



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Oligomerización de receptores α_{1A} adrenérgicos y receptores dopaminérgicos en el SNC: implicación en la modulación de la atención

Patricia C. Homar Ruano

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

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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOMEDICINA MOLECULAR

**OLIGOMERIZACIÓN DE RECEPTORES α_{1A}
ADRENÉRGICOS Y RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS
EN EL SNC: IMPLICACIÓN EN LA MODULACIÓN DE
LA ATENCIÓN**

Memoria presentada por la Graduada en Bioquímica
PATRICIA C. HOMAR RUANO
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona

Esta tesis se ha inscrito en el programa de doctorado de Biomedicina del Departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular de la Universidad de Barcelona. El trabajo experimental y la redacción de la presente memoria han sido realizados por Patricia C. Homar Ruano bajo la dirección del Dr. Enric I. Canela Campos y el Dr. Vicent Casadó Burillo

Dr. Enric I. Canela Campos

Dr. Vicent Casadó Burillo

Patricia C. Homar Ruano

Barcelona, Noviembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Abans de tot, agrair a l'Enric que fes possible que iniciés aquesta Tesi, i sobretot que haguem aconseguit finalitzar-la malgrat tots els entrebancs. I a l'Estefania per haver-me ensenyat a moure'm i organitzar-me al laboratori.

Fer la Tesi ha sigut molt semblant a una carrera d'obstacles al llarg de quatre anys, per sort molts, dintre i fora del laboratori, m'heu acompanyat durant aquest camí i m'heu ajudat a seguir fins el final. Generalment no tenim l'oportunitat d'agrair a la família i els amics el que fan per nosaltres de manera tan "oficial" així que aprofitaré la ocasió.

Por supuesto quiero empezar por dar las gracias a la familia. Al fin y al cabo, llega uno donde está siempre gracias a ellos. A pesar de no entender ni el título de la Tesis, no saber si estoy estudiando o trabajando, ni que narices hacía en el laboratorio los fines de semana siempre me habéis ayudado y tenido paciencia en mis momentos de estrés máximo. Así que gracias mamá i gràcies papà. Y en especial gracias a Nando que además de todo lo de antes se ha leído gran parte de este Trabajo para aportar su granito de arena con su TOC gramatical, ¡gracias!

Entrant a NBM començarem per la més veterana, encara que sembli que tens 23. Jas sempre has estat allà per solucionar totes les cagades que he pogut anar fent al llarg de la tesi, per preparar-me mil milions de plaques de cèl·luls quan les he necessitat i per tornar-me loca cantant quan intentava treballar jajaja. Bichi, l'últim en abandonar-me al laboratori, vas viure els moments més estressants de tots, gràcies per ajudar-me a gestionar-ho!. Iñi, tu fuiste mi primer amigui del lab, y sabes que lo llevo en mi corazoncito, eso y el sentimiento de culpa por tu pipeta-Siber jajaja, espero verte pronto y que me traigas garroticos. Edgar tots sabem que els nostres inicis van ser, si més no, complicats però després d'un temps de buscar vaig poder trobar el teu petit coret i et vas convertir en el meu company preferit de coffee breaks al lab, i un molt bon amic, t'he trobat a faltar aquest últim any. Bueno Miri, tu em feies por jaja ara mateix em fa moltíssima gràcia haver pensat això de tu, gràcies per demostrar-me com ets de veritat, ara només et vendrà tot lo bo que mereixes. Mar, poder fer "pinyita" amb tu va fer les coses més fàcils, gràcies per estar sempre allà per ajudar fos el que fos i sempre amb un somriure encara que portessis 10 anys sense dormir jajaja, espero que tornis ben prest a terres catalanes, o com a mínim, a Europa. Edgar, Mar i Miri heu estat lluny aquest últims mesos

però encara així sempre heu estat ben presents. Sou un gran exemple de vocació i dedicació nens, arribareu on vulgueu.

Cris, la cuqui, a tu te vaig conèixer a NBM pensant que ningú podia ser tan cuqui de veritat, però si. Vas passar a ser una gran amiga quan vas marxar i ara també la compi de pis més top. Gràcies per estar allà al instant per qualssevol situació. I gràcies per incloure a la meua vida a la Marta, siempre llegas con una sonrisa a casa y con ganas de palique, así da gusto!

A mis otros BQ-doctorandos, Lids tu has viscut aquesta Tesi com si estiguessis al lab o casi com si fos la teva pròpia Tesi. Has sigut tal qual sa definició de per lo bó i per lo dolent, gràcies per s'empatia, sa comprensió i paciència quan tenia tanta son que no podia ni xerrar o me posava en el "modo más dramático posible" (Si, ja se que moriré d'exagerada jajaja). Haver coincidit en tot es procés d'escriptura, papers i una miqueta de desesperació amb tu ha fet aquest camí, no sé si més fàcil, però si molt més divertit. I ja que estic agraint-te a tu aprofitaré per xerrar se s'altre membre de sa "V" jaja , gràcies a nen Perusqui per alimentar-me es diumenges i fer-los menys avorrits encara que haguéssim de fer feina. Heu sigut uns companys d'escriptura brutals, vos enyoraré molt, mos veim sa Roqueta!. Andrea tu fuiste mi compi de vida los primeros tres años. Gracias por cuidarme, no sé si como una amiga o más bien como una mami (sabíamos que comía gracias a ti y ahora puedo confirmarlo jaja) pero muchas gracias. No cualquier amigo se pasa 8 horas en urgencias contigo y duerme en el hospital durante una semana para hacerte compañía. Mucha suerte para lo que te queda de tesis Andriu, esto está hecho. Raquel mi inseparable desde Lab I hasta que llegó la Tesis, aun así, lejos (ahora mucho más) pero siempre cerca, nos vemos en NY Caro, no hay nadie mejor con quien celebrar mi tesis. Y a Alber y Alex, a una llamada o un whatsapp para todo lo que de verdad es importante.

Para acabar, quería hablar de los que están fuera del mundo científico pero que aun así han formado parte. Aina i Mar (lletugues) se diu que es amics de d'institut se perden però vosaltres després de molts anys seguíu sent ses meves preferides, per molts anys més de viatges i de no deixar dormir a na Mar. A los de Quality, fuente inagotable de fiestas y distracciones muy necesarias y en especial a Mónica, gracias por tantas, tantísimas risas.

Moltes gràcies a tots.

RESUMEN

La atención es el proceso cognitivo básico que nos otorga la capacidad de seleccionar aquella información interna o externa que va a ser relevante para la toma de decisiones y el control del comportamiento. Múltiples regiones cerebrales interconectadas entre ellas forman una compleja red de circuitos neuronales capaces de activar y modular diversas funciones cognitivas, como la atención. Concretamente, la corteza prefrontal (PFC) es un punto neurálgico de estos circuitos que, a través de distintas regiones funcionales, orquesta prácticamente todos los aspectos del comportamiento y la cognición humana. A su vez, la PFC y sus conexiones se encuentran finamente reguladas por complejos sistemas de neurotransmisores capaces de responder a demandas internas o externas y provocar la activación o la inhibición de la atención y las respuestas cognitivas y/o motoras apropiadas. Entre estos sistemas de neurotransmisores destaca el sistema catecolaminérgico. La noradrenalina (NE) y la dopamina (DA) actúan cooperativamente para ejercer efectos complementarios en el refuerzo y la regulación de las conexiones de la PFC mediante la activación diferencial de distintas familias de receptores acoplados a proteína G (GPCRs), los cuales son importantes dianas terapéuticas para el tratamiento de diversos trastornos neuropsiquiátricos. Actualmente, está plenamente aceptado que los GPCRs pueden interaccionar entre sí para generar homo- o heterooligómeros que representan una nueva entidad funcional con características bioquímicas y farmacológicas únicas por lo que los heterómeros de GPCRs se consideran posibles dianas farmacológicas prometedoras. Múltiples estudios han reportado la capacidad de los receptores de DA para formar complejos oligoméricos, lo que sugiere un papel clave del proceso de oligomerización en la regulación de la señalización DAérgica.

El objetivo de esta Tesis ha sido evaluar si los efectos complementarios de la DA y la NE en la PFC y en el estriado son, en parte, regulados por interacciones intramoleculares en complejos formados por sus receptores. Nuestros resultados ponen de manifiesto la capacidad del receptor adrenérgico α_{1A} para formar heterodímeros funcionales con los receptores de dopamina, D_4 y D_{1-like} en células vivas y en PFC y estriado de rata. Los receptores en estos complejos actúan como moduladores alostéricos del otro protómero y provocan modificaciones en las potencias de activación de sus proteínas G canónicas y alteran su selectividad funcional. Funcionalmente, los heterodímeros $D_4R-\alpha_{1A}R$ y $D_{1R}-\alpha_{1A}R$ exhiben un patrón común de modulación negativa bidireccional tras la coactivación de los receptores tanto con agonistas, como con antagonistas de la pareja. Lo que indica que la interacción molecular entre receptores catecolaminérgicos de distinta familia actúa atenuando la respuesta de los protómeros en el complejo. Además, se hemos descrito diferencias funcionales clave entre la variante más común del receptor D_4 , $D_{4.4}R$, y la variante vinculada al trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), $D_{4.7}R$. Estas diferencias funcionales resultaron ser dependientes de su heteromerización con $\alpha_{1A}R$. Los receptores D_4 , D_1 y α_{1A} participan diferencialmente en la modulación de la atención, las funciones ejecutivas y del control motor. Dado que estos procesos se encuentran afectados en distintas patologías neuropsiquiátricas como, por ejemplo, en los trastornos del neurodesarrollo, como el TDAH, el síndrome de Gilles de la Tourette, el trastorno obsesivo compulsivo o los trastornos del espectro autista, nuestros resultados sugieren que los heterodímeros de estos receptores pueden ser dianas terapéuticas prometedoras para el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos. Los resultados de esta Tesis ponen de manifiesto la relevancia de la heteromerización de receptores adrenérgicos y dopaminérgicos en la PFC y el estriado para modular los efectos complementarios de las catecolaminas. Así, estos heterodímeros constituyen un nivel superior, y más complejo de la regulación de la señalización catecolaminérgica.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. La atención..... | 3 |
| 1.1 Redes funcionales de la atención..... | 4 |
| 1.2 Factores de relevancia de estímulos..... | 6 |
| 1.3 Tipos de atención..... | 7 |
| 2. Sustratos neurales de la atención..... | 9 |
| 3. Neuromodulación de la atención | 17 |
| 3.1 Neurotransmisión catecolaminérgica..... | 18 |
| 3.1.1 Neurotransmisión dopaminérgica..... | 20 |
| 3.1.2 Neurotransmisión noradrenérgica..... | 29 |
| 3.2 Neurotransmisión colinérgica | 36 |
| 3.3 Neurotransmisión serotoninérgica..... | 37 |
| 4. Trastornos del neurodesarrollo..... | 39 |
| 4.1 Alteraciones estructurales y conectivas..... | 46 |
| 4.2 Disfunción del sistema catecolaminérgico..... | 48 |
| 5. Receptores acoplados a proteína G | 56 |
| 5.1 Estructura de los GPCRs..... | 57 |
| 5.2 Clasificación de los GPCRs..... | 59 |
| 5.3 Activación y vías de señalización de los GPCRs..... | 61 |
| 5.3.1 Vías de señalización dependientes de proteína G..... | 62 |
| 5.3.2 Vías de señalización independiente de proteína G..... | 64 |
| 5.4 Oligomerización de GPCRs..... | 67 |
| 5.4.1 Relevancia funcional de los oligómeros de GPCRs..... | 69 |
| II. OBJETIVOS..... | 73 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 77 |
| IV. RESULTADOS..... | 97 |
| 1. Capítulo 1: Diferencias funcionales entre el receptor de dopamina D _{4,4} R y la variante asociada a TDAH- D _{4,7} R dependientes de su heteromerización con el adrenoceptor α_{1A} | 99 |

| | |
|--|-----|
| 2. Capítulo 2: Implicación de los heterómeros formados por los receptores de adrenalina α_{1A} y de dopamina D_1 en la modulación de la atención..... | 123 |
| V. DISCUSIÓN..... | 141 |
| VI. CONCLUSIONES | 167 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA..... | 173 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Anatomía de las tres redes atencionales. | 10 |
| Figura 2. La corteza prefrontal (PFC) regula la atención el comportamiento y las emociones a través de numerosos descendentes hacia otras áreas cerebrales. ... | 16 |
| Figura 3. Respresentación esquemática de la biosíntesis de catecolaminas..... | 19 |
| Figura 4. Principales vías dopaminérgicas en el cerebro. | 20 |
| Figura 5. Representación esquemática de las dos subfamilias de receptores de dopamina..... | 21 |
| Figura 6. Modelo del tercer bucle intracelular (ICL3) del receptor $D_{4,4}$ y $D_{4,7}$ | 23 |
| Figura 7. Impacto de los niveles de neuromoduladores en el funcionamiento de la PFC..... | 27 |
| Figura 8. Principales procesos regulados por el sistema LC-NE..... | 30 |
| Figura 9. Vías de señalización dependientes de proteína G activadas por las distintas familias de receptores adrenérgicos.). | 31 |
| Figura 10. Representación esquemática de las funciones de α_1R en la DLPFC de primates..... | 35 |
| Figura 11. Representación esquemática de la compleja etiología multifactorial vinculada con la aparición de trastornos neuropsiquiátricos. | 45 |
| Figura 12. Esquema del circuito de control motor en los ganglios basales en condiciones normales (a) y en pacientes de SGT (b)..... | 52 |
| Figura 13. Ligandos endógenos y vías de señalización medidas por la activación de GPCRs. | 56 |
| Figura 14. Estructura cristalizada del complejo $\mu OR-G\alpha_i$ | 59 |
| Figura 15. Representación esquemática de la estructura de las principales familias de GPCRs..... | 60 |
| Figura 16. Representación esquemática de las vías de transducción de señales dependientes e independientes de proteína G mediadas por GPCRs. | 61 |
| Figura 17. Ciclo de activación de la proteína G. | 63 |

| | |
|---|-----|
| Figura 18. Fosforilación en regiones específicas (barcode) mediada por distintas isoformas de GRK inducen distintos efectos tras el reclutamiento de β -arrestinas. | 66 |
| Figura 19. Participación funcional de la oligomerización en el ciclo de vida de los GPCRs. | 70 |
| Figura 20. Representación esquemática de la técnica de BRET ¹ | 82 |
| Figura 21. Representación esquemática del ensayo de BRET de activación de proteína G. | 84 |
| Figura 22. Representación esquemática del reordenamiento de las distintas subunidades de la proteína G heterotrimérica inducida por la activación del receptor. | 85 |
| Figura 23. Representación esquemática de la técnica de BiFC. | 87 |
| Figura 24. Esquema del funcionamiento de la técnica de PLA. Kit Duolink II | 88 |
| Figura 25. Fundamento del ensayo de determinación de AMPc intracelular. | 90 |
| Figura 26. Fundamento de la técnica de DMR. Extraído de Perkinelmer. com | 93 |
| Figura 27. Identificación mediante ensayos de BRET de los heterómeros $\alpha_{1A}R$ - $D_{4.4}R$ y $\alpha_{1A}R$ - $D_{4.7}R$ en células HEK-293T. | 101 |
| Figura 28. Activación de la proteína $G\alpha_{i1}$ mediada por los receptores $D_{4x}R$ y los complejos $D_{4x}R$ - $\alpha_{1A}R$. | 106 |
| Figura 29. Activación de las proteínas $G\alpha_q$ y $G\alpha_s$ mediada por $\alpha_{1A}R$ y los complejos $D_{4x}R$ - $\alpha_{1A}R$. | 109 |
| Figura 30. La coactivación del heterómero $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$ produce una modulación negativa en su señalización, pero no la coactivación del heterómero $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$. | 112 |
| Figura 31. Evaluación del reclutamiento de β arrestina-2 en células HEK-293 T cotransfectadas con $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$. | 115 |
| Figura 32. Evaluación de la fosforilación de ERK 1/2 inducida por la activación de los complejos $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$. | 117 |
| Figura 33. Identificación de heterómeros de receptores D_4 y α_{1A} en corteza prefrontal y estriado de rata. | 119 |
| Figura 34. Efecto del bloqueo de la formación del complejo D_4R - $\alpha_{1A}R$ sobre la fosforilación de ERK 1/2 en corteza y estriado de rata. | 120 |
| Figura 35. Identificación de heterómeros de receptores α_{1A} y D_1 en células HEK-293 T. | 125 |
| Figura 36. Evaluación de la activación de la proteína $G\alpha_q$ mediada por $\alpha_{1A}R$ y D_1R - $\alpha_{1A}R$. | 129 |
| Figura 37. Evaluación de la activación de la proteína $G\alpha_s$ mediada por $\alpha_{1A}R$, D_1R y D_1R - $\alpha_{1A}R$. | 131 |
| Figura 38. La coactivación del heterómero D_1R - $\alpha_{1A}R$ modula negativamente su señalización. | 134 |

| | |
|---|-----|
| Figura 39. Efecto de la coactivación del heterómero D ₁ R-α _{1A} R en la activación celular global. | 135 |
| Figura 40. Evaluación de la fosforilación de ERK 1/2 inducida por la activación del heterómero D ₁ R-α _{1A} R. | 136 |
| Figura 41. Caracterización funcional del complejo D _{1/5} R-α _{1A} R en estriado y corteza de rata. | 139 |
| Figura 42. Identificación y caracterización funcional del heterómero D ₅ R-α _{1A} R en células HEK-293 T.. | 140 |
| Figura 43. Representación esquemática de las consecuencias funcionales de la heteodimerización entre los receptores D ₄ R y α _{1A} R. | 165 |
| Figura 44. Representación esquemática de las consecuencias funcionales de la heteodimerización entre los receptores D ₁ R y α _{1A} R. | 166 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Resumen de publicaciones relativas a las características diferenciales entre variantes de D ₄ R..... | 24 |
| Tabla 2. Relación entre la escala temporal de activación del LC con distintos procesos cognitivos..... | 33 |
| Tabla 3. Criterios diagnósticos para el TDAH, TOC, TEA y SGT..... | 42 |
| Tabla 4. Principales regiones cerebrales afectadas en los trastornos del neurodesarrollo..... | 46 |
| Tabla 5. Tabla de genes relacionados con los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico potencialmente implicados en los trastornos del neurodesarrollo..... | 50 |
| Tabla 6. Parámetros de BRET estimados de las curvas de saturación de BRET de los heterómeros D _{4.4} R-α _{1A} R y D _{4.7} R-α _{1A} R..... | 102 |
| Tabla 7. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína Gα _i inducida por DA y NE sobre D _{4.4} R, D _{4.7} R y los complejos D _{4.4} R-α _{1A} R and D _{4.7} R-α _{1A} R y estudio del efecto del A61603 y el prazosín sobre la activación inducida por la DA..... | 105 |
| Tabla 8. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína Gα _q inducida por NE y A61603 sobre α _{1A} R y los complejos D _{4.4} R-α _{1A} R y D _{4.7} R-α _{1A} R y estudio del efecto del A41.2997 y el L-745.870 sobre la activación inducida por el A61603..... | 108 |
| Tabla 9. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína Gα _s inducida por NE y A61603 sobre α _{1A} R y los complejos D _{4.4} R-α _{1A} R y D _{4.7} R-α _{1A} R y estudio del efecto del A41.2997 y el L-745.870 sobre la activación inducida por el A61603..... | 108 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 10. Potencias estimadas para la NE y el A6160 para la activación de G_{α_q} y G_{α_s} mediada por $\alpha_{1A}R$ y los complejos $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$ | 110 |
| Tabla 11. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de reclutamiento de β Arrestina-2 mediado por los complejos $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$ | 114 |
| Tabla 12. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína G_{α_q} mediada por $\alpha_{1A}R$ y el heterómero $D_1R-\alpha_{1A}R$ | 128 |
| Tabla 13. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína G_{α_s} mediada por $\alpha_{1A}R$, D_1R y $D_1R-\alpha_{1A}R$ en respuesta a agonistas adrenérgicos y dopaminérgicos. | 128 |
| Tabla 14. Efecto del cotratamiento del heterómero $D_1R-\alpha_{1A}R$ con antagonistas y agonistas sobre los parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína G_{α_s} | 130 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| 5-HT | Serotonina |
| 5-HTR | Receptor de serotonina |
| AC | Adenilato ciclasa |
| ACC | Corteza cingulada anterior |
| Ach | Acetilcolina |
| AMPC | Adenosina monofosfato cíclico |
| BiFC | Complementación bimolecular fluorescente |
| BRET | Transferencia de energía por resonancia bioluminiscente |
| CSTC | Circuito corticoestriado-talamicocortical |
| DA | Dopamina |
| DAT | Transportador de dopamina |
| DLPF | Corteza prefrontal dorsolateral |
| D _n R | Receptor de dopamina (D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ , D ₅) |
| DS | Estriado dorsal |
| ECL | Bucle extracelular |
| EPI | Epinefrina |
| ERK | Quinasa regulada por señales extracelulares |
| FEF | Campos visuales frontales |
| fMRI funcional) | Imagen por resonancia magnética funcional (neuroimagen funcional) |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| GDB | Guanosina difosfato |
| G _n | Subunidad de la proteína G (G α , G β , G γ) |
| GP (GPi, GPe) | Globo pálido (interno, externo) |
| GPCR | Receptor acoplado a proteína G |
| GRK | Quinasa de GPCRs serina-treonina específica |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| HEK | Células embrionarias de riñón humano |
| ICL | Bucle intracelular |
| IFC | Corteza frontal inferior |
| IP ₃ | Inositol 1, 4, 5-trisfosfato |
| LC | Locus coeruleus (núcleo cerúleo) |
| LFP | Potenciales de campo local |
| LIP | Corteza lateral intraparietal |
| MAO | Monoamina oxidasa |
| MAPK | Proteína quinasa activada por mitógenos |
| NAC | Núcleo accumbens |
| NAT | Transportador de norepinefrina |
| NE | Norepinefrina |

| | |
|---------------|--|
| NMDAR | Receptor glutamatérgico ionotrópico N-metil-D-aspartato |
| OFC | Corteza orbitofrontal |
| PET | Tomografía de emisión de positrones |
| PFC | Corteza prefrontal |
| PIP2 | Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato |
| PKA | Proteína quinasa A dependiente de AMPc |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PLA | Ensayo de ligación por proximidad |
| PLC β | Enzima fosfolipasa C β |
| Rluc | Enzima <i>Renilla reniformis</i> luciferasa |
| SC | Colículo superior |
| SGT | Síndrome de Gilles de la Tourette |
| SMA | Áreas motoras suplementarias |
| SN (SNc, SNr) | Sustancia negra (región compacta, región reticulada) |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SSRI | Inhibidores de la recaptación de serotonina |
| TDAH | Trastorno por déficit de atención e hiperactividad |
| TEA | Trastornos del espectro autista |
| TM | Dominio transmembrana |
| TOC | Trastorno obsesivo compulsivo |
| V1 | Corteza visual primaria V1 |
| VMAT | Transportador vesicular de monoaminas |
| VMPFC | Corteza prefrontal ventromedial |
| VS | Estriado ventral |
| VTA | Área tegmental ventral |
| WT | <i>Wild type</i> |
| YFP | Proteína fluorescente amarilla |
| α_n R | Receptor α -adrenérgico (α_1 R, α_2 R) |
| β_n R | Receptor β -adrenérgico (β_1 R, β_2 R, β_3 R) |

I. Introducción

1. La atención

La atención es el proceso cognitivo básico que, ante la excesiva cantidad de estímulos e información a la que nos exponemos diariamente, nos otorga la capacidad de seleccionar aquella información interna (pensamientos o recuerdos) o externa que va a ser relevante para la toma de decisiones y el comportamiento y que nos permite alcanzar unos objetivos concretos ¹⁻³. Debido a que nos encontramos expuestos a un elevado número de situaciones, objetos y estímulos que presentan distintos niveles de relevancia o importancia para cada individuo, seleccionarlos es una capacidad cognitiva esencial para la supervivencia y el desarrollo de la vida diaria. Asimismo, también se entiende que la atención es un mecanismo crucial para la regulación y el control de la cognición, ya que se encuentra íntimamente relacionada con la percepción, la memoria, el aprendizaje o la motivación. Por ello, difícilmente aprenderemos o memorizaremos algo a lo que no le prestemos atención ⁴.

