 48 y 72 horas) del antibiótico inductor doxiciclina. El marcaje del receptor constitutivo de dopamina D₂ por la proteína fluorescente amarilla (YFP) y del receptor de serotonina inducible por doxiciclina 5-HT_{2A} por la proteína fluorescente cerulean (CFP), permitió la visualización de ambos receptores mediante microscopía de fluorescencia.

1. La exposición de la línea celular HEK293 doble estable a 10 ng/ml de doxiciclina indujo la expresión del receptor 5-HT_{2A}-CFP.

Se observó una expresión constante e independiente de la concentración de doxiciclina (10, 30, 60 y 100 ng/ml) del receptor CFP-5HT_{2A} (Figura 22). Dado que mayores niveles de doxiciclina no mejoraban la expresión del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, se seleccionó la concentración mínima de antibiótico que indujo la expresión del receptor (10 ng/ml).

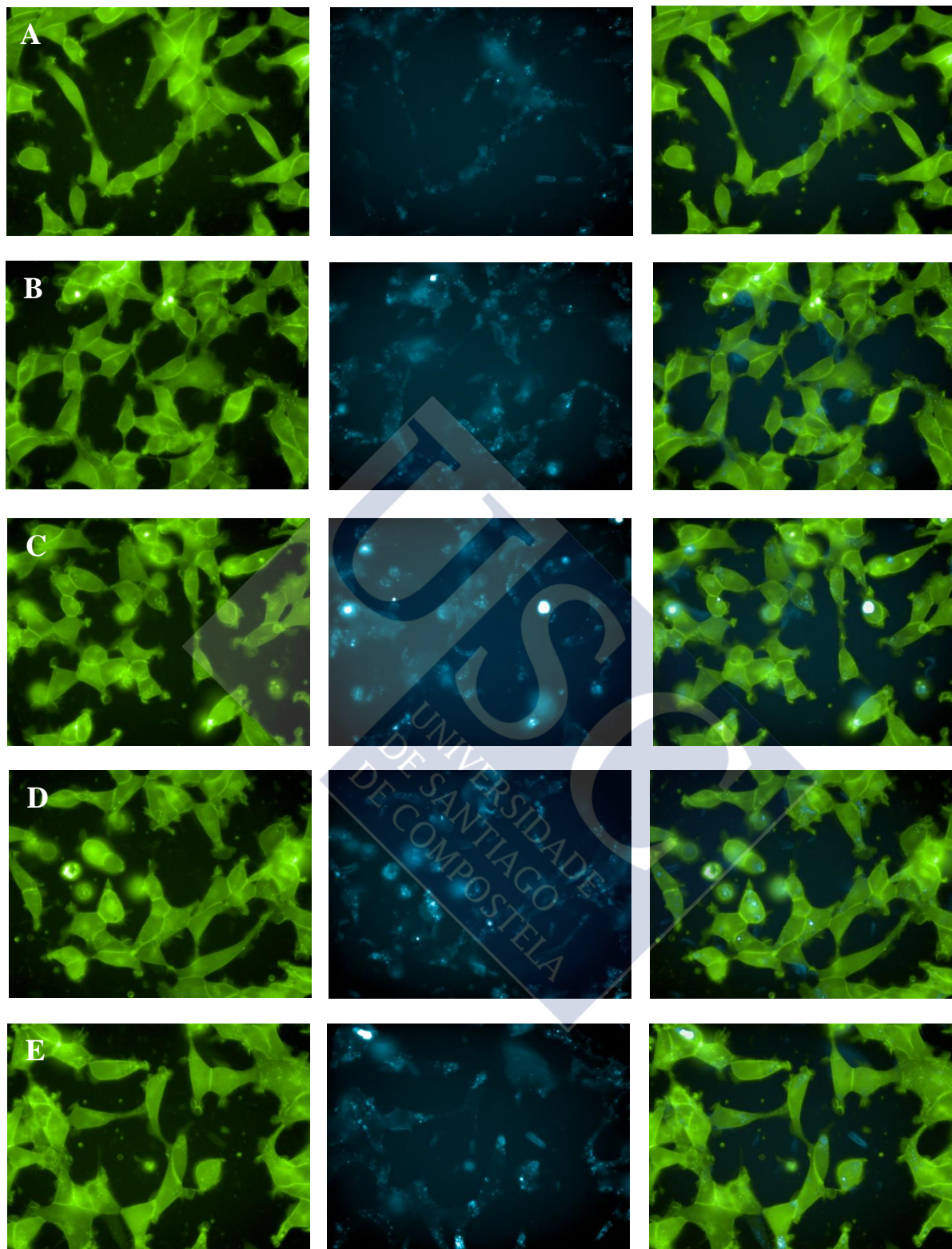


Figura 22. Influencia de distintas concentraciones de doxiciclina sobre la expresión del receptor de serotonina 5-HT_{2A}: A) sin doxiciclina, B) 10 ng/ml, C) 30 ng/ml y D) 60 ng/ml y E) 100 ng/ml de doxiciclina. Se muestran imágenes representativas de un campo de pocillos de placas de 384 pocillos: D₂R-YFP (izquierda), 5-HT_{2A}R-CFP (centro) y expresión de ambos receptores (derecha).

2. El tiempo óptimo de exposición a doxiciclina para la expresión del receptor 5-HT_{2A} fue de 24 horas.

Mediante el análisis de microscopía de fluorescencia del receptor 5-HT_{2A}-CFP, se estableció que el tiempo óptimo de tratamiento con doxiciclina fueron 24 horas, pues una exposición más prolongada no mejoró la expresión del receptor (Figura 23).

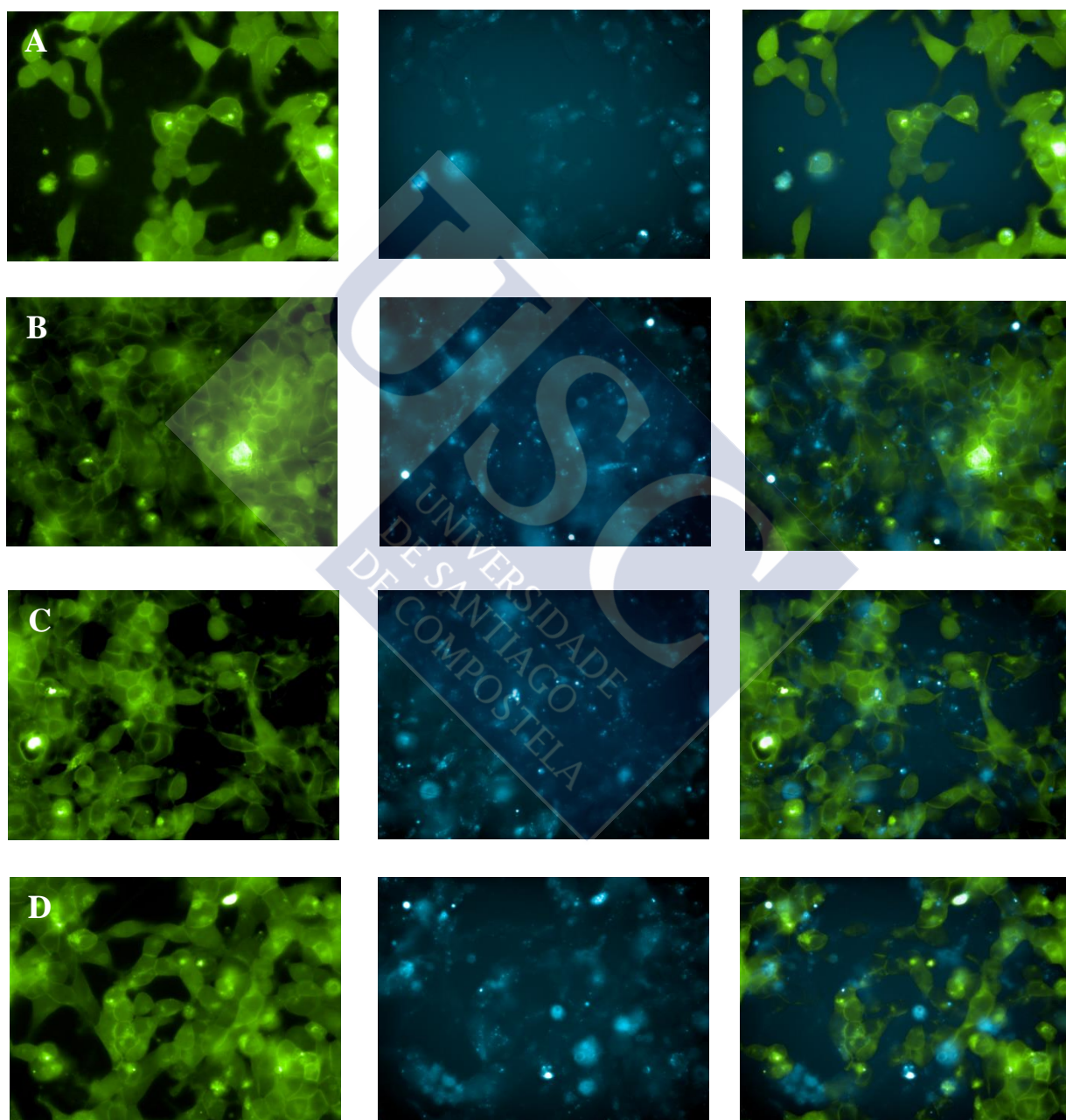


Figura 23. Influencia de distintos tiempos de exposición a doxiciclina 10 ng/ml sobre la expresión del receptor de serotonina 5-HT_{2A}: A) sin doxiciclina, B) 24 horas, C) 48 horas y D) 72 horas. Se muestran imágenes representativas de un campo de pocillos de placas de 384 pocillos: D₂R-YFP (izquierda), 5-HT_{2A}R-CFP (centro) y expresión de ambos receptores (derecha).

II) EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES D₂ CONSTITUTIVO Y 5-HT_{2A} INDUCIBLE POR DOXICICLINA, EN LA LÍNEA DE TRABAJO HEK293

Con el objetivo de confirmar la expresión de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en membranas obtenidas de células tratadas y sin tratar con doxiciclina (10 ng/ml durante 24 horas), se realizaron experimentos de unión de radioligandos que incluyen linealidades de proteína, ensayos de saturación y de competición.

1. Los ensayos de *binding* demostraron la expresión del receptor constitutivo D₂.

La caracterización del receptor de dopamina D₂ se ha realizado mediante estudios de *binding* (linealidad de proteína, saturación y competición de compuestos de referencia), con el fin de establecer la presencia del mismo en membranas obtenidas de células tratadas y sin tratar con doxiciclina. Para ello, se ha utilizado el radioligando [³H]-espiperona, que tiene una elevada afinidad por los receptores de dopamina.

◆ Ensayos de linealidad de proteína

Se observó un incremento lineal de la señal específica de [³H]-espiperona a mayores concentraciones de proteína. Así, 10 µg de membrana por punto permitieron obtener una ventana de trabajo adecuada en los ensayos de unión de radioligandos en ausencia y presencia del receptor 5-HT_{2A} (Figura 24).

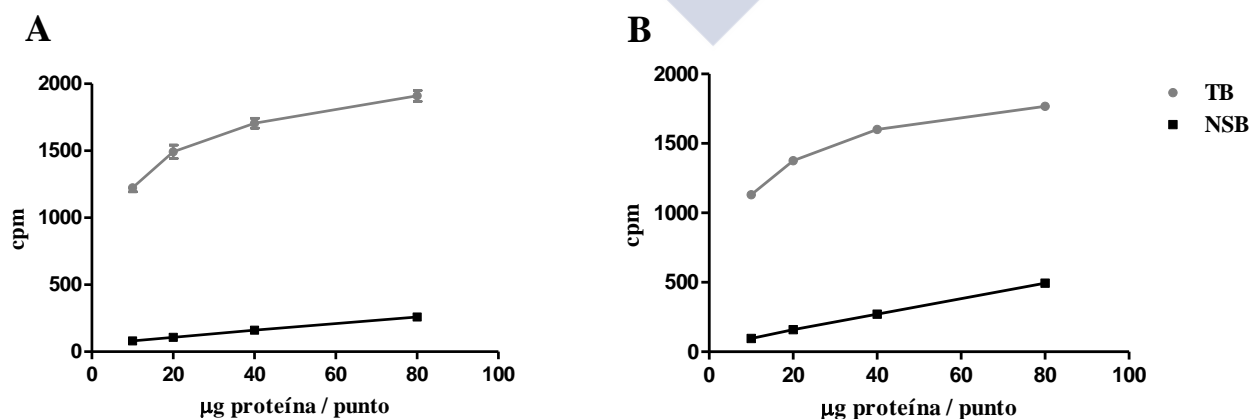


Figura 24. Linealidad de proteína para el receptor de dopamina D₂ en membranas obtenidas de células sin tratar (A) y tratadas (B) con doxiciclina.

◆ Ensayos de saturación

Los ensayos de saturación se realizaron con el objetivo de conocer el nivel de expresión del receptor de dopamina D₂, así como la afinidad de [³H]-espiperona por el mismo, pudiendo establecer la cantidad óptima de radioligando a utilizar en experimentos posteriores. De esta manera, se observó que el valor de K_D de [³H]-espiperona por el receptor D₂ en membranas obtenidas de la línea celular HEK293 empleada en el presente trabajo (Figura 25, Tabla 10) fue cercano al obtenido en la bibliografía científica (0.06 nM (Bunzow y cols., 1988; Hoare y cols., 2000; Zhen y cols., 2010)). Asimismo, se determinó que la concentración de [³H]-espiperona conveniente a utilizar en los ensayos consecutivos de competición fue 0.2 nM, esto es, una cantidad de radioligando aproximada a la constante de disociación en el equilibrio (K_D).

Por otro lado, los ensayos de saturación determinaron que la coexpresión del receptor de serotonina 5-HT_{2A} no afectó a los parámetros de unión (B_{max} y K_D) del radioligando [³H]-espiperona al receptor D₂, pues no hubo diferencias entre ellos cuando se compararon los resultados en membranas obtenidas de células tratadas y sin tratar con doxiciclina.

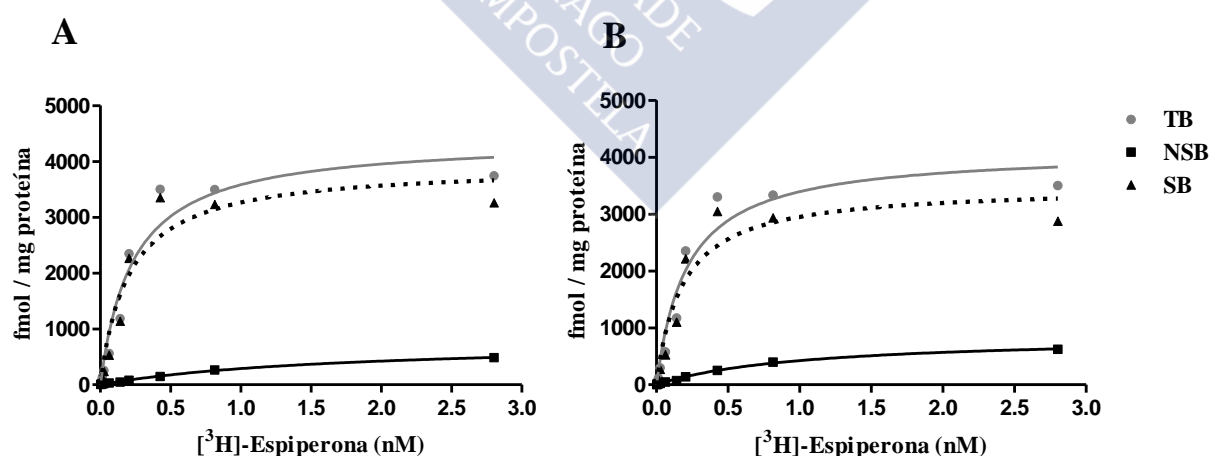


Figura 25. Ensayos de saturación del receptor de dopamina D₂ por el radioligando [³H]-espiperona en membranas obtenidas de células sin tratar (A) y tratadas (B) con doxiciclina. Se muestra la representación gráfica de un ensayo realizado con puntos por triplicado.

Tabla 10. Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-espiperona al receptor de dopamina D_2 , en membranas obtenidas de células sin tratar y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestran los resultados sustraídos de un experimento realizado con puntos por triplicado.

	-DOX	+DOX
B_{max} (fmol/mg proteína)	3928	3486
K_D (nM)	0.22	0.18

◆ Ensayos de competición

En los ensayos de competición, se observó que los compuestos de referencia utilizados (el agonista dopamina, y los antipsicóticos típico haloperidol y atípico risperidona) mostraron una afinidad por el receptor de dopamina D_2 determinada por el valor K_i (Figura 26, Tabla 11) similar a la registrada en otras líneas celulares (dopamina: 63.1-31622 nM (Sautel y cols., 1995; Burris y cols., 1995); haloperidol: 1.6-39.8 nM (Freedman y cols., 1994; Mierau y cols., 1995); risperidona: 0.3-6.4 nM (Seeman y cols., 1997; Fernández y cols., 2005)).

Por otro lado, se estableció que la presencia del receptor de serotonina 5-HT_{2A} no afectó a la afinidad de los compuestos por el receptor de dopamina D_2 , de tal manera que no hubo diferencias significativas en sus valores de K_i en función de la coexpresión del receptor 5-HT_{2A}.

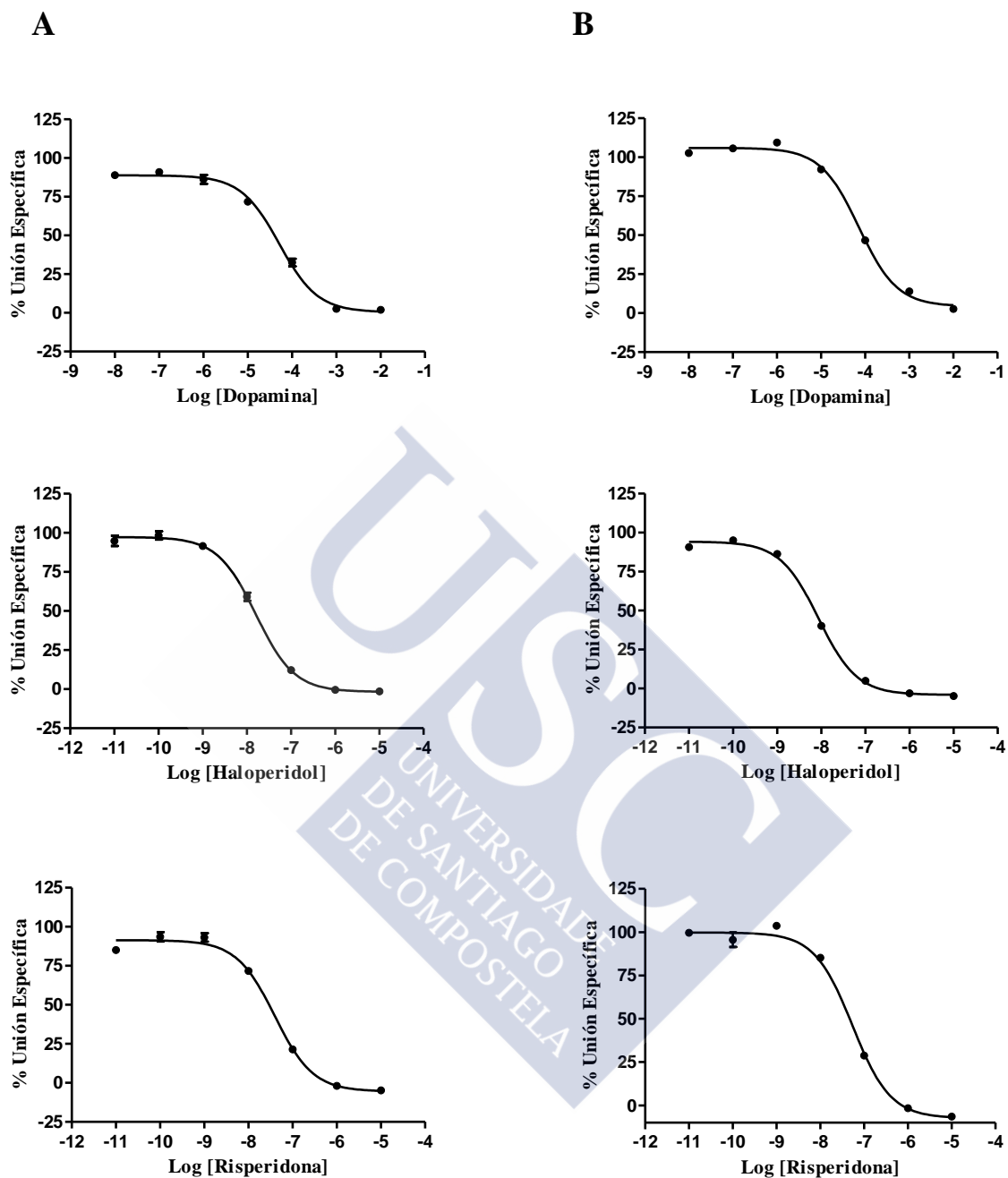


Figura 26. Curvas de competición del agonista dopamina y los antipsicóticos haloperidol y risperidona con el radioligando [^3H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D_2 , en membranas obtenidas de células sin tratar (A) y tratadas (B) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes ($n=3$) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 11. Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de dopamina D_2 de diferentes compuestos estándares (dopamina, haloperidol y risperidona), en membranas obtenidas de células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTOS	-DOX		+DOX	
	K_i (nM)	pK_i	K_i (nM)	pK_i
Dopamina	22940 \pm 6215	4.6 \pm 0.1	28840 \pm 3720	4.5 \pm 0.1
Haloperidol	7.5 \pm 2.5	8.1 \pm 0.1	4.0 \pm 0.0	8.4 \pm 0.0
Risperidona	15.2 \pm 6.1	7.8 \pm 0.2	20.2 \pm 2.8	7.7 \pm 0.1

2. Los ensayos de unión de radioligandos confirmaron la expresión del receptor 5-HT_{2A} en membranas obtenidas de células HEK293 previamente expuestas a doxiciclina.

Con la finalidad de estudiar la expresión del receptor de serotonina 5-HT_{2A} y determinar su presencia exclusivamente en membranas obtenidas de células HEK293 previamente tratadas con doxiciclina, se han realizado ensayos de *binding* (linealidad de proteína, saturación y competición de compuestos estándares), en los que se ha utilizado como radioligando [³H]-ketanserina, siendo el compuesto unido al tritio un antagonista altamente selectivo por el receptor 5-HT_{2A}.

◆ Ensayos de linealidad de proteína

Se observó un aumento lineal de la unión específica del radioligando [³H]-ketanserina al receptor de serotonina 5-HT_{2A} a mayores concentraciones de proteína, habiéndose establecido que la cantidad de proteína a la cual se obtiene una ventana de trabajo adecuada fue 80 μ g de membrana por punto (Figura 27).

Por otro lado, también se determinó la ausencia de expresión del receptor de serotonina 5-HT_{2A} en membranas obtenidas de células no tratadas previamente con doxiciclina.

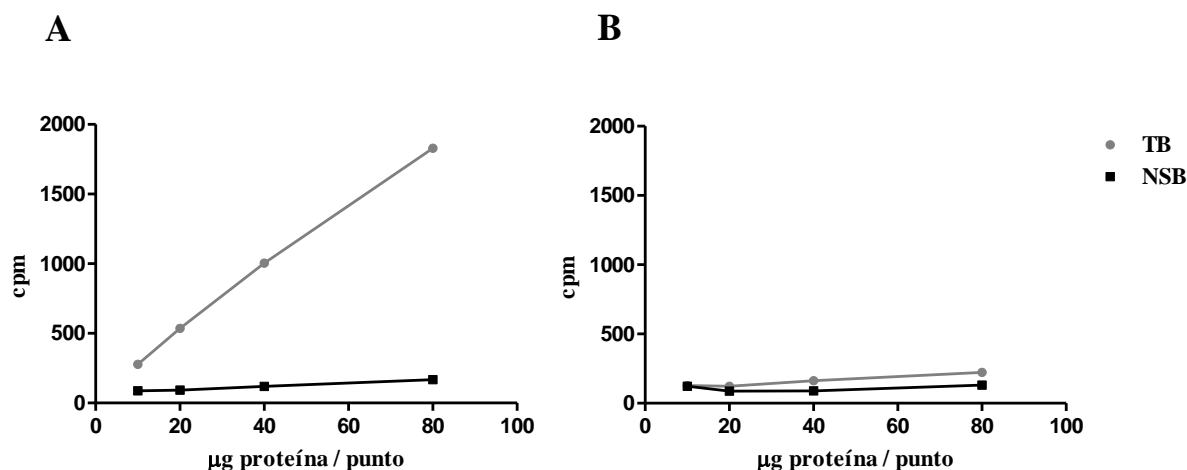


Figura 27. Linealidad de proteína para el receptor de serotonina 5-HT_{2A}, en membranas obtenidas de células tratadas (A) y sin tratar (B) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas.

◆ **Ensayos de saturación**

Los ensayos de saturación se llevaron a cabo con el propósito de conocer el nivel de expresión del receptor de serotonina 5-HT_{2A} y la afinidad de [³H]-ketanserina por el mismo, lo que permitió determinar la cantidad de radioligando a utilizar en ensayos posteriores. Así, se observó que el nivel de expresión del receptor 5-HT_{2A} fue menor que el del receptor D₂, ya que la unión máxima (B_{max}) de [³H]-ketanserina al primero (Figura 28, Tabla 12) fue inferior a la de [³H]-espiperona al receptor D₂. Por otro lado, se estableció que la cantidad de [³H]-ketanserina a utilizar en experimentos de competición posteriores fue 0.3 nM, es decir, su valor de K_D por la unión al receptor 5-HT_{2A}. Por otro lado, se observó que la coexpresión del receptor de dopamina D₂ no moduló la afinidad del radioligando [³H]-ketanserina por el receptor 5-HT_{2A} en la línea HEK293 empleada en el presente trabajo, mostrando un valor de K_D similar al definido en otras líneas celulares donde el receptor 5-HT_{2A} se expresa solo (0.2-2.9 nM (Rashid y cols., 2003; Knight y cols., 2004)).

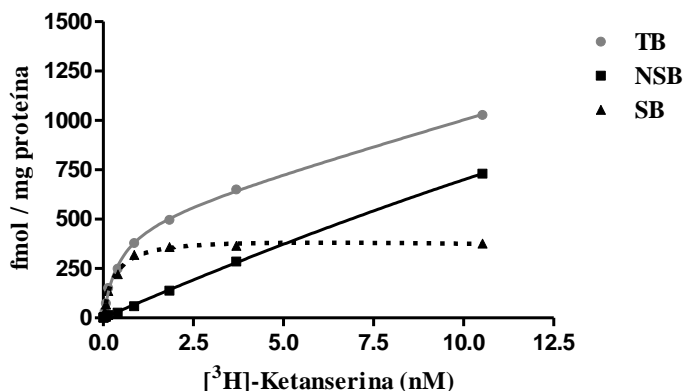


Figura 28. Ensayo de saturación del receptor de serotonina 5-HT_{2A} por el radioligando [³H]-ketanserina, en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la representación gráfica de un ensayo realizado con puntos por triplicado.

Tabla 12. Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [³H]-ketanserina al receptor de serotonina 5-HT_{2A}, en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestran los resultados sustraídos de un experimento realizado con puntos por triplicado.

	+DOX
B_{max} (fmol/mg proteína)	429.8
K_D (nM)	0.3

◆ Ensayos de competición

En base a los resultados obtenidos de los ensayos de competición realizados en membranas procedentes de células HEK293 previamente tratadas con doxiciclina, se determinó que los distintos compuestos de referencia empleados (el agonista 5-HT y los antipsicóticos típico haloperidol y atípico risperidona) mostraron unos valores de K_i (Figura 29, Tabla 13) consistentes con la bibliografía existente (5-HT: 7-42 nM (K_i alta) – 2622-200000 (K_i baja) (Roth y cols., 1987; Roth y cols., 1997); haloperidol: 25-130 nM (Seeman y cols., 1997; Campiani y cols., 2004); risperidona: 0.1-0.5 nM (Seeman y cols., 1997; Davies y cols., 2004)).

Por otro lado, se observó que la presencia del receptor de dopamina D₂ no alteró la afinidad de dichos compuestos por el receptor de serotonina 5-HT_{2A}, pues sus valores de K_i no difirieron de los establecidos en líneas donde el receptor 5-HT_{2A} se expresa solo (indicados en el párrafo anterior).

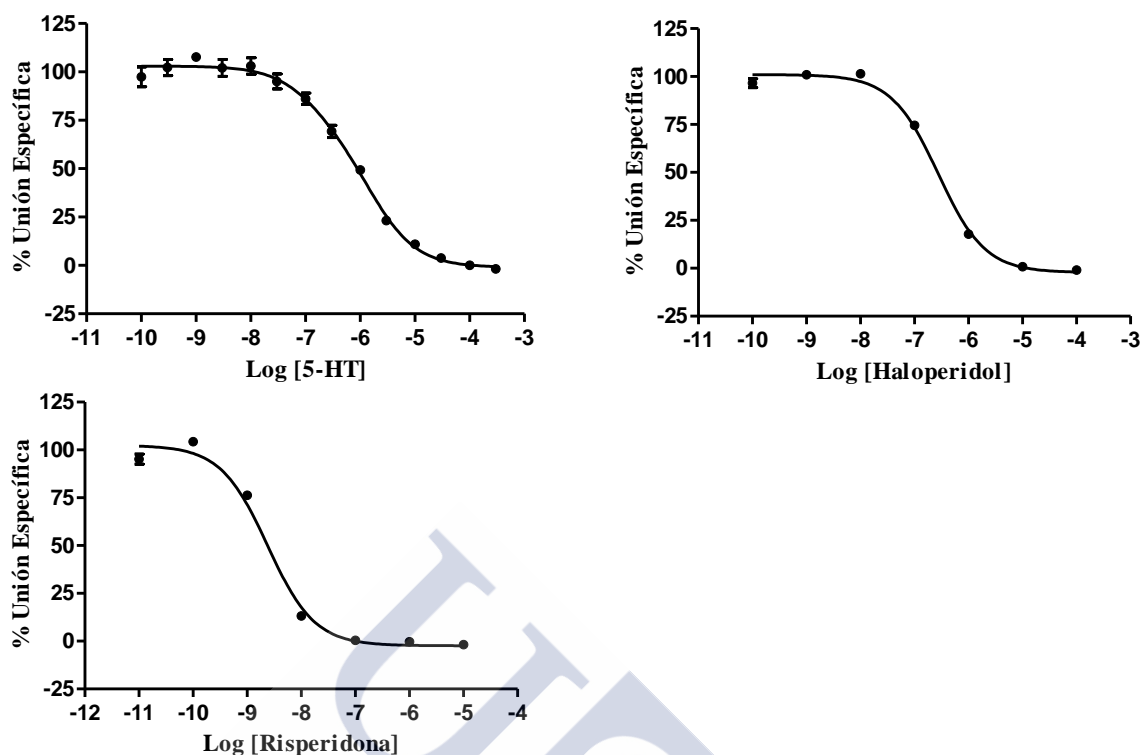


Figura 29. Curvas de competición del agonista 5-HT y los antipsicóticos haloperidol y risperidona con el radioligando [3 H]-ketanserina por la unión al receptor de serotonina 5-HT_{2A}, en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes (n=1-3) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 13. Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de serotonina 5-HT_{2A} de diferentes compuestos estándares (5-HT, haloperidol y risperidona), en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTOS	+DOX			
	K_i alta(nM)	K_i baja(nM)	p <i>K_i</i> alta	p <i>K_i</i> baja
5-HT	55.8	622.0	7.2	6.2
	K_i (nM)		p <i>K_i</i>	
Haloperidol	97.1 \pm 26.0		7.0 \pm 0.1	
Risperidona	0.8 \pm 0.4		9.1 \pm 0.2	

Una vez confirmada la presencia del receptor de dopamina D_2 y del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ inducible por doxiciclina en la membrana celular, se ha procedido al estudio de la funcionalidad de ambos receptores, mediante la medida de segundos mensajeros regulados por sus principales vías de señalización asociadas (AMPC e IPs, respectivamente).

3. El receptor D_2 constitutivo reguló los niveles de AMPC en el interior celular vía proteína $G_{i/o}$.

Como se ha explicado con anterioridad en la introducción, el receptor de dopamina D_2 está acoplado a la proteína $G_{i/o}$, que al ser activada inhibe a la AC, lo que deriva en una disminución de los niveles de AMPC (Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Por ello, los estudios de funcionalidad del receptor D_2 se han realizado mediante la medición del segundo mensajero AMPC utilizando como herramienta metodológica la técnica de HTRF y como compuestos de referencia para su activación o inhibición el agonista endógeno dopamina y los antagonistas antipsicóticos típico (haloperidol) y atípico (risperidona), respectivamente.

En base a los resultados derivados de los ensayos funcionales de AMPC, se observó que la potencia (EC_{50} para dopamina; K_B para haloperidol y risperidona) de los distintos compuestos de referencia para modular el receptor de dopamina D_2 (Figura 30, Tabla 14) se correspondió con la registrada en otras líneas celulares (dopamina: 0.6-470 nM (Möller y cols., 2014; van Wieringen y cols., 2014); haloperidol: 0.2 nM (Masri y cols., 2008); risperidona: 1.08 nM (Masri y cols., 2008)). Adicionalmente, el análisis estadístico realizado por el test t de *Student* determinó que la coexpresión del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ no modificó significativamente la potencia de dichos compuestos para activar o inhibir el receptor de dopamina D_2 .

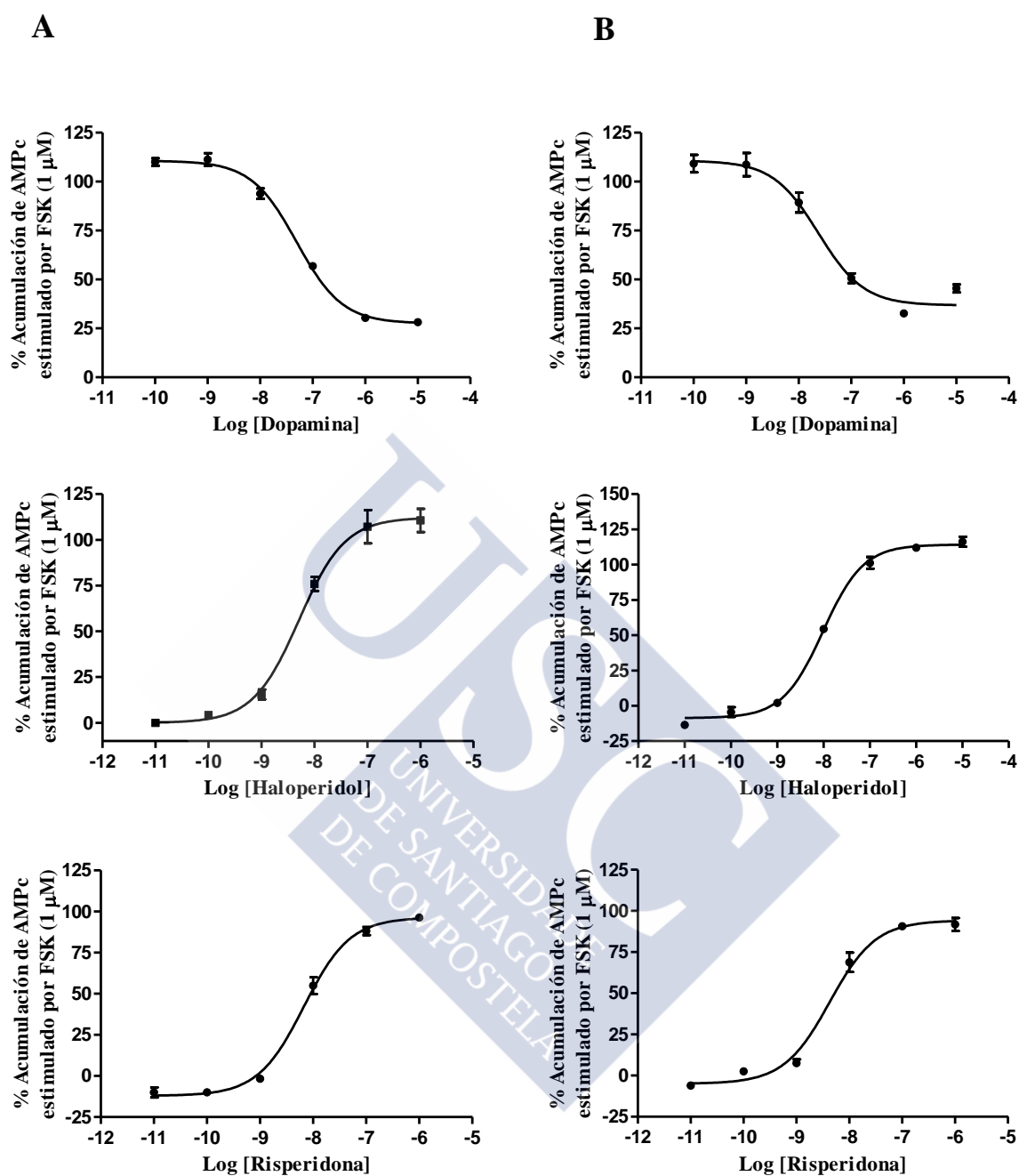


Figura 30. Curvas concentración-respuesta del agonista dopamina y, en presencia de dopamina 1 μ M, de los antagonistas antipsicóticos típico haloperidol y atípico risperidona, sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 , en células sin tratar (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas (B). Se muestra un experimento representativo de un total de tres ($n=3$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 14. Potencia del agonista dopamina (EC_{50}), y de los antipsicóticos típico haloperidol y atípico risperidona (IC_{50} y K_B) en presencia de dopamina $1\mu M$, para inhibir y activar, respectivamente, la producción de AMPc estimulada por FSK $1\mu M$ dependiente de proteína $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 , en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

	-DOX			+DOX		
COMPUESTOS	EC_{50} (nM)	pEC_{50}		EC_{50} (nM)	pEC_{50}	
Dopamina	53.6 ± 5.4	7.3 ± 0.0		33.5 ± 16.4	7.5 ± 0.2	
	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	K_B (nM)	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	K_B (nM)
Haloperidol	5.4 ± 0.3	8.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	8.5 ± 1.6	8.1 ± 0.1	0.3 ± 0.05
Risperidona	6.1 ± 0.6	8.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	5.4 ± 1.2	8.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0

4. Los ensayos funcionales de IPs demostraron el funcionamiento del receptor $5-HT_{2A}$ inducible en células previamente expuestas a 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas, así como la ausencia de movilización de IPs en células no tratadas.