Durante muchos años la atención fue considerada por los filósofos como una simple característica de la propia consciencia de los individuos, y no fue hasta finales del siglo XIX cuando el filósofo William James ² desarrolló el estudio de la atención como un proceso independiente a la consciencia. James (1980) planteó el concepto de atención como un proceso fundamental para el desempeño humano y desde ese momento, numerosos autores se han centrado en comprender los complejos mecanismos que regulan dicho proceso.

La atención la conforman un conjunto de procesos de naturaleza dinámica y dependiente del tiempo. Cuando un estímulo nuevo capta nuestro interés comienza el proceso atencional que posteriormente evolucionará a un estado de falta de atención, o bien finalizará con el inicio de otro proceso atencional ¹. La duración del proceso atencional dependerá de la intensidad o la relevancia del estímulo, es decir,

de la cantidad de recursos o del nivel de concentración necesario para realizar una tarea o procesar un acontecimiento o un estímulo.

La atención, a su vez, está compuesta por distintos elementos (motores, perceptivos, emocionales y motivacionales), por lo que es un proceso altamente complejo desde un punto de vista conceptual y funcional ⁵. En base a esta complejidad funcional, desde el trabajo de James ², han surgido una gran variedad de modelos teóricos para explicar su funcionamiento y regulación. Una de las teorías más influyentes es el modelo teórico de Posner^{6,7}, el cual divide el sistema atencional en tres redes funcionales asociadas a distintos sustratos y vías neurales, de modo que actualmente el estudio de la atención se basa en el análisis de estas redes funcionales.

1.1 Redes funcionales de la atención

La atención no es el resultado de la activación de un solo centro neural ni tampoco deriva de la activación cerebral global, sino que es consecuencia de la activación e interacción entre distintos circuitos anatómicos que dan lugar a tres redes, cada una de ellas asociadas a distintas funciones de la atención: la red de alerta, el sistema de orientación de la atención, y la red de control atencional o control ejecutivo ^{4,8,9}.

La red de alerta controla el nivel intrínseco de activación cerebral y el proceso de vigilancia. El concepto de activación cerebral hace referencia al estado tónico de alerta, es decir, la predisposición cognitiva general de un individuo para percibir estímulos. Por su parte, la vigilancia es el mecanismo de respuesta fásica en presencia de estímulos, mediante el cual se asegura que los estímulos seleccionados van a mantener la atención a lo largo del tiempo (atención sostenida), siempre y cuando el nivel de alerta sea suficiente. El proceso de vigilancia tendrá lugar únicamente si el estado de alerta es alto y en consecuencia la atención perdura a lo largo del tiempo para que se alcance un objetivo ¹⁰⁻¹². Esta red la conforman diversas

áreas corticales frontales y parietales inervadas por circuitos de norepinefrina (NE) procedentes del núcleo cerúleo (LC) ¹³.

En referencia al sistema de orientación Katsuki y Constantinidis describen que en nuestro entorno diario nos vemos sometidos continuamente a una gran cantidad de información que es captada a través de nuestros sentidos. Esto produce una sobrecarga que excede la capacidad de nuestro sistema nervioso y cognitivo por lo que es necesario seleccionar y priorizar cierta información ¹⁴. El sistema de orientación de la atención hace referencia al mecanismo mediante el cual distinguimos las percepciones más relevantes y priorizamos su procesamiento a la vez que suprimimos la información irrelevante. Este proceso otorga a nuestro cerebro la capacidad para hacer frente a todas las fuentes distractoras externas e internas ^{6,15}. La selección no se refiere únicamente a distinguir estímulos relevantes, sino que también se caracteriza por escoger el comportamiento idóneo para cada situación, es decir, seleccionar aquellas respuestas externas más adecuadas que daremos en función de cada estímulo. El proceso de selección es controlado por circuitos colinérgicos que inervan distintas áreas corticales de los lóbulos parietales y frontales. La corteza parietal superior está implicada en la selección de estímulos voluntarios basados en conocimientos como, por ejemplo, de localización. Sin embargo, cuando se lleva a cabo un proceso de reorientación involuntaria hacia un estímulo inesperado, como por ejemplo una alarma, la respuesta se regula mediante la activación unión temporoparietal ^{6,16,17}.

Finalmente, la red de control atencional, o control ejecutivo, hace referencia a la capacidad de mantener continuamente la atención basada en unos objetivos concretos. Esta, otorga la capacidad de planificación, toma de decisiones y resolución de conflictos entre tareas, y permite cambiar el foco atencional interrumpiendo la tarea momentáneamente y retomando posteriormente la atención hacia el objetivo inicial. Confiere la habilidad de que la atención sea flexible

entre distintos estímulos ^{6,18}. Esta red la conforma la corteza cingulada anterior, la corteza prefrontal dorsolateral y los ganglios basales mediante la acción de la noradrenalina y la dopamina provenientes del LC y el área tegmental ventral (VTA), respectivamente ^{19,20}.

1.2 Factores de relevancia de estímulos

La atención es un proceso activo que no se ejecuta de manera equitativa para toda la información que percibimos, se trata de un mecanismo que selecciona la información del entorno en base a distintos factores y la procesa a distintos niveles en función de su relevancia. Los factores determinantes que van a definir qué estímulos serán seleccionados y procesados están relacionados tanto con las propiedades del estímulo en sí, es decir, factores extrínsecos u objetivos, como con las características y pensamientos del sujeto que recibe el estímulo, llamados factores intrínsecos o subjetivos ^{21,22}.

La selección de los estímulos inducida por factores extrínsecos u objetivos es un proceso automático. Se trata de una atención involuntaria que para producirse no requiere un esfuerzo o concentración por parte del sujeto. Este mecanismo se procesa mediante circuitos ascendentes conocidos como atención de “abajo-arriba” (*bottom-up attention*), donde las propiedades físicas desencadenan el proceso atencional. Algunas de las propiedades que pueden influir en la relevancia de un estímulo son el movimiento, la familiaridad o la intensidad de este; así como sus cualidades físicas como su tamaño, su color o su naturaleza ^{8,23-25}.

Por otra parte, la activación o modulación del proceso atencional también se ve influida por la voluntad del individuo. Los factores intrínsecos o subjetivos hacen referencia a las expectativas, deseos, actitud e intereses del sujeto que le predisponen a responder a unos estímulos en detrimento de otros. En este caso, el control de la atención se produce a través de un circuito descendente, de “arriba-

abajo” (*top-down*), donde las emociones, los recuerdos, los objetivos, etc. del sujeto van a activar o regular el proceso atencional ^{25,26}.

La activación automática de la atención es la más rápida y, por tanto, probablemente sea la selección inicial involuntaria. Tras esta activación, el sujeto puede controlar de una manera voluntaria mantener o no el proceso atencional en función del valor subjetivo que tenga el estímulo ²⁵. La activación de cualquiera de estos dos sistemas influye positivamente en el otro, pues tanto la selección intrínseca (de arriba a abajo) como la extrínseca (de abajo a arriba) mejoran su rendimiento mutuamente y contribuyen a incrementar la actividad neuronal facilitando así el proceso de selección ^{8,14}.

1.3 Tipos de atención

El carácter múltiple de la atención, así como a su interacción de este mecanismo con numerosos procesos cognitivos, emocionales, etc. dificulta en gran medida su evaluación, por lo que para poder llevarla a cabo se han descrito distintas categorías o tipologías clínicas. Esta clasificación de los tipos de atención se puede basar en diversos criterios y modelos teóricos de investigación o clínicos. Para describir la atención, así como algunas de sus principales alteraciones, uno de los modelos clínicos más utilizado es el de Sohlberg y Mateer ^{27,28}. Este modelo se basa en los resultados obtenidos en investigaciones de neuropsicología experimental y en observaciones directas de déficits de pacientes. Se trata de un modelo jerárquico en el que cada componente es más complejo que el anterior y se asume que cada nivel depende del correcto funcionamiento del anterior ^{27,28}. Así, este modelo sugiere seis tipos o componentes de la atención:

1. Alerta: Es la capacidad basal de estar despierto y de mantener la activación cerebral necesaria para captar estímulos.

2. Atención focalizada: permite enfocar la atención de manera activa hacia un estímulo visual.
3. Atención sostenida: Hace referencia a la capacidad de mantener una respuesta de forma constante durante un período de tiempo prolongado.
4. Atención selectiva: Permite seleccionar la información relevante para que sea procesada e inhibir el procesamiento de estímulos distractores.
5. Atención alternante: Permite reorientar la atención entre distintas tareas.
6. Atención dividida: Es la capacidad para responder simultáneamente a dos o más tareas o estímulos distribuyendo los recursos atencionales entre ellos.

Por otra parte, algunos autores han propuesto otro modelo para la evaluación de la atención mediante el análisis del componente ejecutivo de la misma ^{29,30}.

Las funciones ejecutivas engloban un conjunto de procesos regulados de manera descendente necesarios para llevar a cabo tareas cognitivas complejas como la concentración y los procesos atencionales voluntarios³¹. Generalmente, las funciones ejecutivas se subdividen en tres procesos principales: el control inhibitorio (que incluye el autocontrol del comportamiento y el control de interferencias relacionado con la atención selectiva), la memoria de trabajo y la flexibilidad cognitiva ³⁰⁻³².

El control inhibitorio es un mecanismo cognitivo que controla la atención, el comportamiento y las emociones mediante la inhibición de preferencias internas o señales externas que guían al individuo para dar las respuestas más apropiadas. De modo que ejerce el control sobre la búsqueda de recompensas guiada tanto por objetivos como de manera automática y evita comportamientos impulsivos³³. Así, proporciona la capacidad de elegir la forma de reaccionar y de comportarse interfiriendo en las respuestas automáticas ³⁴. Por otro lado, permite llevar a cabo procesos de inhibición cognitiva, que impide ciertos pensamientos o recuerdos lo que posibilita así el olvido voluntario. Por último, otorga la capacidad de

autocontrol, que proporciona el control sobre el comportamiento y las emociones ^{31,32}.

La memoria de trabajo es un mecanismo a corto plazo mediante el cual se almacena y manipula simultáneamente la información percibida relevante para la ejecución de una tarea cognitiva ^{30,35}. Permite mantener y combinar la información que ha sido procesada o recuperada de la memoria a largo plazo, pero que ya no se encuentra disponible en el entorno. Así tenemos en cuenta nuestras percepciones anteriores y objetivos para la toma de decisiones, el razonamiento y el control del comportamiento ^{34,36}.

Se entiende como flexibilidad cognitiva la capacidad de modificar y adaptar la atención y la conducta en respuesta a los cambios producidos en el entorno. Es esta capacidad la que permite considerar una situación desde distintas perspectivas, detectar errores, cambiar nuestras ideas o pensamientos, así como ajustar nuestras demandas o prioridades ^{31,37,38}.

2. Sustratos neurales de la atención

Múltiples regiones cerebrales participan en la activación y modulación de la atención, estas áreas anatómicas se encuentran interconectadas entre ellas formando varios circuitos neuronales involucrados en diversas funciones cognitivas. Estos circuitos interactúan en múltiples contextos, sin embargo, las operaciones de estas redes tienen cierto grado de independencia funcional y anatómica.

Mediante estudios de neuroimagen funcional (fMRI), electrofisiológicos y de tomografía de emisión de positrones (PET) se ha podido determinar qué áreas cerebrales se encuentran implicadas en la respuesta a distintas tareas cognitivas. Las regiones encargadas de mediar la atención responden produciendo un incremento de su actividad neuronal, así como con la supresión de la activación neuronal de estímulos desatendidos y con un incremento de la sincronización entre

las regiones implicadas. A pesar de que existe una considerable superposición anatómica, se han atribuido circuitos tanto funcionales como regiones y subregiones cerebrales específicas a cada proceso funcional de la atención³⁹ (Figura 1).

El **sistema de alerta o de vigilancia** tiene como función principal adquirir y mantener

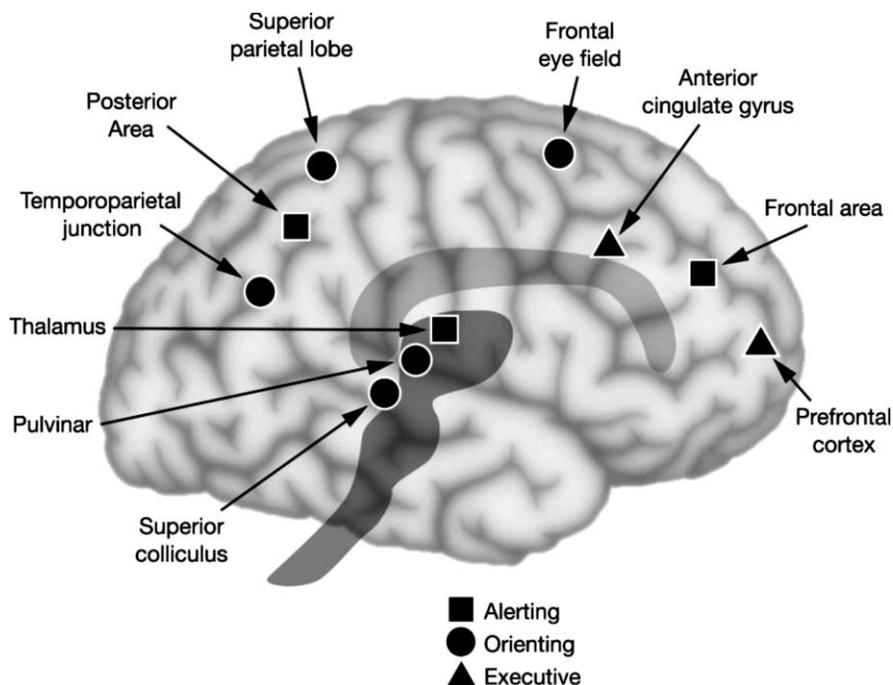


Figura 1. Anatomía de las tres redes atencionales. Extraído de Posner y Rotbhart, 2007³⁹

un estado de activación general que confiere una alta sensibilidad a los estímulos entrantes, y actúa mediante la activación de sistemas ascendentes y descendentes que facilitan la iniciación de una respuesta ante estimulación exógena. El nivel de activación de la red de alerta resulta crítico para la ejecución óptima de tareas que comprenden funciones cognitivas superiores. Esta red puede subdividirse en dos dominios: la alerta tónica y la alerta fásica.

La alerta tónica es un proceso de activación lento y sostenido que permite un incremento de las expectativas y la predisposición a procesar estímulos, de modo que facilita la preparación de respuestas. Por otra parte, el estado de alerta fásica facilita respuestas a un objetivo tras un estímulo. Es una activación rápida y de corta duración en respuesta a señales exógenas. Así, estos dos componentes de alerta operarían a distintas escalas de tiempo ⁴⁰. Ambas submodalidades implican la activación de las mismas áreas y circuitos cerebrales, sin embargo, sí que se ha observado mediante técnicas de fMRI, que en procesos de alerta fásica los niveles de activación cerebral y de conectividad entre las regiones implicadas son más elevados que durante la alerta tónica ¹¹.

A su vez, múltiples estudios han demostrado mediante fMRI ^{11,12} y PET ⁴¹⁻⁴³ que durante la realización de tareas relacionadas tanto con la alerta tónica como con la fásica se produce la activación de regiones frontales y parietales, entre las que se encuentran la corteza prefrontal dorsolateral (DLPFC; *dorsolateral prefrontal cortex*), la corteza cingulada anterior (ACC; *anterior cingulate cortex*) y el tálamo. La activación de esta red está altamente influenciada por la inervación noradrenérgica (NE) que procede de vías ascendentes desde el núcleo cerúleo (LC) ^{13,44}.

El LC es una estructura subcortical que constituye el mayor núcleo noradrenérgico del sistema nervioso central. Niveles tónicos de liberación de NE definen la alerta intrínseca, mientras que la liberación fásica de este neurotransmisor define la reactividad del sistema de alerta a estímulos. Esta estructura modula la atención mediante vías cerúleo-corticales ascendentes y descendentes a través del tálamo ¹¹. El LC recibe fuertes aferencias excitadoras descendentes desde regiones cerebrales prefrontales como la ACC y la DLPFC, lo que permite controlar e impedir la disminución del rendimiento en una tarea que se esté llevando a cabo ^{18,45,46}. Asimismo, el LC también recibe aferencias descendentes desde las cortezas sensoriales, de modo que en el momento en el que aparece una señal exógena, esta

es detectada por la red de alerta que enviará información a otras regiones relevantes para la orientación o el control ejecutivo ⁴⁷. A su vez el LC proyecta aferencias al prosencéfalo basal regulando la liberación de acetilcolina (ACh) lo que induce de manera ascendente la excitación necesaria para el procesamiento atencional de señales ⁴⁸.

Finalmente, cabe destacar que diversas evidencias sugieren que se trata de un proceso lateralizado principalmente en el hemisferio derecho. Siendo así, existirían dos sistemas íntimamente relacionados. El primero respondería a estados tónicos que se modulan con efectos más lentos en un sistema descendente fronto-parieto-talámico en mayor medida desde el hemisferio cerebral derecho. En cambio, la activación del hemisferio izquierdo se relaciona predominantemente con períodos fásicos producidos por sistemas ascendentes en respuesta a señales ^{11,43,49,50}.

El **sistema de orientación** o selección representa la función a la que hace referencia la definición más ampliamente usada para describir la atención. Lleva a cabo la selección de inputs sensoriales relevantes y dirige la atención hacia ellos, involucrando o no respuestas motoras, como los movimientos oculares. Ha sido la red más estudiada de las tres, sobre todo en procesos de atención visual, sin embargo, estudios en otras modalidades sensoriales han revelado resultados similares ⁵⁰. El sistema de orientación visual se ha asociado con la activación en áreas cerebrales posteriores como los lóbulos parietales inferior y superior, la corteza lateral intraparietal (LIP) la unión temporal parietal, así como estructuras frontales, concretamente los campos visuales frontales (FEF; *frontal eye fields*) y finalmente, estructuras subcorticales como el colículo superior (SC; *superior colliculus*), el tálamo pulvinar y el núcleo genicular ^{6,16,47,51}. El área LIP y la unión temporal parietal participan en el control voluntario del cambio de foco atencional mientras que el SC y los FEF están implicados en la generación de movimientos sacádicos ^{52,53}. El tálamo controla el acceso de información a la corteza y regula la transmisión de información

entre regiones corticales. Recibe información ascendente desde el tronco del encéfalo y la médula espinal e información descendente desde áreas corticales y actúa como un punto de control de la transferencia de información ⁵⁴.

El proceso de selección se produce a través de una conjunción de circuitos controlados de manera ascendente y descendente, de modo que la orientación a estímulos basada en lograr tareas u objetivos a largo plazo es modulada mediante vías descendentes (de “arriba-abajo”), y a través de circuitos ascendentes (de “abajo-arriba”) cuando se controla por las propiedades del estímulo en cuestión ⁸. Los circuitos ascendentes de la atención visual se inician a través de vías corticales desde la corteza visual primaria (V1), donde se dividen en una vía ventral hacia distintas áreas corticales implicadas en el reconocimiento de objetos y características del estímulo, y una vía dorsal hacia regiones relacionadas con el movimiento ¹⁴. Inicialmente se definió que los estímulos sensoriales ascendentes atraen la atención de manera automática e independiente de la intención o el objetivo. Sin embargo, se ha descrito que un estímulo sensorial atrae la atención de una manera más eficiente cuando es relevante para el comportamiento del individuo, debido a información programada o almacenada mediante el aprendizaje, el desarrollo o la genética ⁵⁵. Así, se ha observado que el nivel de activación neuronal en respuesta a un estímulo en área LIP de monos es mayor cuando el estímulo es relevante para la tarea a realizar ⁵⁶. Este tipo de orientación dirigida por un estímulo que depende de la tarea subyacente demuestra la integración entre los procesos ascendentes y descendentes que modulan este sistema atención ^{14,57,58}.

En base a esta teoría, la representación neuronal de un input no se produce simplemente por sus características físicas, sino por su saliencia o nivel de relevancia en comparación con las propiedades de los estímulos presentes al mismo tiempo. Este proceso se produce mediante la generación de un “mapa de saliencia cognitiva”

(*saliency map*) donde se suman todas las señales para las diferentes características de cada estímulo. De modo que el estímulo seleccionado es aquel que produce más activación neuronal en este mapa global ^{8,59-61}. Múltiples regiones participan en la formación de este mapa, entre las que se encuentran la región LIP, el SC y los FEF ^{52,62,63}. Los FEF y el área LIP presentan conexiones recíprocas y a su vez también reciben y envían señales al SC y al estriado lo que genera una activación global en respuesta al estímulo más relevante ^{8,52,57}.

La tercera y última función asociada a los procesos atencionales es la que resulta del sistema de **control ejecutivo**. Este sistema regula de manera descendente (de “arriba-abajo”) la actividad de los procesos atencionales en respuesta al aumento o disminución de incentivos que los requieran. Es capaz de optimizar el procesamiento de la información en condiciones distractoras y actuar como un filtro para la información no relevante o “ruido” e inhibiendo respuestas inapropiadas. Asimismo, también es capaz de recuperar y estabilizar la atención tras haberla alternado por algún episodio distractivo u otra señal relevante en aquel instante ¹⁸. Implica mecanismos de vigilancia, resolución de conflictos entre pensamientos, motivación y sentimientos, por lo que requiere de la activación y coordinación de múltiples áreas cerebrales entre las que se encuentran la ACC, la PFC y los ganglios basales.

Estudios realizados mediante fMRI han demostrado que la ACC tiene un papel clave en la monitorización de conflictos y detección de errores y que modula la activación del sistema de control cognitivo en la PFC y las áreas motoras suplementarias (SMA; *supplementary motor areas*) ^{64,65}. Se ha asociado la disminución del volumen de la ACC con un incremento de interferencias de conflictos en la atención ⁶⁶, mientras que lesiones en regiones dorsales de la ACC producen alteraciones en la inhibición de respuestas, probablemente debido a la pérdida de conectividad con la SMA ⁶⁷. Varios autores han demostrado que existe una dicotomía de las funciones en la ACC,

de modo que la activación de la parte dorsal, la cual presenta conexiones con áreas corticales parietales y frontales, se encuentra implicada en la regulación de tareas cognitivas, mientras que la región ventral, con fuertes conexiones hacia áreas subcorticales, se relaciona con la regulación de tareas asociadas con la emoción^{50,68,69}.

La PFC es una estructura crítica para la cognición humana que, a través de distintas regiones funcionales, interviene en el control atencional, la motivación, la emoción y la inhibición de comportamientos inapropiados. La PFC es capaz de ejercer esta regulación descendente debido a sus amplias conexiones con áreas corticales frontales, como la ACC, posteriores y con estructuras subcorticales, a través de las cuales inhibe el procesamiento de estímulos irrelevantes y estimula el procesamiento de la información relevante (Figura 2). La PFC dorsolateral (DLPFC) participa en procesos cognitivos superiores, en la detección de señales, en cambiar y mantener el foco atencional y en la planificación de respuestas^{70,71}. Por otro lado, la parte inferior de esta región, la corteza frontal inferior (IFC; *inferior frontal cortex*), lleva a cabo el control inhibitorio^{72,73}, la inhibición de repuestas inapropiadas y la flexibilidad cognitiva; todo ello mediante su interconexión con múltiples estructuras implicadas en la inhibición cognitiva y motora como son la corteza motora suplementaria y premotora, los ganglios basales y el cerebelo^{74,75}. Las áreas lateral orbitofrontal (OFC; *orbitofrontal cortex*) y ventromedial (VMPFC) están implicadas en el control y la inhibición de la motivación y la emoción mediante conexiones con la amígdala, el hipotálamo, el núcleo accumbens y el núcleo del prosencéfalo⁷⁶. Lesiones en la VMPFC dan lugar a desregulación emocional, comportamientos sociales inapropiados e impulsos agresivos⁷⁷⁻⁷⁹. Todas estas áreas se encuentran estrechamente interconectadas para llevar a cabo conjuntamente la regulación fina de la atención.

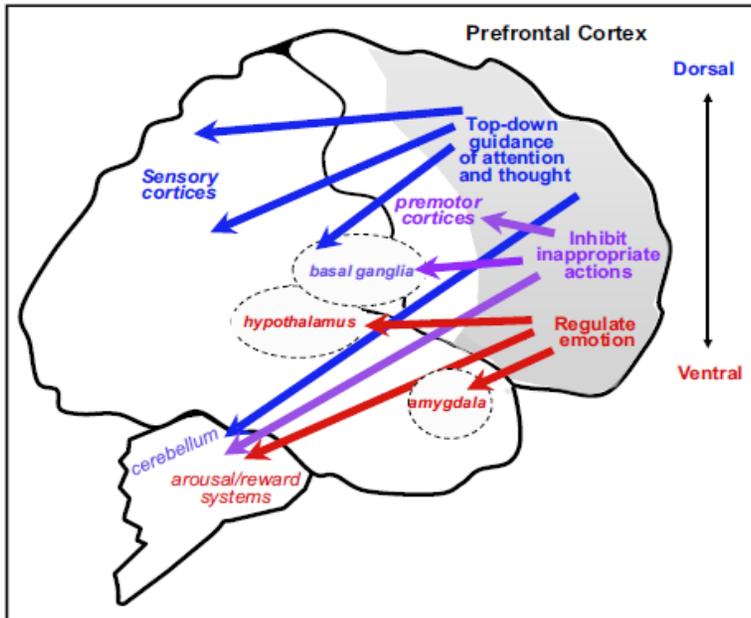


Figura 2. La corteza prefrontal (PFC) regula la atención el comportamiento y las emociones a través de numerosos descendentes hacia otras áreas cerebrales. Extraído de Arnstern y Rubia, 2012 ³⁹⁸

Así, la PFC, a través de distintas subregiones, orchestra prácticamente todos los aspectos del comportamiento y la cognición humana. Como se ha descrito anteriormente, diversas áreas de esta región se encuentran estrechamente conectadas con los ganglios basales, tradicionalmente relacionados con el control motor, aunque actualmente se ha demostrado su papel crucial en el comportamiento. Se han asociado a distintas regiones de los núcleos basales funciones cognitivas y límbicas además de las ampliamente estudiadas funciones sensoriales motoras. Las principales aferencias hacia el estriado provienen de la corteza cerebral, del tálamo y del tronco cerebral. El estriado dorsal (DS; *dorsal striatum*) recibe inputs corticales desde las áreas sensoriales-motoras. El estriado central, por su parte, recibe aferencias desde las cortezas asociativas, Por su parte, el estriado ventral (VS; *ventral striatum*) recibe información procedente de áreas límbicas. A su vez, el estriado proyecta al tálamo y este inerva de nuevo a las

subregiones de la corteza que han iniciado el circuito, lo que cierra el circuito corticoestriadotalámicocortical (CSTC), y es a través de este circuito como se determinan las demandas atencionales y la recompensa que se estima de una tarea ^{80,81}. En monos, mediante el estudio de los potenciales de campo local (LFP; *local field potentials*) se ha demostrado conectividad funcional entre la PFC y el estriado durante la realización de tareas de predicción de recompensas. Y se observó que ambas regiones se encuentran sincronizadas en la banda beta en respuesta a la tarea ⁸². También se ha descrito mediante fMRI la activación del estriado, concretamente el VS, conjuntamente a la PFC durante procesos de flexibilidad atencional guiados por objetivos, de modo que los ganglios basales modulan las interacciones entre la PFC y los FEF y la corteza posterior para llevar a cabo el cambio atencional cuando el nuevo estímulo no activa *per se* el sistema de orientación ^{83,84}, lo que explicaría el hecho de que pacientes con lesiones o afectaciones debido a patologías neurodegenerativas en los ganglios basales presenten déficits para llevar a cabo cambios de foco atencional ⁸⁵⁻⁸⁸.

3. Neuromodulación de la atención

El procesamiento de la información en el cerebro lo regulan diversos sistemas neuromoduladores. Múltiples neurotransmisores forman parte de estos sistemas que participan en la detección e integración de la información y ejercen un importante control sobre el estado general cerebral. Estos neurotransmisores también actúan sobre el funcionamiento neuronal a través de la regulación de las conexiones sinápticas en los circuitos neurales. La mayoría de los neuromoduladores actúan a través de receptores metabotrópicos, capaces de activar diferentes proteínas G y las diversas vías de señalización asociadas a estas.

3.1 Neurotransmisión catecolaminérgica

Las catecolaminas son aminas biogénicas formadas por un grupo catecol (1,2-dihidroxibenceno) y una cadena amínica lateral en la posición 4. Tres neurotransmisores forman parte del grupo de catecolaminas, la norepinefrina (NE), la epinefrina (EPI) y la dopamina (DA). Su síntesis deriva de la tirosina. La tirosina hidroxilasa (EC 1.14.16.2 - tirosina 3-monooxigenasa) convierte la tirosina en L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), a continuación, la L-DOPA descarboxilasa (EC 4.1.1.28 - L-aminoácido-aromático descarboxilasa) da lugar a la dopamina. La NE se forma a partir de la DA mediante la acción de la dopamina β -hidroxilasa (EC 1.14.17.1 - dopamina beta- monooxigenasa) y finalmente, las neuronas liberadoras de epinefrina contienen la enzima feniletanolamina N-metil transferasa (EC 2.1.1.28) capaz de producir EPI a partir de NE (Figura 3). Las catecolaminas se almacenan en vesículas hasta el momento de su liberación inducida por la apertura de canales iónicos de Ca^{2+} dependientes del voltaje y la entrada del ion. Una vez liberadas, su señalización finaliza a través de su recaptación del espacio intersináptico mediante transportadores de dopamina (DAT; *dopamine transporter*) o de noradrenalina (NAT; *norepinephrine transporter*) hacia el citoplasma, donde pueden ser degradadas, mediante la enzima monoamina oxidasa (MAO), o almacenadas de nuevo en vesículas por el transportador vesicular de monoaminas (VMAT; *vesicular monoamine transporter*).

Las catecolaminas una vez liberadas en la hendidura sináptica ejercen sus efectos a través de la unión a distintos receptores acoplados a proteínas G (GPCR) pre- y postsinápticos. La unión a dichos receptores induce un cambio conformacional en ellos que da lugar a una serie de procesos intracelulares que culminarán con la con la activación o inhibición de la neurona postsináptica. Así, la DA y la NE ejercen un papel esencial en la regulación neuronal. Estos neuromoduladores actúan cooperativamente para modular las funciones de la corteza prefrontal como la

atención y la memoria de trabajo. Sin embargo, de momento no se han descrito los mecanismos implicados en la interacción entre estos dos sistemas.

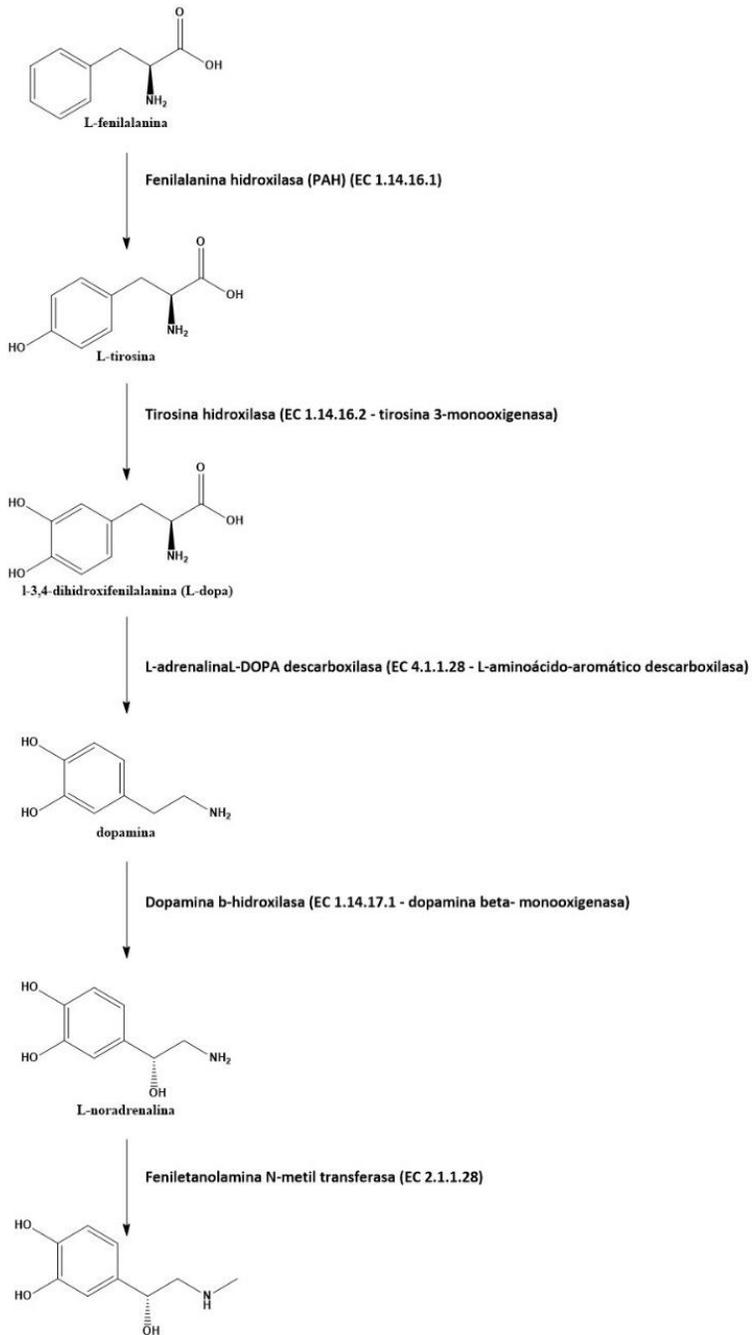


Figura 3. Representación esquemática de la biosíntesis de catecolaminas.

3.1.1 Neurotransmisión dopaminérgica

La dopamina (DA) ha sido ampliamente estudiada a lo largo de los últimos años por su vinculación con diversas enfermedades psiquiátricas. Esta catecolamina modula múltiples funciones cerebrales como la actividad motora, la motivación, la memoria, la cognición y la regulación endocrina. La DA se sintetiza en distintas regiones cerebrales las cuales envían diversas proyecciones dando lugar a cuatro vías dopaminérgicas (Figura 4). La vía nigroestriatal procede de un núcleo neuronal localizado en el mesencéfalo, la sustancia negra compacta, el cual inerva el estriado dorsal y participa en la regulación motora. La vía tuberoinfundibular se origina en los núcleos periventricular y arcuato del hipotálamo y proyecta a la hipófisis para llevar a cabo la regulación de la liberación de las hormonas pituitarias. Por último, las vías mesolímbica y mesocortical proceden del área tegmental ventral (VTA; *ventral tegmental area*) del mesencéfalo. A su vez, de la VTA surgen axones hacia el estriado ventral y distintas áreas del sistema límbico que forman la vía mesolímbica implicada en el control de la motivación, las respuestas emocionales y el aprendizaje. En la vía mesocortical, la VTA envía proyecciones hacia distintas regiones corticales frontales para regular procesos cognitivos.

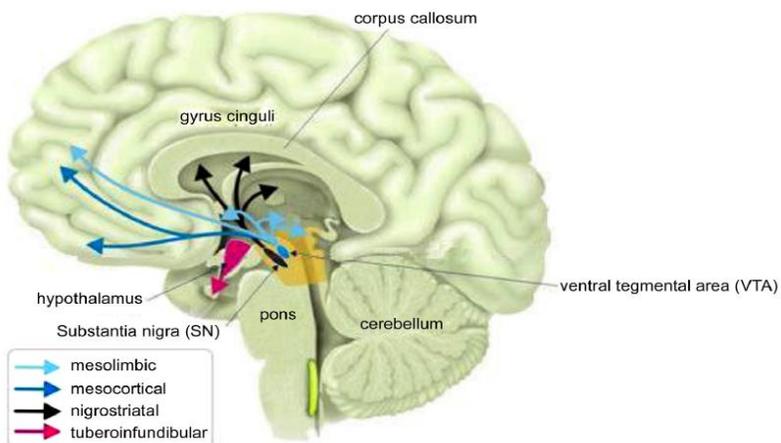


Figura 4. Principales vías dopaminérgicas en el cerebro. Extraído de Buse et al. 2013

La neurotransmisión DAérgica en el cerebro se produce a través de la activación de cinco tipos distintos de GPCR. Estos receptores se clasifican en dos subfamilias en función de sus propiedades bioquímicas y farmacológicas: la familia de receptores *D₁-like*, formada por los receptores *D₁* y *D₅*, y la familia *D₂-like*, que incluye los receptores *D₂*, *D₃* y *D₄*. Los receptores *D₁-like* se encuentran acoplados a proteínas $G\alpha_{s/olf}$, las cuales producen la activación de la adenilato ciclasa (AC) e incrementan la concentración de AMPc. En cambio, los receptores *D₂-like* inhiben la AC y producen la disminución de AMPc a través de su acoplamiento a proteínas $G\alpha_{i/o}$. Ambas familias muestran ciertas diferencias en su estructura molecular. Los receptores *D₁-like* se caracterizan por tener un extremo carboxiterminal largo y el tercer bucle intracelular corto, mientras que la familia *D₂-like* presenta un tercer bucle intracelular más largo y un extremo carboxiterminal corto⁸⁹ (Figura 5).

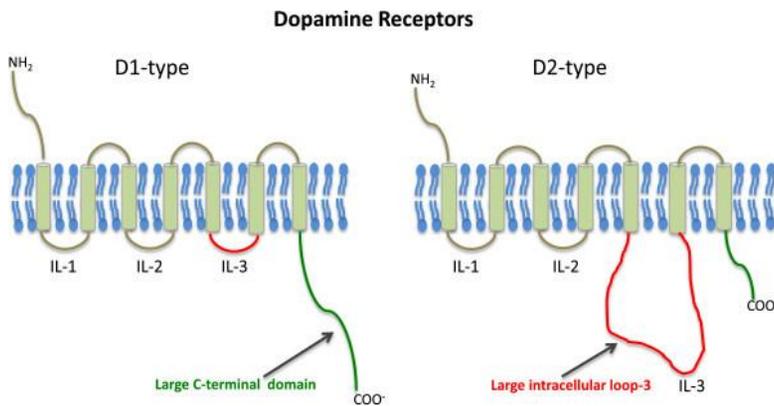


Figura 5. Representación esquemática de las dos subfamilias de receptores de dopamina.
Extraído de Pandey et al., 2013⁸⁸.

Los genes que codifican para los receptores de la familia *D₁-like* consisten en un solo exón, por lo que no se generan variantes⁹⁰. Esta familia de receptores se expresa exclusivamente de manera postsináptica. El receptor *D₁* (*D₁R*) es el receptor dopaminérgico más abundante, pues podemos encontrar niveles elevados en el

estriado dorsal, el núcleo accumbens, la sustancia negra, la amígdala y la corteza frontal y en menor medida, en el cerebelo, el tálamo y el hipocampo. Se expresa postsinápticamente en neuronas piramidales, neuronas e interneuronas GABAérgicas corticales y en neuronas de proyección estriatales⁹⁰⁻⁹³.

Los receptores D₅ (D₅R) presentan patrones de expresión mucho más bajos que los D₁R. Se encuentran distribuidos en diversas regiones cerebrales, entre las que destacan las neuronas piramidales, la corteza premotora, la corteza cingulada, la corteza entorrinal, la sustancia negra, el hipotálamo y el hipocampo y, particularmente, en neuronas piramidales de la PFC, en la DLPFC y FEF, especialmente en las capas II y III^{91,94,95}. También se ha detectado la expresión de estos receptores en interneuronas colinérgicas estriatales^{94,96,97}.

A diferencia de la familia de receptores D_{1-like}, los genes que codifica para los receptores D_{2-like} contienen múltiples intrones en sus secuencias, lo que hace posible la generación de distintas variantes de los receptores. El corte y empalme (*splicing*) alternativo del exón 6 del receptor D₂ (D₂R) da lugar a dos isoformas, una de las cuales se caracteriza por la presencia de 29 aminoácidos adicionales en el tercer bucle intracelular. Así, se generan una variante larga D_{2L} (D₂-long) y una corta D_{2S} (D₂-short). La isoforma D_{2S} se expresa principalmente en terminales presinápticos, a diferencia de la variante D_{2L} que es generalmente postsináptica⁹⁸. El D₂R es el segundo receptor de dopamina más abundante, se encuentran en mayor número postsinápticamente en neuronas GABAérgicas en el estriado, el núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio. También se expresa en el hipotálamo y en la glándula pituitaria, la amígdala y en neuronas piramidales de regiones corticales^{93,99,100}. Asimismo, también se expresa presinápticamente en la sustancia negra compacta, la VTA y en el estriado, donde actúan como autoreceptores para regular la liberación de DA¹⁰¹. Los receptores D₃ presentan patrones de distribución más

bajos en el núcleo accumbens, el tubérculo olfatorio, la sustancia negra compacta, la VTA y áreas corticales ⁹¹.

Por su parte, el receptor D_4 (D_4R) contiene numerosos polimorfismos, el más prevalente consiste en un número variable de repeticiones en tándem de 48 pares de bases en el exón 3 (Figura 6), región que codifica el tercer bucle intracelular del receptor. Las variantes más comunes de este receptor son aquellas que presentan 2, 4 o 7 repeticiones en tándem de la secuencia mencionada, conocidos como los receptores $D_{4.2}$, $D_{4.4}$ y $D_{4.7}$, respectivamente. La variante más abundante es la $D_{4.4}R$ con una frecuencia del 64%, seguida del polimorfismo $D_{4.7}R$ (21%) y, por último, la variante $D_{4.2}R$ (8%) ¹⁰². Los D_4R se expresan mayoritariamente en la PFC, la amígdala, el hipocampo, el globo pálido y el tálamo. En la PFC se localizan específicamente en interneuronas GABAérgicas, en neuronas piramidales glutamatérgicas y en las terminaciones de sus proyecciones estriatales. También se ha detectado la expresión de estos receptores en los ganglios basales ^{91,103,104}.

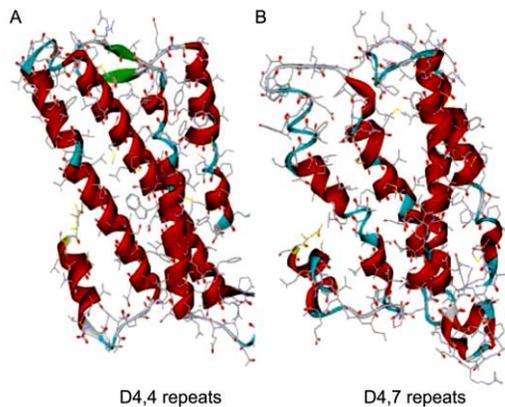


Figura 6. Modelo del tercer bucle intracelular (ICL3) del receptor $D_{4.4}$ (A) y $D_{4.7}$ (B). Extraído de Woods et al., 2010 ¹⁰⁴

Los receptores D_4 han sido ampliamente estudiados debido a su posible relación con diversos trastornos neuropsiquiátricos, principalmente se ha asociado la variante $D_{4.7}R$ con el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) por su alta prevalencia en pacientes con este trastorno ^{102,105}. Debido a ello, múltiples estudios

se han centrado en determinar las diferencias funcionales y farmacológicas entre la variante D_{4.7}R y el polimorfismo más abundante D_{4.4}R. Los resultados obtenidos han sido contradictorios, ya que algunos estudios determinaron una ganancia de función en variante la D_{4.7}R, mientras otros estudios reportan lo contrario (véase Tabla 1). Estudios recientes postulan que las principales diferencias entre ambos polimorfismos serían dependientes de la heteromerización de los mismos con otros receptores ^{106,107}. En la Tabla 1 se resumen diversos estudios realizados para determinar las diferencias entre los dos polimorfismos, así como los estudios realizados sobre su heteromerización.