Como se ha mencionado con anterioridad en la introducción, el receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ está acoplado a la proteína G_q , por lo que su activación implica la inducción de la PLC, y en consecuencia un aumento de los niveles de IPs, DAG y Ca^{+2} (Hannon y Hoyer, 2007). Se ha decidido estudiar la funcionalidad del receptor $5-HT_{2A}$ mediante ensayos de medida de los niveles de IPs marcados con 3H , explicados previamente en el apartado de material y métodos. El objetivo de estos experimentos ha sido optimizar la expresión del receptor $5-HT_{2A}$ mediante su inducción por distintas concentraciones de doxiciclina ($10, 30, 60$ y 100 ng/ml), así como por la exposición a la misma durante diferentes tiempos ($24, 48$ y 72 horas).

Los resultados establecieron que la funcionalidad óptima del receptor $5-HT_{2A}$ tuvo lugar tras la exposición de las células a 10 ng/ml de doxiciclina durante un periodo de 24 horas (Figura 31, Tabla 15). El análisis estadístico mediante ANOVA determinó

una ausencia de diferencias significativas en la potencia y eficacia del agonista 5-HT a mayores concentraciones de doxiciclina, así como a mayor tiempo de exposición a la misma. Por otro lado, los resultados confirmaron la ausencia de formación de IPs cuando la línea celular no fue previamente expuesta a doxiciclina.

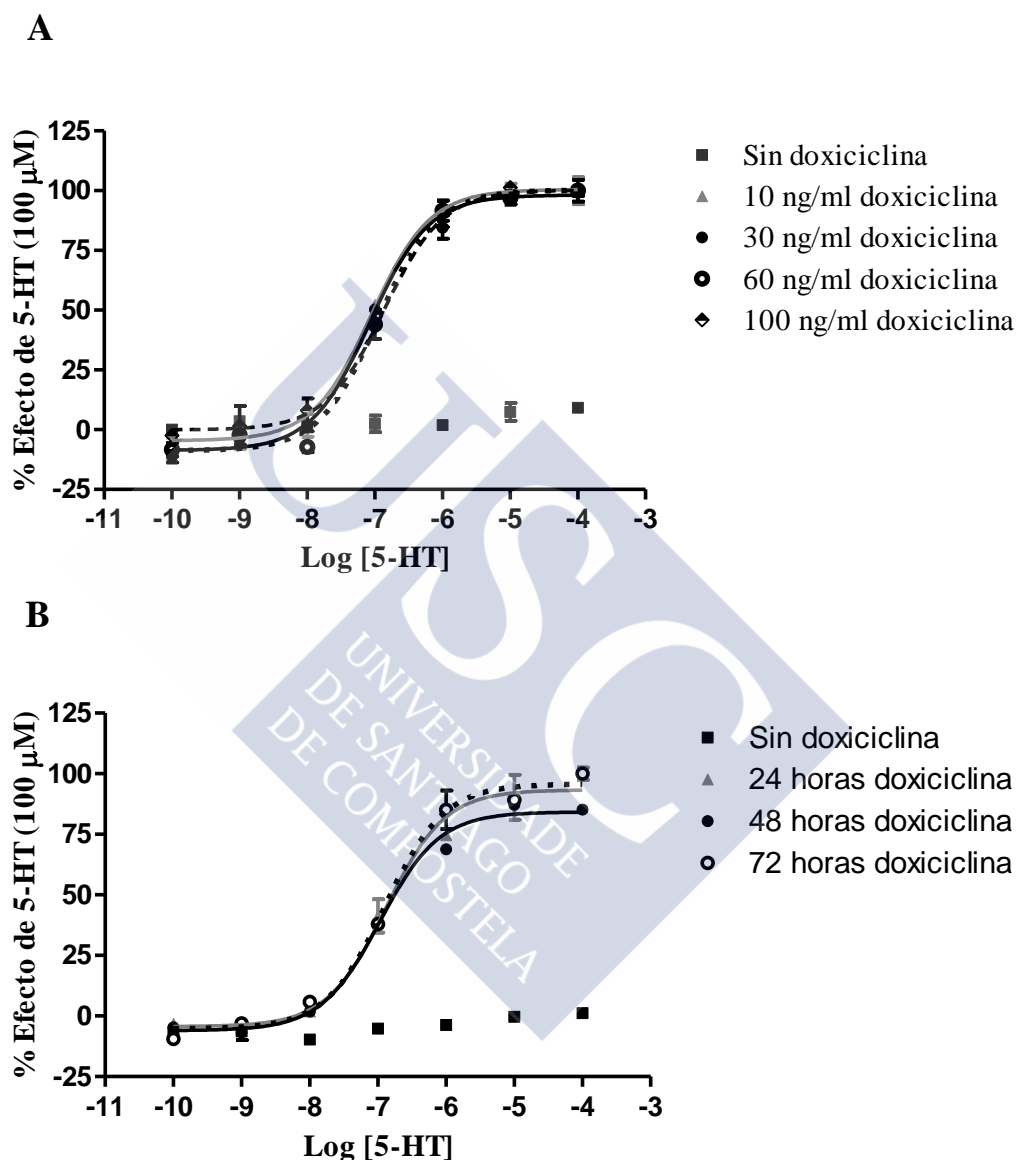


Figura 31. Curvas concentración-respuesta del agonista 5-HT en la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor de serotonina 5-HT_{2A} , en células tratadas con diferentes concentraciones de doxiciclina (A) y diferentes tiempos de exposición a la misma (B). Se muestra un experimento representativo de un total de dos ($n=2$) ensayos independientes realizados por puntos por duplicado.

Tabla 15. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista 5-HT para activar la producción de IPs dependiente del receptor 5-HT_{2A}, en células previamente tratadas con diferentes concentraciones de doxiciclina y distintos tiempos de exposición a la misma. Se muestra la media \pm eem de un total de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

		EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)
Diferentes concentraciones de doxiciclina	10 ng/ml	116 \pm 38.8	6.9 \pm 0.1	105 \pm 6.7
	30 ng/ml	109 \pm 34.1	7.0 \pm 0.1	98.1 \pm 0.2
	60 ng/ml	110 \pm 2.7	7.0 \pm 0.0	95.2 \pm 7.1
	100 ng/ml	117 \pm 28.7	6.9 \pm 0.1	98.6 \pm 2.2
Diferentes tiempos de doxiciclina	24 horas	101 \pm 42.5	7.0 \pm 0.2	96.2 \pm 4.0
	48 horas	127 \pm 27.5	6.9 \pm 0.1	88.2 \pm 6.2
	72 horas	97.1 \pm 42.5	7.03 \pm 0.2	98.8 \pm 4.3

Los resultados derivados de ensayos funcionales de IPs en los que se realizaron curvas dosis-respuesta de varios compuestos de referencia (agonista endógeno 5-HT y antagonistas antipsicóticos atípicos clozapina y risperidona) determinaron la funcionalidad del receptor de serotonina 5-HT_{2A} en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas (Figura 32, Tabla 16). Asimismo, se observó que la potencia de dichos compuestos (EC_{50} para 5-HT y IC_{50} para clozapina y risperidona) para modular el receptor 5-HT_{2A} no fue alterada por la coexpresión del receptor D₂, al ser cercana a la obtenida en líneas celulares en las que el receptor 5-HT_{2A} se expresa solo (5-HT: 1.5-125 nM (Smith y cols., 2008; Arunotayanun y cols., 2013); clozapina: 89 nM (Brea y cols., 2009); risperidona: 9 nM (Brea y cols., 2009)).

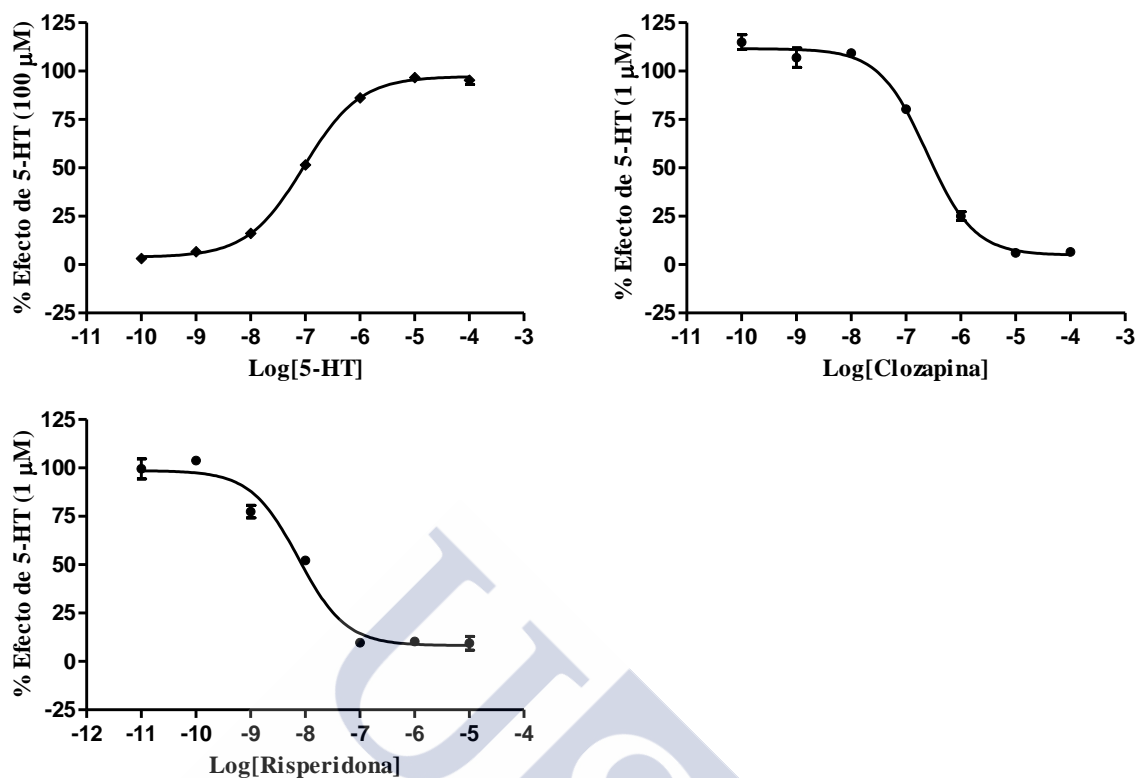


Figura 32. Curvas concentración-respuesta del agonista 5-HT y, en presencia de 5-HT 1 μ M, de los antipsicóticos atípicos clozapina y risperidona, en la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A}, en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ($n=3$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 16. Potencia del agonista 5-HT (EC_{50}), y de los antipsicóticos atípicos clozapina y risperidona (IC_{50} y K_B) en presencia de 5-HT 1 μ M, para activar y bloquear, respectivamente, la producción de IPs dependiente de la vía G_q del receptor 5-HT_{2A}, en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS	+DOX		
	EC_{50} (nM)	pEC_{50}	
5-HT	105 \pm 14.82	6.98 \pm 0.06	
	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	K_B (nM)
Clozapina	195 \pm 29.9	6.7 \pm 0.1	18.5 \pm 2.8
Risperidona	3.7 \pm 2.2	8.5 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1

III) CARACTERIZACIÓN DE INTERFERENCIAS EN LA SEÑALIZACIÓN DEL HETERODÍMERO D₂-5-HT_{2A}, EN LA LÍNEA DE TRABAJO HEK293

1. Los ensayos funcionales de AMPc indicaron la existencia de un receptor endógeno acoplado a proteína G_s.

La detección de un incremento dosis-dependiente de AMPc por 5-HT y la reversión por clozapina del aumento de AMPc inducido por 5-HT 1 μ M, sugirió la existencia de un receptor endógeno acoplado a proteína G_s (Figura 33, Tabla 17).

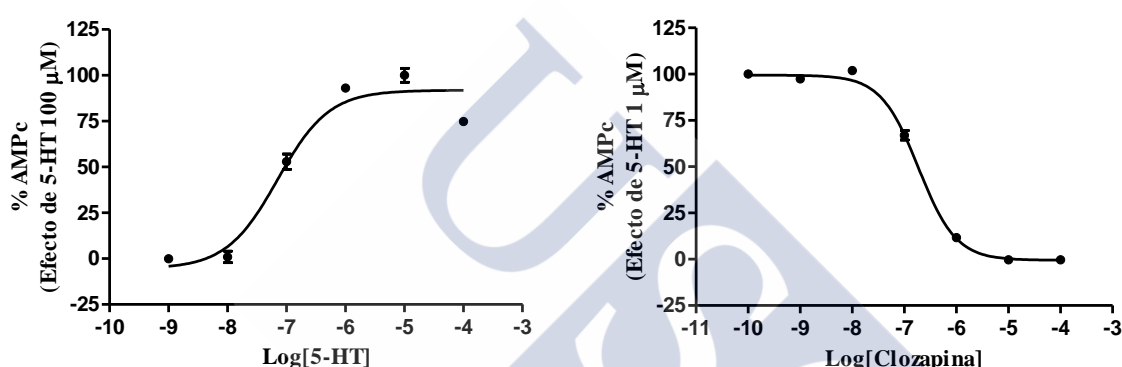


Figura 33. Curvas concentración-respuesta del agonista 5-HT y del antagonista atípico clozapina, en presencia de 5-HT 1 μ M, en la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μ M, en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=1-3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 17. Potencia del agonista 5-HT (EC_{50}), y del antagonista clozapina (K_B) en presencia de 5-HT 1 μ M, en la producción de AMPc dependiente de proteína G_s, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=1-3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS	+DOX	
	EC_{50} (nM)	p EC_{50}
5-HT	114 \pm 61.2	7.0 \pm 0.2
	K_B (nM)	
Clozapina	21.9	

Adicionalmente, se observó una producción de AMPc asociada a curvas dosis-respuesta de 5-HT, independientemente de la expresión del receptor de serotonina 5-HT_{2A} (Figura 34, Tabla 18). Por otro lado, el análisis estadístico realizado mediante el test t de *Student* no mostró diferencias significativas entre la potencia y eficacia de la serotonina para estimular la producción de AMPc en células tratadas y no tratadas con doxiciclina.

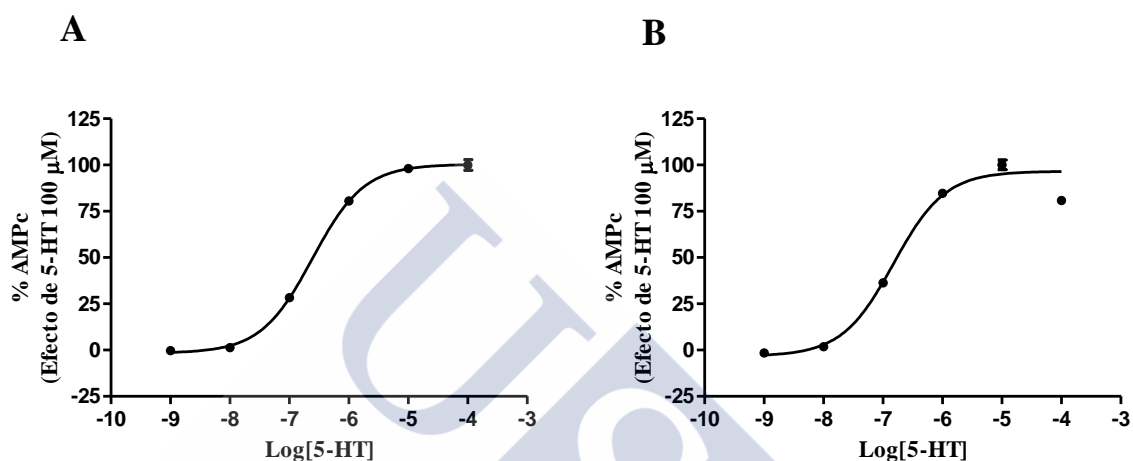


Figura 34. Curvas concentración-respuesta del agonista 5-HT en la producción de AMPc asociada a proteína G_s, en células sin tratar (A) y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas (B). Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 18. Potencia (EC₅₀) del agonista 5-HT, en la producción de AMPc dependiente de proteína G_s, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de dos (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

	-DOX		+DOX	
	EC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀	EC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀
5-HT	239 ± 22.8	6.6 ± 0.0	177 ± 43.8	6.8 ± 0.1

Por otro lado, se observó que el receptor de serotonina 5-HT_{2A} no moduló la vía de señalización dependiente de proteína G_s, al no haberse detectado ninguna señal de regulación de los niveles de AMPc, tras la realización de curvas dosis-respuesta de varios antagonistas de referencia (haloperidol, ketanserina y espiperona), en presencia 5-HT 1 μM (Figura 35).

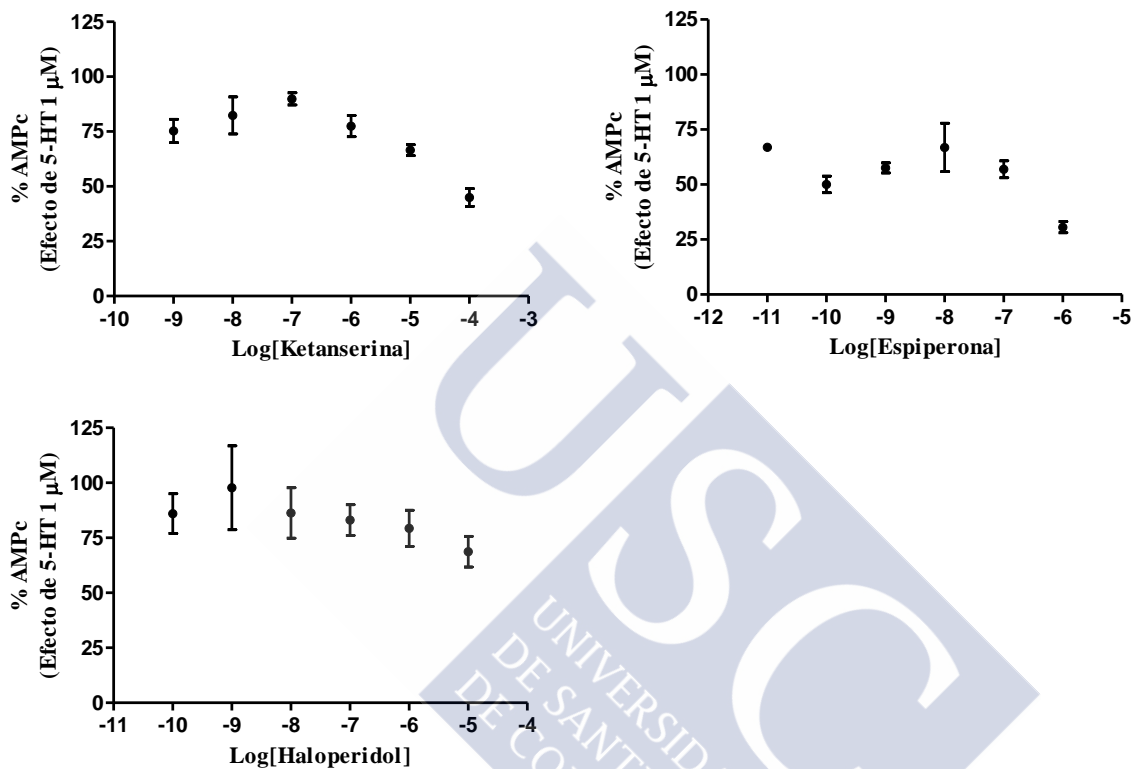


Figura 35. Curvas concentración-respuesta de antagonistas del receptor 5-HT_{2A} ketanserina, espiperona y haloperidol, en presencia de 5-HT 1 μM, en la producción de AMPc, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=2) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

2. El bloqueo de la vía de señalización de AMPc dependiente de proteína G_s por SB-269970 sugirió la expresión endógena del receptor 5-HT₇.

En base a los resultados obtenidos de ensayos funcionales en los que se realizaron curvas dosis-respuesta de antagonistas selectivos de los tres receptores de serotonina acoplados a proteína G_s (SB-203186 para 5-HT₄R (Bach y cols., 2001), SB-271046A para 5-HT₆R (Bromidge y cols., 1999) y SB-269970 para 5-HT₇R (Hagan y cols., 2000)), en presencia de 5-HT 1 μM, se observó la reversión del

efecto de 5-HT por el ligando SB-269970, lo que sugirió la expresión endógena del receptor 5-HT₇ en la línea HEK293 utilizada en el presente trabajo (Figura 36, Tabla 19).

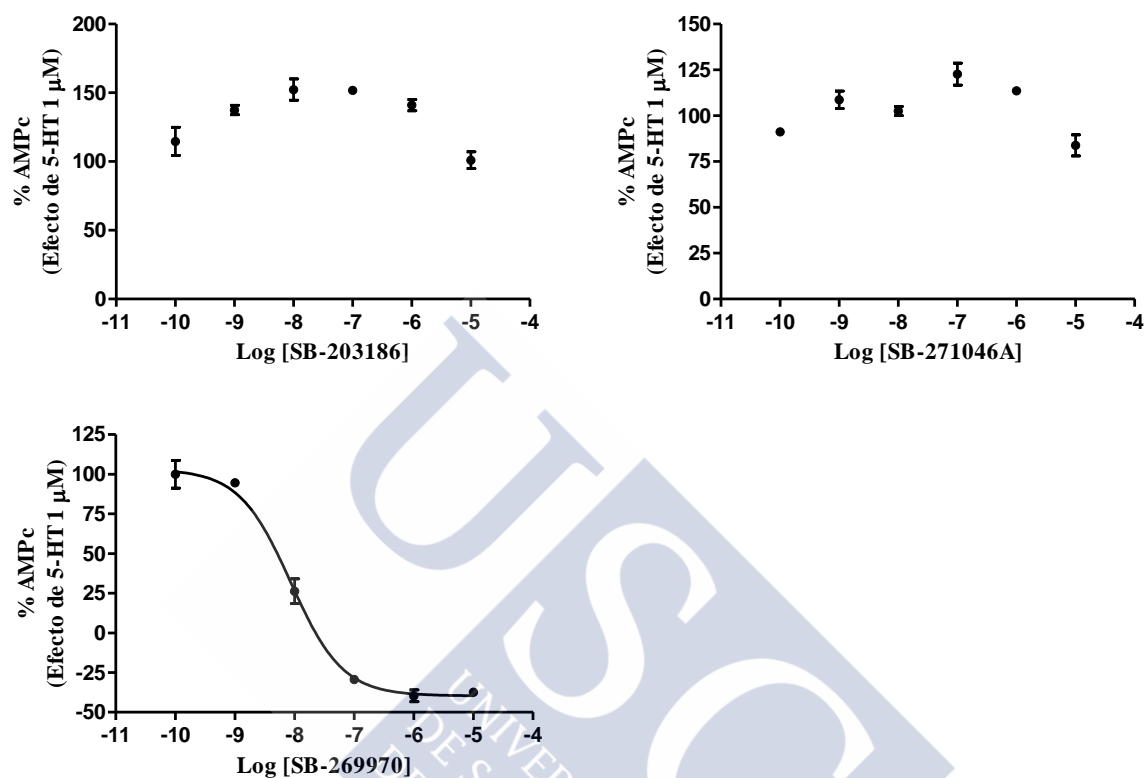


Figura 36. Curvas concentración-respuesta de SB-203186, SB-271046A y SB-269970, en presencia de 5-HT 1 μ M, en la producción de AMPc dependiente de G_s, en células no tratadas con doxiciclina. Se muestra la representación gráfica de un ensayo realizado con puntos por triplicado.

Tabla 19. Potencia (IC₅₀ y K_B) del antagonista SB-269970, en presencia de 5-HT 1 μ M, en la producción de AMPc dependiente de G_s del receptor 5-HT₇. Se muestra la representación gráfica de un ensayo realizado con puntos por triplicado.

COMPUESTOS	- DOX		
	IC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀	K _B (nM)
SB-203186	-	-	-
SB-271046A	-	-	-
SB-269970	8.7	8.1	1.67

3. SB-269970 mostró un comportamiento como antagonista competitivo del receptor 5-HT₇ en la línea celular HEK293.

Seguidamente a la confirmación de la expresión y funcionalidad del receptor de serotonina 5-HT₇ en la línea HEK293 empleada en el presente trabajo, se procedió al estudio del comportamiento de su antagonista selectivo SB-269970 en la vía de señalización dependiente de G_s estimulada por serotonina. De este modo, se emplearon diferentes concentraciones de SB-269970 (1, 0.1 y 0.01 μ M) en curvas dosis-respuesta del agonista 5-HT, habiéndose determinado que dicho compuesto constituye un ligando competitivo, ya que la recta originada en la representación de Schild tiene una pendiente cercana a 1, tanto en células no tratadas como tratadas con doxiciclina (Figura 37, Tabla 20). Por otro lado, no se observaron diferencias en los resultados obtenidos del estudio del comportamiento de SB-269970 en células que expresaban exclusivamente el receptor de dopamina D₂, con respecto a aquellas que lo coexpresaban con el receptor de serotonina 5-HT_{2A}.

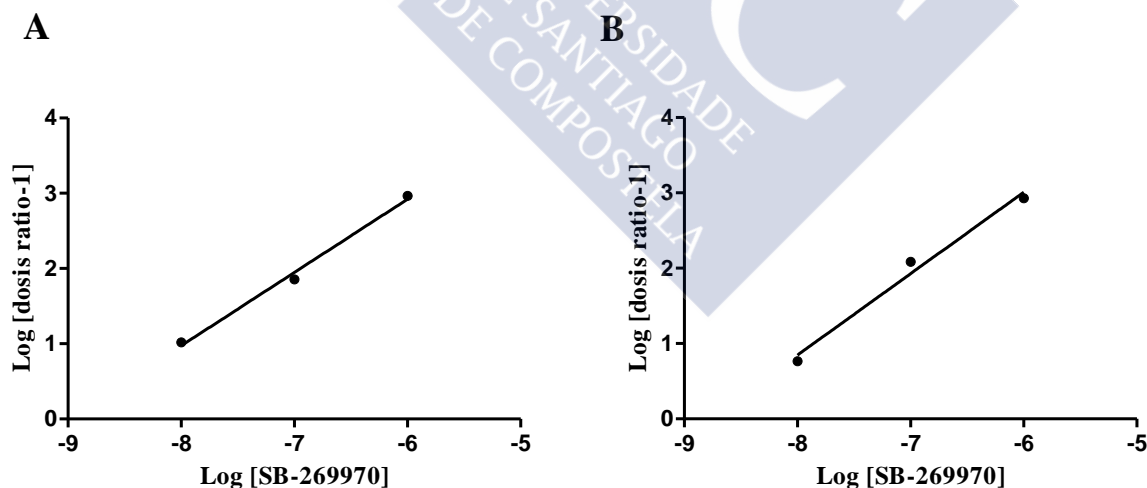


Figura 37. Representación de Schild para el compuesto SB-269970, antagonista del receptor de serotonina 5-HT₇.

Tabla 20. Parámetros de competitividad del compuesto SB-269970, en base a la ecuación de Schild.

-DOX		+DOX	
pA ₂	Pendiente	pA ₂	Pendiente
8.99	0.97 ± 0.08	8.78	1.08 ± 0.14

4. Los ensayos de unión de radioligandos en célula entera confirmaron la expresión endógena del receptor 5-HT₇.

Una vez comprobada la funcionalidad del receptor 5-HT₇ en la línea celular HEK293 utilizada en este trabajo, se confirmó su expresión en la membrana plasmática mediante ensayos de *binding* en célula entera (Figura 38).

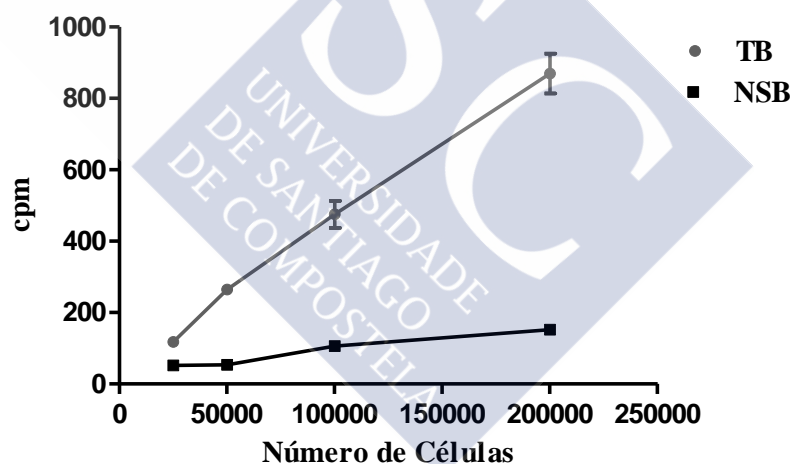


Figura 38. Linealidad celular para el receptor de serotonina 5-HT₇ en células no tratadas con doxiciclina, utilizando como radioligando [³H]-SB269970. Se muestra la representación gráfica de un ensayo realizado con puntos por triplicado.

Previamente al estudio de la funcionalidad del heterodímero de dopamina D₂ y de serotonina 5-HT_{2A}, se ha evaluado si el bloqueo del receptor 5-HT₇ por su antagonista selectivo SB-269970 genera alguna influencia, ya sea en la potencia o en la eficacia, en las vías de señalización estimuladas o inhibidas respectivamente por agonistas y antipsicóticos típicos y atípicos.

5. El bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB-269970 redujo la potencia del agonista dopamina en la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂.

Los ensayos funcionales de medida de la producción de AMPc dependiente de G_{i/o} establecieron que el tratamiento de las células con el antagonista del receptor 5-HT₇ SB-269970 (1 μ M) generó un desplazamiento de la curva dosis-respuesta de dopamina hacia la derecha, lo que reveló una reducción significativa de la potencia del agonista endógeno para activar el receptor D₂ (Figura 39, Tabla 21). Sin embargo, no se observó que el bloqueo del receptor 5-HT₇ produjese cambios significativos en la eficacia de la dopamina para inhibir la producción de AMPc (test estadístico t de Student).

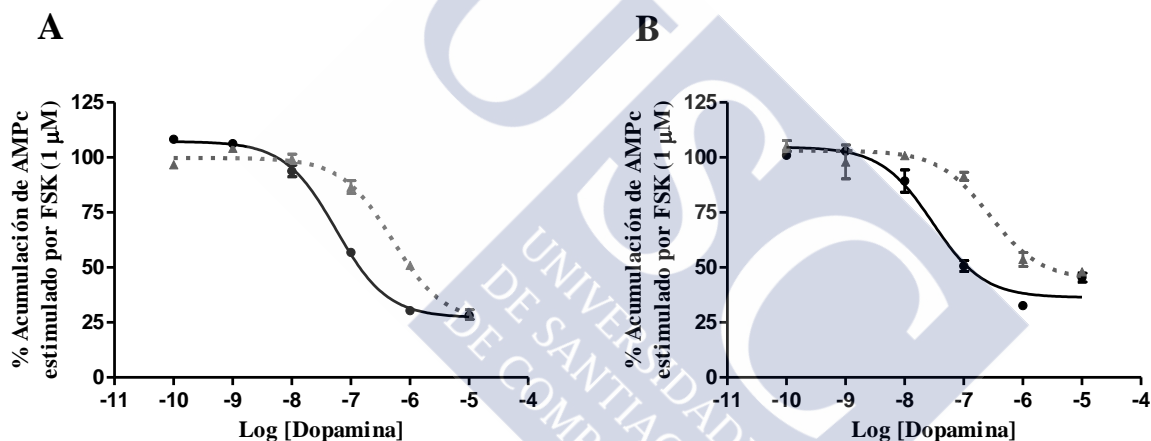


Figura 39. Curvas concentración-respuesta del agonista dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor de dopamina D₂, en ausencia (●) y presencia del antagonista selectivo del receptor 5-HT₇ SB-269970 (▲), en células no tratadas (A) y tratadas previamente con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas (B). Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 21. Potencia del agonista dopamina (EC_{50}) en la inhibición de la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μ M dependiente del receptor D_2 , en ausencia y presencia de SB-269970 (1 μ M), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS	-DOX			+DOX		
	EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)	EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)
Dopamina	53.6 \pm 5.4	7.3 \pm 0.0	70.3 \pm 3.0	35.5 \pm 16.4	7.5 \pm 0.2	57.2 \pm 8.6
Dopamina + SB-269970	417 \pm 101*	6.39 \pm 0.1*	72.4 \pm 3.6	305 \pm 143.0*	6.55 \pm 0.2*	58.9 \pm 8.5

*: $p < 0.001$ respecto a la curva de dopamina control sin SB-269970 (test t de *Student*).

6. El bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB-269970 no afectó a la potencia de los antipsicóticos típicos y atípicos para antagonizar la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 .

Los experimentos funcionales de AMPc establecieron que el tratamiento de las células con SB-269970 (1 μ M) causó una reducción de la amplitud en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 antagonizado por los antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina) y atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol), en células que expresaban exclusivamente el receptor D_2 y en aquellas que lo coexpresaban con el receptor 5-HT_{2A} inducible por doxiciclina (Figuras 40-41, Tablas 22-23). Mediante el test estadístico t de *Student*, se comprobó que esta reducción en la amplitud de la señal en presencia de SB269970 fue significativa. No obstante, la potencia de los antipsicóticos no se vio significativamente alterada por el bloqueo del receptor de serotonina 5-HT₇.