Tabla 1. Resumen de publicaciones relativas a las características diferenciales entre variantes de D₄R.

| Funcionalidad D_{4.7}R vs D_{4.4}R | Conclusiones principales | Referencia |
|---|---|-------------------|
| ↓ | Disminución del incremento de DA, de la liberación de glutamato corticoestriatal y de la activación locomotora inducidas por metanfetamina en ratones knock-in para el receptor D _{4.7} R comparado con ratones WT. | 106 |
| ↑ | La activación de D _{4.7} R en la PFC produce una sobre inhibición de las vías excitadoras glutamatérgicas y una disminución de la inhibición GABAérgica. | 108 |
| ↑ | La activación de D _{4.7} R produce una sobre inhibición sobre los receptores NMDA en neuronas piramidales de la PFC. | 109 |
| = | No se hallaron diferencias entre variantes en la capacidad de inhibición de la adenilato ciclasa, en la activación de distintos subtipos de proteína G $\alpha_{i/o}$ ni en la capacidad de reclutamiento de β arrestina-2. | 110 |
| ↓ | D _{4.7} R presenta patrones de ubiquitinación distintos a los observados en D _{4.4} R | 111 |

| | | |
|---------------------------------|--|-----|
| ↓ | Pacientes portadores de la isoforma D _{4.7} R activan de manera menos eficiente regiones prefrontales implicadas en el control inhibitor. | 112 |
| ↓ | Menor número de alfa-hélices en la estructura de D _{4.7} R lo que produce un mayor índice de desorden | 113 |
| = | Niveles similares de reclutamiento de β arrestina-2. | 114 |
| = | No se observaron diferencias entre D _{4.4} R y D _{4.7} R en la unión de GTPys inducida por DA o NE. D _{4.7} R mostró mayor sensibilidad estructural a los cambios de concentración de sodio. | 115 |
| = | Las variantes polimórficas no presentaron diferencias en la especificidad ni en la eficiencia para el acoplamiento a distintos subtipos de proteínas G α_i . | 116 |
| ↓ | Disminución de la potencia de la DA para inhibir la formación de AMPc en presencia de la isoforma D _{4.7} R | 117 |
| Ensayos heteromerización | | |
| ↑ | D ₂₅ R y D _{4.7} R forman heterómeros funcionales. D _{4.7} R produjo un incremento de la actividad constitutiva de D ₂₅ R en comparación con el heterómero D _{4.4} R-D ₂₅ R | 107 |
| ↓ | D _{4.4} R y D _{4.2} R forman heterómeros funcionales con D ₂₅ R, pero no D _{4.7} R. D ₂₅ R potencia la señalización por MAPK y la inhibición glutamatérgica mediada por D _{4.4} R, pero no por D _{4.7} R. | 118 |
| ↓ | D _{2L} R forma heterómeros con D _{4.4} R, D _{4.2} R y D _{4.7} R (eficacia menor). El heterómero D _{4.7} R-D _{2L} R no presenta interacciones alostéricas en ensayos de MAPK. | 119 |
| ↓ | Menor afinidad de D _{4.7} R para formar homómeros y heterómeros con las otras variantes. | 120 |

3.1.1.1 Neurotransmisión dopaminérgica y atención

Las habilidades cognitivas de prestar atención, controlar el comportamiento, la memoria de trabajo y orquestar nuestra conducta cognitiva y motora dependen esencialmente de la PFC y sus conexiones. La PFC mantiene activamente las representaciones de nuestros objetivos, las cuales se actualizan en función de nueva información o nuevos objetivos. Fallos en la actualización de dichas representaciones se traducen en comportamientos perseverantes, mientras que los fallos en su mantenimiento producen distraibilidad. Este proceso se regula mediante la inervación DAérgica en los lóbulos frontales y el estriado, de hecho, la depleción de inervación dopaminérgica en la PFC produce efectos similares a la eliminación de la propia PFC ¹²¹ y se ha demostrado que disfunciones en este sistema se relacionan con diversos déficits cognitivos.

Los receptores de DA en la PFC regulan tres aspectos esenciales del control ejecutivo, permiten la entrada sensorial, mantienen y manipulan el contenido sensorial (memoria de trabajo) y transmiten las respuestas apropiada hacia áreas premotoras. La DA en la PFC actúa como un neuromodulador incrementando o disminuyendo la transmisión sináptica de información. Así, la DA es capaz de mediar y regular distintos aspectos de las funciones ejecutivas dependiendo del patrón de activación de sus receptores, del tipo celular en el que se encuentran, de la escala temporal de su liberación y del núcleo de procedencia. Se ha descrito que el origen de las neuronas DAérgicas que inervan cada región cortical determina la funcionalidad de la DA. Así, neuronas procedentes de la VTA proyectan información relacionada con la predicción de recompensa tanto a la OFC como al núcleo accumbens (NAc) mientras que las neuronas procedentes de la SN proyectan preferencialmente a la DLPFC y codifican información relacionada con la memoria de trabajo¹²². Se ha determinado que el incremento de la actividad de las neuronas que proyectan al NAc produce fenotipos hiperactivos en ratas ¹²³, lo que podría

relacionarse con distintas alteraciones como el TDAH o el autismo. Por otra parte, las neuronas DAérgicas que se encargan de señalar en función de la relevancia o novedad de un estímulo proceden de la SN e inervan capas más superficiales de la PFC^{92,122}. Asimismo, la señalización DAérgica en la PFC varía a lo largo del tiempo. De hecho es preciso que la DA actúe a distintas escalas temporales para influenciar el procesamiento de las señales de las distintas poblaciones neuronales¹²⁴. Se analizaron los efectos de la DA en regiones prefrontales en monos en respuesta a una tarea de atención visual. Se observaron dos tipos de modulación DAérgica, un conjunto de neuronas inhibitorias fue inhibido por la DA, este efecto tuvo una latencia corta (10 ms) y no se observaron cambios en la relación señal/ruido. Un efecto más lento (200 ms) se observó en un segundo grupo de neuronas, probablemente piramidales. Este grupo de neuronas fue excitado y se determinó un incremento del índice señal/ruido debido a la disminución de la variabilidad de respuesta¹²⁵.

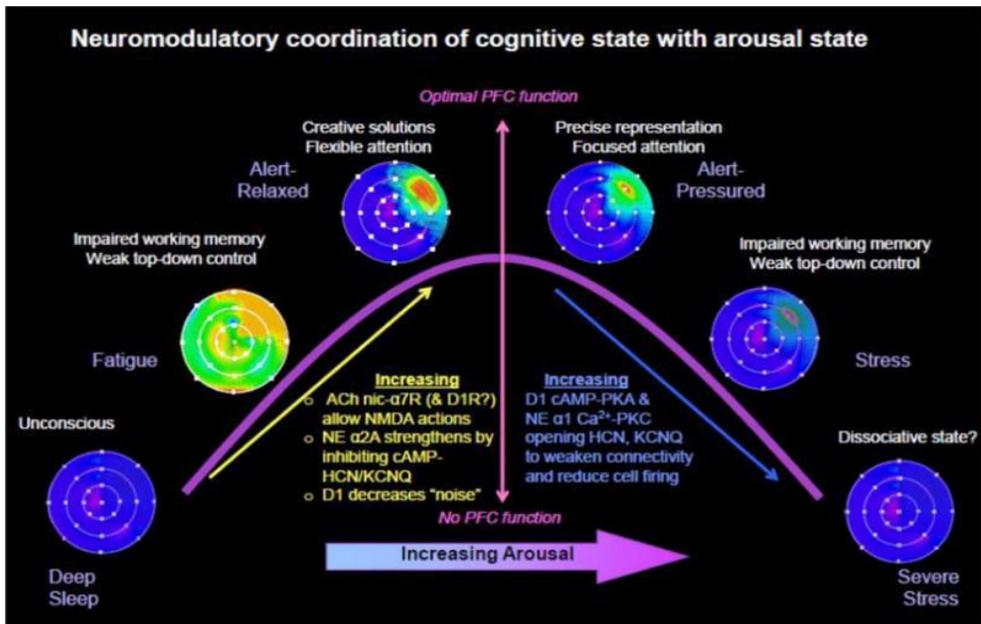


Figura 7. Impacto de los niveles de neuromoduladores en el funcionamiento de la PFC. Representación del efecto de los niveles de liberación de NE, ACh y DA en la activación de la PFC y los procesos cognitivos asociados.

Descargas fásicas de DA permiten la entrada de información sensorial en los circuitos de la PFC. Este mecanismo de entrada implica a los D₁R que se encuentran en estructuras postsinápticas como espinas dendríticas. Su activación disminuye las corrientes postsinápticas excitadoras inducidas por glutamato reduciendo la actividad neuronal en respuesta a estímulos irrelevantes^{126,127}. Los D₁R producen la apertura de canales iónicos en espinas dendríticas que reciben señales irrelevantes, lo que disminuye sus conexiones y reduce la entrada de “ruido”. Esta reducción aumenta la fuerza relativa de las señales que llegan a PFC en comparación con el “ruido de fondo” (relación señal/ruido)^{92,128}. Es preciso que la activación de los D₁R se produzca en niveles óptimos ya que su sobreactivación, como sucede en situaciones de estrés, puede suprimir el procesamiento de todos los estímulos debido un colapso de los circuitos provocado por concentraciones elevadas de AMPc¹²⁸ (Figura 7).

La DA también produce la activación de D₂R, los cuales se encuentran preferencialmente en la capa V, donde actúan de manera excitadora incrementando la activación de respuesta. Estos receptores aumentan la excitabilidad de interneuronas y suprimen la inhibición de neuronas piramidales¹²⁹. La disminución de la inhibición de las neuronas piramidales hace que las vías neuronales de la PFC se encuentren en un estado más lábil lo que permite procesar múltiples estímulos y representaciones, así como la flexibilidad cognitiva y el cambio de foco atencional¹²¹. Esta modulación por parte de los D₂ ha sido demostrada mediante la infusión de antagonistas en la PFC lo que reduce la capacidad para cambiar entre dos estrategias atencionales y ocasiona un incremento en los errores perseverativos¹³⁰.

Los D₄R modulan las funciones corticales regulando neuronas piramidales o interneuronas GABAérgicas que inervan neuronas piramidales. La actividad de las interneuronas GABAérgicas se encuentra equilibrada mediante la influencia excitadora de D₁R y la actividad inhibitoria de D₄R¹³¹. A diferencia de los efectos

inducidos por antagonistas D₂R, el tratamiento con antagonistas D₄R mejora la capacidad de intercambio atencional, mientras que el tratamiento con sus agonistas selectivos deterioran esta capacidad ¹³⁰. Estos efectos podrían deberse a un incremento de la inhibición de neuronas piramidales, ya que los D₄R son capaces de modular negativamente la transmisión mediada por NMDAR en neuronas piramidales de la PFC y a su vez, se ha descrito que el bloqueo de NMDAR perjudica al desacople atencional ^{109,121,131}. Estos receptores también podrían dar lugar a un incremento de la inhibición de neuronas GABAérgicas las cuales, a su vez desregularían la correcta activación de neuronas piramidales para llevar a cabo la tarea ¹³¹.

La DA se encuentra fuertemente relacionada con la señalización de la recompensa y la toma de decisiones que implican motivación. Distintos estudios han mostrado que la administración sistemática de drogas que incrementan la transmisión DAérgica favorecen la preferencia por una recompensa mayor pero más tardía, es decir, mejora la impulsividad. Por su parte, el tratamiento con antagonistas dopaminérgicos incrementa la impulsividad ¹²¹. Los receptores D₂ y D₄ se encuentran implicados en este proceso, ya que participan en la modulación de la transmisión glutamatérgica corticoestriatal en el estriado ^{106,118}.

3.1.2 Neurotransmisión noradrenérgica

A pesar de su aislamiento en el año 1913, no fue hasta 1950 cuando se estableció la función de la epinefrina y la norepinefrina (NE) como neurotransmisores cerebrales. La NE puede ser sintetizada y liberada por el sistema nervioso central y por el sistema nervioso simpático. La función general de la NE es activar el cerebro y el resto del cuerpo para la respuesta de “lucha o huida”.

La liberación de NE en el cerebro es esencial para la regulación de un elevado número de procesos tales como la atención, la alerta, distintos aspectos de la cognición, el control motor y respuestas a estrés (Figura 8). El LC recibe aferencias de múltiples regiones cerebrales relacionadas con la información visceral y el dolor. También recibe información emocional y cognitiva procedente de diversas regiones del prosencéfalo, como la PFC, la amígdala y el hipotálamo. El LC presenta proyecciones muy amplias, inerva prácticamente todo el prosencéfalo, así como algunas regiones del mesencéfalo y el tronco encefálico y el cerebelo ^{46,132}. La liberación de NE en el prosencéfalo facilita el procesamiento sensorial e incrementa la flexibilidad cognitiva y las funciones ejecutivas de la PFC ¹³².

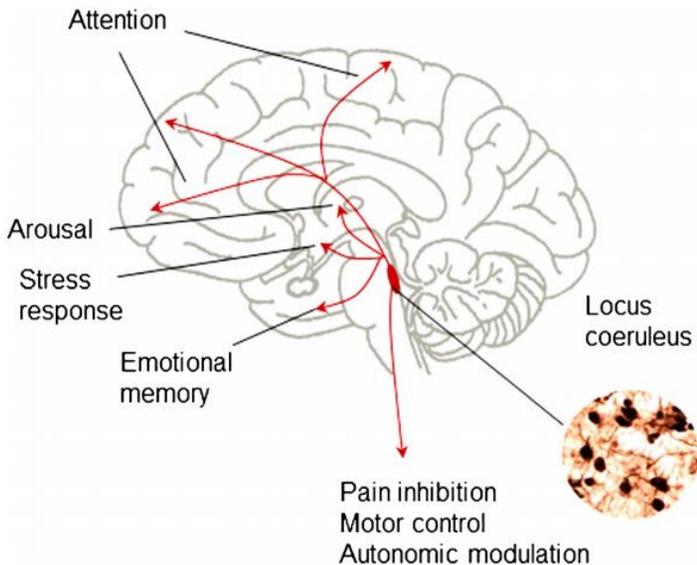


Figura 8. Principales procesos regulados por el sistema LC-NE. Extraído de Benarroch et al., 2017.

La señalización adrenérgica se produce a través de tres familias de GPCR que modulan múltiples funciones celulares, cada una de las familias se encuentra dividida en tres subtipos, así se conocen nueve adrenoceptores (AR): α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) y β (β_1 , β_2 , β_3).

Cada familia de AR se acopla y activa a distintos subtipos de proteínas G y produce diferentes cascadas intracelulares (Figura 9). Así, los receptores de la familia α_1 (α_1R) se encuentran acoplados a proteínas $G_{\alpha_q/11}$ activadoras de la fosfolipasa C, la cual produce el incremento de la concentración de IP_3 y Ca^{2+} . También se ha descrito que los subtipos α_{1A} y α_{1B} son capaces de acoplarse a proteínas G_{α_s} ^{133,134}.

Los α_1R se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del sistema

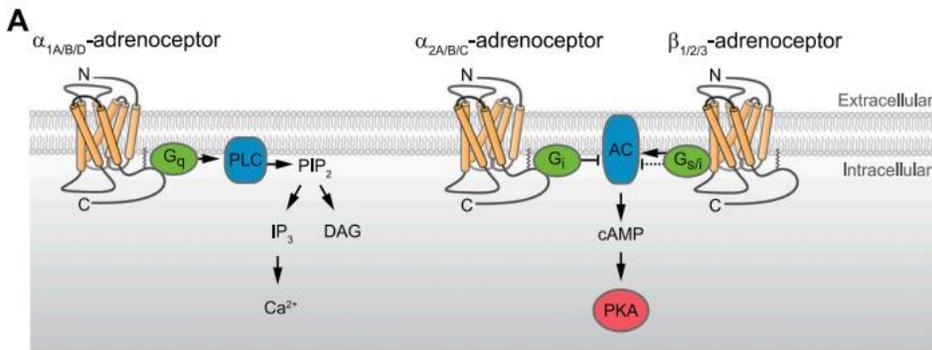


Figura 9. Vías de señalización dependientes de proteína G activadas por las distintas familias de receptores adrenérgicos. Extraído de Ahles y Engelhardt (2014).

mesocorticolímbico, en el estriado, la VTA y SN. Concretamente, el subtipo $\alpha_{1A}R$ se expresa en altos niveles en el hipotálamo y en la PFC en neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas en mayor medida en las capas más profundas. El $\alpha_{1B}R$ se expresa también en capas intermedias de las regiones corticales, sin embargo, los niveles más elevados se encuentran en el tálamo. Por el contrario, $\alpha_{1D}R$ es el subtipo que presenta menores niveles de expresión, se encuentran niveles discretos en las capas superficiales de la PFC y se expresa en altos niveles en el hipocampo¹³⁵⁻¹³⁹. Se ha observado que el $\alpha_{1D}R$ en sistemas recombinantes presenta casi exclusivamente patrones de expresión intracelulares y se cree que la expresión a nivel de membrana puede depender de su coexpresión con otros receptores como el $\alpha_{1B}R$ o el β_2R capaces de trascolar el receptor¹⁴⁰. Se ha descrito que los tres subtipos

de α_1R forman homodímeros y heterodímeros con otros AR lo que podría afectar a su funcionalidad y regulación ¹⁴⁰.

Los receptores α_2 (α_2R) se encuentran acoplados a proteínas $G\alpha_{i/o}$ inhibitoras de la AC. El subtipo predominante en el cerebro es el $\alpha_{2A}R$ y se expresa principalmente en la corteza, en grandes cantidades en la PFC y en los ganglios basales. El $\alpha_{2C}R$ se expresa en regiones cerebrales implicadas en el procesamiento de información sensorial y en control motor, como el NAc, y los núcleos caudado-putamen. El $\alpha_{2B}R$ presenta niveles de expresión muy bajos y prácticamente restringidos al tálamo ¹⁴¹⁻¹⁴³.

Finalmente, la familia de receptores β -adrenérgicos (βR) se acopla a proteínas $G\alpha_{s/olf}$ capaces de activar la AC e incrementar los niveles de AMPc intracelular. El receptor β_1 se expresa tanto en el corazón como en el cerebro, especialmente en la corteza, el tálamo y, la glándula pineal. El β_2R se expresa de un modo más amplio en el bulbo olfatorio, la corteza, hipocampo, tálamo, hipotálamo y la glándula pineal. Por último, la subfamilia β_3R se encuentran principalmente en el tejido adiposo ^{144,145}.

3.1.2.1 Sistema noradrenérgico y atención

Conjuntamente con la DA, la señalización NEérgica también es esencial para el correcto funcionamiento de la cognición y, por ello, este sistema es diana terapéutica de una gran variedad de fármacos utilizados para el tratamiento de déficits cognitivos como el TDAH o el trastorno de estrés postraumático (PTSD).

La activación tónica de las neuronas de LC refleja el nivel de alerta (*arousal*). La actividad es baja durante el sueño, moderada en estados de vigilia y elevada en respuesta a estrés. A su vez, igual que otros neuromoduladores, exhibe patrones de activación fásica en respuesta a estímulos relevantes. De un modo similar a la DA, la actividad fásica de la NE es dependiente de tarea, de modo que es capaz de modular distintos procesos cognitivos en distintas escalas temporales. Procesos cognitivos

rápidos como la reorientación a estímulos novedosos o procesos lentos como el desarrollo de estrategias se asocian con la variación de la actividad neuronal en el LC desde milisegundos a minutos o horas (Tabla 2, revisado en ¹⁴⁶).

La NE produce distintas acciones en la PFC de un modo dependiente de la concentración y del receptor. Generalmente se ha asociado la estimulación de receptores α_2 con el incremento de la activación neuronal, en cambio la estimulación del α_1R produce el efecto contrario. Por ello, se ha relacionado la activación de los receptores α_2 con el control descendente de la atención (*top-down*) desde la PFC, y los α_1R con la activación de la corteza sensorial mediante mecanismos ascendentes (*bottom-up*) ^{122,147}. Sin embargo, la participación de estos receptores en la modulación de la atención ha resultado mucho más compleja. Una gran cantidad de estudios han definido el papel clave de liberación de concentraciones óptimas de NE en la regulación de la memoria de trabajo, siendo extremadamente sensible a los niveles de este neurotransmisor, ya que tanto una concentración demasiado

baja como una excesiva señalización han resultado ser perjudiciales ^{148,149}. En condiciones de liberación moderada de NE se activan los receptores de alta afinidad α_{2A} localizados en espinas dendríticas, los cuales actúan inhibiendo la

Tabla 2. Relación entre la escala temporal de activación del LC con distintos procesos cognitivos. Extraído de Totah et al., 2019

| <i>Cognitive processes</i> | <i>Timescales</i> |
|-----------------------------------|--|
| <i>Reorienting attention</i> | < 200 milliseconds |
| <i>Detecting targets</i> | < 100 milliseconds |
| <i>Response selection</i> | < 200 milliseconds |
| <i>Perceptual alternations</i> | 1 to 10 seconds |
| <i>Working memory</i> | 1 to 10 seconds |
| <i>Behavioral strategy</i> | seconds (single trial) to minutes (multiple trials) |
| <i>Behavioral task engagement</i> | minutes to hours |
| <i>Perceptual learning</i> | minutes to hours |
| <i>Wakefulness</i> | hours (circadian) |
| <hr/> | |
| <i>LC activity</i> | <i>Timescales</i> |
| <i>Tonic mode</i> | Seconds, minutes, hours, circadian |
| <i>Phasic mode</i> | 100 – 200 milliseconds |

producción de AMPc y reduciendo la activación de canales catiónicos. Esto se traduce en un refuerzo de la activación de neuronas piramidales que favorece la activación de la PFC y la memoria de trabajo ¹⁵⁰. Se ha descrito que la activación de $\alpha_{2A}R$ mejora la regulación de la atención y la inhibición del comportamiento. Así, el

bloqueo de estos receptores mediante la infusión de antagonistas en la PFC de monos produce un menor control de impulsos e hiperactividad locomotora ^{151,152}.

En cambio, en condiciones de estrés en las que se liberan grandes cantidades de NE se produce la activación de α_1 R lo que induce la supresión de la activación neuronal mediada por activación de la señalización de PKC y del rendimiento de la memoria de trabajo ^{153,154}. La participación de α_1 R en los déficits cognitivos inducidos por estrés ha sido demostrada ya que su bloqueo mediante la infusión de antagonistas revierte dichos efectos ¹⁵⁵.

Los circuitos prefrontales relacionados con la memoria de trabajo son especialmente vulnerables a elevados niveles de estrés. Altos niveles tanto de NE como de DA liberados durante el estrés estimulan α_1 R y D_1 R los cuales inducen la activación de vías de señalización dependientes de calcio y AMPc. Ello produce la apertura de canales de potasio y la consecuente disminución de la conectividad y de la activación de la PFC. El mantenimiento de niveles crónicos de estrés culmina con la atrofia de espinas y dendritas neuronales, lo que produce importantes daños a largo plazo ¹⁴⁹. Parece que otros procesos atencionales muestran un rango de dosis óptima de NE más amplio que el anteriormente descrito para la memoria de trabajo, lo que explicaría que el tratamiento con agonistas α_1 R produzca mejoras en atención sostenida ^{154,156}.

Inicialmente se describió que la activación de α_1 R se produce únicamente como respuesta a situaciones de estrés dando lugar a la inhibición de la activación neuronal asociada a déficits cognitivos. Sin embargo, estudios recientes han descrito que los receptores α_1 pueden producir efectos excitadores en la PFC lo que incrementa la liberación de glutamato ¹⁵⁷. Ello puede asociarse con el hecho de que el tratamiento con agonistas α_1 mediante infusión directa en la DLPFC o a través de administración subcutánea favorezca la atención sostenida (vigilancia) y reduzca la impulsividad ^{139,158}. El metilfenidato, que es el fármaco psicoestimulante más

ampliamente utilizado para el tratamiento del TDAH, actúa mediante la inhibición de la recaptación de DA y NE. La administración de este fármaco mejora la memoria de trabajo y la atención sostenida. Se ha observado que los efectos sobre la memoria de trabajo son dependientes de la actividad del α_2R mientras que sus efectos sobre la atención sostenida dependen del α_1R ¹⁵⁶. De modo que los efectos excitadores producidos por la NE en la PFC serían mediados por una sinergia entre α_1R presinápticos capaces de incrementar la liberación de glutamato y α_2R (posiblemente $\alpha_{2A}R$) postsinápticos inhibidores de canales HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels*)¹⁵⁷ (Figura 10A).