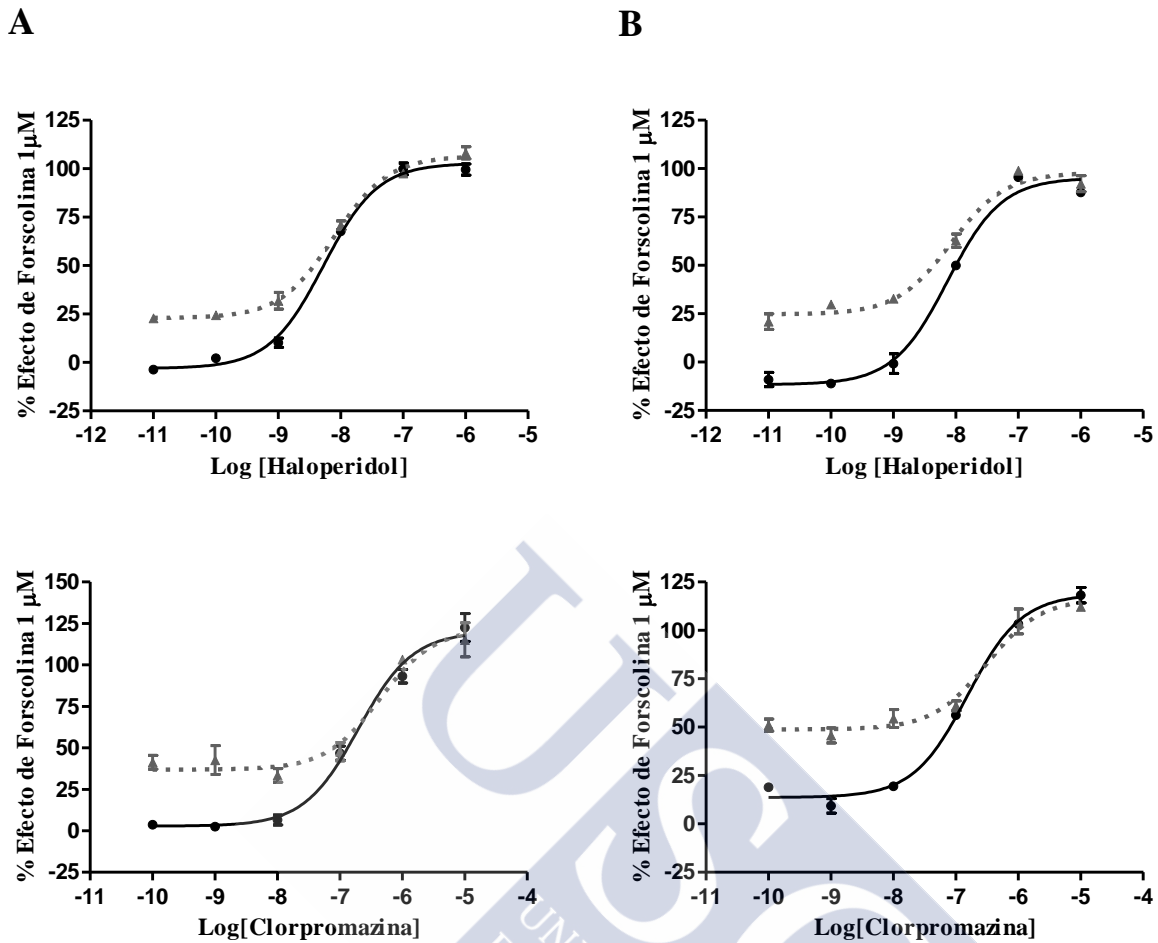


Figura 40. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina), en presencia de dopamina 1 μM , sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 , en ausencia (●) y presencia de SB-269970 (▲), en células no tratadas (A) y previamente tratadas con doxiciclina (B). Se muestra un experimento representativo de un total de tres ($n=3$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 22. Potencia (IC_{50}) de antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina), en presencia de dopamina $1\mu M$, en el bloqueo del receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA y E_{min} DA), en ausencia y presencia de SB-269970 ($1\mu M$), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

		-DOX			
COMPUESTOS		IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)	E_{min} DA (%)
Haloperidol	- SB269970	5.4 ± 0.3	8.3 ± 0.0	108 ± 10.6	-0.7 ± 3.8
	+ SB269970	8.7 ± 3.2	8.1 ± 0.1	113 ± 22.3	$27.1 \pm 5.1^*$
Clorpromazina	- SB269970	173 ± 75.1	6.8 ± 0.2	113 ± 18.0	15.1 ± 13.5
	+ SB269970	383 ± 273.5	6.51 ± 0.3	112 ± 17.1	$37.7 \pm 17.3^*$
		+DOX			
COMPUESTOS		IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)	E_{min} DA (%)
Haloperidol	- SB269970	8.5 ± 1.6	8.1 ± 0.1	101 ± 18.2	2.5 ± 11.8
	+ SB269970	9.9 ± 2.2	8.0 ± 0.1	103 ± 12.9	$26.9 \pm 12.2^*$
Clorpromazina	- SB269970	154 ± 74.1	6.8 ± 0.2	116 ± 13.3	9.0 ± 3.6
	+ SB269970	309 ± 97.9	6.5 ± 0.1	114 ± 12.7	$36.5 \pm 8.4^*$

*: $p < 0.05$ con respecto a las curvas de antipsicóticos típicos control sin SB-269970 (test t de Student).

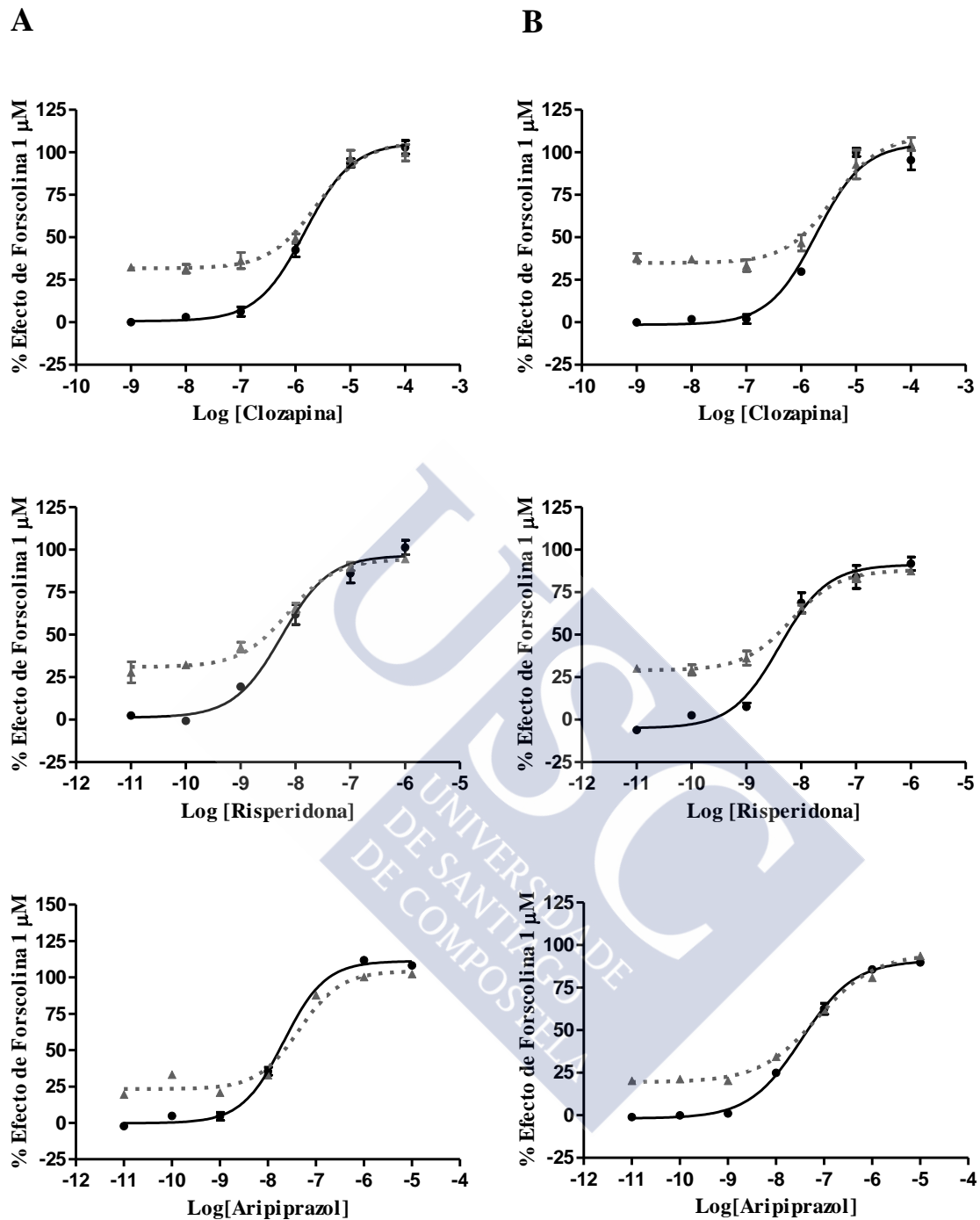


Figura 41. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol), en presencia de dopamina 1 μ M, sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 , en ausencia (●) y presencia de SB-269970 (▲), en células no tratadas (A) y previamente tratadas con doxiciclina (B). Se muestra un experimento representativo de un total de tres ($n=3$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 23. Potencia (IC₅₀) de antipsicóticos atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol), en presencia de dopamina 1μM, en el bloqueo del receptor D₂, y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA y E_{min} DA), en ausencia y presencia de SB-269970 (1 μM), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

		-DOX			
COMPUESTOS		IC₅₀ (nM)	pIC₅₀	E_{max} DA (%)	E_{min} DA (%)
Clozapina	- SB269970	2950 ± 1190	5.6 ± 0.2	104 ± 11.9	4.9 ± 6.2
	+ SB269970	4100 ± 2800	5.5 ± 0.3	103 ± 6.5	33.4 ± 10.4*
Risperidona	- SB269970	6.1 ± 0.6	8.2 ± 0.0	99.3 ± 4.8	-1.0 ± 10.1
	+ SB269970	8.0 ± 1.0	8.1 ± 0.0	98.7 ± 12.3	27.7 ± 7.8*
Aripiprazol	- SB269970	58.9 ± 54.9	7.3 ± 0.5	103 ± 23.7	-2.9 ± 6.4
	+ SB269970	61.9 ± 54.7	7.3 ± 0.4	102 ± 5.5	18.3 ± 7.1*
		+DOX			
COMPUESTOS		IC₅₀ (nM)	pIC₅₀	E_{max} DA (%)	E_{min} DA (%)
Clozapina	- SB269970	2500 ± 1250	5.6 ± 0.2	85.9 ± 22.0	9.0 ± 4.0
	+ SB269970	3140 ± 2300	5.6 ± 0.3	84.3 ± 18.9	29 ± 9.4*
Risperidona	- SB269970	5.4 ± 1.2	8.3 ± 0.1	88 ± 8.7	-2.0 ± 3.0
	+ SB269970	8.0 ± 1.3	8.1 ± 0.1	88.4 ± 3.1	24 ± 5.8*
Aripiprazol	- SB269970	34.9 ± 3.5	7.5 ± 0.0	96.5 ± 11.7	6.1 ± 14.5
	+ SB269970	73.8 ± 9.2	7.1 ± 0.0	96.7 ± 7.0	24.3 ± 4.4*

*: p < 0.05 con respecto a las curvas de antipsicóticos típicos control sin SB-269970 (test t de Student).

7. El bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB-269970 no alteró la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} al ser activado por los agonistas 5-HT y (±)DOI.

Los experimentos de estudio de la funcionalidad de la vía G_q del receptor 5-HT_{2A} mediante medición de los niveles de IPs establecieron una ausencia de diferencias significativas en la potencia y eficacia de los agonistas 5-HT y (±)DOI tras el bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB-269970 en células previamente tratadas con doxiciclina (Figura 42, Tabla 24) (aplicado test estadístico t de *Student*).

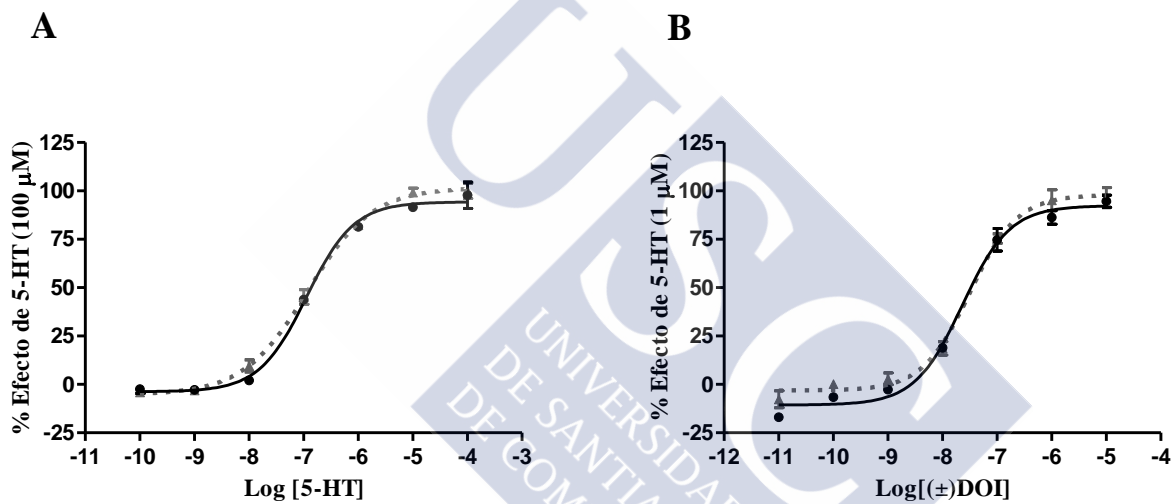


Figura 42. Curvas concentración-respuesta de los agonistas 5-HT y (±)DOI sobre la acumulación de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, en ausencia (●) y presencia de SB-269970 (▲), en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 24. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de los agonistas 5-HT y (\pm)DOI en la activación de la producción de IPs dependiente de la vía G_q del receptor 5-HT_{2A}, en ausencia y presencia de SB-269970 (1 μ M), en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		+DOX		
		EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)
5-HT	- SB269970	105 \pm 14.8	7.0 \pm 0.1	97 \pm 1.7
	+ SB269970	76.9 \pm 18.0	7.1 \pm 0.1	91.2 \pm 3.0
(\pm)DOI	- SB269970	27.8 \pm 1.2	7.6 \pm 0.2	104 \pm 20.9
	+ SB269970	39.7 \pm 23.6	7.4 \pm 0.3	89.4 \pm 4.2

8. El bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB-269970 no modificó la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} al ser antagonizado por los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol.

Los ensayos funcionales de medida de los niveles de IPs dependientes de la vía G_q del receptor de serotonina 5-HT_{2A} establecieron que tras el bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB-269970 no se produjo ninguna alteración significativa en el proceso de señalización antagonizado por los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol en células previamente tratadas con doxiciclina (Figura 43, Tabla 25) (aplicado test estadístico t de *Student*).

Resultados

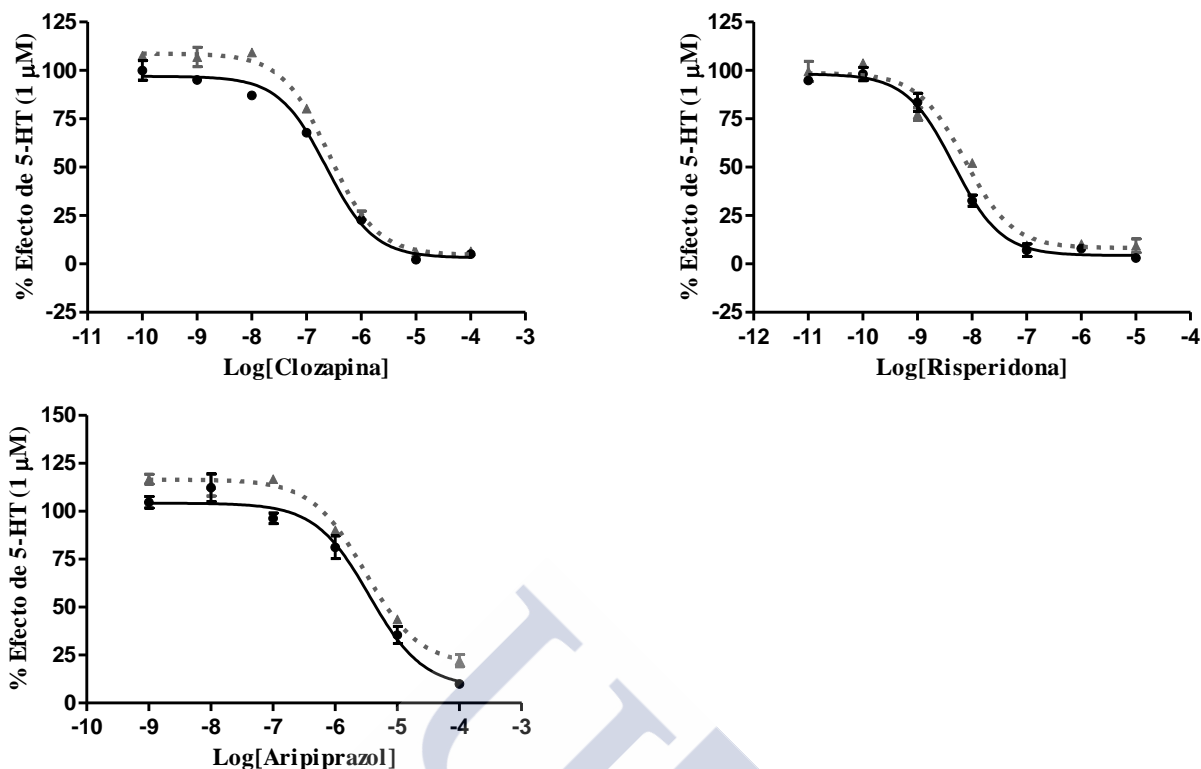


Figura 43. Curvas concentración-respuesta de los antagonistas atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M sobre la acumulación de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, en ausencia (●) y presencia de SB-269970 (▲), en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 25. Potencia (IC₅₀) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M, del bloqueo del receptor 5-HT_{2A}, y su efecto en la modulación de la eficacia de 5-HT (E_{max} 5-HT), en ausencia y presencia de SB-269970 (1 μ M), en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de tres (n=3) ensayos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		IC ₅₀ (nM)	pIC ₅₀	E _{max} 5-HT (%)
Clozapina	- SB269970	195 \pm 29.9	6.7 \pm 0.1	97.2 \pm 1.6
	+ SB269970	192 \pm 26.8	6.7 \pm 0.1	101.2 \pm 3.1
Risperidona	- SB269970	3.7 \pm 2.2	8.5 \pm 0.2	93.9 \pm 5.3
	+ SB269970	3.0 \pm 1.1	8.6 \pm 0.2	97.4 \pm 6.4
Aripiprazol	- SB269970	5730 \pm 3810	5.3 \pm 0.3	86.7 \pm 9.5
	+ SB269970	4260 \pm 1030	5.4 \pm 0.1	91.6 \pm 0.6

DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA

IV) MÉTODO MULTIPLEX DE MEDICIÓN SIMULTÁNEA DE AMPc E IPS PARA EL HETERODÍMERO D₂-5-HT_{2A}.

Con el objetivo de realizar una medición simultánea de las principales vías de señalización de los receptores del heterodímero D₂-5-HT_{2A}, se desarrolló una metodología farmacológica multiplex en placa de 96 pocillos que permitió el estudio de la funcionalidad de ambos receptores en un mismo experimento. Para ello, se hizo uso de la técnica estándar de medida funcional de IPs en placa de 96 pocillos (Iglesias y cols., 2016), así como del método de medición de AMPc por tecnología HTRF (*Cisbio Bioassays*).

En la siembra celular, en el marcaje con [³H]myo-inositol y en el inicio del ensayo, se siguieron las mismas pautas y condiciones que las establecidas en el protocolo del ensayo tradicional de medida de IPs, en placa de 96 pocillos (Iglesias y cols., 2016). No obstante, la lisis celular se produjo tras la incubación de las células con el “buffer lisis” aportado por el kit de AMPc (*Cisbio Bioassays*) (100 µl/pocillo durante 60 minutos a temperatura ambiente). Después del proceso de lisis celular, se determinó necesaria la transferencia de una cantidad de lisado celular (50 µl/pocillo) de la placa de ensayo transparente a una placa opaca *half-area*, en la que, tras la adición de los fluoróforos d2 y Cryptate, se midieron los niveles de AMPc por HTRF. La medida de la formación de IPs mediante *RNA SPA beads* requirió la incubación del lisado celular de la placa de ensayo (50 µl/pocillo) con ácido fórmico (133 mM), para acidificar el medio y cargar negativamente los grupos fosfato de los [³H]-IPs que, tras su unión a las *RNA SPA beads* cargadas positivamente y la excitación del líquido de centelleo albergado en el interior de las mismas, pudieron ser medidos en un contador de radiactividad.

En base a los resultados obtenidos del método multiplex, se observó una funcionalidad óptima del receptor de dopamina D₂ activado por su agonista endógeno, tanto en células que lo expresaban solo, como en aquellas que lo coexpresaban con el receptor de serotonina 5-HT_{2A} (Figura 44, Tabla 26). Igualmente, se estableció una

funcionalidad óptima del receptor de serotonina 5-HT_{2A} estimulado por su agonista endógeno 5-HT, exclusivamente en células que habían sido previamente expuestas a doxiciclina, habiéndose determinado una ausencia en la movilización de IPs en células no tratadas con el antibiótico inductor.

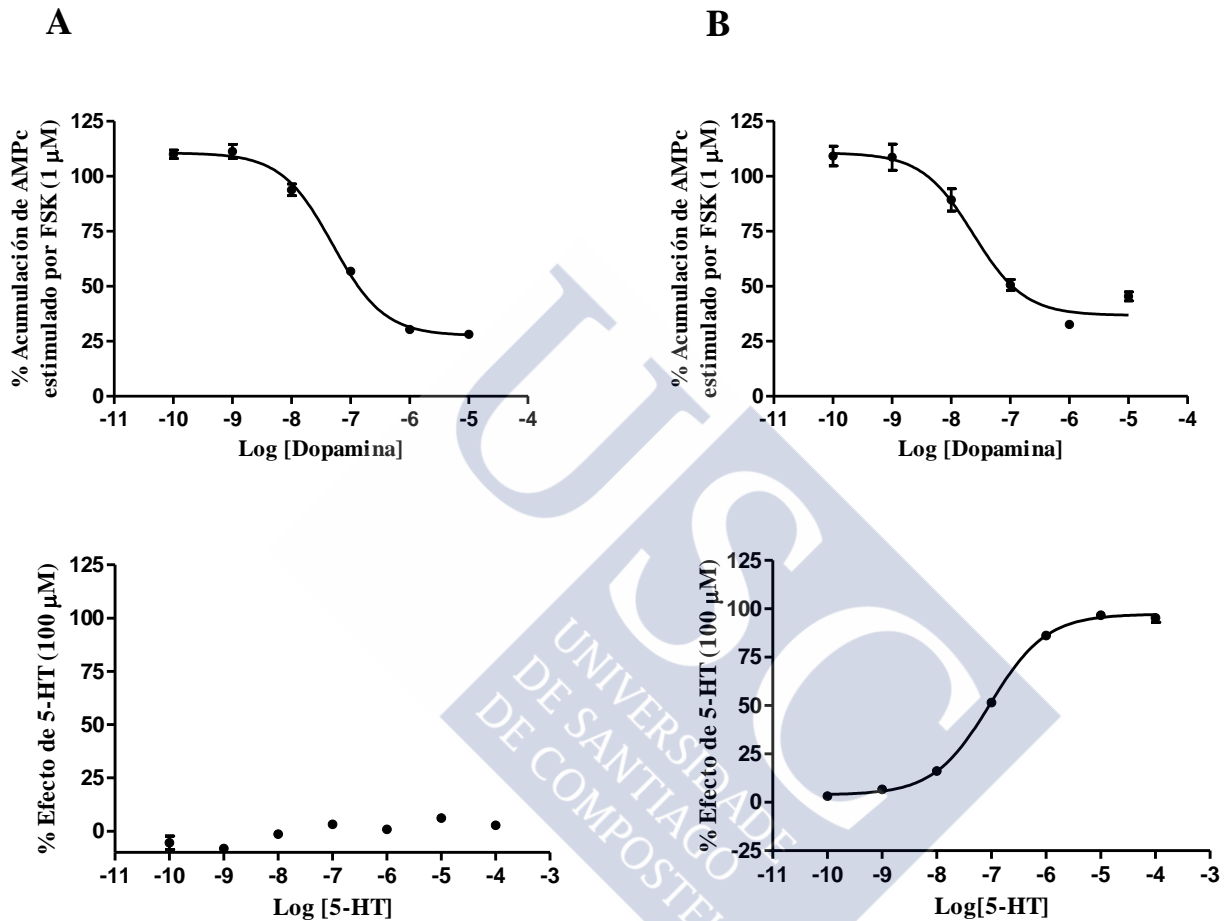


Figura 44. Curvas concentración-respuesta de dopamina y 5-HT sobre la acumulación de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} y sobre la producción de AMPc en la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂, respectivamente, en células no tratadas (A) y tratadas (B) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 26. Potencia de los agonistas dopamina y 5-HT (EC_{50}) para inhibir la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μ M dependiente de proteína $G_{i/o}$ del receptor D_2 y activar la formación de IPs dependiente de proteína G_q del receptor 5-HT $_{2A}$, respectivamente, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS	-DOX		+DOX	
	EC_{50} (nM)	pEC_{50}	EC_{50} (nM)	pEC_{50}
Dopamina	53.6 \pm 5.4	7.3 \pm 0.0	33.5 \pm 16.4	7.5 \pm 0.2
5-HT	-	-	105.0 \pm 14.82	7.0 \pm 0.1



INFLUENCIA DE LA HETERODIMERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES D₂ Y 5-HT_{2A} EN SU FARMACOLOGÍA

El tercer objetivo del presente trabajo ha sido valorar la posible influencia de la expresión, estimulación y bloqueo de uno de los receptores que conforman el heterodímero D₂-5-HT_{2A} sobre la farmacología del otro activado por agonistas y antagonizado por antipsicóticos, tanto en sus parámetros de afinidad, como de potencia y eficacia en sus principales vías de señalización (dependiente de G_i para el receptor de dopamina D₂ y dependiente de G_q para el receptor de serotonina 5-HT_{2A}).

Por otro lado, todos los ensayos funcionales se han realizado en presencia de SB-269970, con el objetivo de bloquear el receptor de serotonina 5-HT₇ y evitar la generación de algún tipo de interferencias en la acumulación de AMPc.

V) INFLUENCIA DE LA HETERODIMERIZACIÓN D₂-5-HT_{2A} EN LA AFINIDAD DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS (ANTIPSIÓTICOS) POR AMBOS RECEPTORES

❖ INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR D₂ EN LA AFINIDAD DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS (ANTIPSIÓTICOS) POR EL RECEPTOR 5-HT_{2A}

1. La expresión del receptor D₂ no alteró la unión de los agonistas 5-HT y (±)DOI al receptor 5-HT_{2A}.

Los ensayos de unión de radioligandos establecieron que la coexpresión de los receptores de dopamina D₂ y de serotonina 5-HT_{2A} no modificó las propiedades de unión de los agonistas endógeno 5-HT y alucinógeno (±)DOI al receptor 5-HT_{2A} (Figura 45, Tabla 27). Así, los parámetros de afinidad de 5-HT y (±)DOI al receptor 5-HT_{2A} en células que lo coexpresaban con el receptor D₂ fueron cercanos a aquellos obtenidos de líneas que lo sobreexpresaban solo (5-HT: 7-42 nM (K_i alta) – 2622-200000 (K_i baja) (Roth y cols., 1987; Roth y cols., 1997); DOI: 6.2±3.5 nM (K_i alta) – 28±20 nM(K_i baja) (Roth y cols., 1997)).

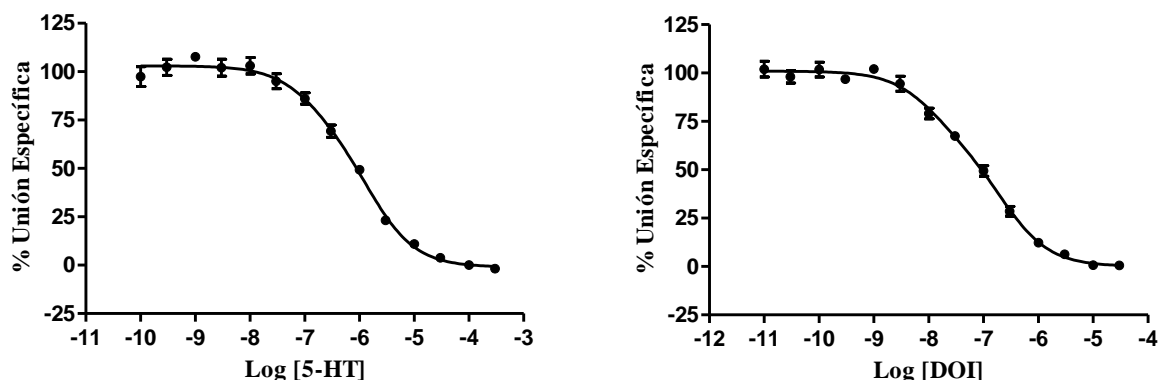


Figura 45. Curvas de competición de los agonistas endógeno no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (\pm)DOI con el radioligando [3 H]-ketanserina por la unión al receptor de serotonina 5-HT_{2A}, en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes (n=3) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 27. Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de serotonina 5-HT_{2A} del agonista endógeno no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (\pm)DOI, en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=1-3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTOS	$K_{i\text{ alta}}$ (nM)	pK_i (alta afinidad)	$K_{i\text{ bajos}}$ (nM)	pK_i (baja afinidad)
5-HT	55.8	6.22	7.2	6.2
(\pm)DOI	4.3 ± 0.1	8.4 ± 0.0	82.9 ± 5.2	7.1 ± 0.0

2. La expresión del receptor D₂ no alteró la afinidad de antipsicóticos atípicos por el receptor 5-HT_{2A}.

Los ensayos de unión de radioligandos determinaron que la coexpresión del receptor de dopamina D₂ con el receptor de serotonina 5-HT_{2A} no moduló las propiedades de unión de antipsicóticos atípicos por este último (Figura 46, Tabla 28). Por tanto, los parámetros de afinidad de clozapina, risperidona y aripiprazol por el receptor 5-HT_{2A} en membranas que lo coexpresaban con el receptor D₂ no cambiaron

con respecto aquellas que lo sobreexpresaban solo, en base a los datos aportados por la literatura científica (clozapina: 1-25 nM (Knight y cols., 2004; Vanover y cols., 2004); risperidona: 0.1-0.5 nM (Seeman y cols., 1997; Davies y cols., 2004); aripiprazol: 8.7-151.3 nM (Kroeze y cols., 2003; Davies y cols., 2005))

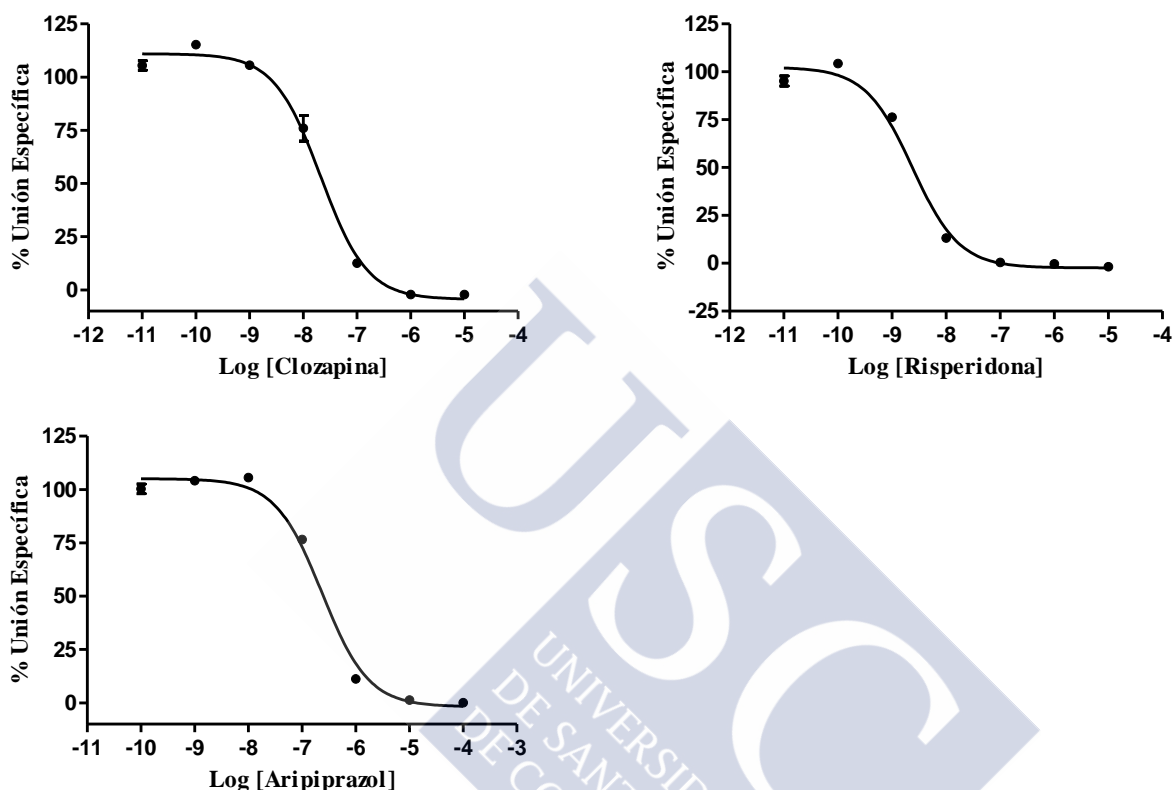


Figura 46. Curvas de competición de antipsicóticos atípicos con [³H]-ketanserina por la unión al receptor 5-HT_{2A}, en membranas obtenidas de células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes (n=3) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 28. Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de serotonina 5-HT_{2A} de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTOS	K _i (nM)	pK _i
Clozapina	6.9 ± 2.5	8.2 ± 0.2
Risperidona	0.8 ± 0.4	9.1 ± 0.2
Aripiprazol	156 ± 135.0	6.9 ± 0.4

❖ INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} EN LA AFINIDAD DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS (ANTIPSICÓTICOS) POR EL RECEPTOR D₂

1. La expresión del receptor 5-HT_{2A} no alteró la afinidad de la dopamina por el receptor D₂.

Los ensayos de unión de radioligandos determinaron que la presencia del receptor de serotonina 5-HT_{2A} no modificó las propiedades de unión del agonista dopamina por el receptor D₂ (Figura 47, Tabla 29). Según lo indicado por el análisis estadístico mediante test t de *Student*, no hubo diferencias significativas entre los parámetros de afinidad de la dopamina por el receptor D₂ en membranas que lo sobreexpresaban solo, con respecto a membranas que los coexpresaban con el receptor 5-HT_{2A}.

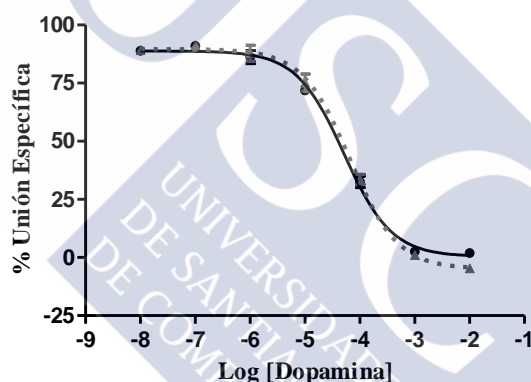


Figura 47. Curvas de competición del agonista dopamina con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D₂, en membranas obtenidas de células sin tratar (●) y tratadas (▲) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes (n=3) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 29. Parámetros de afinidad (K_i) de la dopamina por el receptor de dopamina D₂, en membranas no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

-DOX		+DOX	
K _i (μM)	pK _i	K _i (μM)	pK _i
23.0 ± 6.2	4.6 ± 0.1	28.8 ± 3.7	4.5 ± 0.1

2. La expresión del receptor 5-HT_{2A} no alteró la afinidad de los antipsicóticos típicos por el receptor D₂.

Los experimentos de unión de radioligandos demostraron que la presencia del receptor de serotonina 5-HT_{2A} no moduló las propiedades de unión de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina por el receptor de dopamina D₂ (Figura 48, Tabla 30). En este sentido, el análisis estadístico mediante t de *Student* estableció una ausencia de diferencias significativas entre los parámetros de afinidad del haloperidol y la clorpromazina por el receptor D₂ cuando éste se expresaba solo con respecto a su coexpresión con el receptor 5-HT_{2A}.

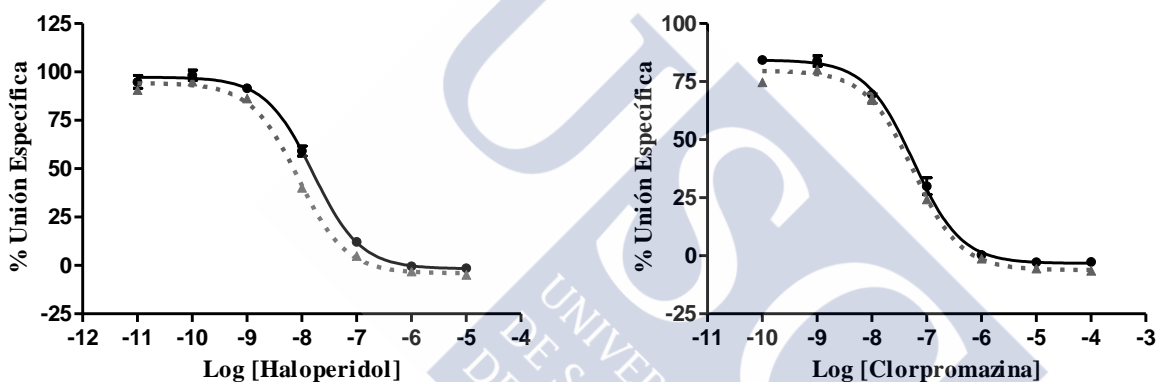


Figura 48. Curvas de competición de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D₂, en membranas obtenidas de células sin tratar (●) y tratadas (▲) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes (n=3) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 30. Parámetros de afinidad (K_i) de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina por el receptor de dopamina D₂, en membranas no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTOS	-DOX		+DOX	
	K _i (nM)	pK _i	K _i (nM)	pK _i
Haloperidol	7.5 ± 2.4	8.1 ± 0.1	4.0 ± 0.0	8.4 ± 0.0
Clorpromazina	28.7 ± 5.3	7.5 ± 0.1	23.6 ± 3.5	7.6 ± 0.1

3. La expresión del receptor 5-HT_{2A} no moduló la afinidad de los antipsicóticos atípicos por el receptor D₂.

Los ensayos de unión de radioligandos establecieron la ausencia de algún tipo de alteración en la afinidad de los antipsicóticos atípicos risperidona y aripiprazol por el receptor de dopamina D₂ cuando éste se coexpresaba con el receptor de serotonina 5-HT_{2A} (Figura 49, Tabla 31). Así, el análisis estadístico por el test t de *Student* determinó que los parámetros de unión de los dos antipsicóticos atípicos por el receptor D₂ no fueron modificados significativamente ante la presencia del receptor 5-HT_{2A}.

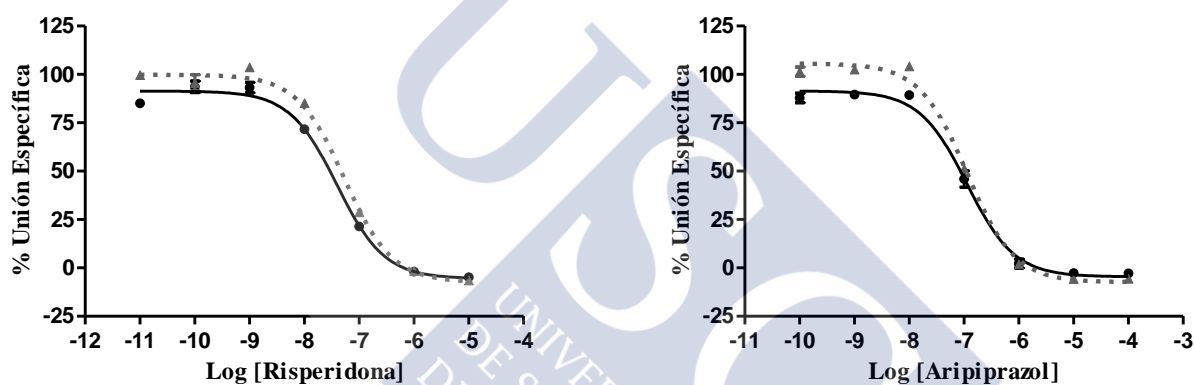


Figura 49. Curvas de competición de los antipsicóticos atípicos risperidona y aripiprazol con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D₂, en membranas obtenidas de células sin tratar (●) y tratadas (▲) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes (n=3) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 31. Parámetros de afinidad (K_i) de los antipsicóticos atípicos risperidona y aripiprazol por el receptor de dopamina D₂ en membranas no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTOS	-DOX		+DOX	
	K _i (nM)	pK _i	K _i (nM)	pK _i
Risperidona	15.2 ± 6.1	7.8 ± 0.2	20.2 ± 2.8	7.7 ± 0.1
Aripiprazol	29.4 ± 21.1	7.6 ± 0.3	25.8 ± 20.1	7.7 ± 0.3

4. La expresión del receptor 5-HT_{2A} aumentó la afinidad de la clozapina por el receptor D₂.

Los ensayos de unión de radioligandos indicaron un aumento de la afinidad del antipsicótico atípico clozapina por el receptor de dopamina D₂ cuando coexpresaba con el receptor de serotonina 5-HT_{2A} (Figura 50, Tabla 32). El análisis estadístico realizado por el test t de *Student* estableció que este incremento en la afinidad de la clozapina por el receptor D₂ coexpresado con el receptor 5-HT_{2A} fue significativo con respecto a cuando se expresaba solo.

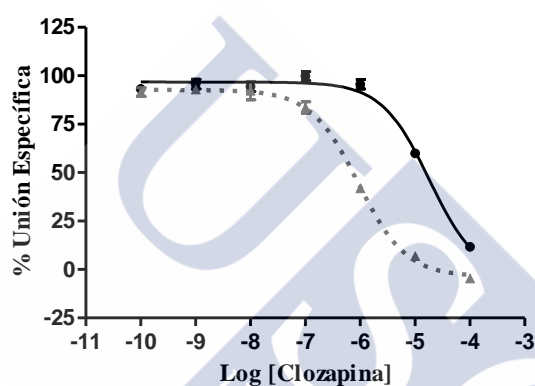


Figura 50. Curvas de competición del antipsicótico atípico clozapina con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D₂, en membranas obtenidas de células sin tratar (●) y tratadas (▲) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes (n=3) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 32. Parámetros de afinidad (K_i) del antipsicótico atípico clozapina por el receptor de dopamina D₂, en membranas no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTOS	-DOX		+DOX	
	K _i μM	pK _i	K _i μM	pK _i
Clozapina	6.2 ± 1.7	5.2 ± 0.1	0.4 ± 0.0*	6.4 ± 0.0*

*: p < 0.05 respecto a la curva de clozapina control (test t de *Student*).

VI) INFLUENCIA DE LA HETERODIMERIZACIÓN D₂-5-HT_{2A} EN LA POTENCIA Y EFICACIA DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS (ANTIPSICÓTICOS) SOBRE AMBOS RECEPTORES

❖ INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN Y MODULACIÓN DEL RECEPTOR D₂ EN LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} POR AGONISTAS

1. La expresión del receptor D₂ no modificó la potencia y eficacia del agonista endógeno 5-HT para activar el receptor 5-HT_{2A}.

Los ensayos de medida de la producción de IPs determinaron que la expresión del receptor de dopamina D₂ no afectó a la funcionalidad del receptor de serotonina 5-HT_{2A} activado por su agonista endógeno 5-HT (Figura 51, Tabla 33). En este sentido, no se encontraron diferencias en los parámetros de potencia y eficacia de 5-HT para activar el receptor 5-HT_{2A} coexpresado con el receptor D₂ en comparación a los valores registrados en líneas en las que se sobreexpresaba solo (EC₅₀: 37 nM y E_{max}: 78% (Berg y cols., 1998)).

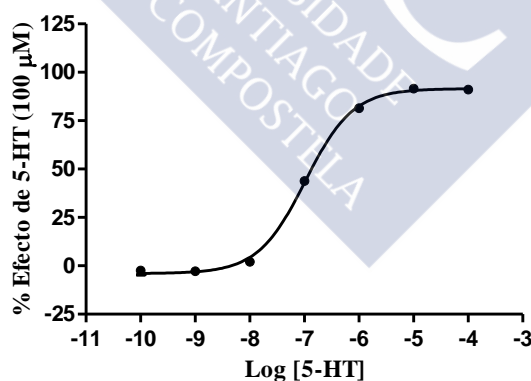


Figura 51. Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno 5-HT en la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A}, en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 33. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista endógeno 5-HT en la estimulación de la producción de IPs dependiente de la proteína G_q asociada al receptor 5-HT_{2A}, en células previamente expuestas a doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

	EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)
5-HT	76.9 \pm 18.0	7.1 \pm 0.1	91.2 \pm 3.0

2. La expresión del receptor D₂ aumentó la eficacia del agonista alucinógeno (\pm)DOI para activar el receptor 5-HT_{2A}.

Los experimentos funcionales de estudio del receptor de serotonina 5-HT_{2A} establecieron que la coexpresión del receptor de dopamina D₂ indujo un aumento de la eficacia del agonista alucinógeno (\pm)DOI para activar la producción de IPs dependiente de proteína G_q (Figura 52; Tabla 34). En este sentido, la literatura científica describe la sustancia psicótica (\pm)DOI como un agonista parcial en la producción de IPs dependiente del receptor 5-HT_{2A} (E_{max} : 61% (Berg y cols., 1998)). No obstante, los resultados de esta investigación confirmaron que cuando el receptor 5-HT_{2A} colocalizaba con el receptor D₂, el alucinógeno (\pm)DOI constituía un agonista total en la formación de IPs, habiendo aumentado así su eficacia de estimulación de la vía de señalización dependiente de G_q . Por otro lado, la potencia del (\pm)DOI para activar el receptor 5-HT_{2A} no fue alterada por la coexpresión del receptor D₂, ya que fue similar a la establecida en líneas celulares que sobreexpresaban exclusivamente el receptor 5-HT_{2A} (EC_{50} : 6.3-192 nM (Berg y cols., 1998; Hansen y cols., 2015)).

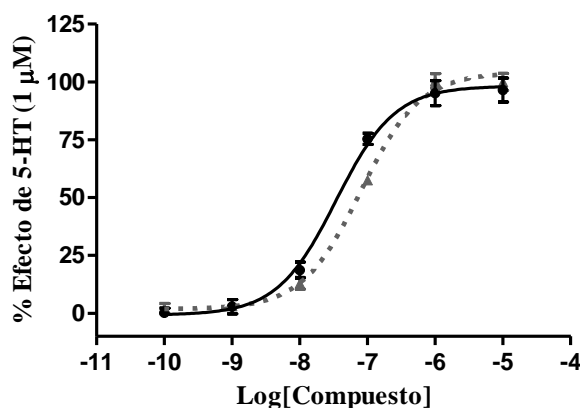


Figura 52. Curvas concentración-respuesta de los agonistas alucinógeno (\pm)DOI (\bullet) y no alucinógeno 5-HT (\blacktriangle) en la producción de IPs dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} , en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ($n=3$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 34. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI en la producción de IPs dependiente de proteína G_q , en células previamente expuestas a doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

	EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)
(\pm)DOI	39.7 ± 23.6	7.4 ± 0.3	89.4 ± 4.2

3. La expresión del receptor D_2 no modificó la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} activado por los agonistas no alucinógeno lisurida y alucinógeno LSD.

A diferencia de la influencia que tuvo la presencia del receptor de dopamina D_2 en la eficacia del agonista alucinógeno (\pm)DOI para activar el receptor de serotonina 5-HT_{2A} , esto no sucedió para dos agonistas farmacológicamente cercanos al (\pm)DOI, los agonistas no alucinógeno lisurida y alucinógeno LSD. Así, se observó que ambos compuestos se comportaron como agonistas parciales del receptor 5-HT_{2A} independientemente de la expresión del receptor D_2 (Figura 53, Tabla 35), puesto que los valores de E_{max} obtenidos cuando ambos receptores se coexpresaban fueron cercanos a los establecidos en líneas celulares que sólo expresaban el receptor 5-

HT_{2A}. Asimismo, su potencia de activación del receptor 5-HT_{2A} no fue modificada por la presencia del receptor D₂, ya que sus valores fueron similares a los registrados en líneas celulares que sobreexpresaban únicamente el receptor 5-HT_{2A} (Lisurida: EC₅₀: 3 nM y E_{max}: 20% (*Drugmatrix*; Porter y cols., 1999); DOI: EC₅₀: 9.8-16 nM y E_{max}: 17% (Berg y cols., 1998; McLean y cols., 2006)).

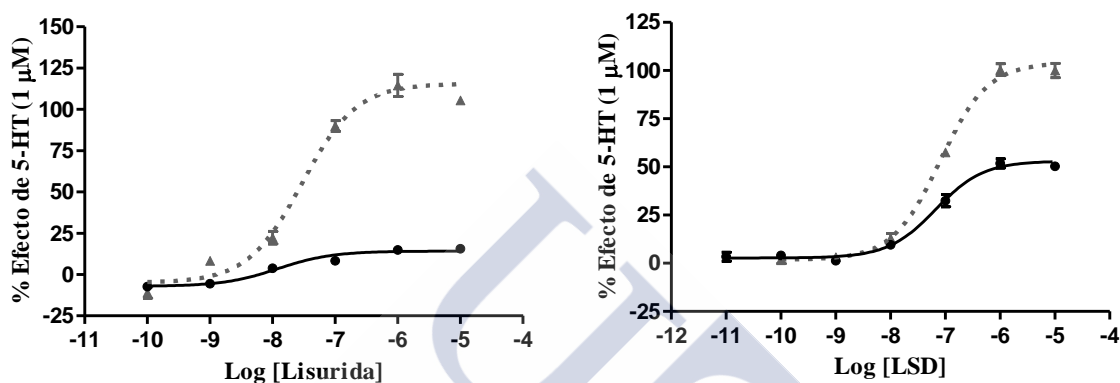


Figura 53. Curvas concentración-respuesta de los agonistas no alucinógeno lisurida y alucinógeno LSD (●) y del agonista endógeno 5-HT (▲) en la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A}, en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total varios (n=1-3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 35. Potencia y eficacia (EC₅₀ y E_{max}) de los agonistas del receptor 5-HT_{2A} no alucinógeno lisurida y alucinógeno LSD en la producción de IPs dependiente de proteína G_q, en células previamente expuestas a doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de varios (n=1-3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

	EC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀	E _{max} (%)
Lisuride	11.1 ± 6.2	8.0 ± 0.3	16.7 ± 3.9
LSD	66.6	7.2	53.0

4. La activación del receptor D₂ no moduló la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} estimulado por 5-HT o (±)DOI.

Previamente a la activación del receptor D₂ por dopamina, se realizaron curvas dosis-respuestas del agonista con el fin de determinar así la concentración apropiada a utilizar del mismo en los ensayos de funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} (Figura 54, Tabla 36). Así, se decidió emplear una concentración de 1 μM, que permitiría una activación óptima del receptor D₂ sin afectar al receptor 5-HT_{2A}.

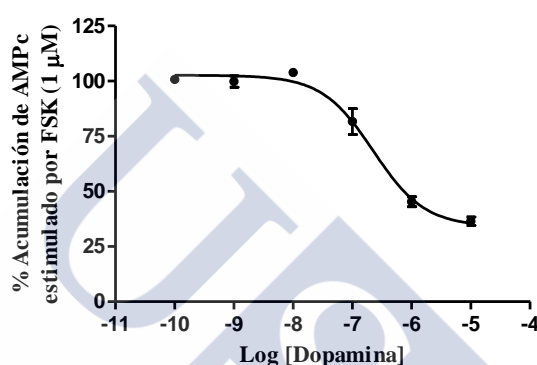


Figura 54. Curva concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor D₂ dopamina sobre la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μM dependiente de la proteína G_i en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 36. Potencia (EC₅₀) del agonista endógeno dopamina para inhibir la producción de AMPc dependiente de la vía G_i del receptor D₂, en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

	EC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀
Dopamina	305 ± 143.0	6.55 ± 0.2

Los ensayos de funcionalidad del receptor de serotonina 5-HT_{2A} establecieron que su activación por el agonista endógeno 5-HT no se vio alterada cuando el receptor D₂ fue estimulado por dopamina. Asimismo, tampoco se registró ningún tipo de modulación en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} activado por el agonista alucinógeno (±)DOI tras la estimulación del receptor D₂ por dopamina

(Figura 55, Tabla 37). Así, el test estadístico t de *Student* confirmó la ausencia de diferencias significativas en la potencia y eficacia de 5-HT y DOI para activar el receptor 5-HT_{2A}, tras la estimulación del receptor D₂ por dopamina.

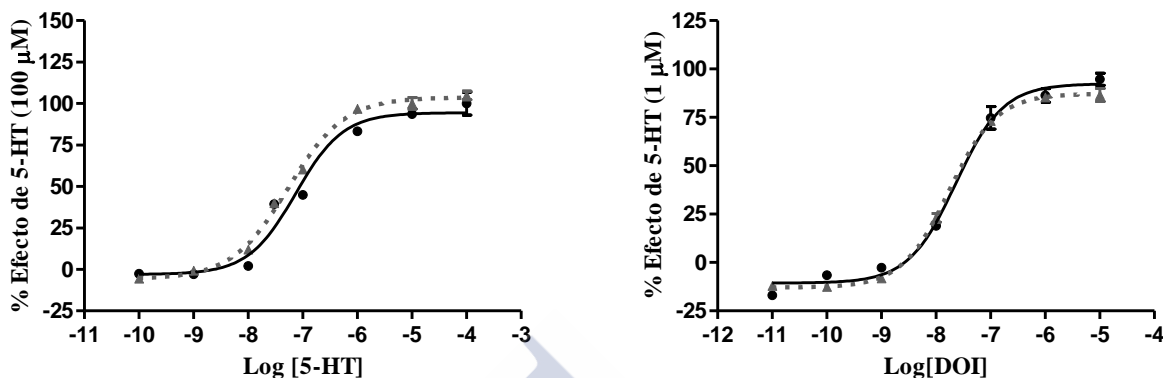


Figura 55. Curvas concentración-respuesta de los agonistas endógeno no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (\pm)DOI del receptor 5-HT_{2A} sobre la producción de IPs dependiente de G_q, solos (●) y en presencia del agonista del receptor D₂ dopamina (1 μ M) (\blacktriangle), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 37. Potencia y eficacia (EC₅₀ y E_{max}) de los agonistas no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (\pm)DOI para estimular la producción de IPs dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A}, en ausencia y presencia de dopamina 1 μ M, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		EC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀	E _{max} (%)
5-HT	- Dopamina	76.9 \pm 18.0	7.1 \pm 0.1	91.2 \pm 3.0
	+ Dopamina	71 \pm 15.6	7.2 \pm 0.1	98.1 \pm 4.7
(\pm)DOI	- Dopamina	39.7 \pm 23.6	7.4 \pm 0.3	89.4 \pm 4.2
	+ Dopamina	24 \pm 11.1	7.7 \pm 0.2	100 \pm 24.1

5. El bloqueo del receptor D₂ por sulpirida no alteró la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} activado por 5-HT.

Previamente al bloqueo del receptor de dopamina D₂ por su antagonista selectivo sulpirida, se realizó una curva dosis-respuesta de dicho compuesto con el objetivo de establecer la concentración óptima del mismo para bloquear el receptor D₂ sin que se viera afectado directamente el receptor de serotonina 5-HT_{2A}. Los resultados determinaron que la concentración adecuada de sulpirida a utilizar es 100 nM (Figura 56, Tabla 38).

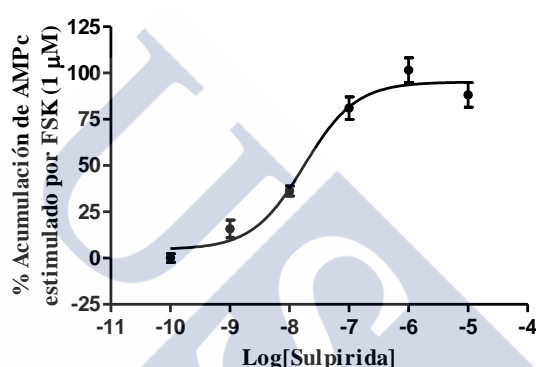


Figura 56. Curvas concentración-respuesta del antagonista selectivo del receptor de dopamina D₂ sulpirida sobre la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μM dependiente de la proteína G_i, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo realizado por puntos por triplicado.

Tabla 38. Potencia (IC₅₀) del antagonista sulpirida para estimular la producción de AMPc dependiente de la vía G_i del receptor D₂, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra los resultados de un experimento realizado con puntos por triplicado.

	IC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀
Sulpirida	17.5	7.8

Los experimentos de medida de la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} determinaron que el bloqueo del receptor D₂ por su antagonista selectivo sulpirida no moduló la potencia y eficacia del agonista endógeno 5-HT para estimular la vía de señalización dependiente de G_q. Por tanto, los parámetros de potencia y eficacia de la serotonina

para activar el receptor 5-HT_{2A} no difirieron significativamente (test t de *Student*) tras el bloqueo del receptor D₂ por sulpirida (Figura 57, Tabla 39).

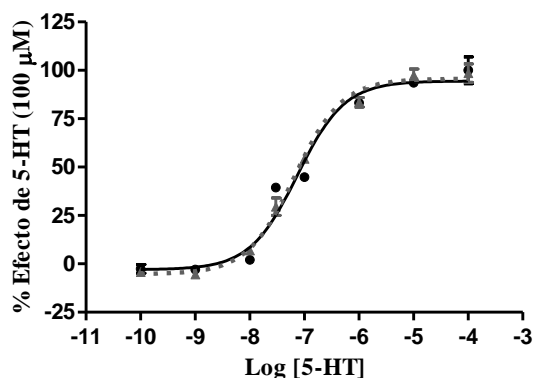


Figura 57. Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor 5-HT_{2A} 5-HT sobre la producción de IPs dependiente de G_q, solo (●) y en presencia del antagonista del receptor D₂ sulpirida (100 nM) (▲), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 39. Potencia y eficacia (EC₅₀ y E_{max}) del agonista endógeno 5-HT para estimular la producción de IPs dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A}, en ausencia y presencia de sulpirida, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		EC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀	E _{max} (%)
5-HT	- Sulpirida	76.9 ± 18.0	7.1 ± 0.1	91.2 ± 3.0
	+ Sulpirida	72.6 ± 5.7	7.1 ± 0.0	92.9 ± 3.3

6. El bloqueo del receptor D₂ por sulpirida redujo la eficacia del agonista alucinógeno (±)DOI para activar el receptor 5-HT_{2A}.

Los ensayos de medida de la producción de IPs y el análisis estadístico (test t de *Student*) determinaron que el bloqueo del receptor D₂ por sulpirida no modificó significativamente la potencia del agonista alucinógeno (±)DOI para estimular el receptor de serotonina 5-HT_{2A}. Sin embargo, se observó una reducción significativa en la eficacia del (±)DOI para activar la producción de IPs dependiente del receptor 5-HT_{2A} (Figura 58, Tabla 40).

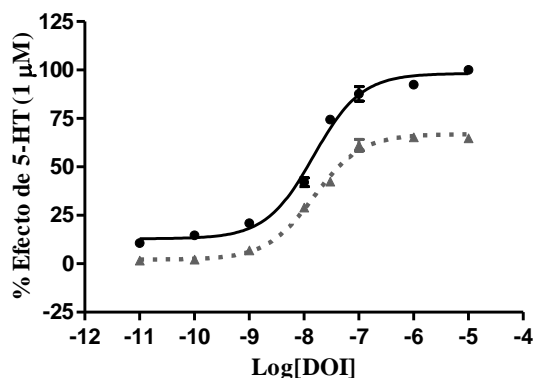


Figura 58. Curvas concentración-respuesta del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI sobre la producción de IPs dependiente de G_q, solo (●) y en presencia del antagonista del receptor D₂ sulpirida (100 nM) (▲), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 40. Potencia y eficacia (EC₅₀ y E_{max}) del agonista alucinógeno (\pm)DOI para estimular la producción de IPs dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A}, en ausencia y presencia de sulpirida, en células tratadas con doxiciclina. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		EC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀	E _{max} %
(\pm)DOI	- Sulpirida	27.8 \pm 12.1	7.6 \pm 0.2	104 \pm 20.9
	+ Sulpirida	19.3 \pm 5.6	7.7 \pm 0.1	82.6 \pm 15.1*

*: p < 0.05 respecto a la curva de (\pm)-DOI control (test t de Student)

❖ INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN Y MODULACIÓN DEL RECEPTOR D₂ EN LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} ANTAGONIZADO POR ANTIPSICÓTICOS

1. La expresión del receptor D₂ redujo la potencia del aripiprazol para bloquear el receptor 5-HT_{2A}, pero no modificó la potencia de la clozapina, ni de la risperidona.

Los ensayos de funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} establecieron que su coexpresión con el receptor D₂ no introdujo ningún tipo de alteración en la potencia de

los antipsicóticos atípicos clozapina y risperidona para inhibir la producción de IPs dependiente de la proteína G_q (Figura 59, Tabla 41). Así, los parámetros de potencia de dichos antipsicóticos atípicos para bloquear el receptor 5-HT_{2A} en coexpresión con el receptor D_2 no difirieron con respecto a los registrados en líneas celulares que lo sobreexpresaban solo (clozapina: 89 nM (Brea y cols., 2009); risperidona: 9 nM (Brea y cols., 2009)). No obstante, se observó que la potencia del antipsicótico atípico aripiprazol para antagonizar el receptor 5-HT_{2A} en la línea de trabajo HEK293 doble estable fue aproximadamente 10 veces inferior a la establecida en líneas celulares que sobreexpresan exclusivamente el receptor 5-HT_{2A} (369 nM (Zhang y cols., 2006)). Ello sugirió que la presencia del receptor D_2 redujo la potencia de bloqueo del aripiprazol sobre el receptor 5-HT_{2A} .

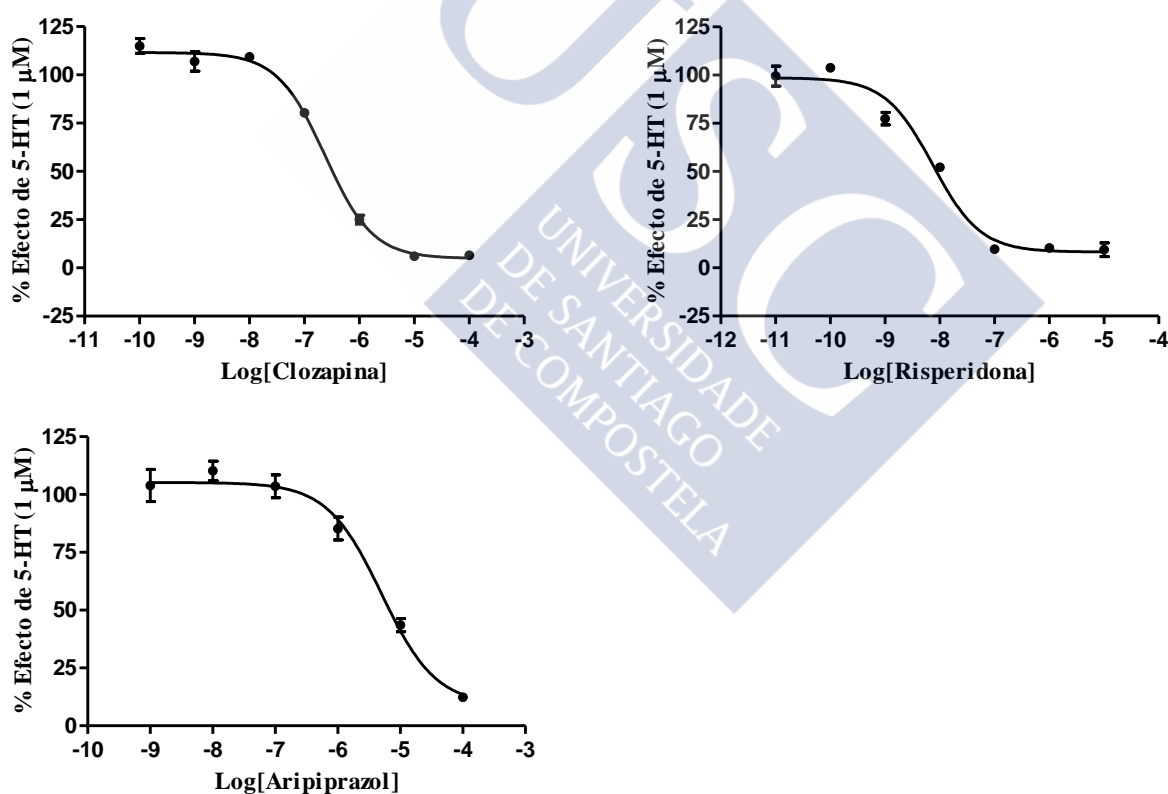


Figura 59. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μM , para inhibir la producción de IPs en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} , en células tratadas con 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ($n=3$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 41. Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M, para antagonizar el receptor 5-HT_{2A}, y su efecto en la modulación de la eficacia de 5-HT 1 μ M (E_{max} 5-HT), en células previamente expuestas a doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} 5-HT (%)
Clozapina	192 \pm 26.8	6.7 \pm 0.1	101.2 \pm 3.1
Risperidona	3.0 \pm 1.1	8.5 \pm 0.2	97.4 \pm 6.4
Aripiprazol	4260 \pm 1035	5.4 \pm 0.1	91.6 \pm 0.6

2. La activación del receptor D₂ por dopamina no moduló la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} antagonizado por antipsicóticos atípicos.

Los ensayos funcionales de IPs demostraron que la activación del receptor D₂ por dopamina no generó ningún tipo de modulación en la potencia de los antipsicóticos atípicos para bloquear la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} (Figura 60, Tabla 42). Así, el test estadístico t de *Student* estableció que no hubo diferencias significativas en los valores de potencia de clozapina, risperidona y aripiprazol para antagonizar el receptor 5-HT_{2A}, en ausencia y presencia de dopamina 1 μ M.

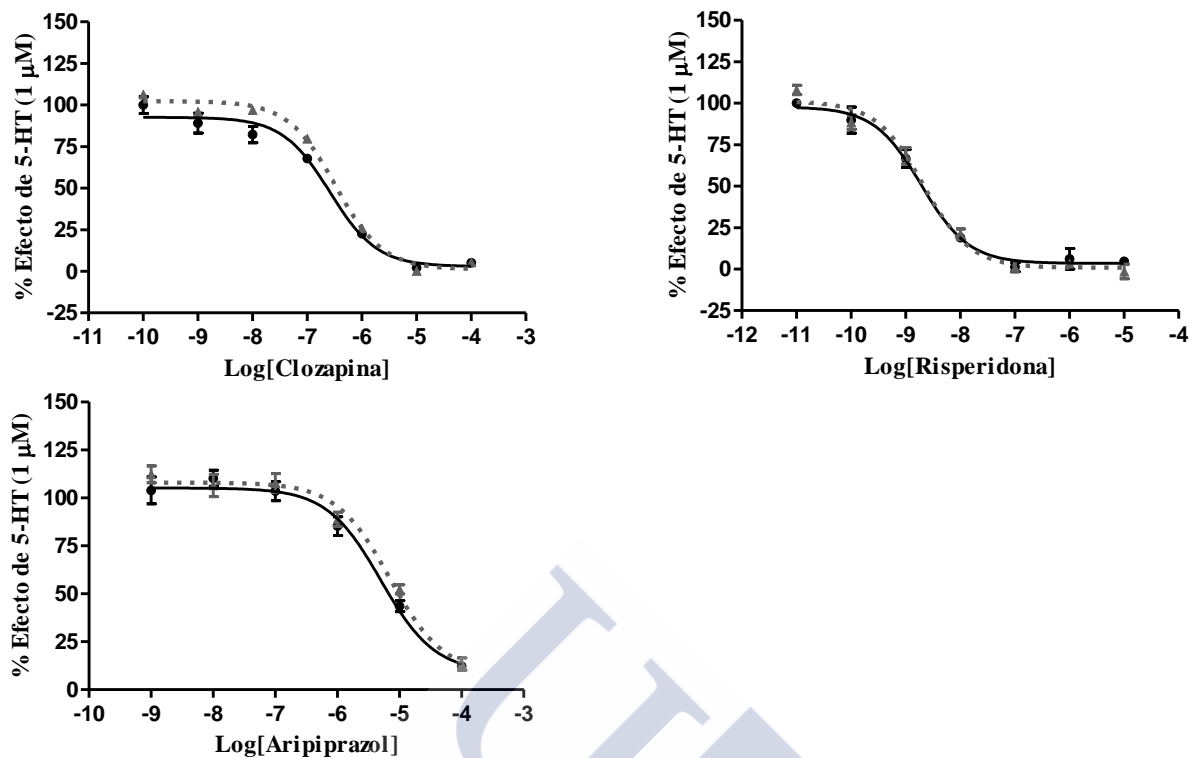


Figura 60. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol en presencia de 5-HT 1 μ M sobre la producción de IPs dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} solos (●) y en presencia del agonista del receptor D₂ dopamina (1 μ M) (▲) en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 42. Potencia (IC₅₀) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M, para bloquear el receptor 5-HT_{2A}, y su efecto en la modulación de la eficacia de 5-HT 1 μ M (E_{max} 5-HT), en ausencia y presencia de dopamina, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		IC ₅₀ (nM)	pIC ₅₀	E _{max} 5-HT (%)
Clozapina	- Dopamina	192 \pm 26.8	6.7 \pm 0.1	101.2 \pm 3.1
	+ Dopamina	257 \pm 77.6	6.6 \pm 0.2	96.8 \pm 3.1
Risperidona	- Dopamina	3.0 \pm 1.1	8.5 \pm 0.2	97.4 \pm 6.4
	+ Dopamina	3.2 \pm 1.2	8.5 \pm 0.2	98.8 \pm 8.6
Aripiprazol	- Dopamina	4260 \pm 1035	5.4 \pm 0.1	91.6 \pm 0.6
	+ Dopamina	5000 \pm 2700	5.3 \pm 0.2	95.6 \pm 2.3

3. El bloqueo del receptor D₂ por sulpirida no alteró la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} antagonizado por antipsicóticos atípicos.

Los ensayos de funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} determinaron que el bloqueo del receptor D₂ por sulpirida no introdujo ningún tipo de modulación en la potencia de clozapina, risperidona y aripiprazol para antagonizar la producción de IPs dependiente de G_q (Figura 61, Tabla 43). Así, según el test estadístico t de *Student*, los parámetros de potencia de los tres antipsicóticos atípicos para antagonizar el receptor 5-HT_{2A}, tras el bloqueo del receptor D₂, no difirieron significativamente de aquellos en ausencia de sulpirida.

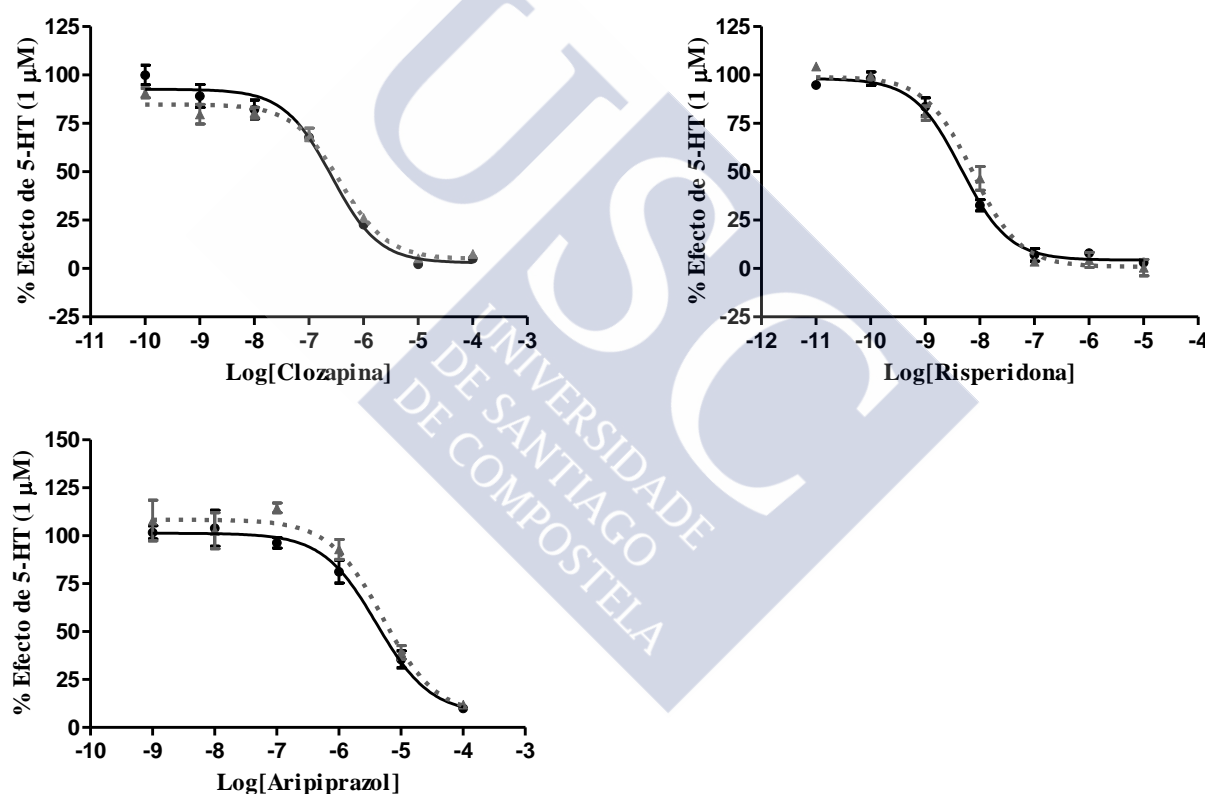


Figura 61. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μM, sobre la producción de IPs dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A}, solos (●) y en presencia del antagonista del receptor D₂ sulpirida (100 nM) (▲), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 43. Potencia (IC_{50}) de clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de 5-HT 1 μ M, para antagonizar el receptor 5-HT_{2A}, y su efecto en la modulación de la eficacia de 5-HT 1 μ M (E_{max} 5-HT), en ausencia y presencia de sulpirida, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} 5-HT (%)
Clozapina	- Sulpirida	192 \pm 26.8	6.7 \pm 0.1	101.2 \pm 3.1
	+ Sulpirida	255 \pm 123.3	6.6 \pm 0.2	97.5 \pm 7.3
Risperidona	- Sulpirida	3.0 \pm 1.1	8.5 \pm 0.2	97.4 \pm 6.4
	+ Sulpirida	3.9 \pm 2.0	8.4 \pm 0.2	101.6 \pm 4.5
Aripiprazol	- Sulpirida	4260 \pm 1035	5.4 \pm 0.1	91.6 \pm 0.6
	+ Sulpirida	5200 \pm 200	5.3 \pm 0.0	91.4 \pm 3.2

❖ **INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN Y MODULACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} EN LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR D₂ POR AGONISTAS**

1. La expresión del receptor 5-HT_{2A} no reguló la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂ activado por dopamina.