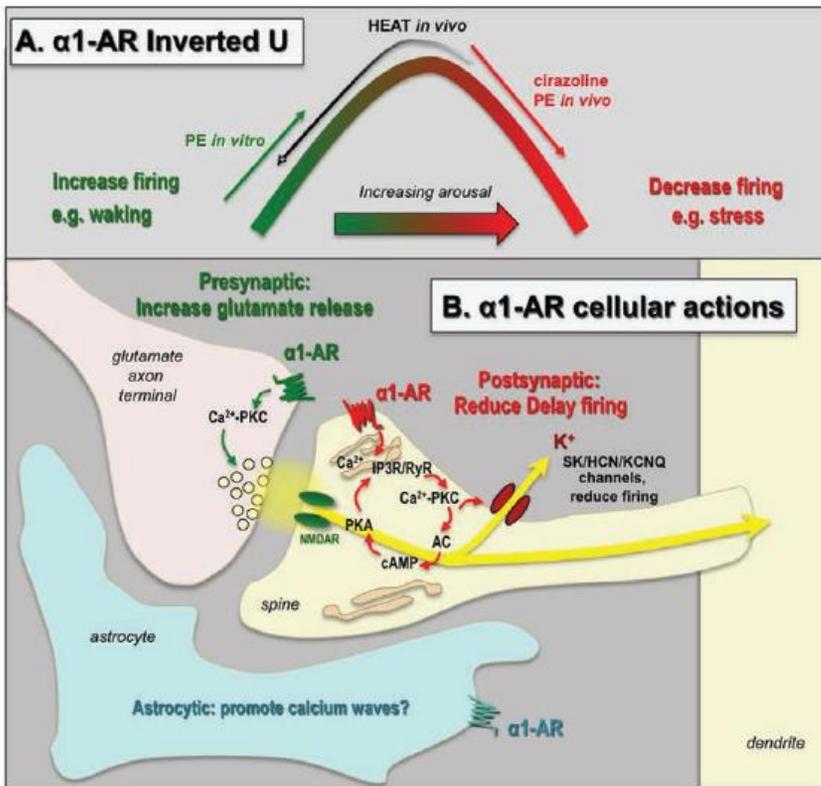


Figura 10. Representación esquemática de las funciones de α_1R en la DLPFC de primates. A. Representación de los efectos mediados por α_1R dependientes de la dosis, donde niveles moderados de NE producen efectos excitadores en algunas neuronas, en cambio, niveles mayores de estimulación bloquean la activación. B. Efectos de la estimulación de receptores α_1R pre- y postsinápticos en la activación neuronal. Extraído de Datta et al. 2019¹⁰⁶

La capacidad de alternar fácilmente la atención entre señales en función del contexto y del conocimiento es una capacidad esencial para cumplir objetivos concretos. A diferencia de la memoria de trabajo, la flexibilidad atencional se encuentra favorecida por la activación de receptores α_1 , mientras que los receptores α_2 y β parecen no participar en su regulación ¹⁵⁹. Esto es debido a que la activación de α_1 R presinápticos suprime las corrientes GABAérgicas, con lo que disminuye la inhibición de las neuronas piramidales y se incrementa la respuesta a estímulos excitadores ¹⁶⁰. Ello promueve la transición desde la atención focalizada y sostenida a un modo más flexible para la captación de estímulos.

En resumen, los diferentes patrones de acción de α_1 R se asocian a distintas localizaciones de los receptores, de modo que los α_1 R localizados presinápticamente producen efectos excitadores y los postsinápticos producen la supresión de la activación neural. Asimismo, se ha observado que los receptores α_1 responden diferencialmente de un modo dosis respuesta (Figura 10B) en la DLPF de monos, lo que implica el reclutamiento de distintos α_1 R con una relación dosis-respuesta ¹⁶¹. Las diferentes acciones de estos receptores probablemente se asocien también a la participación de los distintos subtipos de estos.

3.2 Neurotransmisión colinérgica

La acetilcolina (ACh) ha sido ampliamente relacionada con la regulación de distintas funciones cognitivas entre las que se encuentran el aprendizaje, la memoria y la atención ^{162,163}. Concretamente, se ha asociado el sistema de proyección colinérgica con la modulación descendente de la atención, fundamentalmente en el control de la orientación y selección de estímulos ^{162,164}. La acetilcolina ejerce sus efectos actuando sobre dos tipos de receptores. Por una parte los receptores nicotínicos ionotrópicos, que son canales catiónicos pentaméricos formados por la combinación de distintas subunidades, y por la otra los receptores muscarínicos

metabotrópicos, los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G¹⁶⁵.

Las neuronas colinérgicas, que establecen este sistema, se encuentran situadas en el tronco encefálico y el prosencéfalo basal, reciben fuertes señales desde la PFC, la amígdala y el núcleo accumbens y estas proyectan al tálamo y a la PFC¹⁶⁶. El sistema colinérgico se activa mediante vías descendentes procedentes de regiones corticales en respuesta a estímulos sensoriales^{54,167}. Múltiples estudios de microdiálisis han demostrado la liberación tónica de ACh en la PFC. Este flujo de liberación de ACh se incrementa rápida y transitoriamente, en una escala de segundos o minutos, en respuesta a la demanda atencional en presencia de estímulos distractores^{162,168}. La pérdida de inervación colinérgica en la PFC produce importantes afectaciones en la realización de tareas asociadas con procesos de atención y en la identificación de estímulos^{54,169}. Por otro lado, la activación de receptores nicotínicos tanto en roedores como en humanos induce mejoras en procesos de atención selectiva¹⁷⁰⁻¹⁷². Asimismo, la estimulación de neuronas colinérgicas en monos incrementa la actividad neuronal en la corteza visual V1 de un modo similar a la activación inducida durante la realización de tareas de atención espacial, y la administración local de antagonistas muscarínicos en V1 reduce dichas respuestas neurales¹⁷³, hecho que demuestra el papel clave de la ACh en la regulación de las funciones de atención selectiva.

3.3 Neurotransmisión serotoninérgica

La serotonina (5-HT) es otro de los neurotransmisores que contribuye en la regulación de distintos aspectos de los procesos atencionales. Las neuronas productoras de 5-HT se localizan fundamentalmente en una región específica del tronco encefálico, el núcleo del rafe. Dichas neuronas se distribuyen caudal y dorsalmente, dependiendo de la inervación de sus axones, los cuales proyectan a

todas las áreas cerebrales y a la médula espinal. La 5-HT, al igual que la ACh, actúa a través de dos tipos de receptores: los ionotrópicos y los metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos poseen baja afinidad y rápida activación, mientras que los receptores metabotrópicos, que son GPCR, se activan más lentamente, pero poseen una elevada afinidad. Se conocen 15 genes para los receptores de serotonina (5-HT_R) y únicamente los receptores 5-HT₃ son receptores ionotrópicos¹⁷⁴.

El sistema serotoninérgico inerva múltiples áreas involucradas en la regulación de la atención y su desregulación ha sido asociada a diversos trastornos cerebrales que cursan con alteración en la atención, como el autismo^{175,176}, la esquizofrenia^{177,178} o el trastorno obsesivo compulsivo¹⁷⁹. Concretamente, las neuronas productoras de 5-HT proyectan a la PFC, especialmente a las capas V y VI, estrechamente relacionadas con los procesos atencionales^{165,180}.

Este sistema permite reevaluar la utilidad o la importancia de un estímulo al que se está prestando atención para responder a uno nuevo, y entonces llevar a cabo la inhibición de la recompensa asociada al estímulo anterior¹²². De modo que incrementos físicos en la liberación de 5-HT incrementan la flexibilidad cognitiva y comportamientos exploratorios en busca de nuevos estímulos¹⁸¹. Este aumento de la conducta exploratoria se traduce en una disminución de la capacidad para mantener la atención sostenida y focalizada. El tratamiento con agonistas de los receptores 5-HT_{1A/2A} produce, tanto en ratas como en humanos, una menor precisión en la realización de tareas de atención focalizada y sostenida y en la supresión de estímulos distractores¹⁸²⁻¹⁸⁵. La 5-HT afecta a la atención sostenida y focalizada mediante la supresión de circuitos intracorticales, así como la disminución de la activación neuronal en diversas áreas cerebrales esenciales. El incremento de liberación de 5-HT produce un fuerte efecto inhibitorio sobre las neuronas piramidales de la capa VI de la PFC, las cuales envían proyecciones excitadoras sobre interneuronas de la capa V, lo que activa las conexiones

intracorticales bajo demanda atencional ¹⁸⁶. Mediante estudios de fMRI se ha determinado que el tratamiento con inhibidores de la recaptación de 5-HT induce la disminución de activación en distintas áreas relacionadas con la atención sostenida, como los ganglios basales, el tálamo, el núcleo caudado y regiones prefrontales ^{185,187}. Las proyecciones procedentes del núcleo de rafe producen una inhibición tónica sobre los sistemas dopaminérgicos mesocortical nigroestriatal y mesolímbico, mientras que la sobre-inhibición de la transmisión dopaminérgica produce una disminución de transmisión dopaminérgica cortical y de la interacción entre áreas corticales y subcorticales, lo que permite el desacople atencional ^{181,184,188}.

En resumen, la atención es un proceso cognitivo de orden superior que otorga la capacidad de filtrar la información irrelevante para dedicar los recursos necesarios al procesamiento y generación de respuestas de las señales relevantes. Múltiples circuitos cerebrales intra- y subcorticales se encargan de modular los diferentes sistemas atencionales y las funciones ejecutivas, la PFC es un punto neurálgico de estos circuitos ya que en ella coinciden numerosas conexiones recíprocas con regiones sensoriales, motoras y límbicas. Estos circuitos cerebrales se encuentran finamente regulados por complejos sistemas de neurotransmisores capaces de responder a demandas internas o externas provocando la activación o la inhibición de la atención y las respuestas cognitivas y motoras apropiadas.

Alteraciones estructurales o neuroquímicas de estos circuitos prefrontales se han relacionado con un amplio abanico de patologías asociadas a déficits del control atencional, cognitivo y motor.

4. Trastornos del neurodesarrollo

Los trastornos del neurodesarrollo son un grupo heterogéneo de patologías de etiología desconocida en las que el funcionamiento del sistema nervioso central se

encuentra alterado. Pueden causar disfunciones cerebrales que se traducen en trastornos neuropsiquiátricos o en alteraciones de las funciones motoras o cognitivas.

Algunos de los trastornos del neurodesarrollo más comunes son el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), los trastornos del espectro autista (TEA), el síndrome de Gilles de la Tourette (SGT) y el trastorno obsesivo compulsivo infantil (TOC). Estas enfermedades se manifiestan en la infancia o al inicio de la edad adulta y presentan ciertas características comunes como la pérdida del control atencional y de las funciones ejecutivas y en algunos casos de la función motora.

- El **TDAH** es el trastorno neuropsiquiátrico más común en la infancia con una prevalencia de un 5-7% en la población pediátrica y 2.5 % en adultos. Se caracteriza por presentar síntomas de inatención, hiperactividad e impulsividad. Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V) existe una presentación predominante con falta de atención, cuando se cumple el criterio A1 (Tabla 3), una presentación predominante hiperactiva e impulsiva, si se cumple el criterio A2 y una presentación combinada cuando se observan criterios de A1 y A2 (Tabla 3)¹⁸⁹. La presentación combinada es la más común y la que ha sido la más ampliamente estudiada^{190,191}.
- Los **TEA** abarcan un grupo de trastornos presentes en el 1% de la población infantil caracterizados por síntomas que incluyen trastornos de la comunicación verbal y no verbal, déficits en la interacción social y comportamientos e intereses repetitivos, estereotipados y restringidos (Tabla 3; American Psychiatric Association 2018).

- Se estima que la prevalencia del **SGT** en niños y adolescentes es de un 0.5-1%, los pacientes afectados por este trastorno sufren tics tanto motores como vocales de manera crónica (durante más de un año según los criterios del DSM-5; Tabla 3) ^{189,192}.
- Por último, el **TOC** presenta una prevalencia de menos del 1% en niños y se caracteriza por la presencia de pensamientos y/o impulsos recurrentes involuntarios (obsesiones) generalmente asociados con comportamientos repetitivos y rituales (compulsiones) (Tabla 3) ^{189,192}.

Resulta de especial interés el hecho de que estas patologías presenten elevados patrones comórbidos entre ellas, y con otros trastornos neuropsiquiátricos, es decir, que en un mismo individuo coexisten fenotipos asociados a distintos trastornos ¹⁹³⁻¹⁹⁶. Debido a ello, actualmente se dedica un gran esfuerzo al estudio de las comorbilidades asociadas a los trastornos de neurodesarrollo y otras patologías, ya que puede conducir hacia una mejor comprensión de la fisiopatología de los trastornos y sobre todo al diseño de tratamientos más específicos. Debido a esto, en la última actualización DSM-V se hace especial énfasis en el concepto de comorbilidad e incluso se ha incorporado la posibilidad de un diagnóstico comórbido de TEA y TDAH, cuando en ediciones anteriores eran mutuamente excluyentes ¹⁸⁹.

Por ejemplo, en el caso de pacientes de SGT el nivel de comorbilidades es extremadamente elevado, un 90% de los pacientes diagnosticados con SGT padecen al menos una patología comórbida a lo largo de su vida ¹⁹⁶. Concretamente, se ha descrito que un 30-50% de los pacientes de SGT presenta síntomas de TOC ¹⁹², un 50-70 % de TDAH ¹⁹⁷ y un 5-15% de TEA ^{193,198}. Estos datos se traducen en que, en realidad, la forma pura de este trastorno es la menos frecuente ¹⁹⁶. También es muy habitual la presencia de rasgos de TDAH en pacientes diagnosticados con TEA (40-70%) ^{199,200} o TOC ²⁰¹⁻²⁰⁴.

Tabla 3. Criterios diagnósticos para el TDAH, TOC, TEA y SGT. Extraído de DSM-5 ¹⁸⁹

| TDAH | TOC | TEA | SGT |
|--|--|---|--|
| <p>A1. Falta de atención Seis o más síntomas (5 en >17 años) frecuentes durante más de 6 meses.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ No presta atención a detalles o comete errores debidos a descuidos. ➤ Dificultades para sostener la atención en tareas o actividades recreativas. ➤ No escucha cuando se le habla directamente. ➤ No sigue instrucciones y no finaliza tareas. ➤ Mala organización y gestión del tiempo. ➤ Evita tareas que precisan un esfuerzo sostenido. ➤ Pierde objetos u herramientas necesarias. ➤ Se distrae fácilmente. ➤ Descuidos en las actividades diarias. <p>A2. Hiperactividad-Impulsividad Seis o más síntomas (5 en >17 años) frecuentes durante más de 6 meses.</p> | <p>A. Obsesiones y compulsiones</p> <p>Obsesiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Pensamientos, impulsos o imágenes recurrentes y persistentes que causan ansiedad o estrés (no se reducen a preocupaciones excesivas sobre problemas de la vida real). ➤ Intenta ignorar estos pensamientos, impulsos o imágenes o neutralizarlos mediante otros pensamientos o actos. ➤ Reconoce que los síntomas obsesivos son un producto de su mente. <p>Compulsiones:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Conductas o ideas repetitivas debidos a una obsesión (rezar, lavarse, etc.). ➤ El propósito es reducir o evitar la angustia por algún acontecimiento <p>B. En algún momento reconoce que las ideas obsesivas</p> | <p>A. Déficits persistentes en la comunicación y en la interacción social en diversos contextos, manifestado por todos los siguientes síntomas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Dificultades en reciprocidad socioemocional. P. ej.: fracaso de la conversación, acercamiento social anormal, etc. ➤ Déficit de conductas comunicativas no verbales utilizadas en la interacción social; Comunicación verbal o no verbal poco integrada, anomalías del contacto visual y del lenguaje corporal, etc. ➤ Dificultades para desarrollar, mantener y comprender las relaciones: dificultades para ajustar el comportamiento en contextos sociales, hasta la ausencia de interés por otras personas. <p>B. Patrones repetitivos y restringidos de conducta, actividades e intereses,</p> | <p>A. Presencia de dos o más tics motores (parpadear, encogerse los hombros) y al menos un tic fónico (tararear, gritar una palabra o frase concreta). Es posible que no todos se den al mismo tiempo.</p> <p>B. Haber tenido tics durante al menos un año. Pueden ocurrir varias veces al día, generalmente en ataques.</p> <p>C. Tener tics que comenzasen antes de los 18 años.</p> <p>D. Los tics no deben ser consecuencia del uso de fármacos u otras drogas o a otra afección (convulsiones, enfermedad de Huntington).</p> |

| | | | |
|--|---|---|--|
| <p>Hiperactividad:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Movimientos excesivos en manos y pies. ➤ Dificultad para mantenerse sentado. ➤ Corre/salta en situaciones inapropiadas. ➤ Problemas para mantener la voz baja. ➤ “Está en marcha” actúa como si tuviese un motor. ➤ Habla en exceso. <p>Impulsividad:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Precipita respuestas. ➤ Dificultades para esperar turno. ➤ Interrumpe y se entromete. <p>B. Los síntomas aparecen antes de los 12 años.</p> <p>C. Síntomas presentes en dos o más contextos.</p> <p>D. Pruebas de deterioro social, académico o laboral.</p> <p>E. Los síntomas no dan exclusivamente durante el curso de esquizofrenia o trastornos psicóticos.</p> | <p>compulsivas son excesivas o irracionales (no en niños)</p> <p>C. Los síntomas provocan un malestar clínico significativo y representan una pérdida de tiempo.</p> <p>D. Si hay otro trastorno, el contenido de las obsesiones o compulsiones no se limita a él (p. ej., trastorno alimentario, hipocondría, etc.).</p> <p>E. No se debe a los efectos directos de una sustancia o enfermedad médica.</p> | <p>que se manifiestan en, al menos dos de los siguientes síntomas:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Movimientos, utilización de objetos o hablar estereotipados o repetitivos ➤ Adherencia excesiva a rutinas, patrones de comportamiento verbal y no verbal ritualizado o resistencia excesiva a los cambios. ➤ Intereses muy restringidos y fijos que son anormales en cuanto a su intensidad o foco de interés. ➤ Hiper- o hipo-reactividad a los estímulos sensoriales o interés inusual en aspectos sensoriales del entorno. <p>C. Los síntomas deben estar presentes en la infancia temprana.</p> <p>D. El conjunto de los síntomas limitan y alteran el funcionamiento diario.</p> <p>E. Estas alteraciones no se explican mejor por la discapacidad intelectual o por el retraso global del desarrollo.</p> | |
|--|---|---|--|

Cabe destacar que, debido a la ausencia de marcadores biológicos para estos trastornos se exige un diagnóstico clínico basado en la presencia de determinados rasgos asociados a cada trastorno (Tabla 3). Este tipo de diagnóstico dificulta en gran medida la identificación de rasgos o patologías comórbidas debido al solapamiento de ciertos síntomas o a que algunos de estos trastornos en ciertos momentos puedan mimetizarse entre ellos.

Debido a elevada coexistencia de estos trastornos una gran cantidad de autores conciben un modelo donde distintas patologías neuropsiquiátricas surgen de una base neurobiológica y genética común y se formula la hipótesis de que en realidad forman parte de un mismo espectro de trastornos de distinta severidad ^{195,205}.

Numerosos estudios se han centrado en comprender la etiología y la fisiopatología de estos trastornos y analizar su posible base común, aunque de momento permanece sin resolverse. Estudios familiares han establecido un fuerte componente hereditario asociado al TDAH, el TOC, los TEA y el SGT, con un riesgo entre dos y cuatro veces mayor en individuos con familiares de primer grado afectados, siendo todos ellos más prevalentes en niños que en niñas ²⁰⁶⁻²¹⁰. Es interesante destacar que estos trastornos no son solo heredables en el marco del mismo trastorno, sino que la presencia de cualquiera de ellos en la historia familiar incrementa el riesgo de padecer alguno de los trastornos típicamente comórbidos ²¹¹⁻²¹³. Estos trastornos son considerados patologías poligénicas, lo que facilita la comprensión de su de la elevada heredabilidad y la comorbilidad entre ellas, ya que se postula que pueden compartir la afectación de ciertos genes a la vez que presentan otros únicos asociados a la variedad de sus síntomas ²¹³. Sin embargo, las bases genéticas de estos trastornos o la relación genética entre ellas no se han descubierto aún.

Por otra parte, se ha descrito que su etiología es multifactorial además de la afectación de ciertos genes, factores ambientales y sociales, así como alteraciones estructurales y conectivas se han relacionado con la aparición de los trastornos del neurodesarrollo (Figura 11). Como factores ambientales, la exposición prenatal a alcohol o a tabaco, el bajo peso al nacer, el estrés oxidativo y sobre todo el estrés tanto prenatal como postnatal se han relacionado con la aparición de trastornos del neurodesarrollo ^{214–219}. Por otra parte, se han identificado ciertas alteraciones estructurales y conectiva en pacientes de estos trastornos, que parecen ser comunes o estar estrechamente relacionadas entre los distintos trastornos, lo que podría apoyar la teoría de la existencia un espectro común. Sin embargo, puesto que la etiología de estos trastornos es en gran medida desconocida, este modelo sigue siendo objeto de debate.

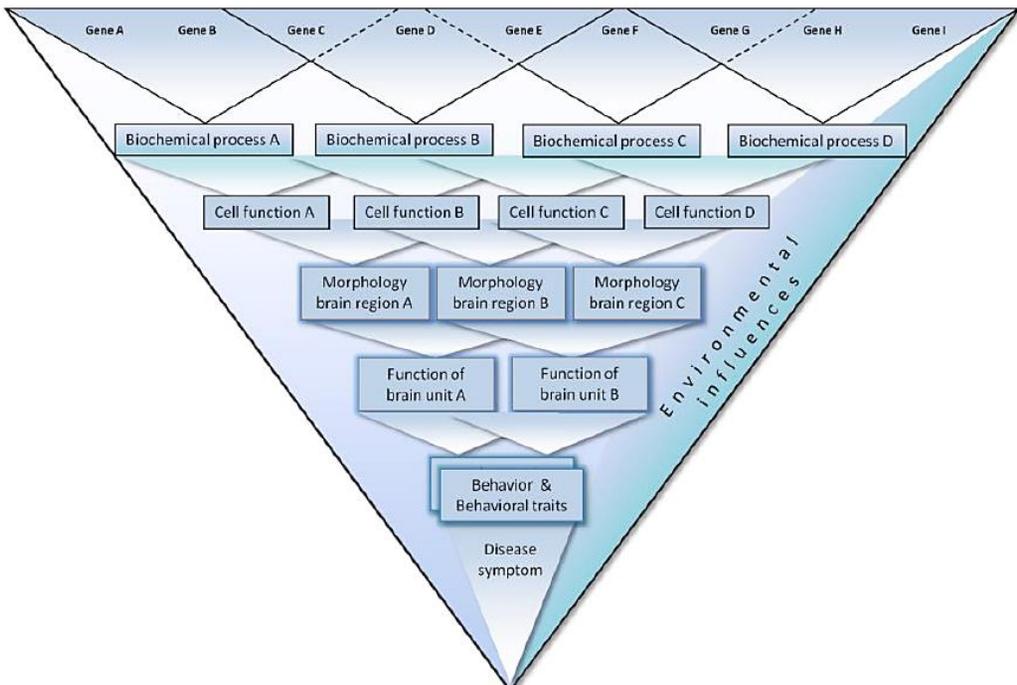


Figura 11. Representación esquemática de la compleja etiología multifactorial vinculada con la aparición de trastornos neuropsiquiátricos. Extraído de Klein et al., 2017.