Los estudios de funcionalidad del receptor D₂ activado por el agonista dopamina establecieron una ausencia de modulación de su vía de señalización dependiente de G_{i/o}, en presencia del receptor de serotonina 5-HT_{2A} (Figura 62, Tabla 44). El análisis estadístico realizado mediante el test t de *Student* determinó que no hubo diferencias significativas en los valores de potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de la dopamina para activar el receptor D₂, cuando éste se expresaba solo, con respecto a su coexpresión con el receptor 5-HT_{2A}.

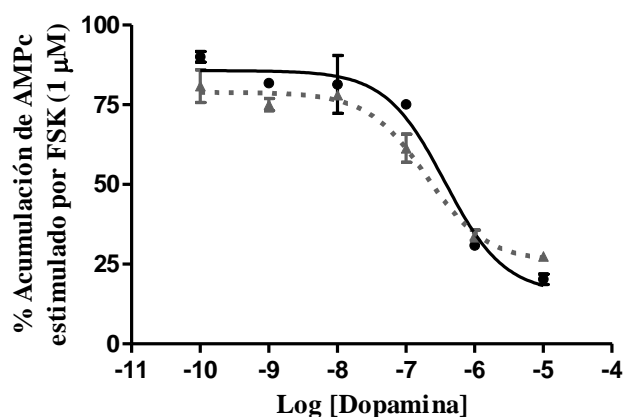


Figura 62. Curvas concentración-respuesta del agonista dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 , en células sin tratar (●) y tratadas (▲) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ($n=3$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 44. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) del agonista dopamina para inhibir la producción de AMPc estimulada por FSK 1 μ M dependiente de la proteína $G_{i/o}$ asociada al receptor D_2 , en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

-DOX			+DOX		
EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)	EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)
417 ± 101.2	6.4 ± 0.1	73.4 ± 3.6	305 ± 143.0	6.5 ± 0.2	58 ± 8.5

2. La activación del receptor 5-HT_{2A} por el agonista alucinógeno (\pm)DOI moduló la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 estimulado por dopamina.

Previamente a la activación del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, se realizó una curva dosis-respuesta del agonista selectivo (\pm)DOI, con el objetivo de establecer la concentración óptima del compuesto a utilizar en los ensayos funcionales del receptor de dopamina D_2 . Los resultados determinaron que la concentración óptima de (\pm)DOI

para activar el receptor 5-HT_{2A} sin que se viese afectada la funcionalidad del receptor D₂ fue 100 nM (aproximadamente su valor de EC₅₀) (Figura 63, Tabla 45).

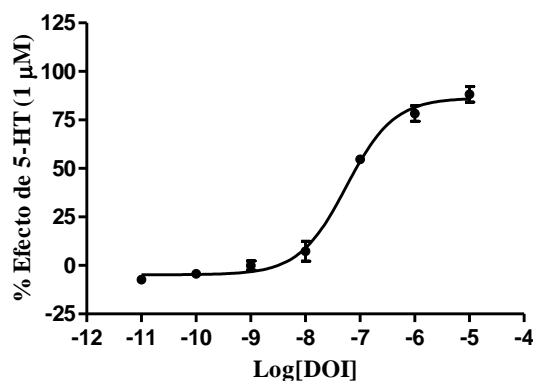


Figura 63. Curva concentración-respuesta del agonista alucinógeno del receptor de serotonina 5-HT_{2A} (±)DOI sobre la producción de IPs dependiente de la proteína G_q, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 45. Potencia (EC₅₀) del agonista alucinógeno (±)DOI para activar la producción de IPs dependiente de la vía G_q del receptor 5-HT_{2A}, en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

	EC ₅₀ (nM)	pEC ₅₀
(±)DOI	39.7 ± 23.6	7.4 ± 0.3

Los ensayos de funcionalidad del receptor de dopamina D₂ determinaron que la activación del receptor de serotonina 5-HT_{2A} por el agonista alucinógeno (±)DOI moduló la eficacia, pero no la potencia de la dopamina para inhibir la producción de AMPc dependiente de la proteína G_{i/o} (Figura 64, Tabla 46). En este sentido, el análisis estadístico mediante el test t de *Student* estableció que hubo diferencias significativas entre cada una de las concentraciones de la curva de dopamina modulada por el tratamiento con (±)DOI con respecto a la curva control, desplazándose la primera hacia mayores niveles de AMPc con respecto a la segunda. Ello indicó que la dopamina, en presencia del receptor 5-HT_{2A} activado por (±)DOI, tuvo menor capacidad para reducir los niveles de AMPc intracelulares, partiendo de concentraciones basales de este segundo mensajero más elevadas. Como se puede

observar en la figura 64, el (\pm)DOI solo mostró este efecto cuando las células fueron previamente expuestas a doxiciclina, por lo que esta regulación funcional del receptor D_2 fue mediada por el receptor $5-HT_{2A}$.

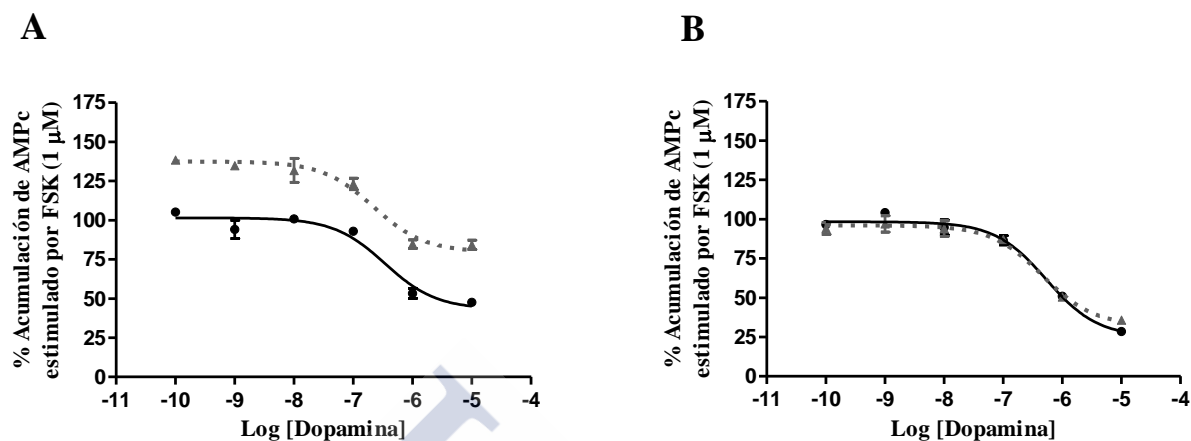


Figura 64. Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor D_2 dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK ($1 \mu\text{M}$) dependiente de $G_{i/o}$, solo (\bullet) y en presencia del agonista alucinógeno del receptor $5-HT_{2A}$ (\pm)DOI ($0.1 \mu\text{M}$) (\blacktriangle), en células tratadas (A) y no tratadas con doxiciclina (B) 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ($n=3$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 46. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de la dopamina para inhibir la producción de AMPc estimulada por FSK $1 \mu\text{M}$ dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 , en ausencia y presencia de (\pm)DOI, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

		-DOX			
COMPUESTOS		EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)	E_{min} (%)
Dopamina	- (\pm)DOI	417 ± 101.2	6.4 ± 0.1	72.4 ± 3.6	10.5 ± 7.7
	+ (\pm)DOI	397 ± 60.0	6.4 ± 0.1	69.5 ± 7.4	7.8 ± 3.8
		+DOX			
COMPUESTOS		EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)	E_{min} (%)
Dopamina	- (\pm)DOI	305 ± 143.0	6.5 ± 0.2	58.9 ± 8.5	2.2 ± 7.0
	+ (\pm)DOI	315 ± 141.0	6.5 ± 0.2	$29.9 \pm 7.0^*$	$-23.2 \pm 11.0^*$

* $p < 0.05$ con respecto a la curva de dopamina control sin (\pm)DOI (test t de Student).

Adicionalmente, se realizó un ensayo de competición del alucinógeno (\pm)DOI con el radioligando [3 H]-espiperona por el receptor de dopamina D₂ con el objetivo de verificar la ausencia de afinidad de este compuesto por el mismo. Como se muestra en la figura 65, se confirmó que el agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI no tuvo afinidad por el receptor D₂, por lo que su efecto funcional en este último no fue dado por activación directa del mismo.

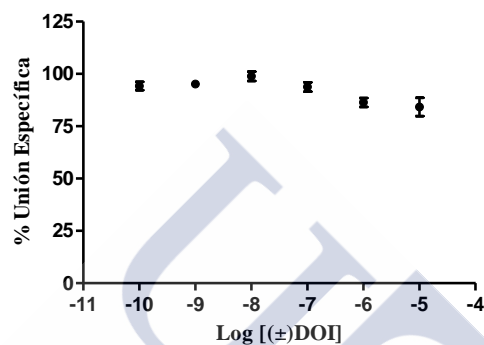


Figura 65. Curvas de competición del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI con el radioligando [3 H]-espiperona por la unión al receptor D₂ en membranas obtenidas de células no tratadas con doxiciclina. Se muestra un experimento representativo con puntos por triplicado.

Asimismo, se llevó a cabo un ensayo funcional para estudiar si el fármaco alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI provocaba un aumento de AMPc. Como puede observarse en la figura 66, (\pm)DOI no tuvo afinidad por el receptor 5-HT₇, lo que permitió descartar la implicación de este último en el efecto modulador del compuesto psicotrópico en la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂.

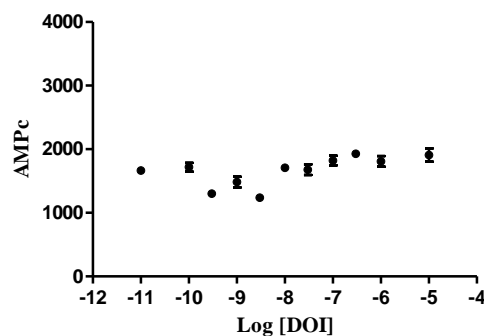


Figura 66. Curvas concentración-respuesta del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI sobre la acumulación de AMPc dependiente de proteína G_s del receptor 5-HT₇, en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un ensayo representativo de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

Con el objetivo de verificar que el efecto del alucinógeno (\pm)DOI se debió a la heterodimerización de los receptores D_2 y $5-HT_{2A}$, se utilizó al antagonista selectivo del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ ketanserina a dos concentraciones diferentes (1 y $0.1 \mu\text{M}$) y se observó que la modulación ejercida por el (\pm)DOI fue revertida por el mismo, de tal manera que los niveles de AMPc de la curva de dopamina, en presencia de (\pm)DOI y ketanserina, se equipararon a los generados en la curva de dopamina control, detectándose una ausencia de diferencias significativas (test estadístico ANOVA) (Figura 67, Tabla 47). Como puede observarse en la figura 67, la concentración más alta de ketanserina fue la que tuvo mayor poder de restitución funcional del receptor D_2 .

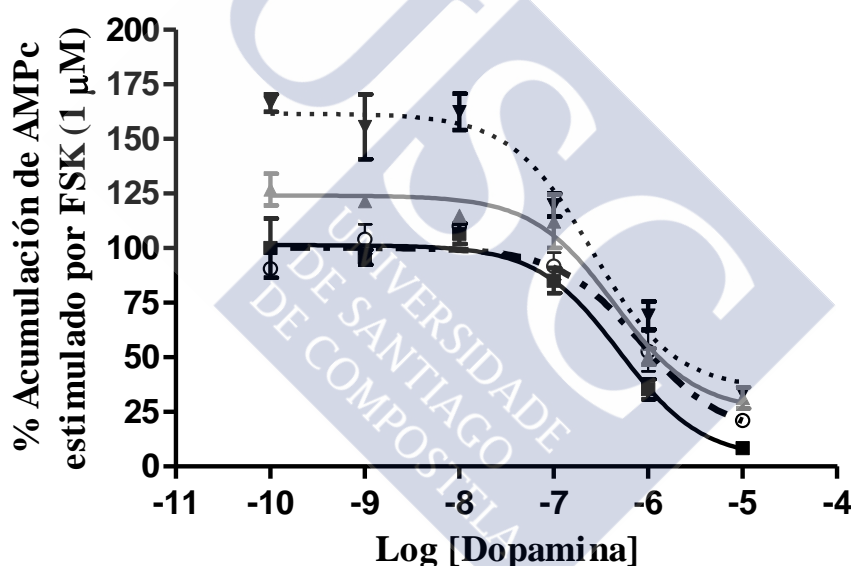


Figura 67. Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor D_2 dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK ($1 \mu\text{M}$) dependiente de $G_{i/o}$, solo (\blacksquare), en presencia de (\pm)DOI $0.1 \mu\text{M}$ (\blacktriangledown), (\pm)DOI y ketanserina $0.1 \mu\text{M}$ (\blacktriangle), y (\pm)DOI y ketanserina $1 \mu\text{M}$ (\star), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de dos ($n=2$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 47. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de la dopamina para inhibir la producción de AMPc dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 sola, en presencia de (\pm)DOI 0.1 μ M, (\pm)DOI y ketanserina 0.1 μ M, y (\pm)DOI y ketanserina 1 μ M, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)	E_{min} (%)
Dop		363 \pm 193	6.5 \pm 0.2	77.5 \pm 27.0	-4.7 \pm 4.7
	+ (\pm)DOI	235 \pm 31.1	6.6 \pm 0.6	54.3 \pm 14.8*	-59.2 \pm 3.5*
	+ (\pm)DOI y Ketanserina 0.1 μ M	559 \pm 174	6.3 \pm 0.1	66.5 \pm 11.9	-34.0 \pm 13.9
	+ (\pm)DOI y Ketanserina 1 μ M	484 \pm 482	6.5 \pm 0.5	66.2 \pm 27.4	-14.9 \pm 20.6

* $p < 0.05$ con respecto a la curva de dopamina control (test estadístico ANOVA)

3. Los efectos del (\pm)DOI mediados por el receptor 5-HT_{2A} sobre la funcionalidad del receptor D₂ activado por dopamina no se debieron a una alteración de la afinidad del agonista endógeno por su receptor.

Los ensayos de unión de radioligandos demostraron que los parámetros de afinidad de la dopamina por el receptor D₂ no fueron modulados por el tratamiento con el agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI. El análisis estadístico mediante el test ANOVA estableció una ausencia de diferencias significativas entre los parámetros de unión de las distintas curvas de dopamina (curva control y curva de dopamina con concentraciones gradualmente crecientes de (\pm)DOI -0.1, 1 y 10 μ M-) (Figura 68, Tabla 48). Por tanto, la modulación funcional que ejerció el (\pm)DOI sobre el receptor D₂ mediante la activación del receptor 5-HT_{2A} no es atribuible a una alteración en las propiedades de unión de la dopamina.

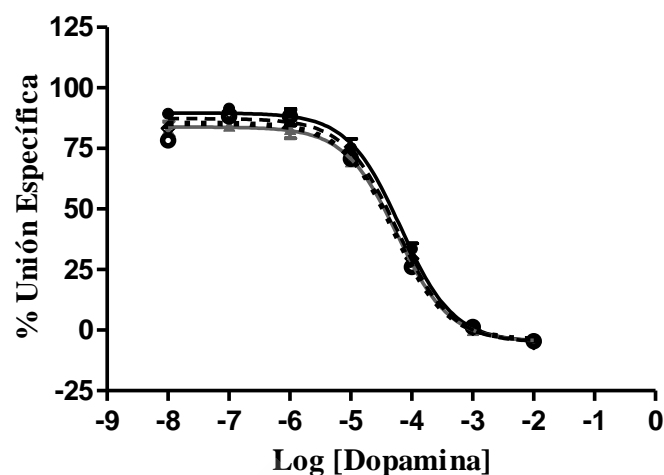


Figura 68. Curvas de competición del agonista dopamina con el radioligando [^3H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D_2 en ausencia (●), y presencia de (\pm)DOI a diferentes concentraciones, 0.1 (▲), 1 (⊛) y 10 μM (◆) en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes ($n=3$) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 48. Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de dopamina D_2 de la dopamina en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI (0.1, 1 y 10 μM) en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTOS		K_i (μM)	$\text{p}K_i$
Dopamina	- (\pm)DOI	33.9 ± 7.19	4.48 ± 0.09
	(\pm)DOI 0.1 μM	28.5 ± 7.47	4.55 ± 0.11
	(\pm)DOI 1 μM	29.6 ± 4.65	4.53 ± 0.07
	(\pm)DOI 10 μM	28 ± 7.53	4.56 ± 0.11

4. El bloqueo del receptor 5-HT_{2A} por ketanserina moduló la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂ estimulado por dopamina.

Previamente al bloqueo del receptor 5-HT_{2A}, se realizó una curva concentración-respuesta de su antagonista selectivo ketanserina sobre la acumulación de IPs dependiente de G_q, con el fin de determinar la concentración óptima del ligando a utilizar en los ensayos funcionales del receptor D₂. Los resultados establecieron que la concentración adecuada de ketanserina para bloquear el receptor 5-HT_{2A} sin que se viese afectada la funcionalidad del receptor D₂ fue 100 nM (aproximadamente su valor de IC₅₀) (Figura 69, Tabla 49).

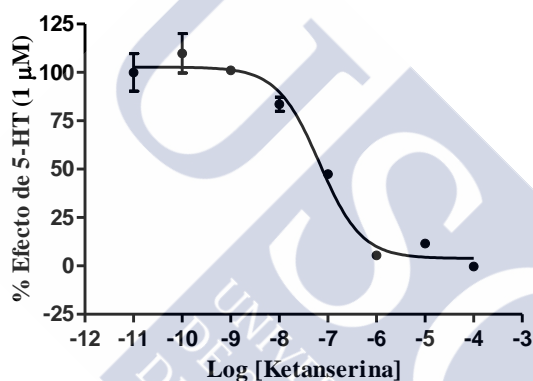


Figura 69. Curvas concentración-respuesta del antagonista selectivo del receptor de serotonina 5-HT_{2A} ketanserina sobre la producción de IPs dependiente de la proteína G_q, en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la representación gráfica de un ensayo realizado con puntos por triplicado.

Tabla 49. Potencia (IC₅₀) del antagonista selectivo del receptor de serotonina 5-HT_{2A} ketanserina para inhibir la producción de IPs dependiente de la vía G_q, en células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la representación gráfica de un ensayo realizado con puntos por triplicado.

	IC ₅₀ (nM)	pIC ₅₀
Ketanserina	66.9	7.1

Los ensayos funcionales de AMPc establecieron que el bloqueo del receptor de serotonina 5-HT_{2A} por su antagonista selectivo ketanserina moduló la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂ activado por dopamina (Figura 70, Tabla 50). El análisis estadístico realizado mediante el test t de *Student* determinó que en presencia de ketanserina, la curva de dopamina se desplazó significativamente hacia niveles más bajos de AMPc con respecto a la curva control, lo que sugirió que el antagonista selectivo del receptor 5-HT_{2A} aumentó la eficacia de la dopamina para activar el receptor D₂ y en definitiva, inhibir la adenilato ciclasa, siendo reducidos los niveles de AMPc por debajo de concentraciones basales. Como puede observarse en la figura 70, la ketanserina solo mostró este efecto cuando las células habían sido previamente expuestas a doxiciclina, lo que demostró que esta regulación funcional del receptor D₂ fue mediada por el receptor 5-HT_{2A}. No obstante, no se observaron diferencias significativas en la potencia de la dopamina para estimular el receptor D₂, tras el bloqueo del receptor 5-HT_{2A} por ketanserina.

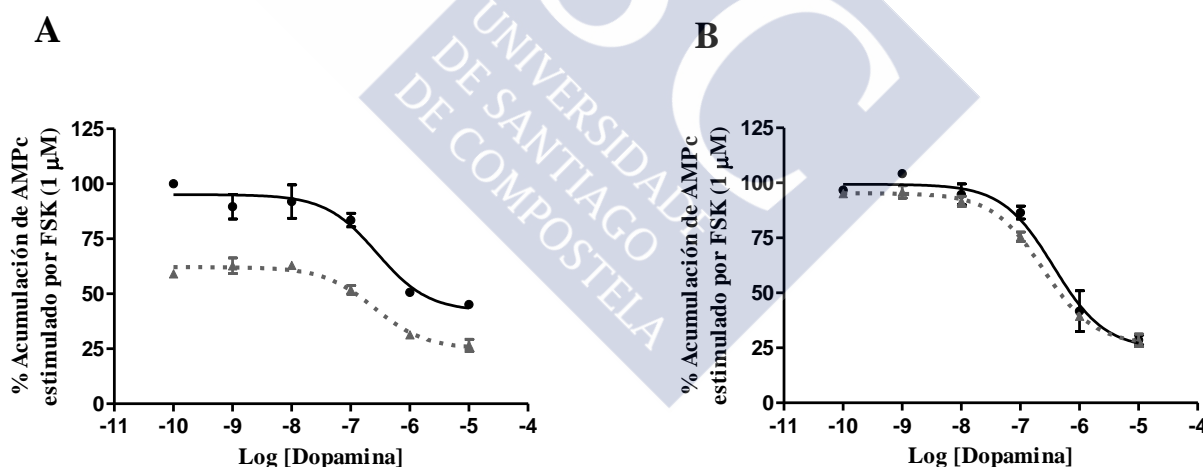


Figura 70. Curvas concentración-respuesta del agonista endógeno del receptor D₂ dopamina sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK (1 μM) dependiente de G_{i/o}, solo (●) y en presencia del antagonista del receptor 5-HT_{2A} ketanserina (100 nM) (▲), en células tratadas (A) y no tratadas con doxiciclina (B) 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 50. Potencia y eficacia (EC_{50} y E_{max}) de la dopamina para inhibir la producción de AMPc dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 , en ausencia y presencia de ketanserina, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

		-DOX			
COMPUESTOS		EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)	E_{min} (%)
Dopamina	- Ketanserina	417 \pm 101.2	6.4 \pm 0.1	72.4 \pm 3.6	10.5 \pm 7.7
	+ Ketanserina	308 \pm 151.2	6.54 0.2	75 \pm 11.6	12.3 \pm 6.7
		+DOX			
COMPUESTOS		EC_{50} (nM)	pEC_{50}	E_{max} (%)	E_{min} (%)
Dopamina	- Ketanserina	305 \pm 143	6.5 \pm 0.2	58 \pm 8.5	2.2 \pm 6.9
	+ Ketanserina	323 \pm 80.8	6.5 \pm 0.1	80.1 \pm 6.1*	41.0 \pm 19.6*

*: $p < 0.001$ respecto a la curva de dopamina control sin ketanserina (test t de *Student*).

❖ **INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN Y MODULACIÓN DEL RECEPTOR 5-HT_{2A} EN LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR D₂ ANTAGONIZADO POR ANTIPSICÓTICOS**

1. La presencia del receptor 5-HT_{2A} no moduló la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 antagonizado por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina.

Los experimentos de funcionalidad del receptor de dopamina D_2 antagonizado por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina determinaron la ausencia de alteraciones en la potencia de estos ligandos por la presencia del receptor de serotonina 5-HT_{2A} (Figura 71, Tabla 51). De esta manera, el análisis estadístico realizado por el test t de *Student* estableció que no hubo diferencias significativas en la funcionalidad del receptor D_2 bloqueado por dichos antipsicóticos típicos cuando se coexpresaba con el receptor 5-HT_{2A}, con respecto a cuando se expresaba solo.

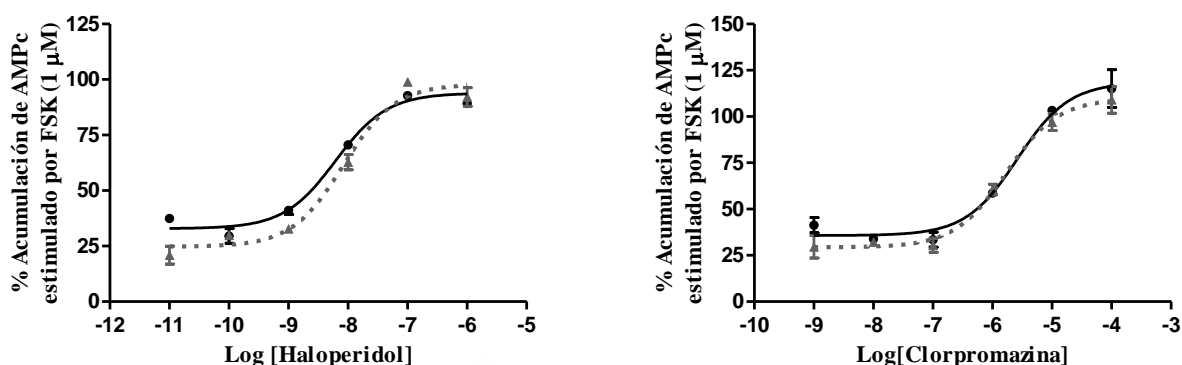


Figura 71. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μ M, sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 , en células sin tratar (\bullet) y tratadas (\blacktriangle) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres ($n=3$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 51. Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μ M, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

	-DOX			+DOX		
	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)
Haloperidol	8.7 ± 3.2	8.1 ± 0.1	113 ± 22.3	9.9 ± 2.2	8.0 ± 0.1	103 ± 12.9
Clorpromazina	383 ± 273.5	6.51 ± 0.3	112 ± 17.1	309 ± 97.9	6.5 ± 0.1	114 ± 12.7

2. La expresión del receptor 5-HT_{2A} no moduló la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂ antagonizado por los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol.

Los ensayos funcionales de acoplamiento de proteína G_{i/o} al receptor de dopamina D₂ antagonizado por los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol establecieron la ausencia de algún tipo de alteración funcional por la presencia del receptor de serotonina 5-HT_{2A} (Figura 72, Tabla 52). En este sentido, el análisis estadístico llevado a cabo mediante el test t de *Student* reveló que no hubo diferencias en la potencia de los antipsicóticos atípicos sobre el receptor D₂ en células que lo sobreexpresaban solo, con respecto a aquellas que lo coexpresaban con el receptor 5-HT_{2A}.

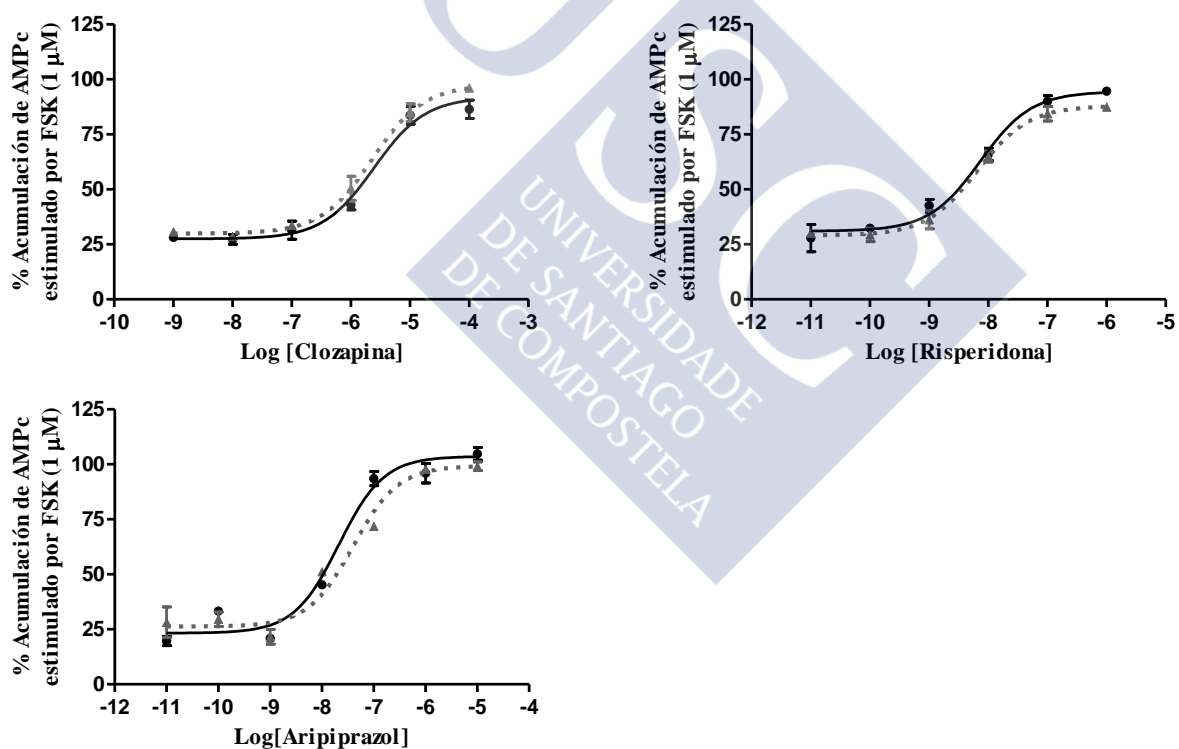


Figura 72. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μM, sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor de dopamina D₂, en células sin tratar (●) y tratadas (▲) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 52. Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina $1 \mu M$, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina $1 \mu M$ (E_{max} DA), en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante **24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.**

	-DOX			+DOX		
	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)	IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)
Clozapina	4100 ± 2800	5.5 ± 0.3	103 ± 6.5	3140 ± 2299	5.6 ± 0.3	84.3 ± 18.9
Risperidona	8.0 ± 0.9	8.1 ± 0.0	98.7 ± 12.3	8.0 ± 1.3	8.1 ± 0.1	88.4 ± 3.1
Aripiprazol	61.9 ± 54.7	7.3 ± 0.4	102 ± 5.5	73.8 ± 9.2	7.13 ± 0.1	96.7 ± 7.0

3. La activación del receptor $5-HT_{2A}$ por el agonista alucinógeno (\pm)DOI moduló la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 bloqueado por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina.

Los ensayos de funcionalidad del receptor D_2 determinaron que la activación del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ por su agonista alucinógeno (\pm)DOI moduló la producción de AMPc dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 antagonizado por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina (Figura 73, Tabla 53). Como puede observarse en la figura 73, el tratamiento con (\pm)DOI en células que expresaban el heterodímero D_2-5-HT_{2A} indujo un desplazamiento paralelo de las curvas dosis-respuesta de haloperidol y clorpromazina hacia mayores niveles de AMPc con respecto a la curva control. Según el test estadístico t de *Student*, las diferencias entre cada concentración gradualmente mayor de la curva de antipsicóticos en presencia de (\pm)DOI en relación a la curva control fueron significativas. Asimismo, se confirmó que el efecto del (\pm)DOI fue mediado por el receptor de serotonina $5-HT_{2A}$, puesto que no era desencadenado en células no tratadas con doxiciclina y que por tanto no expresaban dicho receptor.

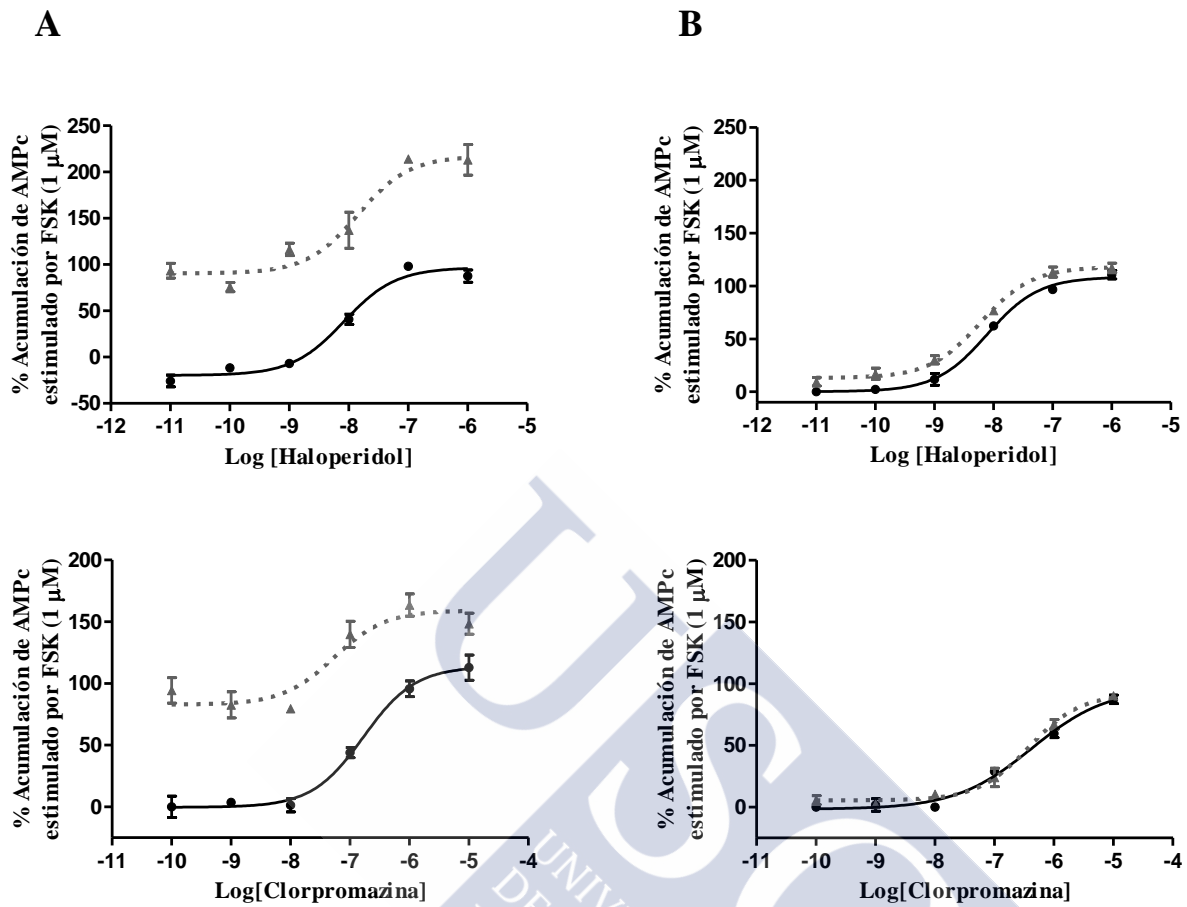


Figura 73. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μ M, sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 , solos (●) y en presencia del agonista alucinógeno del receptor 5-HT $_{2A}$ (\pm)DOI (100 nM) (▲), en células tratadas (A) y sin tratar (B) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 53. Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μ M, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA y E_{min} DA), en ausencia y presencia de (\pm)DOI, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

		-DOX			
COMPUESTOS		IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)	E_{min} DA (%)
Haloperidol	- (\pm)DOI	8.7 \pm 3.2	8.1 \pm 0.1	113 \pm 12.9	27.1 \pm 5.1
	+ (\pm)DOI	5.6 \pm 0.4	8.2 \pm 0.0	122 \pm 5.4	1.1 \pm 17.0
Clorpromazina	- (\pm)DOI	383 \pm 273.5	6.5 \pm 0.3	112 \pm 17.1	37.7 \pm 17.3
	+ (\pm)DOI	360 \pm 179.5	6.5 \pm 0.2	112 \pm 15.3	14.3 \pm 15.7
		+DOX			
COMPUESTOS		IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)	E_{min} DA (%)
Haloperidol	- (\pm)DOI	9.9 \pm 2.2	8.0 \pm 0.1	103 \pm 12.9	26.9 \pm 12.2
	+ (\pm)DOI	10.7 \pm 3.5	8.0 \pm 0.2	182 \pm 31.6*	56.7 \pm 30.6*
Clorpromazina	- (\pm)DOI	309 \pm 97.9	6.5 \pm 0.1	114 \pm 12.7	36.5 \pm 8.4
	+ (\pm)DOI	228 \pm 228.3	6.8 \pm 0.4	159 \pm 29.5*	74.6 \pm 12.2*

*: $p < 0.001$ respecto a las curvas de haloperidol y clozapina control sin (\pm)DOI (test t de Student).

Con el objetivo de verificar que el efecto del (\pm)DOI en la regulación de la vía de señalización $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 bloqueado por los antipsicóticos típicos era mediado por el receptor de serotonina 5-HT_{2A}, se utilizó un antagonista competitivo selectivo del mismo (ketanserina), habiéndose ratificado que dicho efecto fue significativamente reversible (test estadístico ANOVA) (Figura 74, Tabla 54). Por tanto, se confirmó que el efecto del (\pm)DOI no fue directo sobre el receptor D_2 , sino que se produjo por un *crosstalk* funcional de los receptores del heterodímero D_2 -5-HT_{2A}, tras la activación del receptor 5-HT_{2A} por el agonista alucinógeno.

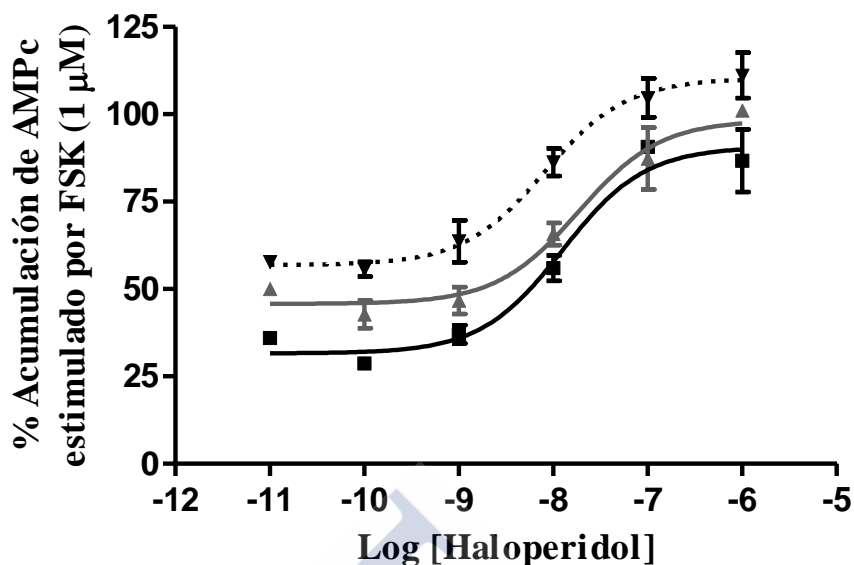


Figura 74. Curvas concentración-respuesta del antipsicótico típico haloperidol, en presencia de dopamina 1 μM , sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK (1 μM) dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 , solo (■), en presencia de (\pm)DOI 0.1 μM (▼) y (\pm)DOI y ketanserina 0.1 μM (▲), en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de dos ($n=2$) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 54. Potencia (IC_{50}) del antipsicótico típico haloperidol, en presencia de dopamina 1 μM , para antagonizar el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina ($E_{\text{max dop}}$ $E_{\text{min dop}}$), solo, en presencia de (\pm)DOI 0.1 μM y (\pm)DOI y ketanserina 0.1 μM , en células tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de dos ($n=2$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		IC_{50} (nM)	pIC_{50}	$E_{\text{max DA}}$ (%)	$E_{\text{min DA}}$ (%)
Haloperidol	Solo	13.8 ± 4.8	7.9 ± 0.2	113.0 ± 8.3	-7.0 ± 5.5
	+ (\pm)DOI	22.7 ± 20.6	7.8 ± 0.5	$174.0 \pm 4.3^*$	$45.0 \pm 5.8^*$
	+ (\pm)DOI y Ket.	23 ± 6.7	7.6 ± 0.1	143 ± 8.7	18.4 ± 7.0

*: $p < 0.05$ respecto a la curvas de haloperidol control (test ANOVA).

4. El efecto del (\pm)DOI mediado por el receptor 5-HT_{2A} sobre la funcionalidad del receptor D₂ antagonizado por haloperidol no se debió a una alteración de la afinidad del antipsicótico típico.

Los ensayos de unión de radioligandos determinaron que la exposición a (\pm)DOI de células previamente tratadas con doxiciclina y que por tanto expresaban el heterodímero D₂-5-HT_{2A} no alteró la afinidad del antipsicótico típico haloperidol por el receptor D₂ (Figura 75, Tabla 55). El análisis estadístico mediante el test ANOVA estableció una ausencia de diferencias significativas entre la constante de disociación K_i del haloperidol solo y en presencia de concentraciones gradualmente crecientes de (\pm)DOI (0.1, 1 y 10 μ M). Estos resultados confirmaron que el efecto del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI sobre la funcionalidad del receptor D₂ bloqueado por haloperidol no se debió a una modulación de la afinidad del antipsicótico típico.

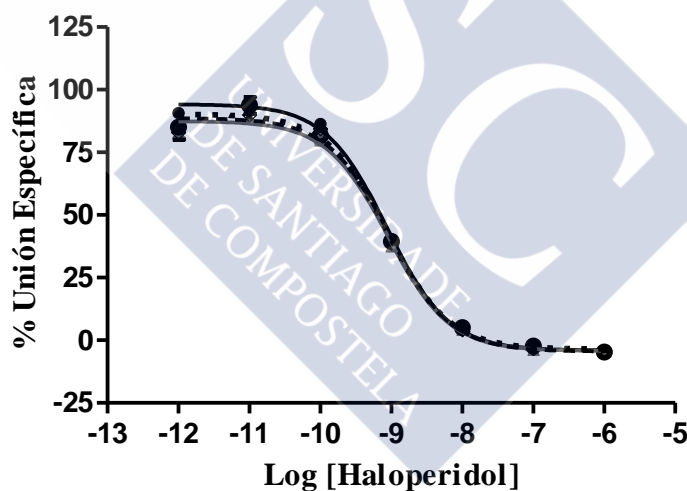


Figura 75. Curvas de competición del antipsicótico típico haloperidol con el radioligando [³H]-espiperona por la unión al receptor de dopamina D₂ en ausencia (●), y presencia de (\pm)DOI a diferentes concentraciones, 0.1 (▲), 1 (✱) y 10 μ M (◆) en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de dos ensayos independientes (n=2) realizado con puntos por duplicado.

Tabla 55. Parámetros de afinidad (K_i) por el receptor de dopamina D_2 del antipsicótico típico haloperidol, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones del agonista alucinógeno del receptor $5-HT_{2A}$ (\pm)DOI (0.1, 1 y 10 μ M), en membranas obtenidas de células previamente tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de dos ($n=2$) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTOS		K_i (nM)	pK_i
Haloperidol	- (\pm)DOI	4.4 ± 0.4	8.4 ± 0.0
	(\pm)DOI 0.1 μ M	4.1 ± 0.5	8.4 ± 0.5
	(\pm)DOI 1 μ M	4.4 ± 0.1	8.3 ± 0.0
	(\pm)DOI 10 μ M	4.6 ± 0.5	8.3 ± 0.0

5. La activación del receptor $5-HT_{2A}$ por el agonista alucinógeno (\pm)DOI moduló el antagonismo de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 .

Los ensayos de medida de los niveles de AMPc establecieron que la activación del receptor $5-HT_{2A}$ por el agonista alucinógeno (\pm)DOI produjo una modulación en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 bloqueado por los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol (Figura 76, Tabla 56). Como puede observarse en la figura 76, la exposición a (\pm)DOI generó un desplazamiento hacia mayores niveles de AMPc de la curva dosis-respuesta de los distintos antipsicóticos atípicos con respecto a la curva control, que según el test estadístico t de *Student* fue significativo. En el caso de la clozapina y la risperidona, ambas curvas prácticamente convergieron a la concentración más alta de antipsicótico, alcanzando niveles equiparables de AMPc. Sin embargo, la curva de aripiprazol en presencia de (\pm)DOI configuró un perfil semejante al de los antipsicóticos típicos, pues se desplazó hacia mayores niveles de AMPc de forma paralela con respecto a la curva control. Por otro lado, se observó que la potencia de los antipsicóticos atípicos para antagonizar el receptor de dopamina D_2 no cambió significativamente en presencia de (\pm)DOI.

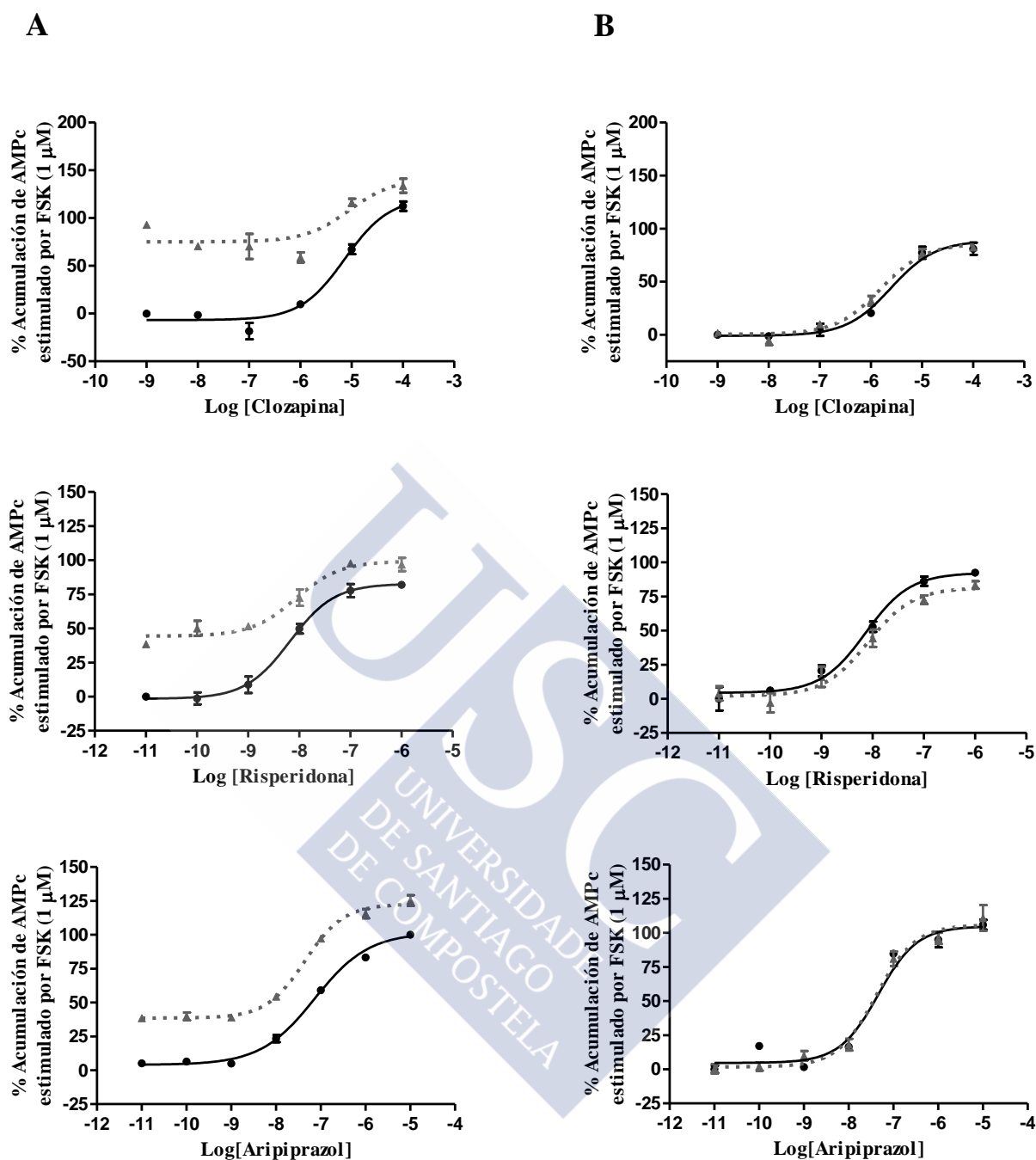


Figura 76. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μ M, sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSK en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 , solos (\bullet) y en presencia del agonista alucinógeno del receptor 5-HT_{2A} (\pm)DOI (100 nM) (\blacktriangle), en células tratadas (A) y sin tratar (B) con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 56. Potencia (IC₅₀) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μM, para bloquear el receptor D₂, y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA E_{min} DA), en ausencia y presencia de (±)DOI, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

COMPUESTOS		-DOX			
		IC ₅₀ (nM)	pIC ₅₀	E _{max} DA (%)	E _{min} DA (%)
Clozapina	- (±)DOI	4100 ± 2800	5.5 ± 0.3	103 ± 6.5	33.4 ± 10.4
	+ (±)DOI	4750 ± 3100	5.4 ± 0.3	95.6 ± 11.7	9.1 ± 7.2
Risperidona	- (±)DOI	8.0 ± 1.0	8.1 ± 0.0	98.7 ± 12.3	27.7 ± 7.8
	+ (±)DOI	13.6 ± 8.0	7.9 ± 0.2	103 ± 28.8	-0.5 ± 7.4
Aripiprazol	- (±)DOI	61.9 ± 54.7	7.3 ± 0.4	102 ± 5.5	18.3 ± 7.1
	+ (±)DOI	52.3 ± 16.0	7.3 ± 0.1	102 ± 4.8	7.2 ± 7.8
COMPUESTOS		+DOX			
		IC ₅₀ (nM)	pIC ₅₀	E _{max} DA (%)	E _{min} DA (%)
Clozapina	- (±)DOI	3100 ± 2300	5.6 ± 0.3	84.3 ± 19	29 ± 9.4
	+ (±)DOI	1480 ± 1530	4.97 ± 0.4	105 ± 29.1*	57.1 ± 12.1*
Risperidona	- (±)DOI	8.0 ± 1.3	8.1 ± 0.1	88.4 ± 3.1	24 ± 5.8
	+ (±)DOI	9.5 ± 3.1	8.0 ± 0.1	99.5 ± 2.3**	40.8 ± 9.5**
Aripiprazol	- (±)DOI	73.8 ± 9.2	7.1 ± 0.1	96.7 ± 7.0	24.3 ± 4.4
	+ (±)DOI	59.1 ± 24.0	7.25 ± 0.2	147 ± 33.9***	47.3 ± 26.5***

*: p < 0.001 respecto a la curva de clozapina control sin (±)DOI (test t de Student).

** : p < 0.001 respecto a la curva de risperidona control sin (±)DOI (test t de Student).

***: p < 0.05 respecto a la curva de aripiprazol control sin (±)DOI (test t de Student).

6. El bloqueo del receptor 5-HT_{2A} por ketanserina no alteró la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂ antagonizado por antipsicóticos típicos.

Los ensayos funcionales de AMPc determinaron que el bloqueo del receptor de serotonina 5-HT_{2A} por ketanserina no generó ninguna alteración en la potencia de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina para antagonizar la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor de dopamina D₂ (Figura 77, Tabla 57). Así, el test estadístico *t Student* estableció que no hubo diferencias significativas en la potencia de dichos antipsicóticos típicos para bloquear el receptor 5-HT_{2A}, en ausencia y presencia de ketanserina.

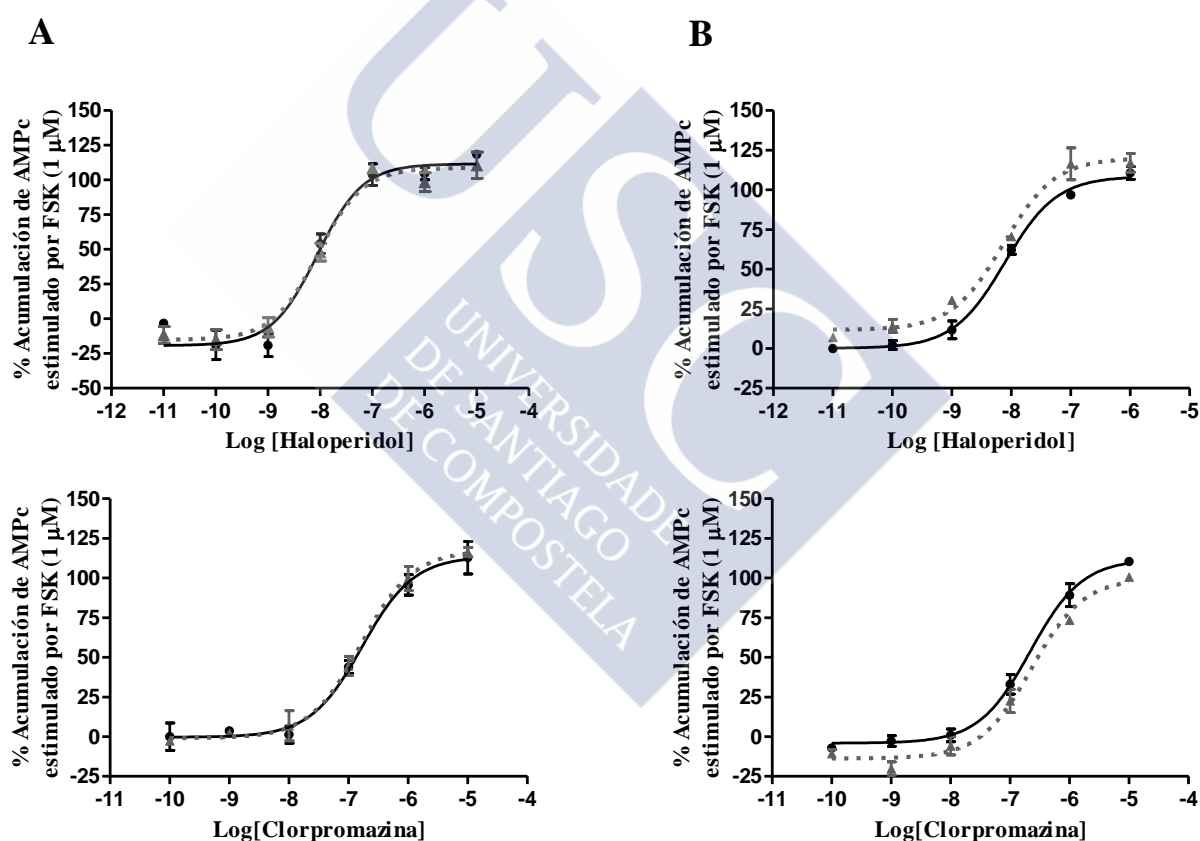


Figura 77. Curvas concentración-respuesta de haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina 1 μ M, sobre la acumulación de AMPc dependiente de G_{i/o} del receptor D₂, solos (●) y presencia de ketanserina (▲), en células tratadas (A) y no tratadas con doxiciclina (B) 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 57. Potencia (IC_{50}) de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, en presencia de dopamina $1 \mu M$, para bloquear el receptor D_2 , y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA), en ausencia y presencia de ketanserina, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media \pm eem de un total de tres ($n=3$) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

		- DOX		
COMPUESTOS		IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)
Haloperidol	- Ketanserina	8.7 ± 3.2	8.1 ± 0.1	113 ± 22.3
	+ Ketanserina	5.9 ± 1.3	8.2 ± 0.1	129 ± 10.5
Clorpromazina	- Ketanserina	383 ± 273.5	6.5 ± 0.3	112 ± 17.1
	+ Ketanserina	326 ± 197.3	6.55 ± 0.3	104 ± 17.2
		+ DOX		
COMPUESTOS		IC_{50} (nM)	pIC_{50}	E_{max} DA (%)
Haloperidol	- Ketanserina	9.9 ± 2.2	8.0 ± 0.1	103 ± 12.9
	+ Ketanserina	8.5 ± 4.1	8.1 ± 0.3	94 ± 19.2
Clorpromazina	- Ketanserina	309 ± 97.9	6.5 ± 0.1	114 ± 12.7
	+ Ketanserina	272 ± 120.5	6.6 ± 0.2	125 ± 8.9

7. El bloqueo del receptor $5-HT_{2A}$ por ketanserina no modificó la potencia de los antipsicóticos atípicos para antagonizar el receptor D_2 .

Los ensayos funcionales de medida de AMPc determinaron que el bloqueo del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ por ketanserina no alteró la potencia de clozapina, risperidona y aripiprazol para antagonizar la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 (Figura 78, Tabla 58). En este sentido, el análisis estadístico mediante el test t de *Student* estableció que no hubo diferencias significativas entre los parámetros de potencia de los antipsicóticos atípicos para antagonizar el receptor D_2 , en ausencia y presencia de ketanserina.

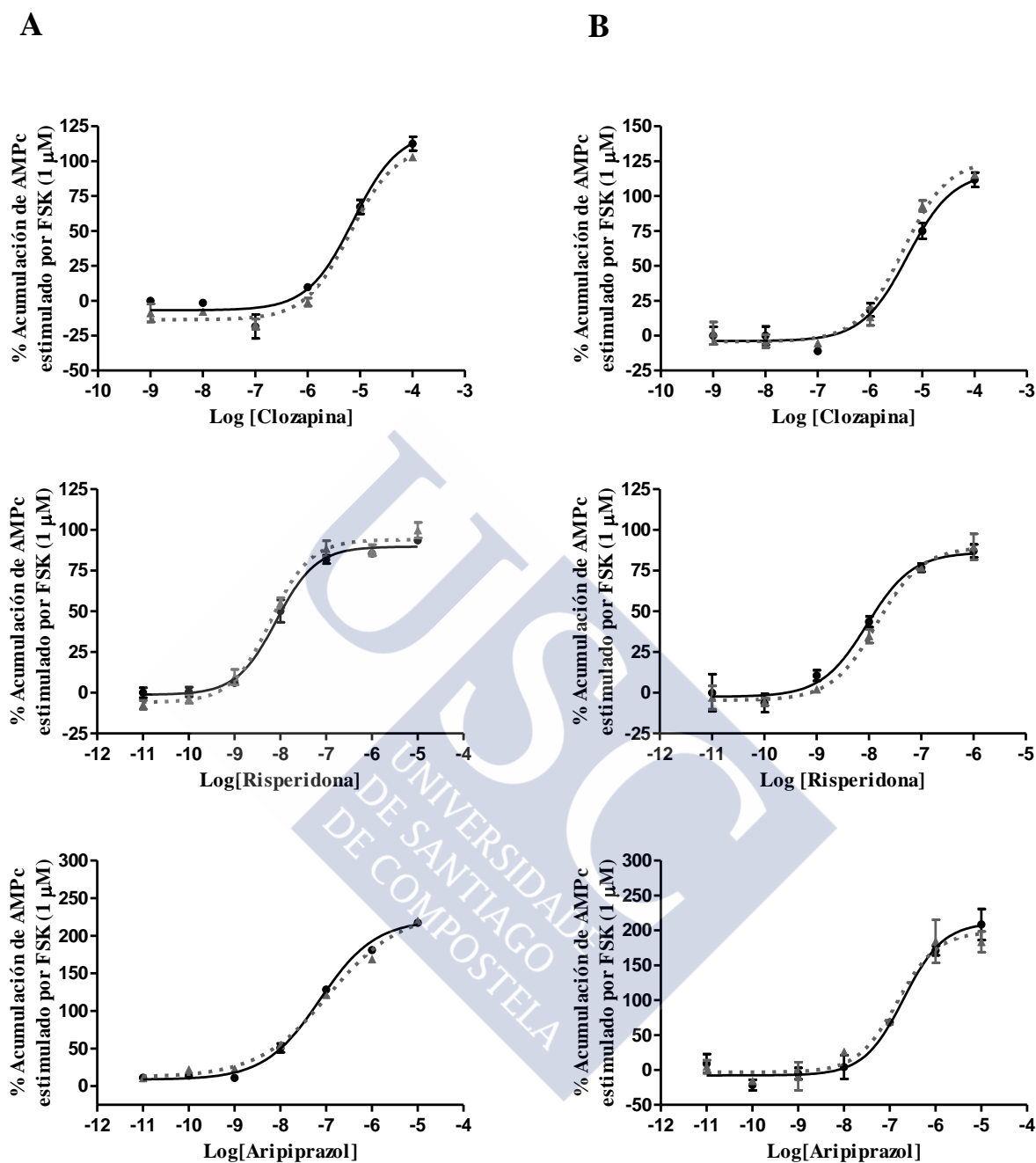


Figura 78. Curvas concentración-respuesta de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μ M, sobre la acumulación de AMPc estimulado por FSK (1 μ M) dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 , solos (●) y en presencia de ketanserina (▲), en células tratadas (A) y no tratadas con doxiciclina (B) 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) ensayos independientes realizados por puntos por triplicado.

Tabla 58. Potencia (IC₅₀) de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, en presencia de dopamina 1 μM, para bloquear el receptor D₂, y su efecto en la modulación de la eficacia de la dopamina (E_{max} DA), en ausencia y presencia de ketanserina, en células no tratadas y tratadas con doxiciclina 10 ng/ml durante 24 horas. Se muestra la media ± eem de un total de tres (n=3) experimentos independientes realizados con puntos por triplicado.

		- DOX		
COMPUESTOS		IC₅₀ (nM)	pIC₅₀	E_{max} DA (%)
Clozapina	- Ketanserina	4100 ± 2800	5.5 ± 0.3	103 ± 6.5
	+ Ketanserina	3940 ± 9300	5.4 ± 0.1	106 ± 14.7
Risperidona	- Ketanserina	8.0 ± 1.0	8.1 ± 0.0	98.7 ± 12.3
	+ Ketanserina	10.3 ± 4.1	8.0 ± 0.2	103 ± 30.2
Aripiprazol	- Ketanserina	61.9 ± 54.7	7.3 ± 0.4	102 ± 5.5
	+ Ketanserina	87.1 ± 83.7	7.2 ± 0.5	89.8 ± 7.4
		+ DOX		
COMPUESTOS		IC₅₀ (nM)	pIC₅₀	E_{max} DA (%)
Clozapina	- Ketanserina	3140 ± 2299	5.6 ± 0.3	84.3 ± 18.9
	+ Ketanserina	2070 ± 1180	5.8 ± 0.3	87.9 ± 18.1
Risperidona	- Ketanserina	10.3 ± 4.1	8.0 ± 0.2	103 ± 30.2
	+ Ketanserina	9.3 ± 3.0	8.0 ± 0.1	85.4 ± 14
Aripiprazol	- Ketanserina	73.8 ± 9.2	7.1 ± 0.0	96.7 ± 7.0
	+ Ketanserina	129 ± 71.0	6.9 ± 0.2	106 ± 18.3



DISCUSIÓN



El principal hallazgo de la presente tesis doctoral es la observación de un *cross-talk* funcional que engloba fenómenos de cooperatividad entre los receptores del heterodímero D₂-5-HT_{2A}. La existencia de procesos de modulación alostérica en este heterocomplejo sustenta la integración de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico en la fisiopatología y psicofarmacología de la esquizofrenia.

La esquizofrenia es un trastorno mental crónico que afecta a más de 21 millones de personas en el mundo, caracterizado por una distorsión psicótica de la realidad y de las percepciones sensoriales (esto es, alucinaciones y delirios), junto con apatía y retraimiento social, así como daño cognitivo (van Os y Kapur, 2009). Este desorden mental se presenta en la adolescencia o edad adulta temprana y carece de una causa concreta, siendo por tanto una enfermedad de naturaleza multifactorial, cuyo desarrollo se fundamenta en factores genéticos (genes codificantes de proteínas del desarrollo, como DISC-1, NRG1 o la reelina; genes de la región 22q11; etc.) y elementos ambientales (complicaciones durante el desarrollo del feto, consumo de drogas, etc.), que a su vez pueden condicionar la expresión de los receptores en las neuronas. Asimismo, la esquizofrenia es de difícil diagnóstico temprano, debido a la ausencia de biomarcadores asociados, basándose principalmente en el estudio mental del paciente durante un periodo de tiempo que puede llegar a los 6 meses (Lewis y Lieberman, 2000; Frangou, 2008; Owen y cols., 2016).

En el estudio de la esquizofrenia, se ha descrito un gran abanico de posibles dianas farmacológicas implicadas en su fisiopatología. Sin embargo, hasta la actualidad, los tratamientos farmacológicos más eficaces se relacionan con dos receptores: el receptor de dopamina D₂ y el receptor de serotonina 5-HT_{2A}.

El descubrimiento fortuito de la eficacia antipsicótica de la clorpromazina por bloqueo de receptores de dopamina D₂, condujo al desarrollo farmacológico de los primeros antipsicóticos, los llamados neurolépticos convencionales, además de aportar la primera prueba de que este receptor está ligado a la sintomatología de la esquizofrenia. Más tarde, se observó que agentes potenciadores del sistema dopaminérgico, como la cocaína, exacerbaban los síntomas positivos de personas que padecen este trastorno mental (Harrison, 1999; Karam y cols., 2010). Por otro lado, el hallazgo de que determinadas sustancias alucinógenas, como el LSD o el (±)DOI,

actúan como agonistas del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, puso de relieve la importancia de este receptor en la fisiopatología de la esquizofrenia. Adicionalmente, el antagonismo del receptor 5-HT_{2A} característico de los antipsicóticos de segunda generación y la implicación de este receptor en el perfil atípico de los mismos (ausencia de efectos secundarios extrapiramidales, hiperprolactinemia y eficacia en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos) determinaron su protagonismo indiscutible en el desarrollo de la esquizofrenia (Meltzer, 1989; Meltzer y Massey, 2011).

Desde hace años, se conoce que proteínas de membrana, como las tirosinas quinasas, las citoquinas o los factores de crecimiento son activas en forma oligomérica. Sin embargo, el concepto de oligomerización de los GPCRs es relativamente reciente. Actualmente, se ha demostrado que algunos GPCRs, como los receptores GABA funcionan exclusivamente como dímeros, mientras que otros, como los receptores de dopamina D₂ o los de serotonina 5-HT_{2A} están en equilibrio en sus formas mono- y homodiméricas, pudiendo interaccionar con receptores diferentes y dar lugar a los heterodímeros D₂-5-HT_{2A} y mGluR₂-5-HT_{2A}, entre otros. Asimismo, el descubrimiento de la selectividad funcional y el alosterismo añaden un mayor nivel de complejidad al sistema de regulación de los receptores. Por otro lado, el tipo de célula y el medio en el que ésta se localiza condiciona la expresión de los GPCRs, define el equilibrio entre los diversos estados conformacionales que pueden adquirir y restringe o promueve procesos de monomerización y oligomerización entre unidades iguales o distintas a su vez asociados a un desencadenamiento diferencial de múltiples sistemas de señalización efectores (Dalrymple y cols., 2008; Rozenfeld y Devi, 2010; Moreno y cols., 2013).

Varios estudios anteriores al descubrimiento del heterodímero D₂-5-HT_{2A} establecieron la colocalización de los receptores de dopamina D₂ y de serotonina 5-HT_{2A} en el área tegmental ventral del mesencéfalo, en la sustancia negra pars compacta y en el núcleo arcuato del hipotálamo (Doherty y Pickel, 2000; Nocjar y cols., 2002; Albizu y cols., 2011). En el año 2010, mediante técnicas de BRET y FRET, se describió la existencia del heterodímero D₂-5-HT_{2A} *in vitro*, concretamente en una línea HEK293 transfectada por genes codificantes de ambos receptores (Lukasiewicz y

cols., 2010; Borroto-Escuela y cols., 2010). Unos años más tarde, mediante técnicas de ligación por proximidad, se identificó el heterodímero D_2 -5-HT_{2A} *in vivo*, específicamente en la regiones del estriado dorsal y ventral de rata, así como en el núcleo accumbens, con un papel relevante en esquizofrenia (Borroto-Escuela y cols., 2013).

El principal objetivo de este trabajo ha sido caracterizar el heterodímero D_2 -5-HT_{2A} en una línea HEK293 doble estable Flp-In T-Rex que expresa constitutivamente el receptor D_2 y de manera inducible por doxiciclina el receptor 5-HT_{2A}, así como estudiar su influencia en los mecanismos de señalización específicos de los alucinógenos y de los antipsicóticos típicos y atípicos.

Con el objetivo de definir las condiciones de inducción del receptor de serotonina 5-HT_{2A} marcado con CFP, se recurrió a técnicas de microscopía de fluorescencia y se expuso la línea celular a diferentes concentraciones (10, 30, 60 y 100 ng/ml) y tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 horas) de doxiciclina. Los resultados obtenidos mostraron que la inducción óptima del receptor 5-HT_{2A} tuvo lugar tras la exposición de las células a 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas, comprobándose que un aumento en los niveles y tiempo de tratamiento del antibiótico inductor no mejoraba la expresión de dicho receptor. Adicionalmente, a sabiendas de que concentraciones muy elevadas de doxiciclina pueden provocar muerte celular por apoptosis (Ahler y cols., 2013), se creyó conveniente utilizar bajos niveles de antibiótico inductor y un tiempo de exposición al mismo reducido. Con la finalidad de contrastar estos resultados, se llevaron a cabo ensayos funcionales de medida de la formación de IPs, en los que se realizaron curvas dosis-respuesta del agonista endógeno del receptor 5-HT_{2A} serotonina, en células expuestas a diferentes concentraciones (10, 30, 60 y 100 ng/ml) y tiempos de tratamiento (24, 48 y 72 horas) de doxiciclina. Los resultados derivados de estos experimentos fueron consistentes con los obtenidos en las técnicas de microscopía de fluorescencia previamente realizadas, habiendo revelado la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A}, tras previa exposición de las células a 10 ng/ml de doxiciclina durante 24 horas. Asimismo, el análisis estadístico determinó que un incremento en los niveles y tiempo de tratamiento del antibiótico inductor no mejoró la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} ni modificó la potencia y eficacia de la serotonina

para activarlo. Por otro lado, se confirmó la ausencia de movilización de IPs dependiente del receptor 5-HT_{2A} en células que no habían sido previamente tratadas con doxiciclina.

Tras haber definido las condiciones de inducción del receptor 5-HT_{2A}, se caracterizó la expresión y funcionalidad de los receptores D₂ constitutivo y 5-HT_{2A} inducible por doxiciclina, en la línea de trabajo HEK293 doble estable.

Para ello, se realizaron experimentos de *binding* con radioligandos selectivos para los receptores de dopamina D₂ y de serotonina 5-HT_{2A}, que demostraron la adecuada expresión de ambos, ya que los valores de K_D del radioligando utilizado para cada receptor ([³H]-espiperona y [³H]-ketanserina, respectivamente) fueron consistentes con los registrados en la literatura científica (Bunzow y cols., 1988; Hoare y cols., 2000; Rashid y cols., 2003; Knight y cols., 2004; Zhen y cols., 2010). Asimismo, se confirmó la ausencia de expresión del receptor 5-HT_{2A} en membranas obtenidas de células que no fueron previamente expuestas a doxiciclina. Además, se observó que el nivel de expresión del receptor D₂ fue superior al del receptor 5-HT_{2A}, ya que la unión máxima (B_{max}) de [³H]-espiperona al primero fue aproximadamente diez veces mayor a la de [³H]-ketanserina al segundo. La explicación de ello se sustenta en el hecho de que la línea HEK293 empleada en esta investigación expresa constitutivamente el receptor D₂, mientras que la expresión del receptor 5-HT_{2A} no es permanente, sino que se induce por el antibiótico doxiciclina. Adicionalmente, se observó que la presencia del receptor 5-HT_{2A} no modificó la afinidad del radioligando [³H]-espiperona por el receptor D₂. Igualmente, no se observaron diferencias en la afinidad del radioligando [³H]-ketanserina por el receptor 5-HT_{2A} coexpresado con el receptor D₂, con respecto a los valores obtenidos de líneas celulares que lo expresaban solo (Knight y cols., 2004; Zhen y cols., 2010).