4.1 Alteraciones estructurales y conectivas

Estudios de neuroimagen y de neurofisiología indican que los síntomas asociados a estos trastornos tienen su origen en fallos de las conexiones de los circuitos neurales (Figura 4) y se postula que la elevada comorbilidad entre ellos podría resultar de distintos factores etiológicos que provocan la afectación de los circuitos corticoestriatotalamocorticales (CSTC) encargados de modular la atención y las funciones ejecutivas ²²⁰. El trastorno que se manifiesta de un modo predominante dependería del nivel de afectación de los circuitos CSTC, de modo que síntomas como la falta de atención, la hiperactividad, la impulsividad, la compulsividad o los tics motores resultarían de distintos grados de afectación de estos circuitos ¹⁹⁰.

Mediante estudios de neuroimagen se ha demostrado la presencia de anomalías estructurales y conectivas en pacientes con TOC, TDAH, SGT o TEA en regiones implicadas en los circuitos CSTC. Se han observado alteraciones volumétricas en el tálamo, la PFC, la ACC y los ganglios basales en comparación con grupos control ^{190,221,222}. Distintas evidencias sugieren que cada trastorno se asocia además con un grado distinto de afectación y con la alteración en regiones específicas, lo que se traduce en modificaciones de la conectividad y funcionalidad de ciertos subcircuitos entre la PFC y las regiones subcorticales, que darán lugar a determinados síntomas característicos.

Tabla 4. Principales regiones cerebrales afectadas en los trastornos del neurodesarrollo.

| | Regiones afectadas |
|-------------|--|
| TDAH | Afectación general PFC y ganglios basales |
| TEA | Sobrecrecimiento PFC |
| TOC | OFC, ACC, núcleo caudado |
| SGT | OFC, ACC, VLPFC, núcleo caudado y estriado |

Se ha relacionado el TOC con la reducción del volumen de la OFC, la ACC y los ganglios basales, especialmente del núcleo caudado^{223,224}. De un modo similar, en pacientes de SGT se ha detectado una disminución del volumen en áreas prefrontales (OFC, VLPFC, ACC) y en núcleo caudado. Por otro lado, el TDAH y los TEA surgen de daños más extensos a lo largo de la PFC y las regiones subcorticales^{225,226}. Los síntomas del TDAH se han asociado con una disminución del volumen cerebral, siendo un 3-5% menor comparado con los grupos control²²⁷⁻²²⁹. Al contrario, en los individuos afectados por TEA se han detectado patrones anormales de crecimiento cortical acompañados de un sobrecrecimiento de las regiones prefrontales.

A pesar de la afectación de regiones comunes, las alteraciones funcionales frontoestriatales difieren entre ellas. El TOC y el SGT se asocian con una hiperactividad funcional y conectiva. Se ha observado un hipermetabolismo en regiones frontales y estriatales como la OFC, la VMPFC los ganglios basales y el tálamo en pacientes de TOC y en las cortezas motoras y áreas subcorticales, especialmente en el estriado, en SGT^{198,206,230-233}. Por el contrario, se ha descrito una disminución de la activación y la conectividad prefrontal en individuos con TDAH^{206,234}. En el caso del TEA, los resultados han mostrado tanto hipoconectividad como hiperconectividad y se cree que la conectividad interregional se encuentra reducida, como ocurre en el TDAH, mientras que las conexiones intrarregionales se encontrarían sobreactivadas, aunque estos datos necesitan ser evaluados en más profundidad²³⁵⁻²³⁷. Así, las alteraciones estructurales, funcionales y conectivas de las distintas regiones de la PFC en cada trastorno se traducen en la afectación de distintos subcircuitos CSTC asociados con los rasgos característicos.

En resumen, que regiones frontales y subcorticales concretas, así como el nivel de afectación funcional y conectivo de las mismas determina el grado de severidad y los síntomas asociados a cada trastorno. Es decir, que cuantos más subcircuitos CSTC

se vean afectados, más síntomas se observarán y cuanto más severa sea la alteración de la conectividad, más graves serán los síntomas²³⁸. Estos circuitos se encuentran finamente regulados por distintos sistemas de neurotransmisores, de manera que alteraciones en la liberación o señalización de estos neuromoduladores también pueden afectar a la conectividad cerebral por lo que se han dedicado numerosos esfuerzos a evaluar la funcionalidad de los sistemas de neurotransmisión en estos trastornos.

4.2 Disfunción del sistema catecolaminérgico

Existen numerosas evidencias que indican la participación de alteraciones en los sistemas de neurotransmisión catecolaminérgico y serotoninérgico en la disfunción de las funciones ejecutivas y la atención presente en los trastornos del neurodesarrollo. Esta teoría se basa en múltiples ensayos donde se han descrito alteraciones de los niveles de estos neurotransmisores en la PFC y en los ganglios basales. Juntamente con distintos datos obtenidos mediante estudios genéticos que describen distintos polimorfismos de los receptores, los transportadores o las enzimas implicadas en la síntesis o degradación de DA, NE o 5-HT o alteraciones en la expresión o afinidad de sus receptores y transportadores capaces de conferir cierta susceptibilidad a padecer estos trastornos (Tabla 5). Sin embargo, cabe destacar que los resultados obtenidos son, en numerosas ocasiones, contradictorios o no han conseguido ser reproducidos. De modo que las teorías relacionadas con la participación de estos sistemas de neurotransmisión en el TDAH, los TEA, el TOC y el SGT se hacen realmente evidentes cuando se analizan los fármacos más ampliamente utilizados como tratamiento de estos trastornos, ya que actúan principalmente sobre los receptores o transportadores de dichos neurotransmisores.

El sistema catecolaminérgico juega un papel esencial en la regulación de la atención, las funciones ejecutivas, la recompensa y el control motor (véase apartado 3.1) por

lo que su disfunción se relaciona con un elevado número de trastornos neuropsiquiátricos. Se han descrito distintas alteraciones funcionales y polimorfismos asociados a este sistema relacionadas con los trastornos del neurodesarrollo (Tabla 5). Sobre todo, se han diseñado ciertas teorías dopaminérgicas como posible base etiológica de estos trastornos. La participación del sistema noradrenérgico se deduce en gran parte por la eficacia de los fármacos dirigidos a sus receptores o transportadores y al efecto de la depleción de la NE en roedores, la cual se ha descrito que produce deficiencias atencionales, hiperactividad motora y la incapacidad de filtrar información irrelevante ²¹³.

La sintomatología del TDAH ha sido ampliamente asociada a una reducción de la señalización catecolaminérgica en la PFC. Concretamente, se cree la disminución de la señalización dopaminérgica implica una disminución de la motivación, de evaluación de la recompensa y del control motor, lo que se traduce en una necesidad constante de estimulación, de recompensas anticipadas y requieren altos niveles de refuerzo para mantener los niveles de motivación adecuados para finalizar una tarea ^{239,240}. Debido a esta hipoactivación el tratamiento para el TDAH se centra en intentar incrementar la neurotransmisión catecolaminérgica mediante la utilización de psicoestimulantes inhibidores de la recaptación de catecolaminas (metilfenidato), agonistas α_2 (clonidina, guanfacina) e inhibidores de la recaptación de NE o 5-HT, entre otros ^{241,242}. Se han identificado diversos genes y polimorfismos relacionados con la señalización catecolaminérgica que otorgan cierta vulnerabilidad (Tabla 5) para padecer este trastorno, siendo el más reconocido el polimorfismo del receptor de dopamina D₄.

Tabla 5. Tabla de genes relacionados con los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico potencialmente implicados en los trastornos del neurodesarrollo.

| Gen | Función | TDAH | TEA | TOC | SGT |
|--------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| DRD4 | Receptor de DA D ₄ | Sí ^{102,105,243} -245 | Sí ²⁴⁶ | Sí/No ²⁴⁷⁻ 253 | Sí/No ²⁵⁴⁻ 256 |
| DRD5 | Receptor de DA D ₅ | Sí/No ^{105,24} 5,257,258 | Sí/No ²⁵⁹⁻²⁶¹ | - | Sí/No ²⁶²⁻ 264 |
| DRD1 | Receptor de DA D ₁ | Sí ^{105,245,265,} 266 | Sí/No ^{261,267} | Sí ²⁶⁸ | No ^{264,269} |
| DRD2 | Receptor de DA D ₂ | Sí ^{245,270} | No ²⁶⁰ | Sí ²⁷¹ | Sí/No ^{255,2} 72,273 |
| DRD3 | Receptor de DA D ₃ | Sí ^{274,275} | Sí ²⁷⁶ | No ²⁷⁷ | No ²⁵⁵ |
| ADRA2A | Receptor de NE α_{2A} | Sí ²⁷⁸⁻²⁸⁰ | - | - | - |
| SLC6A3 | Transportador de DA; DAT1 | Sí ^{243,257,281} -283 | Sí ²⁸⁴⁻²⁸⁷ | No ^{249,288} | Sí ^{254,255,28} 9 |
| SLC6A2 | Transportador de NE NET | Sí ^{283,290,291} | No ²⁹² | No ²⁹³ | No ²⁹⁴ |
| COMT | Catecol-o- metiltransferasa | Sí/No ²⁹⁵⁻ 29 8 | Sí ^{287,299,300} | Sí, No ^{249,301,30} 2 | No ²⁵⁴ |
| DBH | Dopamina- β - hidroxilasa | Sí ³⁰³⁻³⁰⁵ | Sí/No ^{306,307} | - | Sí/No ^{264,3} 08,309 |
| MAOA | Monoamin- oxidasa | Sí ³¹⁰⁻³¹² | Sí/No ^{260,306,} 307 | Sí ^{251,313} | Sí ²⁵⁵ |

El polimorfismo del receptor de dopamina D_4 , el $D_{4.7}R$, ha sido uno de los más ampliamente estudiados en relación con la señalización dopaminérgica debido a que diversas investigaciones han vinculado este polimorfismo con una mayor susceptibilidad para padecer TDAH ^{102,105}. A su vez, se ha descrito que los pacientes de TDAH portadores del polimorfismo $D_{4.7}R$ muestran una mayor impulsividad y déficits más severos en la inhibición de respuestas, así como afectaciones estructurales más graves ³¹⁴⁻³¹⁶. En el año 2011, Reiersen y colaboradores describieron que los pacientes de TDAH portadores de este polimorfismo también mostraban un riesgo mayor de sufrir síntomas autísticos, lo que plantea el posible papel como factor de riesgo de la variante $D_{4.7}R$ en el TEA ³¹⁷. Ciertamente, un estudio donde se realizó el genotipado del gen *DRD4* en niños autistas reveló una mayor frecuencia del alelo $D_{4.7}R$ en los niños afectados en comparación con el grupo control. Además, los pacientes portadores de $D_{4.7}R$ mostraron un cociente intelectual más bajo ²⁴⁶. En cuanto a la posible participación como factor de riesgo de este polimorfismo en el SGT y el TOC, los datos publicados hasta ahora son discordantes. Algunos autores han descrito una elevada prevalencia de este polimorfismo en individuos afectados con TOC ^{249,250} o SGT ^{255,318}, sin embargo, otros han reportado lo contrario en el caso de TOC ²⁵¹⁻²⁵³ y SGT ^{254,262,289}. Aun así, se ha asociado un incremento de la severidad de los tics y de los comportamientos obsesivo-compulsivos en pacientes de TEA portadores del alelo $D_{4.7}R$ ³¹⁹. Esto sugiere que probablemente este polimorfismo si se encuentra, en cierta medida, asociado al TOC y al SGT. A pesar de los numerosos estudios que se han llevado a cabo para poder determinar el alcance funcional de esta variante, hasta ahora las diferencias entre $D_{4.7}R$ y la variante más común, $D_{4.4}R$, se desconocen (véase apartado 3.1.1), lo que impide conocer el efecto de este polimorfismo en los distintos trastornos.

A diferencia del tratamiento para el TDAH, los fármacos DAérgicos utilizados para el tratamiento del SGT y el TEA se centran en bloquear la activación dopaminérgica mediante la utilización de antagonistas DAérgicos como la risperidona o el haloperidol. Se cree que tanto los tics como los comportamientos estereotípicos asociados al TEA se producen como consecuencia de una excesiva transmisión dopaminérgica en la vía nigroestriatal, que da lugar a desajustes en la vía directa e indirecta. La excitación aberrante del estriado producida por una hiperactividad dopaminérgica induce la inhibición de las neuronas en el globo pálido con la consiguiente desinhibición de las neuronas prefrontales motoras (Figura 12) ²⁰⁹. Sin embargo, se desconoce cuál es la causa las alteraciones de la transmisión DAérgica.

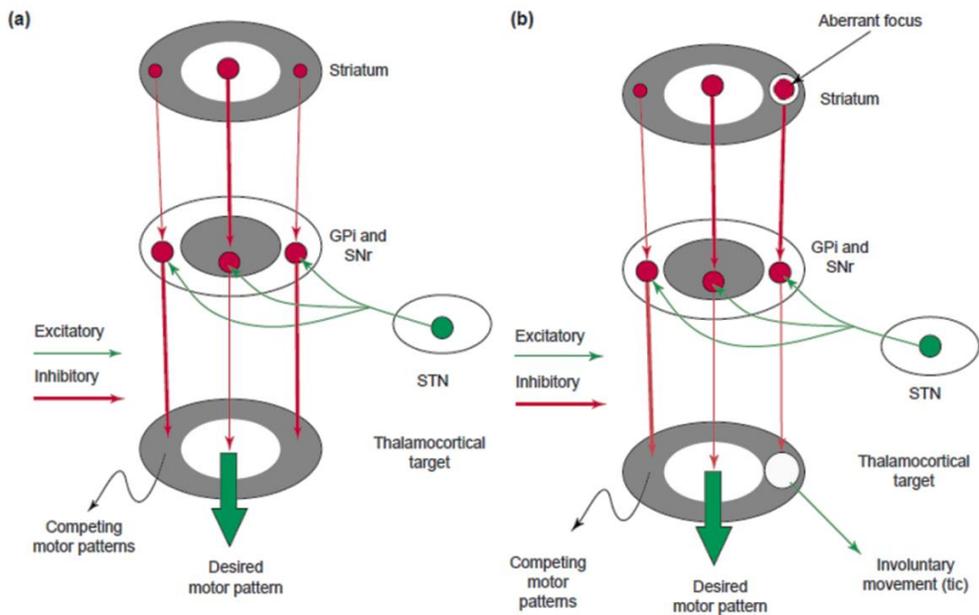


Figura 12. Esquema del circuito de control motor en los ganglios basales en condiciones normales (a) y en pacientes de SGT (b). Los pacientes de SGT sufrirían una reorganización de la señalización en los ganglios basales debido a una activación inapropiada de un grupo de neuronas estriatales. Extraído de Albin y Mink, 2006²⁰⁷

En el caso del SGT se han planteado distintas hipótesis basadas en disfunciones dopaminérgicas presinápticas e intrasinápticas (revisado en ³²⁰). Los modelos presinápticos se basan por una parte en el posible hipofuncionamiento de las

neuronas DAérgicas que darían lugar a receptores hipersensibles y, en el extremo opuesto, una posible hiperinervación DAérgica. En cuanto a las teorías intrasinápticas, se ha postulado la existencia de un desajuste entre la liberación tónico-fásica de la DA. Esta teoría se basa en ciertos estudios en los que se han reportado la presencia del transportador DAT hiperactivo. El incremento de la actividad de DAT reduciría los niveles tónicos de DA por una excesiva recaptación y a su vez se incrementarían los niveles acumulados presinápticamente lo que daría lugar a que la liberación inducida en respuesta a estímulos sea muy elevada ³²¹. Mediante ensayos de PET se observó que la liberación de DA en el estriado tras el tratamiento con anfetaminas en pacientes de SGT. Paralelamente, también reportaron un incremento en el número de receptores de dopamina D₂ lo que podría desregular en mayor medida la vía directa e indirecta ³²². Finalmente, se cree que la noradrenalina también podría estar implicada en la fisiopatología del SGT. La hipótesis se basa en la capacidad de suprimir los tics mediante el tratamiento con agonistas de α_2 como la clonidina o la guanfacina.

Gran cantidad de autores se han centrado en comprender como la disfunción dopaminérgica puede dar lugar a la fisiopatología del TEA. Como se ha comentado, los comportamientos repetitivos y estereotípicos se asocian con disfunciones en la vía nigroestriatal. En un estudio reciente Lee y colaboradores (2018) determinaron mediante la supresión de DAT y la estimulación optogenética de esta vía que el incremento de DA en el estriado dorsal (región clave de la vía nigroestriatal) induce no solo comportamientos repetitivos sino también déficits sociales³²³. Estas alteraciones en el comportamiento desaparecían tras la administración de antagonistas de D₁R y eran mimetizadas mediante su estimulación ³²³. Por otro lado, también se ha postulado que los déficits sociales asociados a este trastorno se deben a una disminución extrema de la motivación y de los sistemas de recompensa como consecuencia de una hipoactividad dopaminérgica ³²⁴. Esta teoría se basa en

ciertos estudios donde se ha descrito una menor liberación de DA en la PFC y la disminución de la actividad de la vía mesolímbica en pacientes de TEA ³²⁵⁻³²⁷. También, en relación al sistema DAérgico, se han reconocido ciertos haplotipos de D₁R y sobre todo variantes del transportador DAT que actúan como factores de riesgo para la aparición de esta patología (tabla 5)^{267,284-286}. Además de la desregulación DAérgica, también se han relacionado con el TEA alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión, entre ellos la NE. Se ha planteado la hipótesis sobre la participación de un funcionamiento aberrante del sistema noradrenérgico en la etiología del TEA. Se ha descrito la posible desregulación tónico-fásica de este sistema, donde los niveles tónicos son excesivamente elevados y la respuesta fásica, insuficiente. La alerta fásica es capaz de inducir la reorientación de la atención y permite actualizar la información cerebral en función de los acontecimientos que se producen en el ambiente o bien internamente mediante proyecciones descendentes al LC. Así, el funcionamiento aberrante de la alerta fásica disminuiría la capacidad de reaccionar a estímulos salientes y gestionar un comportamiento y atención flexible en función de las demandas, como por ejemplo estímulos sociales, uno de los principales rasgos del TEA (revisado en ³²⁸). Los fármacos dirigidos al sistema NEérgico no son la primera línea de acción para este trastorno, pero aun así han demostrado ser útiles como tratamiento para los rasgos asociados al TEA^{329,330}.

Por último, los estudios sobre la neuromodulación en pacientes de TOC se han centrado tradicionalmente en las disfunciones del sistema serotoninérgico debido a la eficacia del tratamiento con inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT y a la asociación de ciertos polimorfismos del transportador de serotonina con la aparición del TOC. Sin embargo, estos tratamientos solo resultan efectivos en un 50% de los casos, lo que sugiere que otros neurotransmisores podrían estar participando en la sintomatología de este trastorno. La evaluación de ciertos modelos animales utilizados para el estudio del TOC ha revelado que el sistema

DAérgico podría encontrarse hiperactivado en este trastorno. Wood y colaboradores han descrito recientemente la existencia de una desregulación dopaminérgica en un modelo de ratón ampliamente aceptado para el estudio del TOC (ratones *knock-out* SAPAP3). En estos ratones se observó un incremento del *turnover* de DA en la OFC lo que contribuye, probablemente, a la aparición de comportamientos compulsivos y con la inflexibilidad cognitiva característica de los afectados con TOC ³³¹. Asimismo, se ha descrito que en ratones hiperdopaminérgicos, debido al bloqueo del transportador DAT, se observan comportamientos más rígidos y patrones de comportamiento compulsivos de un modo similar al que induce la administración de agonistas D₁R ³³². Asimismo, el tratamiento con el agonista D₂R también parece producir un incremento de la compulsividad ^{333,334}. La hipótesis de una posible hiperactividad dopaminérgica la avala la mejora de los síntomas observada en pacientes resistentes a inhibidores de la recaptación de serotonina (SSRI) tras el tratamiento conjunto con SSRI y antagonistas dopaminérgicos como la risperidona o el haloperidol ³³⁵⁻³³⁹. A diferencia del sistema DAérgico, no se han descrito evidencias directas de la participación del sistema NAérgico en la fisiopatología del TOC. Sin embargo, si se ha descrito la utilidad de la administración de tratamientos basados en inhibidores de la recaptación de 5-HT no selectivos como la clomipramina o la venlafaxina, que también son capaces de inhibir la recaptación de NE. Estos fármacos presentan mayores efectos secundarios, pero parecen ser más efectivos para el tratamiento de pacientes que han mostrado resistencia al tratamiento con únicamente SSRI ³⁴⁰⁻³⁴³.

A pesar de la de que ciertos resultados son discordantes, en conjunto estos datos demuestran la participación del sistema catecolaminérgico en los distintos trastornos del neurodesarrollo y la efectividad de los fármacos dirigidos a incrementar o bloquear su actividad. Sin embargo, es de vital importancia analizar

en mayor profundidad su papel en la fisiopatología de dichos trastornos y evaluar la interacción entre ambos sistemas y con otros sistemas de neurotransmisores con el objetivo de diseñar mejores tratamientos.

5. Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) o receptores de 7 dominios transmembrana (7-TM) son proteínas que constituyen la mayor familia moléculas de membrana implicadas en la transducción de señales. Prácticamente el 2% del genoma humano codifica para estos receptores, dando lugar a más de 1.000 proteínas y el 90% ellas se encuentran en el Sistema Nervioso Central (SNC)³⁴⁴⁻³⁴⁶.

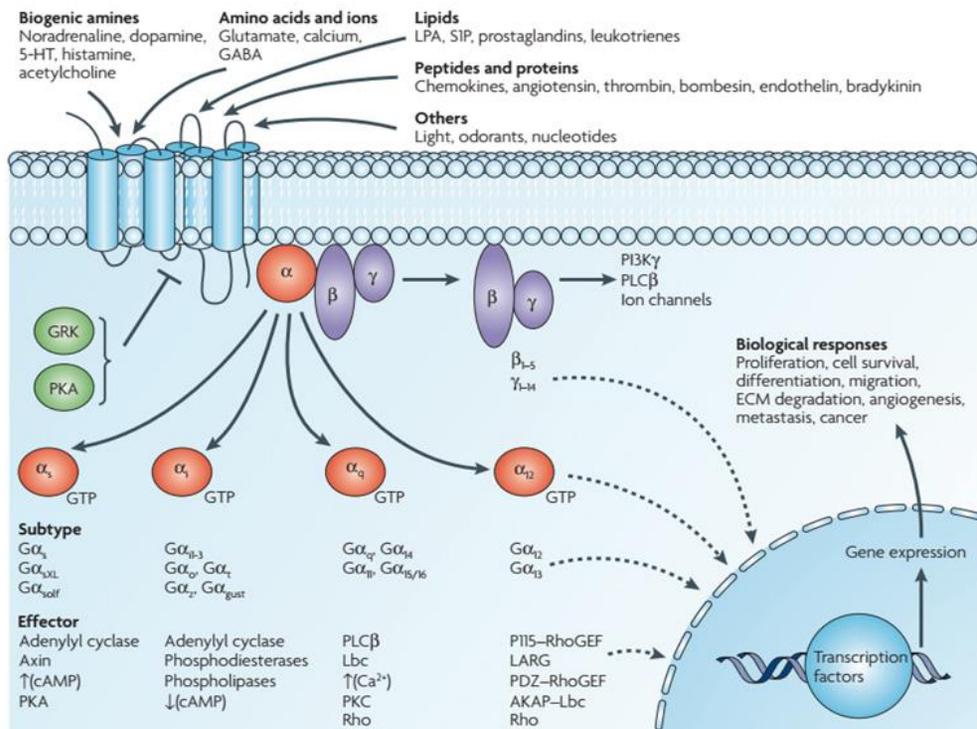


Figura 13. Ligandos endógenos y vías de señalización medidas por la activación de GPCRs. Extraído de Dorsam y Gutkind, 2007.