Los resultados derivados de ensayos de competición con varios compuestos de referencia (los agonistas endógenos dopamina y 5-HT y los antipsicóticos típico haloperidol y atípico risperidona) mostraron que la afinidad de los mismos por los receptores D₂ y 5-HT_{2A} no era significativamente diferente a la establecida en la literatura científica (Roth y cols., 1987; Roth y cols., 1997; Freedman y cols., 1994; Burris y cols., 1995; Mierau y cols., 1995; Sautel y cols., 1995; Seeman y cols., 1997;

Campiani y cols., 2004; Davies y cols., 2004; Fernández y cols., 2005). Además, se comprobó que las propiedades de unión de los compuestos de referencia por ambos receptores no eran modificadas por su coexpresión. Así, la afinidad de dichos compuestos por el receptor D_2 no cambió significativamente tras la expresión del receptor 5-HT_{2A}. Asimismo, las propiedades de unión de los compuestos de referencia por el receptor 5-HT_{2A} coexpresado con el receptor D_2 fueron similares a las establecidas en líneas celulares que sobreexpresaban únicamente el receptor 5-HT_{2A}. En conjunto, estos resultados determinan que la inducción del receptor 5-HT_{2A} por doxiciclina no afectó al nivel de expresión del receptor D_2 ni a la afinidad de los distintos compuestos de referencia por el mismo. De igual modo, la comparación de los resultados derivados de esta tesis doctoral con la bibliografía científica existente determinó que la coexpresión del receptor D_2 no moduló la afinidad de los diferentes compuestos empleados por el receptor 5-HT_{2A}.

La evaluación de la funcionalidad de los receptores de dopamina D_2 y de serotonina 5-HT_{2A} se llevó a cabo mediante el estudio de las principales vías de señalización que regulan. Como se comentó anteriormente, el receptor D_2 está acoplado a la proteína $G_{i/o}$, de modo que su activación implica la inhibición de la AC y en consecuencia, una reducción de los niveles de AMPc (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Beaulieu y cols., 2015). Por otro lado, el receptor 5-HT_{2A} está asociado a la proteína G_q , por lo que tras su estimulación se produce una activación de la PLC, lo que conduce a un incremento de los niveles de IPs (Nichols y Bush, 2001; Hannon y Hoyer, 2007). Por tanto, la confirmación de la funcionalidad de los receptores D_2 y 5-HT_{2A} tuvo lugar mediante la realización de ensayos funcionales de AMPc e IPs, respectivamente. Así, estos experimentos determinaron un funcionamiento óptimo de ambos receptores, ya que la potencia de los agonistas (dopamina y 5-HT) y de los antagonistas (antipsicóticos haloperidol y risperidona) ensayados fue similar a la descrita en la literatura científica (Masri y cols., 2008; Smith y cols., 2008; Brea y cols., 2009; Arunotayanun y cols., 2013; Möller y cols., 2014; van Wieringen y cols., 2014).

En base a la existencia de investigaciones previas que habían confirmado la expresión endógena del receptor 5-HT₇ en una línea HEK293 parental (Johnson y cols., 2003), y tras haber observado que el agonista 5-HT provocaba un aumento dosis-dependiente de los niveles de AMPc, inhibido por el antagonista clozapina, se llevó a cabo el estudio de la posible expresión endógena de un receptor dependiente de proteína G_s. Adicionalmente, el incremento dosis-dependiente de AMPc inducido por 5-HT tanto en células tratadas como no tratadas con doxiciclina y la incapacidad de la ketanserina (antagonista altamente selectivo del receptor 5-HT_{2A}) para revertir dicho efecto, confirmaron que el receptor 5-HT_{2A} no estaba implicado en la modulación de la vía de señalización asociada a proteína G_s. Tras la realización de curvas concentración-respuesta de antagonistas selectivos para cada uno de los receptores de serotonina acoplados a proteína G_s (SB-203186 para 5-HT₄R (Bach y cols., 2001), SB-271046A para 5-HT₆R (Bromidge y cols., 1999) y SB-269970 para 5-HT₇R (Hagan y cols., 2000)) y el reconocimiento de solamente una de ellas (curva dosis-respuesta de SB-269970), se sugirió la funcionalidad del receptor 5-HT₇ en la línea de trabajo HEK293 doble estable. Con el propósito de corroborar la expresión de dicho receptor, se llevó a cabo un ensayo de *binding* en célula entera, específicamente una linealidad celular, que estableció la presencia del mismo en la línea HEK293 empleada en el presente trabajo.

El receptor 5-HT₇ es uno de los receptores de serotonina menos estudiados y caracterizados. En el inicio de su investigación, el principal papel fisiológico que se le atribuía al receptor 5-HT₇ en el SNC era la regulación del ritmo circadiano (Glass y cols., 2003), así como la termorregulación (Hedlund y cols., 2004). Actualmente, se sabe que el receptor 5-HT₇ está ligado a un elevado número de desórdenes psiquiátricos, que incluyen ansiedad y depresión (Hedlund, 2009). Asimismo, existen múltiples evidencias que apoyan la implicación del receptor 5-HT₇ en procesos de memoria y aprendizaje dependientes del hipocampo (Roberts y cols., 2004; Sarkysian y Hedlund, 2009), lo que podría estar asociado a síntomas cognitivos característicos de la esquizofrenia. En este sentido, la elevada afinidad de muchos antipsicóticos atípicos por este receptor (clozapina, aripiprazol, etc.) y su localización en el tálamo y en determinadas regiones del sistema límbico (hipocampo, amígdala y otros) de varias

especies (Ruat y cols., 1993; Hagan y cols., 2000), han conducido a la especulación de la importancia que podría tener su antagonismo en el tratamiento de la esquizofrenia.

Una vez determinada la expresión endógena del receptor 5-HT₇ en la línea de trabajo HEK293, se estudió el comportamiento de su antagonista selectivo SB-269970. Los resultados derivados de ensayos en los que se realizaron curvas dosis-respuesta del agonista 5-HT en presencia de concentraciones gradualmente crecientes del SB-269970 (0.01, 0.1 y 1 μM), determinaron que dicho compuesto se comportó como un antagonista competitivo, ya que las curvas concentración-respuesta de 5-HT se desplazaron hacia la derecha a mayores concentraciones del mismo. Adicionalmente, el análisis del comportamiento de SB-269970 mediante la ecuación de Schild, mostró una pendiente próxima a 1, tanto en células no tratadas como tratadas con doxiciclina, lo que corroboró que el incremento de AMPc asociado a 5-HT se debió a la estimulación del receptor 5-HT₇. Los resultados obtenidos de estos estudios son consistentes con los establecidos por Hagan y colaboradores, que realizaron una caracterización del compuesto SB-269970 *in vitro* (en células HEK293 transfectadas por el gen codificante del receptor 5-HT₇) e *in vivo* (en homogenados de tejido cortical hipocampal de *guinea-pig*), confirmándose el comportamiento competitivo del mismo (Hagan y cols., 2000). Por otro lado, cabe destacar que la potencia y eficacia de la serotonina para activar el receptor de 5-HT₇, así como el comportamiento competitivo de SB-269970 no difirió significativamente en células que solo expresaban el receptor de dopamina D₂, con respecto a aquellas que lo coexpresaban con el receptor de serotonina 5-HT_{2A}.

Tras la confirmación de la expresión endógena del receptor 5-HT₇ en la línea celular HEK293 utilizada en la presente tesis doctoral, así como la determinación del carácter competitivo de su antagonista selectivo SB-269970, se decidió bloquear dicho receptor mediante la adición de este compuesto en todos los ensayos funcionales llevados a cabo. Asimismo, se resolvió que era necesario estudiar la influencia que podría tener el bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB-269970 en la funcionalidad de los receptores del heterodímero D₂-5-HT_{2A}.

El bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB269970 no modificó la funcionalidad del receptor 5-HT_{2A} activado por sus agonistas no alucinógeno 5-HT y alucinógeno

(±)DOI, pero por el contrario, redujo significativamente la potencia del agonista dopamina para estimular el receptor D_2 tanto en células que lo sobreexpresaban solo, como en células que lo coexpresaban con el receptor $5-HT_{2A}$. Estos resultados guardan relación con una investigación de Galici y cols., en la que se demostró que el antagonista del receptor $5-HT_7$ SB-269970 bloquea significativamente la hiperactividad locomotora inducida en ratones por ketamina y anfetamina, perdiendo su efecto en animales KO $5-HT_7$ (Galici R. y cols., 2008). Ello es indicativo de que el bloqueo del receptor $5-HT_7$ podría contribuir a reducir los síntomas positivos en pacientes con esquizofrenia, habiendo sugerido nuestros resultados que dicho efecto podría estar mediado por una disminución de la activación de la vía dopaminérgica mesolímbica.

Asimismo, se observó que el bloqueo del receptor $5-HT_7$ por SB-269970 redujo la amplitud de la curva asociada a la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 antagonizado por antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina) y atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol), aunque no generó ninguna alteración en su potencia y eficacia. Estos resultados son coherentes con la reducción de la potencia de la dopamina para estimular el receptor D_2 , tras el bloqueo del receptor $5-HT_7$ por SB-269970, ya que en presencia de este último, dicho agonista presenta una menor capacidad de inhibición de la AC, de modo que las curvas de antipsicóticos parten de unos niveles de AMPc más elevados. Por otro lado, no se registró una modulación secundaria al bloqueo del receptor $5-HT_7$ en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ antagonizado por antipsicóticos atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol).

En conjunto, los resultados del presente trabajo abren un nuevo campo de investigación en el estudio de la interacción de los receptores de dopamina D_2 y de serotonina $5-HT_7$, como posible diana farmacológica en el tratamiento de la esquizofrenia.

Una vez caracterizada la línea de trabajo HEK293 que expresa constitutivamente el receptor de dopamina D_2 y de forma inducible por doxiciclina el receptor de serotonina $5-HT_{2A}$, se decidió desarrollar una técnica multiplex de medición simultánea de las principales vías de señalización de ambos receptores, es decir, de los

segundos mensajeros AMPc e IPs. El objetivo de desarrollo de esta técnica fue estudiar la funcionalidad de ambos receptores en la misma población de células y en las mismas condiciones, para así poder salvar cualquier tipo de variabilidad ligada a la siembra celular, uso de diferentes buffers, placas, tiempos y temperatura de incubación, entre otros. Asimismo, esta metodología permitió confirmar el bloqueo del receptor de serotonina 5-HT₇ tras la adición de su antagonista selectivo SB-269970, en ensayos funcionales de AMPc simultáneamente realizados con experimentos de medida de IPs dependientes de proteína G_q asociada al receptor 5-HT_{2A}. El método dual de medida simultánea de AMPc e IPs podría ser de gran interés en el estudio de agonistas y agonistas inversos comunes para los receptores de dopamina D₂ y de serotonina 5-HT_{2A}, ya que una única técnica permite valorar la funcionalidad de dos receptores con vías de señalización dependientes de dos proteínas G diferentes.

En el método de medida dual de AMPc e IPs, se observó que era conveniente llevar a cabo la siembra celular 48 horas antes del ensayo, realizándose el marcaje con [³H]myo-inositol 10 µCi/mL al día siguiente. Además, se comprobó que el buffer característico del método tradicional de medida de IPs (HBSS, LiCl 20 mM, HEPES 20 mM, pH 7.55) podía ser empleado en la metodología multiplex, ya que al ser transparente no generaba ninguna interferencia en la medida por fluorescencia de AMPc. Asimismo, se estableció que el tiempo óptimo de incubación de las células con los compuestos era de 20 minutos a 37 °C. En el proceso de lisado de las células, se descartó el uso de ácido fórmico debido a que provocaba la destrucción de AMPc, imposibilitando la medida de este segundo mensajero. No obstante, se seleccionó el “buffer lisis” del kit de AMPc (CISBIO) para producir la lisis celular, tras haber comprobado que permitía no solo la medida de AMPc, sino también de IPs. Tras la lisis celular, se requirió la transferencia de la mitad del lisado celular a una placa opaca para poder realizar la medición de AMPc mediante tecnología HTRF. De igual modo, fue necesario el tratamiento del lisado celular de la placa de ensayo con ácido fórmico, cuyo función fue acidificar el medio y cargar negativamente los grupos fosfato de los [³H]-IPs, que adquirirían la capacidad de unión a las SPA beads cargadas positivamente, pudiendo así causar la excitación del líquido de centelleo contenido en el interior de las mismas.

Mediante experimentos de unión de radioligandos, se valoró la posible influencia que podría tener la expresión de uno de los receptores del heterodímero D_2 -5-HT_{2A} en la afinidad de agonistas y antagonistas (antipsicóticos típicos y atípicos) por el otro receptor. Así, se comprobó que la presencia del receptor D_2 no modificó las propiedades de unión de los agonistas no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (\pm)DOI por el receptor 5-HT_{2A}, puesto que éstas no difirieron de las establecidas en líneas celulares que expresaban exclusivamente el receptor 5-HT_{2A} (Roth y cols., 1987; Roth y cols., 1997). Asimismo, se observó que la afinidad de los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol por el receptor 5-HT_{2A} no fue alterada por su coexpresión con el receptor D_2 , ya que no fue diferente a la determinada en líneas celulares que expresaban el receptor 5-HT_{2A} solo (Seeman y cols., 1997; Kroeze y cols., 2003; Davies y cols., 2004; Knight y cols., 2004; Vanover y cols., 2004). Con respecto a estos resultados, Albizu y cols. observaron una disminución de la afinidad del alucinógeno (\pm)DOI por el receptor 5-HT_{2A}, cuando éste se coexpresaba con el receptor D_2 (Albizu y cols, 2011). Esta discrepancia podría deberse a la utilización de un sistema diferente, en su caso, utilizaron una línea celular HEK293 transfectada transitoriamente por los genes codificantes de uno o ambos receptores (*in vitro*) y receptores nativos de estriado de ratón (*in vivo*). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de unión del agonista dopamina y de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina y atípicos risperidona y aripiprazol por el receptor D_2 en presencia del receptor 5-HT_{2A}, con respecto a cuando se expresaba solo. No obstante, se detectó un incremento significativo de la afinidad del antipsicótico atípico clozapina por el receptor D_2 cuando era coexpresado con el receptor 5-HT_{2A}. Este resultado determina que el receptor 5-HT_{2A} ejerce una modulación alostérica positiva sobre el receptor D_2 para este fármaco, al aumentar la afinidad de la clozapina por este último. Ello podría estar relacionado con la eficacia antipsicótica de la clozapina en pacientes resistentes a cualquier otro tratamiento.

Tras evaluar la influencia de la heterodimerización D_2 -5-HT_{2A} en la afinidad de agonistas y antagonistas (antipsicóticos) por ambos receptores, se llevó a cabo el estudio de las posibles modulaciones funcionales entre los receptores de este

heterocomplejo, mediante la metodología multiplex de medición simultánea de AMPc e IPs.

En base a los resultados obtenidos del método dual, se observó que la coexpresión del receptor de dopamina D_2 no alteró ni la potencia ni la eficacia del agonista endógeno no alucinógeno 5-HT para estimular el receptor de serotonina $5-HT_{2A}$, pues sus valores de EC_{50} y E_{max} fueron cercanos a los establecidos en líneas celulares que sobreexpresaban exclusivamente el receptor $5-HT_{2A}$ (Berg y cols., 1998). Sin embargo, se detectó un aumento de la eficacia del agonista alucinógeno (\pm)DOI en la activación del receptor $5-HT_{2A}$ coexpresado con el receptor D_2 , al haberse observado un incremento en el valor de E_{max} con respecto al registrado en línea celulares que sobreexpresaban el receptor $5-HT_{2A}$ solo (Berg y cols., 1998). Por otro lado, se observó que ni la eficacia ni la potencia de los agonistas no alucinógeno lisurida y alucinógeno LSD para estimular el receptor $5-HT_{2A}$ fueron moduladas por la coexpresión del receptor D_2 . El (\pm)DOI se describe en la bibliografía científica como un agonista parcial en la producción de IPs dependiente de proteína G_q asociada al receptor $5-HT_{2A}$ (Berg y cols., 1998). No obstante, los resultados del presente trabajo establecen que la coexpresión del receptor D_2 induce un incremento en la eficacia del alucinógeno (\pm)DOI para activar el receptor $5-HT_{2A}$, convirtiéndose así en un agonista total de este último. En relación a ello, algunos estudios establecieron que agonistas alucinógenos del receptor $5-HT_{2A}$ estabilizan una conformación diferente a los no alucinógenos, que está ligada a la estimulación de mecanismos de señalización y expresión de genes específicos (*egr-1* y *egr-2*) (González Maeso y cols., 2003, 2007). Los resultados de este trabajo señalan que la coexpresión del receptor D_2 podría añadir un mayor grado de complejidad al sistema, al haberse observado que el mismo ejerce un efecto alostérico de cooperatividad positiva sobre el receptor $5-HT_{2A}$, el cual adquiere un estado conformacional susceptible de ser activado de manera más eficaz por el alucinógeno (\pm)DOI. En un estudio realizado previamente sobre el heterodímero D_2-5-HT_{2A} en células HEK293, se estableció que la potencia del agonista (\pm)DOI era significativamente incrementada en presencia del receptor de dopamina D_2 , al observarse un desplazamiento de la curva dosis-respuesta de este compuesto alucinógeno hacia la izquierda (Albizu L. y cols., 2011). En la línea celular HEK293

doble estable empleada en el presente trabajo, se observó que la coexpresión del receptor D₂ no moduló la potencia del alucinógeno (±)DOI en la estimulación del receptor 5-HT_{2A}. Estas divergencias podrían deberse a la utilización de sistemas celulares diferentes, que como ya se comentó con anterioridad, en la investigación del 2011 realizada por Albizu y cols., se empleó un línea HEK293 transfectada transitoriamente por los genes codificantes de uno o ambos receptores. Asimismo, Albizu y cols. establecieron que el alucinógeno LSD se comporta como un agonista parcial del receptor 5-HT_{2A} independientemente de la coexpresión del receptor D₂. Ello podría atribuirse a que, aunque algunas investigaciones reportan mecanismos de señalización comunes y específicos de sustancias alucinógenas, se mantengan diferencias entre compuestos psicotrópicos.

Por otro lado, se observó que la activación del receptor D₂ por dopamina no alteró ni la potencia ni la eficacia de los agonistas no alucinógeno 5-HT y alucinógeno (±)DOI para estimular el receptor de serotonina 5-HT_{2A}. Estos resultados contradicen lo establecido en investigaciones anteriores, que determinaron un aumento en la potencia y eficacia del agonista 5-HT para activar el receptor 5-HT_{2A} cuando el receptor D₂ era sinérgicamente estimulado por quinpirol (Borroto-Escuela y cols., 2010). Estas discordancias podrían ser atribuidas a que, en la investigación de Borroto-Escuela y cols., se recurrió a la utilización de un sistema celular y técnicas funcionales diferentes, en concreto una línea HEK293T transfectada transitoriamente por genes codificantes de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} y ensayos funcionales de luciferasa y medición de los niveles intracelulares de Ca⁺². Teniendo en cuenta que ha sido demostrada la selectividad funcional en el receptor 5-HT_{2A} (Berg y cols., 1998), la medición de diferentes sistemas efectores puede estar ligada a distintos valores de potencia y eficacia para un mismo fármaco. Asimismo, se observó que el bloqueo del receptor D₂ por sulpirida no modificó ni la potencia ni la eficacia en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} activado por 5-HT. No obstante, se detectó una reducción significativa de la eficacia del agonista alucinógeno (±)DOI para estimular el receptor 5-HT_{2A}, tras el bloqueo del receptor D₂ por sulpirida. Por tanto, estos resultados sugieren que la sulpirida estimula un proceso de cooperatividad negativa del receptor D₂ sobre el receptor 5-HT_{2A} para ser activado por el agonista

alucinógeno (\pm)DOI, que actúa como agonista parcial del mismo. En conjunto, estos datos indican que mientras la coexpresión del receptor D_2 ejerce una modulación alostérica positiva sobre el receptor 5-HT_{2A} para ser activado por el alucinógeno (\pm)DOI, su bloqueo por sulpirida provoca el efecto inverso, es decir, genera una modulación alostérica negativa en la eficacia de (\pm)DOI para estimular el receptor 5-HT_{2A}.

Por otro lado, no se detectó que la presencia del receptor de dopamina D_2 generase alguna modulación en la potencia de los antipsicóticos atípicos clozapina y risperidona para antagonizar el receptor de serotonina 5-HT_{2A}, pues sus valores de K_i coincidieron con los establecidos en líneas celulares que sobreexpresaban el receptor 5-HT_{2A} solo (Brea y cols., 2009). Por el contrario, se observó una reducción de la potencia del antipsicótico atípico aripiprazol para bloquear el receptor 5-HT_{2A}, en coexpresión con el receptor D_2 , ya que su valor de K_i fue aproximadamente 10 veces inferior al registrado en líneas celulares que sobreexpresaban exclusivamente el receptor 5-HT_{2A} (Zhang y cols., 2006). Ello señala la existencia de un proceso de alosterismo negativo del receptor D_2 sobre el receptor 5-HT_{2A}, adquiriendo este último un estado conformacional que lo hace menos sensible a la acción antagonista del aripiprazol. Además, no se observaron cambios significativos en la potencia de antagonismo sobre el receptor 5-HT_{2A} de los tres antipsicóticos atípicos de segunda generación (clozapina, risperidona y aripiprazol), tras la activación y bloqueo del receptor D_2 , por dopamina y sulpirida, respectivamente. Estos resultados indican que no hay influencia de la modulación de la actividad del receptor D_2 sobre la potencia de bloqueo de los antipsicóticos atípicos en el receptor 5-HT_{2A}.

En base a los resultados obtenidos en la metodología multiplex, se determinó que la coexpresión del receptor de serotonina 5-HT_{2A} no modificó la potencia ni la eficacia del agonista endógeno dopamina para activar el receptor D_2 . Sin embargo, se observó que la activación del receptor de serotonina 5-HT_{2A} por el agonista alucinógeno (\pm)DOI condujo a una modulación de la eficacia en la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 activado por su agonista endógeno dopamina. En presencia de (\pm)DOI, la curva de dopamina se desplazó significativamente hacia mayores niveles de AMPc con respecto a la curva control, lo que sugirió un aumento en la eficacia del

agonista endógeno. Se estableció que este efecto solamente se produjo en células pretratadas con doxiciclina, lo que indicó que era mediado por el receptor de serotonina 5-HT_{2A}. Adicionalmente, la reversión del efecto del (±)DOI por ketanserina (antagonista selectivo del receptor 5-HT_{2A}) ratificó que esta regulación era dependiente del receptor 5-HT_{2A}. Asimismo, experimentos de unión de radioligandos en los que se ensayaron curvas de dopamina control y en combinación con tres concentraciones gradualmente crecientes de (±)DOI (0.1, 1 y 10 µM) confirmaron que el efecto de este compuesto psicotrópico en la señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂ no era producto de una alteración de la afinidad de su agonista endógeno, sino que era debido a una modulación funcional. Estos datos señalan que el receptor de serotonina 5-HT_{2A} activado por el alucinógeno (±)DOI ejerce una modulación en la estimulación del receptor D₂ por su agonista endógeno dopamina, que resulta en un *cross-talk* funcional entre los receptores del heterodímero D₂-5-HT_{2A}. Esta regulación funcional puede ser desencadenada por un proceso de selección conformacional del (±)DOI sobre el receptor 5-HT_{2A}, el cual adquiere una conformación específica que modifica la función del receptor D₂ activado por dopamina. Estos resultados pueden estar relacionados con la estimulación de la vía de señalización dependiente de G_{i/o} cuando el receptor de serotonina 5-HT_{2A} es activado por compuestos psicotrópicos como (±)DOI o LSD, así como con la inducción de la expresión de genes específicos (*egr-1* y *egr-2*) por estos alucinógenos (González-Maeso y cols., 2003, 2007). Asimismo, estos datos concuerdan con investigaciones anteriores sobre el heterodímero mGluR₂-5-HT_{2A} también implicado en esquizofrenia, en las que se describió una reducción en la vía de señalización G_{i/o} dependiente del receptor mGluR₂ activado por glutamato, cuando el receptor 5-HT_{2A} era estimulado por el agonista alucinógeno (±)DOI (Fribourg y cols., 2011). No obstante, contrariamente a lo establecido en el presente trabajo, Borroto y colaboradores determinaron que agonistas alucinógenos del receptor 5-HT_{2A} ((±)DOI y LSD) potenciaban la inhibición de la adenilato ciclasa cuando el receptor de dopamina D₂ era activado por quinpirol (Borroto-Escuela y cols., 2013).

Por otro lado, se observó que el bloqueo del receptor de serotonina 5-HT_{2A} por su antagonista selectivo ketanserina también generó una modulación de la eficacia del

agonista endógeno dopamina para activar el receptor D_2 . Así, se observó que en presencia de ketanserina, la curva de dopamina se desplazó significativamente hacia niveles menores de AMPc. El efecto de la ketanserina fue dependiente del receptor $5-HT_{2A}$, puesto que solamente se produjo en células que habían sido anteriormente expuestas a doxiciclina. Estos resultados constituyen un mecanismo adicional de modulación alostérica del receptor $5-HT_{2A}$ sobre el receptor D_2 , que tras ser bloqueado por la ketanserina, regula la eficacia de la dopamina para estimular este último. Estos datos concuerdan con lo establecido por Fribourg y colaboradores con respecto al heterodímero $mGluR_2-5-HT_{2A}$, en el que se observó que el bloqueo del receptor $5-HT_{2A}$ por clozapina generaba una potenciación de la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor $mGluR_2$ activado por glutamato (2011).

A la vista del *crosstalk* D_2-5HT_{2A} , se evaluó la influencia de la heterodimerización sobre el efecto de los antipsicóticos de primera y segunda generación en el receptor de dopamina D_2 . Según los resultados obtenidos de ensayos funcionales de AMPc, se observó que la expresión del receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ no modificó la potencia de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, y atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, para bloquear el receptor de dopamina D_2 . No obstante, Albizu y cols. establecieron que el receptor de serotonina $5-HT_{2A}$ es necesario para el desencadenamiento del efecto antipsicótico del haloperidol, al haberse observado una respuesta reducida al mismo en ratones KO para el receptor $5-HT_{2A}$ con hiperlocomoción estimulada por el alucinógeno MK-801 (Albizu y cols., 2011). Los resultados del presente trabajo determinaron que la estimulación del receptor $5-HT_{2A}$ por el agonista alucinógeno (\pm)DOI condujo a una modulación de la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor de dopamina D_2 antagonizado por los antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina) y atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol). Esto es, en presencia de (\pm)DOI, las curvas de antipsicóticos se desplazaron significativamente hacia mayores concentraciones de AMPc con respecto a la curva control. En el caso de los antipsicóticos típicos, las curvas de haloperidol y clorpromazina, en presencia de (\pm)DOI, se mantuvieron en todo su curso paralelas con respecto a la curva control. Sin embargo, en relación a los antipsicóticos atípicos, las curvas de clozapina y risperidona, en presencia de (\pm)DOI, mostraban una

tendencia paralela a concentraciones bajas, pero confluían con la curva control a la concentración más elevada. Contrariamente, el aripiprazol configuró un perfil similar al de los neurolépticos convencionales, pues la curva de dicho antipsicótico en presencia de (\pm)DOI describió un recorrido paralelo con respecto a la curva control. Nuevamente, se demostró que el efecto del (\pm)DOI era 5-HT_{2A} dependiente, puesto que se desencadenó exclusivamente en células pretratadas con doxiciclina, siendo anulado tras la adición del antagonista competitivo ketanserina. Asimismo, en base a los resultados obtenidos de experimentos de *binding* en los que se realizaron curvas de haloperidol control y en presencia de distintas concentraciones de (\pm)DOI (0.1, 1 y 10 μ M), se confirmó que el efecto de este alucinógeno no vino dado por una regulación de la afinidad del antipsicótico por el receptor D₂, sino que se debió a una alteración a nivel funcional. En conjunto, estos resultados muestran que el receptor de serotonina 5-HT_{2A}, al ser estimulado por el alucinógeno (\pm)DOI, induce un proceso alostérico sobre el receptor D₂, modulando la acción antagonista de los distintos antipsicóticos sobre la eficacia de la dopamina en la activación de la vía de señalización dependiente de G_{i/o}. En base a los datos derivados de este trabajo, el perfil típico y atípico característico de los antipsicóticos de primera y segunda generación, respectivamente, guarda relación con la modulación funcional del receptor D₂ generada por el receptor 5-HT_{2A} activado por (\pm)DOI. En oposición al efecto inducido por el alucinógeno (\pm)DOI, se observó que el bloqueo del receptor de serotonina 5-HT_{2A} por ketanserina no produjo ninguna modificación en la funcionalidad del receptor D₂ antagonizado por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina y atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol.

En resumen, en la presente tesis doctoral se ha puesto de relieve la existencia de un *cross-talk* funcional en el heterodímero D₂-5-HT_{2A}, desencadenado tras múltiples procesos de alosterismo positivo y negativo que ejercen de manera recíproca ambos receptores. Por un lado, se ha establecido que la presencia y el bloqueo del receptor de dopamina D₂ induce mecanismos opuestos de cooperatividad positiva y negativa, respectivamente, sobre la eficacia del alucinógeno (\pm)DOI en la producción de IPs dependiente del receptor 5-HT_{2A}. Por otro lado, se ha determinado que la estimulación del receptor 5-HT_{2A} por (\pm)DOI genera una modulación funcional específica en la vía

de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 activado por dopamina y antagonizado por los antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina) y atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol). Ello indica que la expresión del receptor de dopamina D_2 es necesaria en la generación de la conducta *head-twich* y en la manifestación de los síntomas positivos en individuos con esquizofrenia. En relación a ello y con respecto al heterodímero $mGluR_2-5-HT_{2A}$, Moreno y cols. observaron una ausencia de respuesta *head-twich* en ratones KO $mGluR_2$ a los que se les había administrado LSD y (\pm)DOI, lo que sugirió la implicación del receptor $mGluR_2$ en la conducta psicótica (Moreno y cols., 2009).

En conclusión, el desarrollo de síntomas psicóticos en patologías mentales como la esquizofrenia o el trastorno bipolar podría fundamentarse en un desequilibrio en el balance de las vías de señalización $G_{i/o}/G_q$, sujeto a una expresión anómala de los receptores de dopamina D_2 , de serotonina $5-HT_{2A}$ y de glutamato $mGluR_2$ y en definitiva a un desajuste en su mono-, homo- y hetero-dimerización.







CONCLUSIONES



1. Los ensayos de microscopía de fluorescencia mostraron que las condiciones óptimas de inducción de la expresión del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en la línea HEK293 Fl-In T-Rex doble estable fueron 10 ng/ml del antibiótico inductor doxiciclina, durante un tiempo de tratamiento de 24 horas.
2. La caracterización de los receptores constitutivo D₂ e inducible por doxiciclina 5-HT_{2A}, mediante ensayos de unión de radioligandos y funcionales, confirmó la expresión y funcionalidad de ambos receptores, así como la ausencia de expresión del receptor 5-HT_{2A} y movilización de IPs en células no tratadas con el antibiótico inductor.
3. La expresión endógena del receptor 5-HT₇ de serotonina en la línea celular HEK293 se evidenció mediante experimentos de *binding* en célula entera y ensayos funcionales de AMPc. El bloqueo del receptor 5-HT₇ por SB-269970 generó una reducción de la potencia de la dopamina para activar el receptor D₂, aunque no alteró la potencia ni la eficacia de 5-HT en la estimulación de la producción de IPs dependiente del receptor 5-HT_{2A}. No se observó una modulación en la potencia de los antipsicóticos típicos (haloperidol y clorpromazina) y atípicos (clozapina, risperidona y aripiprazol) para antagonizar los receptores D₂ y 5-HT_{2A}, tras el bloqueo del receptor 5-HT₇.
4. Se desarrolló un método multiplex que permitió medir simultáneamente las vías de señalización de los receptores del heterodímero D₂-5-HT_{2A} asociadas a los segundos mensajeros AMPc e IPs, así como evaluar el *cross-talk* funcional existente entre ambos, en la misma población de células y en iguales condiciones.
5. La expresión del receptor D₂ no alteró la afinidad de los ligandos agonistas 5-HT y (±)DOI, ni de los antipsicóticos clozapina, risperidona y aripiprazol por el receptor 5-HT_{2A}. La coexpresión del receptor 5-HT_{2A} no modificó las propiedades de unión del agonista dopamina, ni de los antipsicóticos haloperidol, clorpromazina, risperidona y aripiprazol por el receptor D₂. Sin embargo, se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de la afinidad del antipsicótico atípico clozapina por el receptor D₂, cuando se coexpresaba con el receptor 5-HT_{2A}, lo que sugiere que este último ejerce una modulación alostérica positiva sobre el receptor D₂ en la unión del fármaco.

6. La expresión del receptor D_2 no modificó ni la potencia ni la eficacia de los agonistas 5-HT, lisurida y LSD para activar el receptor 5-HT_{2A}. Por el contrario, la presencia del receptor D_2 generó un aumento en la eficacia del agonista alucinógeno (\pm)DOI para estimular la producción de IPs dependiente del receptor 5-HT_{2A}, pero no moduló su potencia. Ello indica que el receptor D_2 desencadena un proceso de cooperatividad positiva sobre el receptor 5-HT_{2A}, que adquiere un estado conformacional susceptible de ser activado de manera más eficaz por el alucinógeno (\pm)DOI.
7. La activación del receptor D_2 por dopamina no produjo cambios en la potencia y eficacia de estimulación del receptor 5-HT_{2A} por los agonistas endógeno 5-HT y alucinógeno (\pm)DOI.
8. El bloqueo del receptor D_2 por sulpirida no alteró la potencia ni eficacia de 5-HT para activar el receptor 5-HT_{2A}, aunque redujo de manera significativa ($p < 0.05$) la eficacia de (\pm)DOI en la estimulación de la producción de IPs dependiente de dicho receptor. Esto indica que la sulpirida genera una modulación alostérica negativa del receptor D_2 sobre el receptor 5-HT_{2A}, para ser activado por el alucinógeno (\pm)DOI.
9. La expresión del receptor D_2 no modificó la potencia de los antipsicóticos atípicos clozapina y risperidona para antagonizar el receptor 5-HT_{2A}. En cambio, se observó una reducción en la potencia del aripiprazol para bloquear el receptor 5-HT_{2A}, en coexpresión con el receptor D_2 , lo que indica la existencia de un proceso alostérico negativo promovido por este último sobre el receptor 5-HT_{2A}.
10. La activación y bloqueo del receptor D_2 por dopamina y sulpirida, respectivamente, no produjo ninguna alteración en la vía de señalización dependiente de G_q del receptor 5-HT_{2A} antagonizado por los antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol.
11. La expresión del receptor 5-HT_{2A} no moduló la potencia ni la eficacia de la dopamina para activar el receptor D_2 .
12. La activación del receptor 5-HT_{2A} por el alucinógeno (\pm)DOI moduló la vía de señalización dependiente de $G_{i/o}$ del receptor D_2 estimulado por dopamina, causando un desplazamiento significativo ($p < 0.05$) de la curva del agonista endógeno hacia mayores niveles de AMPc, con respecto a la curva control. Esto señala la existencia

- de una modulación alostérica del receptor 5-HT_{2A} estimulado por (±)DOI sobre el receptor D₂, que es activado con menor eficacia por el agonista endógeno dopamina. No se observaron diferencias en la unión de la dopamina al receptor D₂, en presencia de (±)DOI, lo que sugiere una modulación únicamente a nivel de señalización.
13. El bloqueo del receptor 5-HT_{2A} por ketanserina reguló la estimulación del receptor D₂ por su agonista endógeno, generando un desplazamiento significativo ($p < 0.001$) de la curva de dopamina hacia menores niveles de AMPc, con respecto a la curva control. Ello indica que el receptor 5-HT_{2A}, tras ser bloqueado por ketanserina, induce una modulación alostérica sobre el receptor D₂, reduciendo la eficacia de la dopamina para estimular este último.
 14. La expresión del receptor 5-HT_{2A} no modificó la potencia de bloqueo de la vía de señalización dependiente de G_{i/o} del receptor D₂ antagonizado por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina, y atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol.
 15. La activación del receptor 5-HT_{2A} por (±)DOI moduló el bloqueo del receptor D₂ por los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina y atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol, produciendo un desplazamiento significativo ($p < 0.001$) de las curvas de los compuestos hacia mayores niveles de AMPc, con respecto a la curva control. En presencia de (±)DOI, las curvas dosis-respuesta de los antipsicóticos convencionales mostraron un desplazamiento paralelo en relación a la curva control, mientras que las curvas de los antipsicóticos atípicos se mantuvieron paralelas a bajas concentraciones del fármaco para confluir con la curva control a la concentración más alta, exceptuando el aripiprazol, que mostró un perfil semejante al de los antipsicóticos típicos. Estos resultados sugieren que el receptor 5-HT_{2A}, tras ser activado por el alucinógeno (±)DOI, desencadena una modulación alostérica sobre el receptor D₂, que deriva en una regulación funcional de la señalización G_{i/o} antagonizada por los antipsicóticos mencionados.
 16. El bloqueo del receptor 5-HT_{2A} por ketanserina no modificó la potencia de los antipsicóticos típicos haloperidol y clorpromazina y atípicos clozapina, risperidona y aripiprazol para estimular la producción de AMPc dependiente de G_{i/o} del receptor D₂.