Los GPCRs son capaces de mediar una gran variedad de cascadas de señalización celular en respuesta a la unión de un amplio abanico de ligandos endógenos y exógenos, como fotones, hormonas, neurotransmisores, nucleótidos, lípidos, proteínas, sustancias odorantes o azúcares³⁴⁷. Estos receptores participan en la modulación de un elevado número de procesos fisiológicos. De hecho, aproximadamente un 80% de las hormonas y neurotransmisores implicados en la activación de vías de transducción de señales actúan mediante su unión a GPCRs (Figura 13). Debido a ello, el 35% de los fármacos comercializados actualmente ejercen sus efectos modulando la actividad de GPCRs, el 26% de los cuales tienen como diana el SNC³⁴⁸.

Investigaciones recientes han demostrado que la regulación y la señalización de los GPCRs presenta una mayor complejidad de la que se había descrito inicialmente. Se ha reportado la posibilidad de señalización mediante vías independientes de proteína G, la existencia de ligandos funcionalmente selectivos capaces de estimular preferencialmente ciertas vías de señalización a través de un mismo receptor (ligandos *biased*) y su aceptada capacidad de oligomerización con otros receptores o proteínas de otras familias tales como canales iónicos. En la actualidad los GPCRs son el foco de numerosos estudios centrados en diseñar nuevos fármacos más específicos y selectivos capaces de regular la actividad de los GPCRs acorde a su complejidad funcional asociada.

5.1 Estructura de los GPCR

Los GPCRs se caracterizan por un lado por compartir una estructura terciaria común con la presencia de siete segmentos α -hélice hidrofóbicos que atraviesan la membrana plasmática, y por otra por ser capaces de acoplarse a proteínas G heterotriméricas. Las α -hélices tienen una longitud de entre 25 y 35 residuos y los dominios que conforman cada una de ellas se hallan interconectados mediante 3 bucles extracelulares (ECL1, ECL2 y ECL3) y 3 intracelulares (ICL1, ICL2 y ICL3). Los

GPCRs también presentan un extremo amino-terminal (N-terminal) extracelular, el cual participa en el reconocimiento y la unión del ligando al centro ortostérico (centro de unión de agonistas y antagonistas del receptor) y un extremo carboxilo-terminal (C-terminal) intracelular que media la propagación de la señal actuando sobre elementos transductores de señales como las proteínas G ³⁴⁹. La correcta integración y orientación de la proteína se produce en el retículo endoplasmático y las α -hélices se insertan y estabilizan en la membrana lipídica debido a su hidrofobicidad. Finalmente, la estructura terciaria se forma gracias a interacciones específicas entre las α -hélices que dan lugar a una estructura compacta.

La primera estructura cristalizada de un GPCR fue la del receptor de rodopsina bovina, mediante la cual se pudo describir la presencia de siete dominios α -hélice TM conectados por los distintos bucles intra- y extracelulares ³⁵⁰. Actualmente se han resuelto más de cien estructuras de GPCRs, la mayoría de ellos pertenecen a la clase A (véase apartado siguiente) de GPCRs, como el receptor de adenosina A_{2A} ³⁵¹ y el receptor de adrenalina β_2 ³⁵² entre otros. Poco después, se publicó la estructura cristalina del receptor de opsina acoplado a la proteína G, de este modo se avanzó en la interpretación de los cambios estructurales asociados a la transducción de señal de los GPCRs ³⁵³. Actualmente, numerosos esfuerzos se centran en resolver la estructura cristalizada de un mismo receptor en sus diferentes conformaciones (activo/inactivo) y/o unido a diferentes ligandos, o formando complejo con su propia proteína G, lo que permite avanzar en comprender las bases estructurales de la función de los GPCRs. En 2011 se publicó la estructura cristalina del complejo activo formado por el receptor β_2 -adrenérgico monomérico unido a la vez a un agonista y a una proteína $G\alpha_s$ ³⁵⁴. Posteriormente se cristalizó el receptor μ -opioide unido a la proteína inhibidora $G\alpha_i$, lo que reveló diferencias en la posición del TM6 respecto a los datos observados en complejos receptor- $G\alpha_s$ (Figura 14) ³⁵⁵, estas

diferencias estructurales podrían ser esenciales para la determinación de la especificidad de los receptores por las proteínas G.

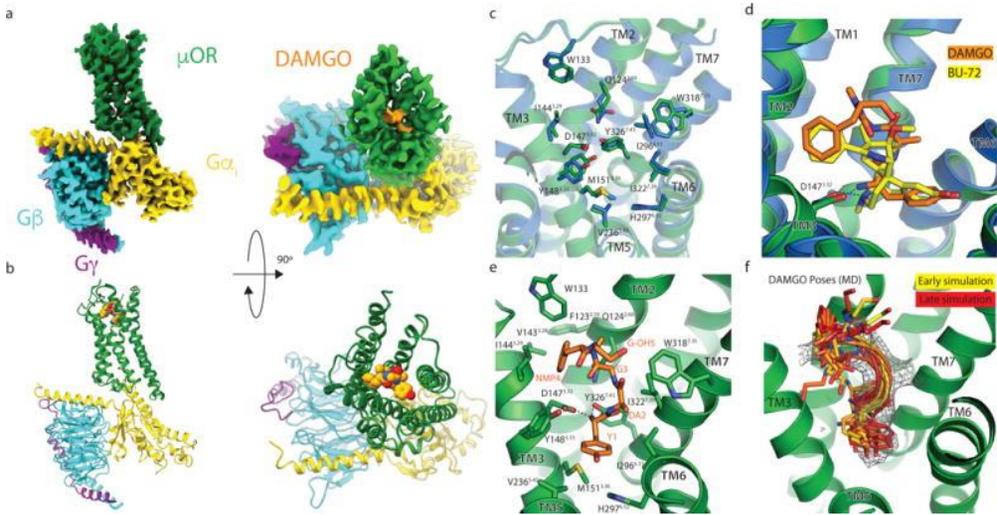


Figura 14. Estructura cristalizada del complejo μ OR-G α_i (Koehl et al. 2018³⁴⁸)

5.2 Clasificación de los GPCRs

A lo largo de los años los GPCRs han sido clasificados en función de distintos criterios tanto estructurales como fisiológicos. Actualmente se acepta una clasificación basada en el análisis filogenético de los GPCRs presentes en vertebrados. Este sistema de clasificación apoya la teoría de que los GPCRs surgieron a partir de un único predecesor, que evolucionó desde moléculas simples en sus orígenes a la elevada complejidad asociada a la superfamilia de GPCRs en la actualidad. Esta clasificación es conocida como GRAFS por las iniciales de cada una de las cinco familias en las que se divide (Glutamato, Rodopsina, Adhesión, Frizzled/taste2 y Secretina) (Figura 15)^{356,357}:

- Familia de la rodopsina o **clase A**: es la mayor familia de GPCRs e incluye receptores para una gran variedad de ligandos como, neurotransmisores y

hormonas entre otros. La homología entre los receptores de esta familia se limita a un número de residuos altamente conservados. El único residuo conservado corresponde a la arginina del motivo Asp-Arg-Tyr en el tercer dominio transmembrana y por tener un puente disulfuro que conecta el primer bucle extracelular con el segundo. Esta conexión entre ECL1 y ECL2 parece ser vital para el plegamiento y estabilización de ciertas conformaciones de los receptores. En esta familia encontramos los receptores de adrenalina, dopamina e histamina entre muchos otros ³⁵⁸⁻³⁶⁰.

- Familia de los receptores de secretina o **clase B**: incluye receptores para una variedad de hormonas peptídicas y neuropéptidos. Presentan un largo dominio N-terminal con múltiples cisteínas que forman una red de puentes disulfuro. Presentan en común con la familia A el puente disulfuro que conecta el ECL1 y ECL2 ³⁶¹.

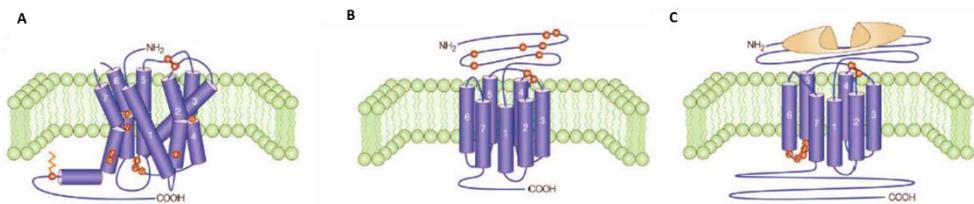


Figura 15. Representación esquemática de la estructura de las principales familias de GPCRs. A: Clase A/ familia de rodopsina; B: Clase B/ familia secretina; C: Clase C/ Familia de receptores de glutamato. Extraído de George, 2002.

- Familia de los receptores de Glutamato o **clase C**: incluye receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) y receptores sensores de Ca²⁺, como receptores gustativos, olfativos y de feromonas. Presentan un gran dominio extracelular que contiene el centro ortostérico y un dominio rico en cisteínas.
- Familia de receptores de adhesión: Se caracterizan por presentar un dominio N-terminal muy largo que contienen diversos dominios de

adhesión. Esta familia de receptores comparte una elevada similitud de secuencia entre las regiones TM con los receptores de la familia secretina.

- Familia de los receptores frizzled/taste2: incluye receptores implicados en el control de la diferenciación, proliferación y polaridad celular durante el desarrollo embrionario, entre otros.

5.3 Activación y vías de señalización de los GPCRs

La activación de los GPCRs inducida por la unión de un ligando produce cambios conformacionales en el receptor que inducen reclutamiento y la regulación de la actividad de las proteínas G heterotriméricas citoplasmáticas. Sin embargo, la señalización mediada por los GPCRs es mucho más compleja y no se limita a su acoplamiento con las proteínas G, sino que se ha demostrado que estos receptores también son capaces de activar ciertas vías de señalización de manera independiente de proteína G³⁴⁷(Figura 16).

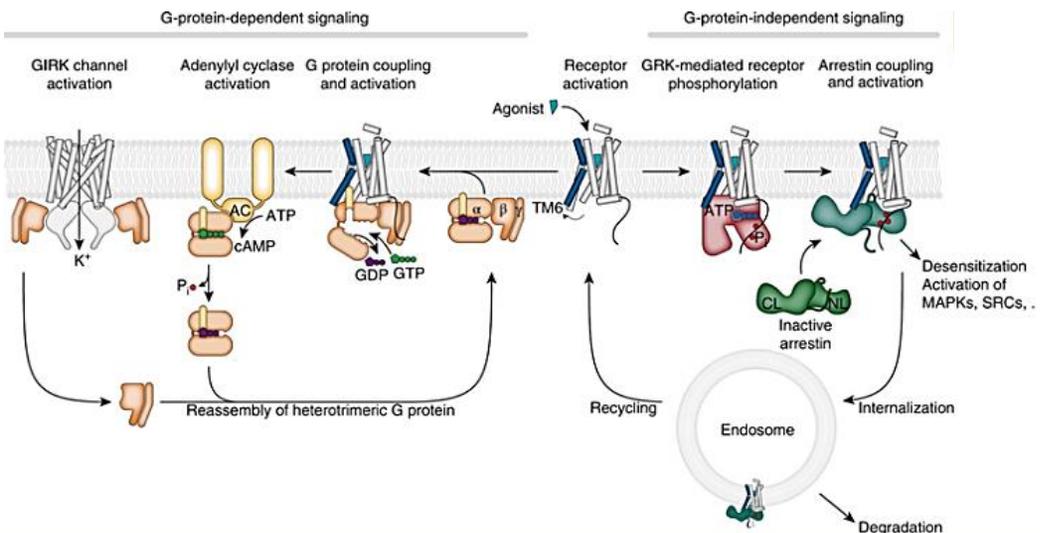


Figura 16. Representación esquemática de las vías de transducción de señales dependientes e independientes de proteína G mediadas por GPCRs. Extraído de Hilger et al. 2018³⁴⁰

5.3.1 Vías de señalización dependientes de proteína G

La activación producida tras la interacción entre un ligando y un GPCR induce un cambio conformacional en el receptor que conlleva al reclutamiento y activación de la proteína G a la que se encuentra acoplada el GPCR en concreto ³⁶². Las proteínas G son complejos heterotriméricos formados por tres subunidades distintas (α , β , γ). Existen cuatro tipos de subunidad α ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$) que pueden formar parte de la proteína G. Por su parte, se han descrito 5 y 12 tipos de subunidades $G\beta$ y $G\gamma$, respectivamente ^{363–365}.

En ausencia de ligando la proteína G heterotrimérica se encuentra en un estado inactivo, en este estado la subunidad $G\alpha$ presenta gran afinidad de unión por el GDP (guanosina difosfato). Tras la unión de un ligando a un GPCR y la posterior activación de la proteína G el receptor actúa como GEF (*guanosine exchanging factor*) y se produce la liberación de la molécula de GDP con la subsiguiente unión de una molécula de GTP (guanosina trifosfato). Para que se produzca la liberación de la molécula de GDP es necesario que se produzca un cambio conformacional en la hélice α_5 de la subunidad $G\alpha$ junto con reajustes estructurales en la subunidad $G\beta$ ³⁶⁶. La unión del GTP a la subunidad $G\alpha$ produce su disociación del receptor, así como del dímero $G\beta\gamma$. A continuación, tanto la subunidad $G\alpha$ como el dímero $G\beta\gamma$ son capaces de actuar sobre distintas moléculas efectoras y modular diversas vías de señalización (Figura 17) ^{349,365}.

La subunidad $G\alpha$ posee actividad GTPasa intrínseca, mediante la cual es capaz de hidrolizar la molécula de GTP a GDP y fosfato y adquirir de nuevo un estado inactivo. De esta manera se finaliza la señalización y $G\alpha$ se asocia nuevamente con el dímero $G\beta\gamma$ reconstituyendo el complejo heterotrimérico ³⁶⁵.

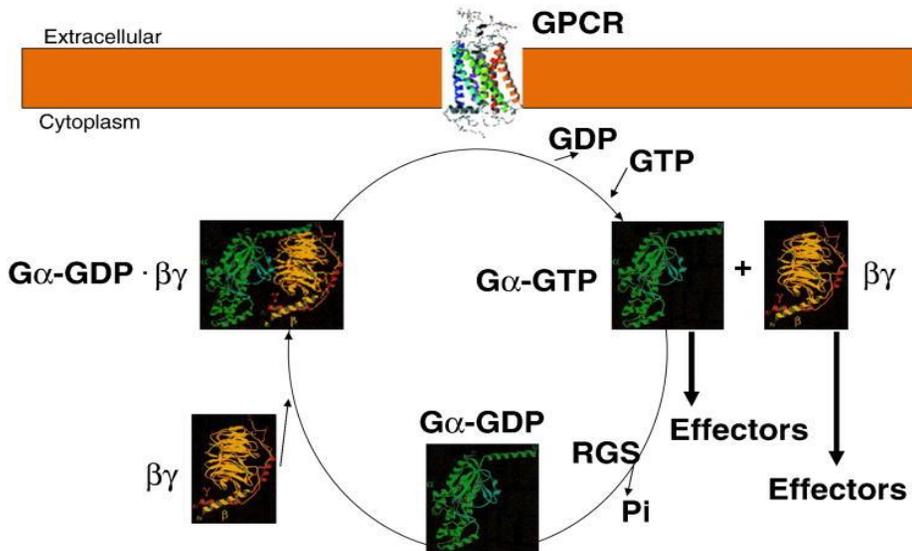


Figura 17. Ciclo de activación de la proteína G. Extraído de Syrovatkina et al., 2016³⁵⁸

Como se ha comentado anteriormente, existen distintos tipos de proteínas $G\alpha$, cada una de ellas es capaz de actuar sobre distintos efectores para modular distintas vías de señalización intracelulares. Las proteínas $G\alpha_{q/11}$ producen la activación de la proteína PLC β (fosfolipasa C β), la cual induce la hidrólisis del PIP2 (fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato) presente en la membrana y se forman en consecuencia dos segundos mensajeros: DAG (diacilglicerol) e IP3 (inositol 1, 4, 5-trisfosfato). La formación de DAG produce la activación de la PKC (proteína quinasa C) mientras el IP3 estimula la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, y el Ca^{2+} liberado activa diversas quinasas dependientes de Ca^{2+} . Por otra parte, las proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_{i/o}$ estimulan o inhiben, respectivamente, la enzima adenilato ciclasa (AC), que cataliza la conversión de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina monofosfato cíclico (AMPc), un importante segundo mensajero celular. Por último, $G\alpha_{12/13}$ estimulan pequeñas GTPasas mediante la activación de factores intercambiadores de

nucleótidos de guanina ³⁶⁷. Estructuralmente, se ha descrito que la unión del receptor a la proteína G depende de la interacción del extremo C-terminal de la hélice $\alpha 5$ de la subunidad $G\alpha$ en la cavidad creada por el movimiento del extremo citoplasmático del TM6 que se acerca a TM5 y se aleja de TM3 ³⁶⁸.

Por su parte, el dímero $G\beta\gamma$ generalmente era considerado como un estabilizador de la subunidad $G\alpha$, sin embargo, actualmente está ampliamente aceptada la participación de este complejo en la señalización celular. Efectivamente, $G\beta\gamma$ es capaz de regular en ciertos casos la AC y puede participar en la activación de la vía de las MAPK (*mitogen activated protein kinase*) ³⁶⁹.

5.3.2 Vías de señalización independientes de proteína G

Algunos GPCRs son capaces de señalizar mediante vías independientes a la activación de la proteína G. Esto se debe a la capacidad de estos receptores de interactuar con proteínas distintas a la proteína G heterotrimérica como las quinasas de GPCRs (GRK) o las β -arrestinas. Las GRK catalizan la fosforilación del receptor tras su activación y dicha fosforilación induce el proceso de reclutamiento de β -arrestinas.

Se han descrito cuatro tipos de β -arrestinas en humanos. La distribución de las de tipo 1 y 4 se limita a la retina y a la glándula pineal y las de tipo 2 y 3 (conocidas como β -arrestina 1 y β -arrestina 2, respectivamente) se expresan de manera ubicua ³⁷⁰. Los GPCRs de clase A presentan mayor afinidad por la β -arrestina 2, mientras que los de clase B parecen unirse con la misma afinidad a ambos subtipos. En el caso de GPCRs de clase A el complejo GPCR- β -arrestina el tiempo de unión es en torno a 10-15 minutos, por lo que rápidamente son reciclados a membrana, en cambio los de clase B son reciclados lentamente ^{371,372}.

La unión de β -arrestinas por una parte desacopla la proteína G del GPCR y hace que finalice su señalización, y por otro lado inicia un proceso conocido como internalización o endocitosis del receptor mediante la unión de clatrina y la formación de vesículas. Una vez internalizado, el receptor puede o bien ser ubiquitinizado y degradado en los lisosomas, o ser desfosforilado y reciclado de nuevo en la membrana, o simplemente permanecer en el interior de la célula e iniciar una señalización independiente de proteína G mediante el reclutamiento de distintas proteínas, esencialmente quinasas ^{372,373}.

De modo que las β -arrestinas pueden actuar como proteínas adaptadoras e inducir el tráfico e internalización del receptor, o bien interaccionar con proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) tales como las quinasas de señalización extracelular 1 y 2 (ERK) y la quinasa 3 N-terminal c-Jun (JNK3) en endosomas tras la internalización del GPCR ³⁷⁴. Cabe destacar que ciertos estudios han reportado que la internalización no es necesaria para la señalización inducida por β -arrestinas. Se ha descrito que las distintas funciones de las β -arrestina vienen determinadas por una selectividad funcional dependiente del patrón de fosforilación o código de barras (*barcode*) del receptor por el cual está siendo reclutada. Es decir, la actuación de distintos subtipos de GRK, las cuales fosforilan regiones distintas determinaran que acción va a ser mediada tras el reclutamiento de β -arrestina (Figura 18) ³⁷⁵. Por ejemplo, en trabajos realizados con múltiples GPCRs se describe que se requiere la fosforilación por GRK2 y GRK3 para la internalización del receptor, mientras que la fosforilación por GRK5 y GRK6 es necesaria para la señalización vía ERK1/2 dependiente de β -arrestina ^{376,377}. La expresión de cada GRK es dependiente de tejido, así como del tipo celular. Por otra parte, el reclutamiento de una u otra GRK se produce de manera específica en función del ligando que activa al receptor.

Es decir que la señalización de los GPCRs parece ser bimodal. Esta puede ser mediada por las proteínas G y/o por β -arrestinas tras la fosforilación inducida en

regiones específicas por GRK. El reclutamiento de GRKs específicas que determinaran el *barcode* es ligando específico, es decir, se reclutará uno u otra GRK según el ligando unido al receptor. Se ha descrito que los GPCRs pueden ser activados para favorecer una ruta u otra dependiendo del ligando que se encuentre interaccionando con el GPCRs. Este fenómeno se conoce como selectividad funcional (*biased signalling*). En ella distintos ligandos producen diferentes cambios conformacionales en el receptor de modo que pueden favorecer la activación de una u otra vía de señalización ³⁷⁸.

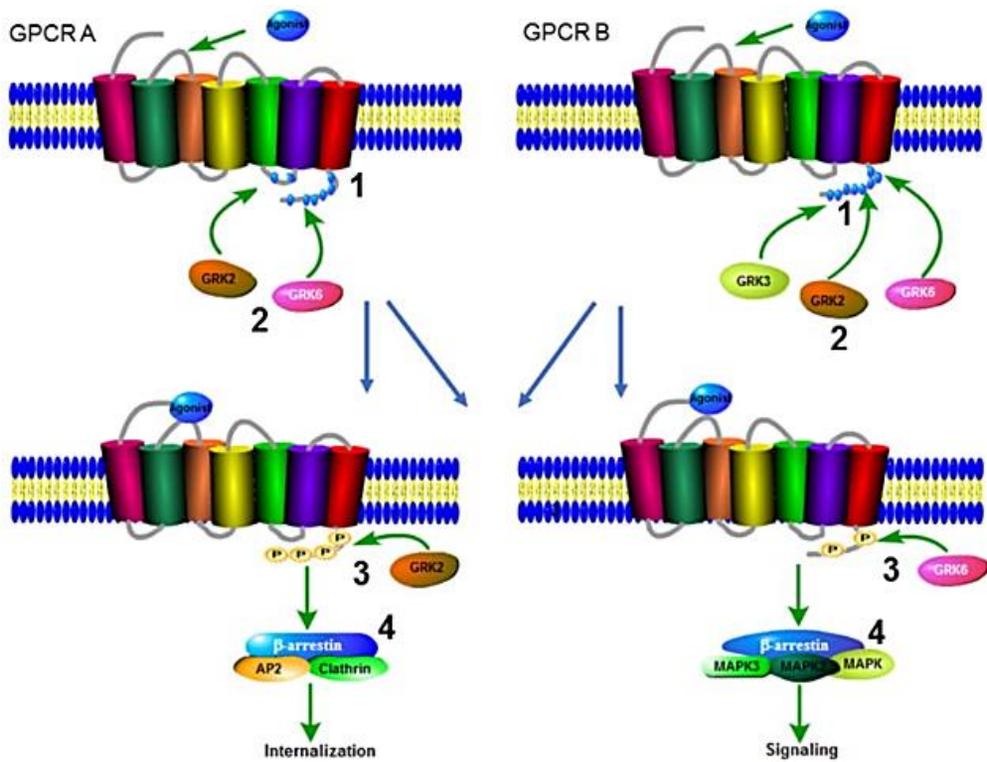


Figura 18. Fosforilación en regiones específicas (*barcode*) mediada por distintas isoformas de GRK inducen distintos efectos tras el reclutamiento de β -arrestinas. Extraído de Jean-Charles et al.,2017³⁶⁸.