BIBLIOGRAFÍA



- Albizu L, Holloway T, González-Maeso J, Sealfon SC (2011) Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Neuropharmacology* 61:770–7
- Alex KD, Pehek EA (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther* 113:296–320
- American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*.
- Andreasen NC (1999) Understanding the causes of schizophrenia. *N Engl J Med* 340:645–7
- Andreasen NC, Arndt S, Swayze V, Cizadlo T, Flaum M, O’Leary D, Ehrhardt JC, Yuh WT (1994) Thalamic abnormalities in schizophrenia visualized through magnetic resonance image averaging. *Science* 266:294–8
- Antonova E, Sharma T, Morris R, Kumari V (2004) The relationship between brain structure and neurocognition in schizophrenia: a selective review. *Schizophr Res* 70:117–45
- Arnold SE, Ruschinsky DD, Han LY (1997) Further evidence of abnormal cytoarchitecture of the entorhinal cortex in schizophrenia using spatial point pattern analyses. *Biol Psychiatry* 42:639–47
- Arnold SE, Talbot K, Hahn C-G (2005) Neurodevelopment, neuroplasticity, and new genes for schizophrenia. *Prog Brain Res* 147:319–45
- Arunotayanun W, Dalley JW, Huang X-P, Setola V, Treble R, Iversen L, Roth BL, Gibbons S (2013) An analysis of the synthetic tryptamines AMT and 5-MeO-DALT: emerging “Novel Psychoactive Drugs”. *Bioorg Med Chem Lett* 23:3411–5
- Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Krobert KA, Brattelid T, Kaumann AJ, Levy FO (2001) 5HT_{4(a)} and 5-HT_{4(b)} receptors have nearly identical pharmacology and are both expressed in human atrium and ventricle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363:146–60
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–152

- Beaulieu J-M, Espinoza S, Gainetdinov RR (2015) Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol* 172:1–23
- Beaulieu J-M, Gainetdinov RR (2011) The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev* 63:182–217
- Beaulieu J-M, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG (2005) An Akt/ β -Arrestin 2/PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior. *Cell* 122:261–273
- Becker DR, Drake RE (2003) A working life for people with severe mental illness. Oxford University Press
- Bellack AS (2004) Social skills training for schizophrenia : a step-by-step guide. Guilford Press
- Bembenek A [Seasonality of birth in schizophrenia patients. Literature review]. *Psychiatr Pol* 39:259–70
- Benes FM, Sorensen I, Bird ED (1991) Reduced neuronal size in posterior hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophr Bull* 17:597–608
- Berg K a, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, Clarke WP (1998) Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol* 54:94–104
- Besoiu S [Internet] (2010) Microalgae Tiny workers in nutrient waste recovery. Disponible en: <http://www.odec.ca/projects/2013/beso13s/Counting%20the%20cells.html>
- Borroto-Escuela DO, Pintsuk J, Schäfer T, Friedland K, Ferraro L, Tanganelli S, Liu F, Fuxe K (2016) Multiple D2 heteroreceptor complexes: new targets for treatment of schizophrenia. *Ther Adv Psychopharmacol* 6:77–94
- Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Narvaez M, Oflijan J, Agnati LF, Fuxe K (2014) Hallucinogenic 5-HT_{2A}R agonists LSD and DOI enhance dopamine D₂R protomer recognition and signaling of D₂-5-HT_{2A} heteroreceptor complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 443:278–284
- Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Tarakanov AO, Marcellino D, Ciruela F, Agnati LF, Fuxe K (2010) Dopamine D₂ and 5-

- hydroxytryptamine 5-HT_{2A} receptors assemble into functionally interacting heteromers. *Biochem Biophys Res Commun* 401:605–10
- Bray NJ, Leweke FM, Kapur S, Meyer-Lindenberg A (2010) The neurobiology of schizophrenia: new leads and avenues for treatment. *Curr Opin Neurobiol* 20:810–5
- Brea J, Castro M, Giraldo J, López-Giménez JF, Padín JF, Quintián F, Cadavid MI, Vilaró MT, Mengod G, Berg KA, Clarke WP, Vilaro JP, Milligan G, Loza MI (2009) Evidence for distinct antagonist-revealed functional states of 5-hydroxytryptamine(2A) receptor homodimers. *Mol Pharmacol* 75:1380–91
- Bridges TM, Lindsley CW (2008) G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem Biol* 3:530–41
- Bromidge SM, Brown AM, Clarke SE, Dodgson K, Gager T, Grassam HL, Jeffrey PM, Joiner GF, King FD, Middlemiss DN, Moss SF, Newman H, Riley G, Routledge C, Wyman P. (1999) 5-Chloro-N-(4-methoxy-3-piperazin-1-yl-phenyl)-3-methyl-2-benzothiophenesulfonamide (SB-271046): a potent, selective, and orally bioavailable 5-HT₆ receptor antagonist. *J Med Chem* 42:202–5
- Brown AS, Susser ES (2002) In utero infection and adult schizophrenia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:51–7
- Bunzow JR, Tol HHM Van, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783–787
- Burris KD, Pacheco MA, Filtz TM, Kung MP, Kung HF, Molinoff PB (1995) Lack of discrimination by agonists for D2 and D3 dopamine receptors. *Neuropsychopharmacology* 12:335–45
- Campiani G, Butini S, Fattorusso C, et al (2004) Pyrrolo[1,3]benzothiazepine-based serotonin and dopamine receptor antagonists. Molecular modeling, further structure-activity relationship studies, and identification of novel atypical antipsychotic agents. *J Med Chem* 47:143–57

- Canals M, Burgueño J, Marcellino D, et al (2003) Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem* 88:726–734
- Cannon M, Jones PB, Murray RM (2002) Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am J Psychiatry* 159:1080–92
- Carlsson A (1978) Antipsychotic drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 135:165–73
- Carlsson A, Carlsson ML (2006) A dopaminergic deficit hypothesis of schizophrenia: the path to discovery. *Dialogues Clin Neurosci* 8:137–42
- Carlsson A, Lindqvist M (1963) Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 20:140–4
- Carriba P, Ortiz O, Patkar K, Justinova Z, Stroik J, Themann A, Müller C, Woods AS, Hope BT, Ciruela F, Casadó V, Canela EI, Lluís C, Goldberg SR, Moratalla R, Franco R, Ferré S (2007) Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* 32:2249–59
- Casadó V, Cortés A, Ciruela F, Mallol J, Ferré S, Lluís C, Canela EI, Franco R (2007) Old and new ways to calculate the affinity of agonists and antagonists interacting with G-protein-coupled monomeric and dimeric receptors: the receptor-dimer cooperativity index. *Pharmacol Ther* 116:343–54
- Christopoulos A, Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 54:323–74
- Cisbio Bioassays. Francia (2016) [Internet] Disponible en: <http://www.cisbio.com/usa/drug-discovery/product-insert-camp-dynamic-2-kit-20000-tests>
- Conn PJ, Lindsley CW, Jones CK (2009) Activation of metabotropic glutamate receptors as a novel approach for the treatment of schizophrenia. *Trends Pharmacol Sci* 30:25–31

- Cools R, Roberts AC, Robbins TW (2008) Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends Cogn Sci* 12:31–40
- Cornblatt B, Obuchowski M, Roberts S, Pollack S, Erlenmeyer-Kimling L (1999) Cognitive and behavioral precursors of schizophrenia. *Dev Psychopathol* 11:487–508
- Curson DA, Patel M, Liddle PF, Barnes TR (1988) Psychiatric morbidity of a long stay hospital population with chronic schizophrenia and implications for future community care. *BMJ* 297:819–22
- Dahlström A, Fuxe K (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20:398–399
- Dalrymple MB, Pflieger KDG, Eidne KA (2008) G protein-coupled receptor dimers: Functional consequences, disease states and drug targets. *Pharmacol Ther* 118:359–371
- Davies MA, Setola V, Strachan RT, Sheffler DJ, Salay E, Hufeisen SJ, Roth BL (2006) Pharmacologic analysis of non-synonymous coding h5-HT2A SNPs reveals alterations in atypical antipsychotic and agonist efficacies. *Pharmacogenomics J* 6:42–51
- Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M (1991) Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry* 148:1474–86
- De Bartolomeis A, Buonaguro EF, Iasevoli F (2013) Serotonin-glutamate and serotonin-dopamine reciprocal interactions as putative molecular targets for novel antipsychotic treatments: From receptor heterodimers to postsynaptic scaffolding and effector proteins. *Psychopharmacology (Berl)* 225:1–19
- DeLisi LE (1992) The significance of age of onset for schizophrenia. *Schizophr Bull* 18:209–15
- Doherty MD, Pickel VM (2000) Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 864:176–85
- Dorsam RT, Gutkind JS (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 7:79–94

- Dorsch S, Klotz K-N, Engelhardt S, Lohse MJ, Bünemann M (2009) Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy. *Nat Methods* 6:225–30
- Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA (2004) Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet* 36:131–7
- Farde L, Nordström a L, Wiesel F a, Pauli S, Halldin C, Sedvall G (1992) Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry* 49:538–544
- Farde L, Nordström AL, Nyberg S, Halldin C, Sedvall G (1994) D1-, D2-, and 5-HT2-receptor occupancy in clozapine-treated patients. *J Clin Psychiatry* 55 Suppl B:67–9
- Farde L, Wiesel F a, Halldin C, Sedvall G (1988) Central D2-dopamine receptor occupancy in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs. *Arch Gen Psychiatry* 45:71–76
- Felder CC, Kanterman RY, Ma a L, Axelrod J (1990) Serotonin stimulates phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2187–2191
- Fernández J, Alonso JM, Andrés JI, Cid JM, Díaz A, Iturrino L, Gil P, Megens A, Sipido VK, Trabanco AA (2005) Discovery of new tetracyclic tetrahydrofuran derivatives as potential broad-spectrum psychotropic agents. *J Med Chem* 48:1709–12
- Ferré S, Popoli P, Giménez-Llort L, Finnman UB, Martínez E, Scotti de Carolis A, Fuxe K (1994) Postsynaptic antagonistic interaction between adenosine A1 and dopamine D1 receptors. *Neuroreport* 6:73–6
- Flaum M, Arndt S, Andreasen NC (1990) The role of gender in studies of ventricle enlargement in schizophrenia: a predominantly male effect. *Am J Psychiatry* 147:1327–32

- Fonseca JM, Lambert NA (2009) Instability of a class a G protein-coupled receptor oligomer interface. *Mol Pharmacol* 75:1296–9
- Frangou S (2008) Schizophrenia. *Psychiatric disorders* 36: 405-9.
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L-G, Schiöth HB (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63:
- Freedman R (2003) Schizophrenia. *N Engl J Med* 349:1738–49
- Freedman SB, Patel S, Marwood R, Emms F, Seabrook GR, Knowles MR, McAllister G (1994) Expression and pharmacological characterization of the human D3 dopamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 268:417–26
- Galici R, Boggs JD, Miller KL, Bonaventure P, Atack JR (2008) Effects of SB-269970, a 5-HT7 receptor antagonist, in mouse models predictive of antipsychotic-like activity. *Behav Pharmacol* 19:153–159
- Galvez T, Duthey B, Kniazeff J, Blahos J, Rovelli G, Bettler B, Prézeau L, Pin JP (2001) Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function. *EMBO J* 20:2152–9
- Gaudreault P, Guay J, Thivierge RL, Verdy I Benzodiazepine poisoning. Clinical and pharmacological considerations and treatment. *Drug Saf* 6:247–65
- George JS, Bernard WA (1999) *Basic Neurochemistry*, 6^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven
- Gilmore JH, Jarskog LF (1997) Exposure to infection and brain development: cytokines in the pathogenesis of schizophrenia. *Schizophr Res* 24:365–7
- Glantz LA, Lewis DA (1997) Reduction of synaptophysin immunoreactivity in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. Regional and diagnostic specificity. *Arch Gen Psychiatry* 54:660–9
- Glass JD, Grossman GH, Farnbauch L, DiNardo L (2003) Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 23:7451–60

- Gogos JA, Santha M, Takacs Z, Beck KD, Luine V, Lucas LR, Nadler J V, Karayiorgou M (1999) The gene encoding proline dehydrogenase modulates sensorimotor gating in mice. *Nat Genet* 21:434–9
- Goldstein JM, Goodman JM, Seidman LJ, Kennedy DN, Makris N, Lee H, Tourville J, Caviness VS, Faraone S V, Tsuang MT (1999) Cortical abnormalities in schizophrenia identified by structural magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* 56:537–47
- González-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, López-Giménez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ, Sealfon SC (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 452:93–7
- González-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, López-Giménez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ, Sealfon SC (2008) Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 452:93–97
- González-Maeso J, Sealfon SC (2009) Psychedelics and schizophrenia. *Trends Neurosci* 32:225–32
- González-Maeso J, Weisstaub N V., Zhou M, et al (2007) Hallucinogens Recruit Specific Cortical 5-HT_{2A} Receptor-Mediated Signaling Pathways to Affect Behavior. *Neuron* 53:439–452
- González-Maeso J, Yuen T, Ebersole BJ, Wurmbach E, Lira A, Zhou M, Weisstaub N, Hen R, Gingrich JA, Sealfon SC (2003) Transcriptome fingerprints distinguish hallucinogenic and nonhallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex. *J Neurosci* 23:8836–43
- Gould RA, Mueser KT, Bolton E, Mays V, Goff D (2001) Cognitive therapy for psychosis in schizophrenia: an effect size analysis. *Schizophr Res* 48:335–42
- Green AR, Heal DJ (1985) The effects of drugs on serotonin-mediated behavioural models. *Neuropharmacology of Serotonin Oxford University* 326-365.

- Gross G (1997) The onset of schizophrenia. *Schizophr Res* 28:187–98
- Gross H, Langner E (1966) [On the use of 7-chlor-1,3-dihydro-3-hydroxy-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepine-2-one in psychiatry]. *Arzneimittelforschung* 16:1328–30
- Guillin O, Abi-Dargham A, Laruelle M (2007) Neurobiology of Dopamine in Schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 78:1–39
- Guo W, Shi L, Javitch JA (2003) The Fourth Transmembrane Segment Forms the Interface of the Dopamine D2 Receptor Homodimer. *J Biol Chem* 278:4385–4388
- Guo W, Shi L, Javitch JA (2003) The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer. *J Biol Chem* 278:4385–8
- Guo W, Urizar E, Kralikova M, Mobarec JC, Shi L, Filizola M, Javitch JA (2008) Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J* 27:2293–304
- Häfner H, an der Heiden W (1999) The course of schizophrenia in the light of modern follow-up studies: the ABC and WHO studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl :14–26
- Hagan JJ, Price GW, Jeffrey P, Deeks NJ, Stean T, Piper D, Smith MI, Upton N, Medhurst AD, Middlemiss DN, Riley GJ, Lovell PJ, Bromidge SM, Thomas DR (2000) Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT(7) receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 130:539–48
- Hannon J, Hoyer D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195:198–213
- Hansen M, Jacobsen SE, Plunkett S, Liebscher GE, McCorvy JD, Bräuner-Osborne H, Kristensen JL (2015) Synthesis and pharmacological evaluation of N-benzyl substituted 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamines as 5-HT2A/2C partial agonists. *Bioorg Med Chem* 23:3933–7
- Harrison PJ (1999) The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 593–624

- Heckers S, Rauch SL, Goff D, Savage CR, Schacter DL, Fischman AJ, Alpert NM (1998) Impaired recruitment of the hippocampus during conscious recollection in schizophrenia. *Nat Neurosci* 1:318–23
- Hedlund P, Sutcliffe J (2004) Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT receptor research. *Trends Pharmacol Sci* 25:481–486
- Hedlund PB (2009) The 5-HT₇ receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology (Berl)* 206:345–354
- Hernández-López S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ (2000) D₂ Dopamine Receptors in Striatal Medium Spiny Neurons Reduce L-Type Ca²⁺ Currents and Excitability via a Novel PLCβ₁–IP₃–Calcineurin-Signaling Cascade. *J. Neurosci.* 20:
- Herrick-Davis K, Grinde E, Mazurkiewicz JE (2004) Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry* 43:13963–71
- Hoare SRJ, Coldwell MC, Armstrong D, Strange PG (2000) Regulation of human D₁, D_{2(long)}, D_{2(short)}, D₃ and D₄ dopamine receptors by amiloride and amiloride analogues. *Br J Pharmacol* 130:1045–1059
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533–554
- Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, Laughlin IAO, Meltzer HY (2001) D₂ receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT. *J Neurochem* 1521–1531
- Iglesias A, Lage S, Cadavid MI, Loza MI, Brea J (2016) Development of a Multiplex Assay for Studying Functional Selectivity of Human Serotonin 5-HT_{2A} Receptors and Identification of Active Compounds by High-Throughput Screening. *J Biomol Screen* 21(8):816-23
- International Schizophrenia Consortium (2008) Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* 455:237–41

- Iritani S (2013) What happens in the brain of schizophrenia patients?: an investigation from the viewpoint of neuropathology. *Nagoya J Med Sci* 75:11–28
- Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35:1503–19
- Jenkins MA, Traynelis SF (2012) PKC phosphorylates GluA1-Ser831 to enhance AMPA receptor conductance. *Channels (Austin)* 6:60–4
- Johnson MS, Lutz EM, Firbank S, Holland PJ, Mitchell R (2003) Functional interactions between native Gs-coupled 5-HT receptors in HEK-293 cells and the heterologously expressed serotonin transporter. *Cell Signal* 15:803–811
- Julian MD, Martin AB, Cuellar B, Rodriguez De Fonseca F, Navarro M, Moratalla R, Garcia-Segura LM (2003) Neuroanatomical relationship between type 1 cannabinoid receptors and dopaminergic systems in the rat basal ganglia. *Neuroscience* 119:309–18
- Kapur S, Remington G, Zipursky RB, Wilson AA, Houle S (1995) The D2 dopamine receptor occupancy of risperidone and its relationship to extrapyramidal symptoms: a PET study. *Life Sci* 57:PL103–7
- Kapur S, Zipursky R, Remington G (2000) Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:514–520
- Karam CS, Ballon JS, Bivens NM, Freyberg Z, Girgis RR, Lizardi-Ortiz JE, Markx S, Lieberman JA, Javitch JA (2010) Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci* 31:381–90
- Karayorgou M, Gogos JA (2004) The molecular genetics of the 22q11-associated schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res* 132:95–104
- Karayorgou M, Simon TJ, Gogos JA (2010) 22q11.2 microdeletions: linking DNA structural variation to brain dysfunction and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 11:402–16

- Kenakin T (1995) Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* 16:232–8
- Keshavan MS, Tandon R, Boutros NN, Nasrallah HA (2008) Schizophrenia, “just the facts”: What we know in 2008. Part 3: Neurobiology. *Schizophr Res* 106:89–107
- Kinney GG, Burno M, Campbell UC, Hernandez LM, Rodriguez D, Bristow LJ, Conn PJ (2003) Metabotropic glutamate subtype 5 receptors modulate locomotor activity and sensorimotor gating in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 306:116–23
- Kinney GG, O’Brien JA, Lemaire W, Burno M, Bickel DJ, Clements MK, Chen TB, Wisnoski DD, Lindsley CW, Tiller PR, Smith S, Jacobson MA, Sur C, Duggan ME, Pettibone DJ, Conn PJ, Williams DL Jr (2005) A novel selective positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor subtype 5 has in vivo activity and antipsychotic-like effects in rat behavioral models. *J Pharmacol Exp Ther* 313:199–206
- Klosterkötter J, Schultze-Lutter F, Ruhrmann S (2008) Kraepelin and psychotic prodromal conditions. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258:74–84
- Knable MB, Heinz A, Raedler T, Weinberger DR (1997) Extrapiramidal side effects with risperidone and haloperidol at comparable D2 receptor occupancy levels. *Psychiatry Res* 75:91–101
- Kniazeff J, Bessis A-S, Maurel D, Ansanay H, Prézeau L, Pin J-P (2004) Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nat Struct Mol Biol* 11:706–13
- Knight AR, Misra A, Quirk K, Benwell K, Revell D, Kennett G, Bickerdike M (2004) Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370:114–23
- Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P, Jayathilake K, Meltzer HY, Roth BL (2003) H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology* 28:519–26

- Kuroki T, Nagao N, Nakahara T (2008) Neuropharmacology of second-generation antipsychotic drugs: a validity of the serotonin-dopamine hypothesis. *Prog Brain Res* 172:199–212
- Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB (1996) Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9235–40
- Laruelle M, Frankle WG, Narendran R, Kegeles LS, Abi-Dargham A (2005) Mechanism of action of antipsychotic drugs: From dopamine D2 receptor antagonism to glutamate NMDA facilitation. *Clin Ther.* doi: 10.1016/j.clinthera.2005.07.017
- Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lanca AJ, O'Dowd BF, George SR (2004) Dopamine D1 and D2 Receptor Co-activation Generates a Novel Phospholipase C-mediated Calcium Signal. *J Biol Chem* 279:35671–35678
- Lewis y Lieberman 2000 (2000) Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28:325–334
- Lukasiewicz S, Polit A, Kędracka-Krok S, Wędzony K, Maćkowiak M, Dziedzicka-Wasylewska M (2010) Hetero-dimerization of serotonin 5-HT(2A) and dopamine D(2) receptors. *Biochim Biophys Acta* 1803:1347–58
- Luoma S, Hakko H, Ollinen T, Järvelin M-R, Lindeman S (2008) Association between age at onset and clinical features of schizophrenia: the Northern Finland 1966 birth cohort study. *Eur Psychiatry* 23:331–5
- Luttrell LM (2008) Reviews in molecular biology and biotechnology: Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol* 39:239–264
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455–65

- Marcellino D, Carriba P, Filip M, Borgkvist A, Frankowska M, Bellido I, Tanganelli S, Müller CE, Fisone G, Lluis C, Agnati LF, Franco R, Fuxe K (2008) Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology* 54:815–823
- Marshall FH, White J, Main M, Green A, Wise A (1999) GABA(B) receptors function as heterodimers. *Biochem Soc Trans* 27:530–5
- Masri B, Salahpour A, Didriksen M, Ghisi V, Beaulieu J-M, Gainetdinov RR, Caron MG (2008) Antagonism of dopamine D2 receptor/ -arrestin 2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci* 105:13656–13661
- McCarley RW, Wible CG, Frumin M, Hirayasu Y, Levitt JJ, Fischer IA, Shenton ME (1999) MRI anatomy of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45:1099–119
- McLean TH, Chambers JJ, Parrish JC, Braden MR, Marona-Lewicka D, Kurrasch-Orbaugh D, Nichols DE (2006) C-(4,5,6-trimethoxyindan-1-yl)methanamine: a mescaline analogue designed using a homology model of the 5-HT_{2A} receptor. *J Med Chem* 49:4269–74
- Mei L, Xiong W-C (2008) Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 9:437–52
- Meltzer H, Massey B (2011) The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Curr Opin Pharmacol* 11:59–67
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC (1989) Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 251:238–46
- Meyer N, MacCabe JH (2012) Schizophrenia. *Medicine (Baltimore)* 40:586–590
- Mierau J, Schneider FJ, Ensinger HA, Chio CL, Lajiness ME, Huff RM (1995) Pramipexole binding and activation of cloned and expressed dopamine D₂, D₃ and D₄ receptors. *Eur J Pharmacol* 290:29–36
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189–225

- Moghaddam B, Adams BW (1998) Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 281:1349–52
- Möller D, Kling RC, Skultety M, Leuner K, Hübner H, Gmeiner P (2014) Functionally selective dopamine D₂, D₃ receptor partial agonists. *J Med Chem* 57:4861–75
- Moreno JL, Holloway T, Albizu L, Sealfon SC, González-Maeso J (2011) Metabotropic glutamate mGlu2 receptor is necessary for the pharmacological and behavioral effects induced by hallucinogenic 5-HT_{2A} receptor agonists. *Neurosci Lett* 493:76–79
- Moreno JL, Holloway T, Gonzalez-Maeso J (2013) G protein-coupled receptor heterocomplexes in neuropsychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci* 117:187–205
- Moreno JL, Holloway T, González-Maeso J (2013) G protein-coupled receptor heterocomplexes in neuropsychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci* 117:187–205
- Mueser KT, MCGurk SR (2004) Schizophrenia. *363:2063–2072*
- Mueser KT, MCGurk SR (2004) Schizophrenia. *Lancet (London, England)* 363:2063–72
- Murphy JA, Stein IS, Lau CG, et al (2014) Phosphorylation of Ser1166 on GluN2B by PKA Is Critical to Synaptic NMDA Receptor Function and Ca²⁺ Signaling in Spines. *J Neurosci* 34:869–879
- Navarro G, Carriba P, Gandí J, Ciruela F, Casadó V, Cortés A, Mallol J, Canela EI, Lluís C, Franco R (2008) Detection of Heteromers Formed by Cannabinoid CB₁, Dopamine D₂, and Adenosine A_{2A} G-Protein-Coupled Receptors by Combining Bimolecular Fluorescence Complementation and Bioluminescence Energy Transfer. *Sci World J* 8:1088–1097
- Nichols DE, Nichols CD (2008) Serotonin Receptors. *Chem Rev* 108:1614–1641
- Nocjar C, Roth BL, Pehek EA (2002) Localization of 5-HT(2A) receptors on dopamine cells in subnuclei of the midbrain A10 cell group. *Neuroscience* 111:163–76

- Nordstrom A, Farde L, Wiesel F (1993) : Central D2- dopamine receptor occupancy in relation to antipsychotic drug effects: a double-blind PET study of schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 33:227–235
- Panetta R, Greenwood MT (2008) Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discovery. *Drug Discov Today* 13:1059–1066
- Perreault ML, Hasbi A, Alijaniam M, Fan T, Varghese G, Fletcher PJ, Seeman P, O'Dowd BF, George SR (2010) The dopamine D1-D2 receptor heteromer localizes in dynorphin/enkephalin neurons: increased high affinity state following amphetamine and in schizophrenia. *J Biol Chem* 285:36625–34
- Pickel VM, Chan J, Kearns CS, Mackie K (2006) Targeting dopamine D2 and cannabinoid-1 (CB1) receptors in rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 495:299–313
- Pitschel-Walz G, Leucht S, Bäuml J, Kissling W, Engel RR (2001) The effect of family interventions on relapse and rehospitalization in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Bull* 27:73–92
- Porter RHP, Benwell KR, Lamb H, Malcolm CS, Allen NH, Revell DF, Adams DR, Sheardown MJ (1999) Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 128:13–20
- Rapport MM (1949) Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem* 180:961–9
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem* 174:735–41
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176:1243–51
- Rashid M, Manivet P, Nishio H, Pratuangdejkul J, Rajab M, Ishiguro M, Launay JM, Nagatomo T (2003) Identification of the binding sites and selectivity of sarpogrelate, a novel 5-HT₂ antagonist, to human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor subtypes by molecular modeling. *Life Sci* 73:193–207

- Roberts AJ, Krucker T, Levy CL, Slanina KA, Sutcliffe JG, Hedlund PB (2004) Mice lacking 5-HT₇ receptors show specific impairments in contextual learning. *Eur J Neurosci* 19:1913–1922
- Ross CA, Margolis RL, Reading SAJ, Pletnikov M, Coyle JT (2006) Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52:139–53
- Roth BL, Choudhary MS, Khan N, Uluer AZ (1997) High-affinity agonist binding is not sufficient for agonist efficacy at 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors: evidence in favor of a modified ternary complex model. *J Pharmacol Exp Ther* 280:576–83
- Roth BL, McLean S, Zhu XZ, Chuang DM (1987) Characterization of two [³H]ketanserin recognition sites in rat striatum. *J Neurochem* 49:1833–8
- Rozenfeld R, Devi LA (2010) Receptor heteromerization and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 31:124–130
- Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC (1993) Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8547–51
- Sarkisyan G, Hedlund PB (2009) The 5-HT₇ receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. *Behav Brain Res* 202:26–31
- Sautel F, Griffon N, Lévesque D, Pilon C, Schwartz JC, Sokoloff P (1995) A functional test identifies dopamine agonists selective for D₃ versus D₂ receptors. *Neuroreport* 6:329–32
- Sawa A, Snyder SH (2002) Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science* (80-) 296:692–695
- Schenkel LS, Silverstein SM (2004) Dimensions of premorbid functioning in schizophrenia: a review of neuromotor, cognitive, social, and behavioral domains. *Genet Soc Gen Psychol Monogr* 130:241–70
- Schwartz TW, Holst B (2007) Allosteric enhancers, allosteric agonists and allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol Sci* 28:366–373

- Sebat J, Levy DL, McCarthy SE (2009) Rare structural variants in schizophrenia: one disorder, multiple mutations; one mutation, multiple disorders. *Trends Genet* 25:528–35
- Seeman M V, Seeman P (2014) Is schizophrenia a dopamine supersensitivity psychotic reaction? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 48:155–60
- Seeman P (2006) Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. *Expert Opin Ther Targets* 10:515–31
- Seeman P (2013) Are dopamine D2 receptors out of control in psychosis? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46:146–52
- Seeman P, Corbett R, Van Tol HH (1997) Atypical neuroleptics have low affinity for dopamine D2 receptors or are selective for D4 receptors. *Neuropsychopharmacology* 16:93–110; discussion 111–35
- Seeman P, McCormick PN, Kapur S (2007) Increased dopamine D2 receptors in amphetamine-sensitized rats, measured by the agonist [3H](+)PHNO. *Synapse* 61:263–267
- Shipley WC, Kant F (1940) The insulin-shock and metrazol treatments of schizophrenia, with emphasis on psychological aspects. *Psychol Bull* 37:259–284
- Sills TL, Azampanah A, Fletcher PJ (2001) The adenosine A2A agonist CGS 21680 reverses the reduction in prepulse inhibition of the acoustic startle response induced by phencyclidine, but not by apomorphine and amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 156:187–93
- Smith BM, Smith JM, Tsai JH, Schultz JA, Gilson CA, Estrada SA, Chen RR, Park DM, Prieto EB, Gallardo CS, Sengupta D, Dosa PI, Covell JA, Ren A, Webb RR, Beeley NR, Martin M, Morgan M, Espitia S, Saldana HR, Bjenning C, Whelan KT, Grottick AJ, Menzaghi F, Thomsen WJ (2008) Discovery and structure-activity relationship of (1R)-8-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1-methyl-1H-3-benzazepine (Lorcaserin), a selective serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist for the treatment of obesity. *J Med Chem* 51:305–13

- Sokoloff P, Giros B, Martres M-P, Bouthenet M-L, Schwartz J-C (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146–151
- St Clair D, Xu M, Wang P, et al (2005) Rates of adult schizophrenia following prenatal exposure to the Chinese famine of 1959-1961. *JAMA* 294:557–62
- Stefansson H, Rujescu D, Cichon S, et al (2008) Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature* 455:232–6
- Stein LI, Santos AB (1998) Assertive community treatment of persons with severe mental illness. W W Norton & Co
- Swayze VW (1995) Frontal leukotomy and related psychosurgical procedures in the era before antipsychotics (1935-1954): a historical overview. *Am J Psychiatry* 152:505–15
- Szymanski S, Lieberman JA, Alvir JM, Mayerhoff D, Loebel A, Geisler S, Chakos M, Koreen A, Jody D, Kane J (1995) Gender differences in onset of illness, treatment response, course, and biologic indexes in first-episode schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 152:698–703
- Tandon R, Gaebel W, Barch DM, et al (2013) Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. *Schizophr Res* 150:3–10
- Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA (2008) Schizophrenia, “just the facts” what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* 102:1–18
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2009) Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res* 110:1–23
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2010) Schizophrenia, “Just the Facts” 5. Treatment and prevention Past, present, and future. *Schizophr Res* 122:1–23
- Tebano MT, Martire A, Chiodi V, Pepponi R, Ferrante A, Domenici MR, Frank C, Chen J-F, Ledent C, Popoli P (2009) Adenosine A_{2A} receptors enable the synaptic effects of cannabinoid CB₁ receptors in the rodent striatum. *J Neurochem* 110:1921–1930

- Teitler M, Toohey N, Knight JA, Klein MT, Smith C (2010) Clozapine and other competitive antagonists reactivate risperidone-inactivated h5-HT₇ receptors: radioligand binding and functional evidence for GPCR homodimer protomer interactions. *Psychopharmacology (Berl)* 212:687–97
- Torrey EF, Miller J, Rawlings R, Yolken RH (1997) Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature. *Schizophr Res* 28:1–38
- Twarog BM, Page IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 175:157–61
- Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, et al (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1–13
- Urs NM, Snyder JC, Jacobsen JPR, Peterson SM, Caron MG (2012) Deletion of GSK3 in D2R-expressing neurons reveals distinct roles for β -arrestin signaling in antipsychotic and lithium action. *Proc Natl Acad Sci* 109:20732–20737
- van Os J, Kapur S (2009) Schizophrenia. *Lancet* 374:635–645
- van Rossum JM (1966) The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch Int Pharmacodyn therapie* 160:492–4
- van Wieringen J-P, Shalgunov V, Janssen HM, Franssen PM, Janssen AGM, Michel MC, Booij J, Elsinga PH (2014) Synthesis and characterization of a novel series of agonist compounds as potential radiopharmaceuticals for imaging dopamine D_{2/3} receptors in their high-affinity state. *J Med Chem* 57:391–410
- Vanover KE, Harvey SC, Son T, Bradley SR, Kold H, Makhay M, Veinbergs I, Spalding TA, Weiner DM, Andersson CM, Tolf BR, Brann MR, Hacksell U, Davis RE (2004) Pharmacological characterization of AC-90179 [2-(4-methoxyphenyl)-N-(4-methyl-benzyl)-N-(1-methyl-piperidin-4-yl)-acetamide hydrochloride]: a selective serotonin 2A receptor inverse agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 310:943–51

- Varela MJ, Lage S, Caruncho HJ, Cadavid MI, Loza MI, Brea J (2015) Reelin influences the expression and function of dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{2A} receptors: a comparative study. *Neuroscience* 290:165–74
- Verdoux H (2004) Perinatal risk factors for schizophrenia: how specific are they? *Curr Psychiatry Rep* 6:162–7
- Vialli M, Erspamer V (1937) Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat* 27:81–99
- Villardaga J-P, Agnati LF, Fuxe K, Ciruela F (2010) G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J Cell Sci* 123:4215–20
- Weis WI, Kobilka BK (2008) Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr Opin Struct Biol* 18:734–740
- Westerink BHC (2002) Can antipsychotic drugs be classified by their effects on a particular group of dopamine neurons in the brain? *Eur J Pharmacol* 455:1–18
- Winlow W, Profit L, Chrisp P (2006) Aripiprazole: the evidence of its therapeutic impact in schizophrenia. *Core Evid* 1:251–64
- Zhang JY, Kowal DM, Nawoschik SP, Lou Z, Dunlop J (2006) Distinct functional profiles of aripiprazole and olanzapine at RNA edited human 5-HT_{2C} receptor isoforms. *Biochem Pharmacol* 71:521–9
- Zhen J, Antonio T, Dutta AK, Reith MEA (2010) Concentration of receptor and ligand revisited in a modified receptor binding protocol for high-affinity radioligands: [³H]Spiperone binding to D₂ and D₃ dopamine receptors. *J Neurosci Methods* 188:32–38