5.4 Oligomerización de GPCRs

Durante varios años los GPCRs fueron considerados entidades monoméricas ya que un solo GPCR es capaz de activar vías de señalización intracelulares específicas. A principios del 1980, debido a la existencia de distintas evidencias bioquímicas y biofísicas que no podían explicarse si los GPCRs eran considerados entidades individuales, se planteó la hipótesis de que estos receptores eran capaces de interactuar entre ellos ^{379,380}. Ciertamente, hoy en día una gran cantidad de estudios bioquímicos, estructurales y funcionales han demostrado que los GPCRs son capaces de interactuar con otras proteínas. Así, pueden formar dímeros o complejos oligoméricos de orden superior y está ampliamente aceptado que el proceso de di- y oligomerización es esencial para el correcto funcionamiento de los receptores.

Las primeras evidencias sobre interacciones receptor-receptor surgieron del estudio de la regulación por neuropéptidos de receptores de dopamina y serotonina³⁸¹. Poco después, se demostró la existencia de un proceso de modulación recíproca entre receptores muscarínicos y adrenérgicos en células transfectadas con los receptores M2 y M3 mutados, en los que la porción C-terminal que contiene los segmentos TM6 y TM7 fue intercambiada entre ambos receptores. Tras la transfección individual de los mutantes no se observó ningún tipo de unión de ligandos, pero al transfectar ambos los receptores recuperaron la capacidad de unir ligandos de manera similar a los receptores no mutados (*wild type*; WT) ³⁸². El hecho de que la coexpresión de dos receptores fuese capaz de regular su funcionalidad sugería de manera muy evidente la capacidad de interacción de ambos receptores a nivel molecular.

Los GPCRs puede existir como homodímeros, cuando el complejo está formado por la interacción entre dos receptores idénticos. También pueden asociarse dos

receptores distintos, formando un heterodímero, o bien oligómeros cuando más de dos receptores participan en la formación del complejo. Este fenómeno confiere un nuevo nivel de complejidad a la señalización y regulación de los GPCRs. Se ha sugerido que la formación de estos complejos es un proceso dinámico en el cual se crean y destruyen continuamente y la presencia de los complejos depende de la densidad de receptores en cada caso³⁸³.

Las interacciones entre GPCRs pueden darse mediante enlaces covalentes en forma de puentes disulfuro o no covalentes, en estas uniones participan los dominios extra- e intracelulares, así como los segmentos transmembrana^{384,385}. De hecho, los TM son las regiones que guían y determinan, mediante su interacción, la formación de los complejos³⁸⁶.

Algunos autores defienden el dímero como la unidad mínima de señalización y que esta es la especie más común y estable en los GPCRs, sin embargo, diversos estudios han mostrado que ciertos receptores monoméricos son capaces de ser completamente funcionales en su activación de la proteína G, por ejemplo, es el caso de los receptores β_2 -adrenérgico, rodopsina y μ -opioide³⁸⁷⁻³⁸⁹.

Los oligómeros son definidos como complejos macromoleculares formados por al menos dos unidades funcionales y la formación de dichos complejos tiene consecuencias esenciales en sus características funcionales. La IUPHAR (Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica) definió tres criterios consensuados para clasificar un complejo como un heterómero de GPCRs. El primer criterio indica el requerimiento de pruebas de la interacción física receptor-receptor; el segundo criterio exige que los heterómeros deben exhibir propiedades funcionales distintas de las de los protómeros que lo conforman y, el tercero y último, que la disrupción del heterómero debe generar la pérdida de las propiedades específicas de dicho heterómero. Los tres criterios deben cumplirse bien en cultivos primarios o bien en tejido nativo.

5.4.1 Relevancia funcional de los oligómeros de GPCRs

Los GPCRs exhiben una elevada relevancia terapéutica debido a su participación en un gran número de respuestas fisiológicas, sobre todo en el SNC. Entre los procesos biológicos estudiados capaces de regular la función de los GPCRs surgió su capacidad de formar heterómeros y se mantiene como una importante área de estudio por su contribución a la heterogeneidad farmacológica de estos receptores. La importancia de la formación de complejos de GPCRs no se conoce bien. Aun así, hoy en día se sabe que su relevancia no se limita a las nuevas propiedades bioquímicas y a la modulación funcional a nivel de membrana plasmática, sino que, en ciertos casos, la dimerización juega un papel clave en la ontogenia, en la maduración del receptor y en el reciclaje de este.

Los GPCRs se sintetizan y ensamblan en el retículo endoplasmático (ER), a continuación, son reclutados y almacenados en vesículas para su posterior transporte al aparato de Golgi y, finalmente, los receptores maduros son translocados hacia la membrana plasmática. La salida del ER es un paso crucial que controla la expresión de los GPCRs en la superficie celular y la formación de oligómeros puede ocurrir durante estos primeros pasos de biosíntesis. De hecho, se ha descrito que en ciertos casos la oligomerización es esencial para poder ser liberados desde el ER hacia el aparato Golgi (Figura 19). Se ha reportado que la formación de oligómeros, en muchos casos, permite que se enmascaren señales de retención específicas y ciertos segmentos hidrofóbicos que impiden la liberación del ER³⁹⁰⁻³⁹³. Un claro ejemplo de este fenómeno es el del receptor GABA tipo B (GABAB). Este receptor está compuesto por dos subunidades, la subunidad GABAB1 y la GABAB2. Si la subunidad GABAB1 se expresa sola, ésta queda secuestrada en el ER por una secuencia de retención en el extremo C-terminal. En cambio, la subunidad GABAB2 sí es capaz de llegar a la superficie celular pero una vez allí el receptor no es funcional. La heteromerización de ambas subunidades permite

enmascarar la secuencia de retención de GABAB1 y la movilización de un receptor funcional hacia la membrana ^{394,395}.

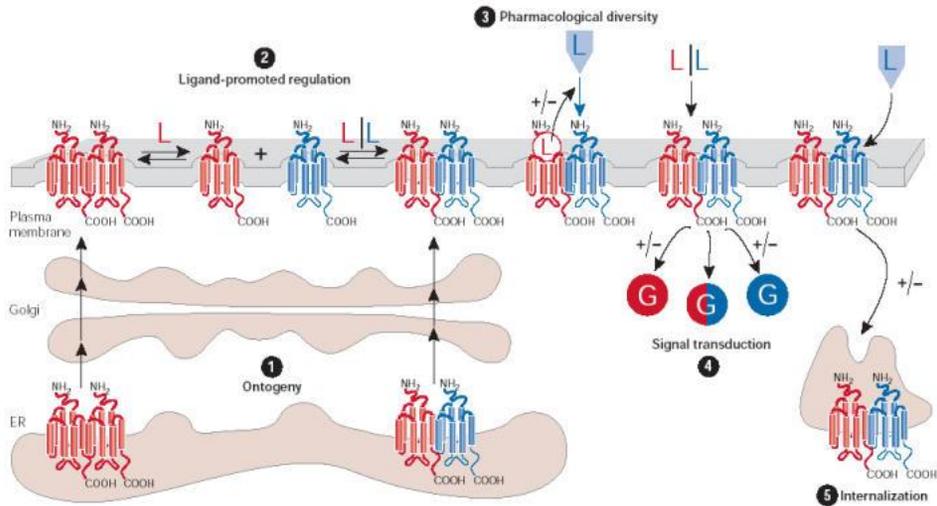


Figura 19. Participación funcional de la oligomerización en el ciclo de vida de los GPCRs. Extraído de Terillon y Bouvier, 2004³⁸⁶.

La formación de oligómeros también puede afectar a la internalización de los receptores que forman el complejo. La estimulación de un solo protómero en el complejo puede inducir su co-internalización, incluso cuando la endocitosis no se produce en los receptores en su forma individual. Por el contrario, también se ha descrito que la presencia en el complejo de un protómero resistente a la internalización en respuesta a la estimulación con un agonista también puede inhibir la internalización del complejo ^{396,397}. Un ejemplo claro de este fenómeno es el caso del receptor de tromboxano A₂, existen dos isoformas de este receptor,

cuando la isoforma TP α se expresa sola no sufre endocitosis constitutiva ni inducida por ligando, pero sí cuando heteromeriza con la isoforma TP β ³⁹⁸.

Asimismo, como se ha comentado anteriormente, la formación de oligómeros de GPCRs implica la formación de una nueva entidad funcional asociada a un perfil farmacológico específico. Este nuevo perfil farmacológico define lo que se conoce como huella bioquímica o *fingerprint* del heterómero, que una vez evaluado *in vitro*, puede ser utilizado para detectar los oligómeros en tejido nativo. Estas nuevas características surgen como consecuencia de las modulaciones alostéricas que ejercen los protómeros entre ellos. El alosterismo en los GPCRs, se puede definir como un proceso donde la interacción de un ligando en un lugar específico de un receptor o complejo modifica la capacidad de unión o la funcionalidad de ese mismo ligando u otro distinto que se va a unir en un lugar distinto. Cuando los GPCRs se encuentran formando dímeros se asume que existe una interacción alostérica entre los protómeros que se traduce en la presencia de una cooperatividad entre ellos a distintos niveles ³⁹⁷.

Así, es posible que la mera interacción entre protómeros genere cambios en la afinidad de un receptor por un ligando determinado. Este hecho se ha observado, por ejemplo, en los receptores δ -opioide y μ -opioide. George y colaboradores observaron que la afinidad detectada para distintos ligandos en los receptores individuales se veía modificada cuando se co-expresaban ³⁹⁹. También se ha descrito que la activación de uno de los protómeros es capaz de modular positiva o negativamente la eficacia de señalización o la afinidad del otro protómero/s. Esta interacción suele producirse de manera bidireccional, aunque en algunos casos puede ser unidireccional. Algunos ejemplos de modulación negativa a nivel funcional es la observada entre los protómeros de los heterómeros α_{1B} R-D₄R y β_1 R-D₄R, donde la activación de D₄R disminuye la activación de la vía de las MAPK inducida por ligandos adrenérgicos ⁴⁰⁰

Otra importante característica es que la formación de complejos oligoméricos también puede dar lugar a un cambio en la selectividad funcional (*biased signaling*) de los protómeros. Es decir, no solo afecta a la afinidad del receptor por su ligando, sino que también puede alterar la capacidad de un ligando de inducir de manera selectiva una vía de señalización específica. Esto puede producirse mediante la alteración del acoplamiento a proteínas efectoras o bien modificando la potencia del receptor para activar ciertas vías. Por ejemplo, se ha descrito que el heterómero D₂R-CB₁R se encuentra acoplado a proteína Gα_s, en cambio los receptores individuales se acoplan a proteína Gα_i ⁴⁰¹. De manera similar, el receptor D₁, el cual señala a través de Gα_s, también es capaz de modificar su selectividad cuando interacciona con otros receptores. Así, cuando interacciona con el receptor de H₃ de histamina su señalización es mediada por Gα_i y por Gα_q cuando forma heterómeros con D₂R ^{402,403}.

Los datos expuestos en este apartado ponen de manifiesto la elevada relevancia funcional de la formación de oligómeros de GPCRs. Este fenómeno eleva en gran medida la complejidad de la señalización mediada por GPCRs y numerosas investigaciones están centradas en definir nuevos complejos y comprender las características funcionales de estos y su posible participación en procesos patológicos. Como se ha explicado anteriormente, una gran cantidad de fármacos comercializados presentan como diana terapéutica un GPCR. Sin embargo, actualmente estos fármacos asumen que los GPCRs actúan como entidades individuales, el estudio de los oligómeros presenta un gran abanico de posibilidades para desarrollar nuevos fármacos más específicos para cada complejo, que disminuyan así los efectos secundarios ⁴⁰⁴.

II. Objetivos

La atención es un proceso cognitivo de orden superior que nos otorga la capacidad de filtrar información irrelevante para dedicar los recursos necesarios al procesamiento y la generación de respuestas de señales relevantes. La corteza prefrontal (PFC) es un punto neurálgico para la modulación de los sistemas atencionales y de las funciones ejecutivas. La funcionalidad de la PFC es finamente regulada por complejos sistemas de neurotransmisores, siendo especialmente relevante el sistema catecolaminérgico. Así, la noradrenalina (NE) y la dopamina (DA) ejercen efectos complementarios en el refuerzo y la regulación de las conexiones de la PFC mediante la activación diferencial de distintos receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Distintos estudios farmacológicos y bioquímicos apoyan la participación del sistema DAérgico y NEérgico y sus receptores en la fisiopatología de diversos trastornos neuropsiquiátricos tales como los trastornos del neurodesarrollo.

Hoy en día, está plenamente aceptado que GPCRs de la misma o diferentes familias pueden interactuar entre sí para generar homo- o heterooligómeros que representan una nueva entidad funcional con características bioquímicas y farmacológicas únicas (*fingerprint* molecular y bioquímico). Por consiguiente, los heterómeros de GPCRs pueden considerarse nuevas dianas farmacológicas. Múltiples estudios han puesto de manifiesto la capacidad de los receptores de DA para formar complejos oligoméricos entre ellos y con otras familias de receptores, lo que sugiere un papel clave del proceso de oligomerización en la regulación de la señalización DAérgica.

En base a esto, la **Hipótesis** planteada en esta Tesis Doctoral es que los efectos complementarios de la DA y la NE son regulados, en cierta medida, por interacciones intramoleculares en complejos formados por sus receptores. Así, el estudio de los efectos coordinados entre estos neurotransmisores y la regulación ejercida por sus receptores puede contribuir a una mayor comprensión de la modulación de los

procesos atencionales a nivel molecular y a elucidar como alteraciones en su señalización participan en la aparición de distintas patologías neuropsiquiátricas.

Teniendo en cuenta esta hipótesis, se planteó como **objetivo general** evaluar la capacidad del receptor adrenérgico α_{1A} para formar heterodímeros con receptores de dopamina, así como caracterizar las consecuencias funcionales que tendría la formación de estos complejos. Para ello, se plantearon dos objetivos específicos:

Objetivo 1: Estudiar las interacciones del receptor de dopamina $D_{4.4}$ así como de la variante vinculada a TDAH, $D_{4.7R}$, con el receptor adrenérgico α_{1A} y establecer si forman complejos heteroméricos.

En el caso de que estos receptores formen heterodímeros se planteó:

- **Objetivo 1.1:** Investigar las consecuencias funcionales de la formación de los complejos evaluando la capacidad de $\alpha_{1A}R$ para modular la señalización de D_4R y viceversa en cultivos celulares y en corteza prefrontal (PFC) y estriado de rata.
- **Objetivo 1.2:** Evaluar si existen diferencias en la interacción funcional entre las variantes de D_4R ($D_{4.4R}$ y $D_{4.7R}$) con $\alpha_{1A}R$ que puedan contribuir a una mayor comprensión de la fisiopatología del TDAH.

Objetivo 2: Estudiar las posibles interacciones entre los receptores de dopamina D_{1-like} con el receptor adrenérgico α_{1A} en cultivos celulares, corteza prefrontal (PFC) y estriado de rata y establecer si forman complejos heteroméricos

En el caso de que estos receptores formen heterodímeros se planteó:

- **Objetivo 2.1:** Definir las nuevas propiedades bioquímicas y funcionales que caracterizan al heterodímero $D_1R-\alpha_{1A}R$.

III. Materiales y métodos

1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho de 2 meses de edad del servicio de animales de la facultad de Biología (Universidad de Barcelona). Se colocaron dos animales por jaula y se mantuvieron con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad con comida y agua disponible *ad libitum*. Los experimentos se realizaron durante el ciclo de luz. Todos los procedimientos han sido aprobados por el Comité Ético Catalán para el Uso de Animales (CEAA / DMAH 4049 y 5664).

2. Vectores de expresión y proteínas de fusión

Se utilizaron cDNAs humanos que codifican para los receptores de estudio clonados en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen™ Life technologies, Waltham, MA, EE. UU). El cDNA fue amplificado por PCR sin el codón de parada utilizando cebadores específicos sentido y antisentido que contienen sitios de restricción únicos para los enzimas *EcoRI* y *BamHI*. A continuación, los fragmentos obtenidos se subclonaron para estar en pauta de lectura con las proteínas *Rluc* o YFP en los lugares de restricción *EcoRI* y *BamHI* en los vectores pRluc-N1 (*Rluc*) y/o pEYFP-N1 (YFP) en el caso de los receptores y *Rluc8* en el caso de la proteína β arrestina-2. Mediante este proceso se obtuvieron los plásmidos que expresan los receptores fusionados por su extremo C-terminal a la proteína fluorescente (YFP) o bioluminiscente (*Rluc*). Por medio del mismo procedimiento también se obtuvieron proteínas de fusión del receptor D_1 , α_{2A} y α_{1A} fusionados a las hemiproteínas C-Venus y N-Venus (correspondientes a las partes C- i N-terminal de la proteína fluorescente Venus). Para los ensayos de activación de proteína G se utilizaron las siguientes construcciones de proteínas G humanas: $G_{\alpha i1}$ -*Rluc8* con la *Rluc8* insertada en la posición 91, $G_{\alpha s}$ -*Rluc8* con la *Rluc8* insertada en la posición 67, $G_{\alpha q}$ -*Rluc8* con la *Rluc8* insertada en la posición 97, $G_{\gamma 2}$ -Venus con la proteína mVenus fusionada en su extremo N terminal y la subunidad $G\beta_1$ nativa. Estas construcciones fueron cedidas por el laboratorio del doctor Sergi Ferré (NIDA, Baltimore, MD, EE. UU.).

3. Cultivos celulares i transfección

Se utilizaron células procedentes de riñón de embrión humano (HEK-293 T) y dos líneas celulares HEK-293 T que expresan de manera inducible las variantes del receptor D₄ (D_{4.4} y D_{4.7}) cedidas por el doctor Sergi Ferré (NIDA, Baltimore, MD, EE. UU.). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco; Paisley, Escocia, Reino Unido) suplementado con L-Glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales (*MEM non essentials amino acids solution 1/100*), 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina 50 (P/S) (Invitrogen; Paisley, Escocia, Reino Unido) y 5% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco; Paisley, Escocia, Reino Unido) inactivado por calor. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmosfera húmeda con un 5% de CO₂. Las líneas celulares inducibles se mantuvieron mediante la adición de 50 µg/ml de higromicina y 15 µg/ml de blasticidina al medio de cultivo. Estas células se obtuvieron mediante el sistema Flp-In T-Rex y expresan las variantes del receptor D₄ después de la inducción con 250 ng/ml de tetraciclina 18-24 horas previas al experimento. Las células se han pasado dos veces por semana cuando se encontraban en una confluencia del 80-90%.

Las células fueron transfectadas transitoriamente con los cDNA correspondientes mediante el método de la polietilenimina (PEI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU). Según el protocolo de transfección, cada cDNA fue diluido en una solución de NaCl 150 mM, mientras que el reactivo de PEI 40 mM fue diluido 1/20 en NaCl 150 mM en un volumen total igual a la solución de cDNA-NaCl. A continuación, se unieron ambas soluciones y una vez transcurridos 10 minutos, la mezcla se añadió a las células plaqueadas en medio DMEM no suplementado. Las células se incubaron durante 4 horas a 37°C, en una atmosfera húmeda con un 5% CO₂, transcurrido este tiempo se reemplazó el medio por DMEM-suplementado. Para la transfección transitoria también se utilizó un segundo método de transfección, el de Lipofectamina 2000 (Invitrogen; Paisley, Escocia, Reino Unido). La Lipofectamina 2000 fue diluida en medio Opti-MEM

de acuerdo con las recomendaciones de la casa comercial, y cada cDNA fue diluido en un volumen total de Opti-MEM igual a la solución de Lipofectamina 2000-Opti-MEM. Seguidamente, se mezclaron las dos soluciones y tras 15 minutos se incorporó la mezcla a las células en medio Opti-MEM no suplementado. Transcurridas 4 horas de incubación se substituyó por medio DMEM suplementado. Los experimentos se realizaron 48 horas después de la transfección.

4. Péptidos transmembrana (péptidos TAT-TM)

Los péptidos transmembrana fueron utilizados como moléculas disruptivas de los oligómeros. Son péptidos derivados del transactivador de la transcripción del VIH (TAT) (aminoácidos 47-57: YGRKKRRQRRR) fusionados a diferentes péptidos con la secuencia aminoacídica correspondiente a los dominios transmembrana (TM) de los receptores (Peptide Synthesis Facility, Universidad Pompeu Fabra, Barcelona). El péptido TAT es capaz de penetrar las células y unirse al fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato presente en la cara interna de la membrana, lo que permite la inserción de los péptidos que lleva fusionados⁴⁰⁵. Para que la inserción de los péptidos en la membrana se produzca en la orientación adecuada, el péptido TAT del VIH se fusionó al extremo N-terminal de las secuencias correspondientes a los dominios TM4 y TM6, en cambio fueron fusionados al extremo C-terminal para los dominios TM5 y TM7. Las secuencias de aminoácidos de cada péptido utilizado fueron:

- **TAT-TM4** de D₄R: **RRRQRRKKRGYGSRRQLLLIGATWLLSAAVAAPVLCGL**
- **TM5-TAT** de D₄R: **YVYSSVCSFFLPCPLMLLLYWATFYGRKKRRQRRR**
- **TAT-TM6** de D₄R: **RRRQRRKKRGYVLPVVVGAFLLCWTPFFVVHI**
- **TM7-TAT** de D₄R: **LVS AVTWLGYVNSALNPVIYTVFNAYGRKKRRQRRR**

- **TAT-TM4** de D_{1-like}R: **RRRQRRKKRGYGSRRQLLLIGATWLLSAAVAAPVLCGL**
- **TM5-TAT** de D_{1-like}R: **YVYSSVCSFFLPCPLMLLLYWATFYGRKKRRQRRR**
- **TAT-TM6** de D_{1-like}R: **YGRKKRRQRRRTLSVIMGVFVCCWLPFFISNCMV PFC**
- **TM7-TAT** de D_{1-like}R: **LVS AVTWLGYVNSALNPVIYTVFNAYGRKKRRQRRR**

- **TAT-TM4** de α₁R: **RRRQRRKKRGYLMALLCVWALSLSVISIGPLFGWRQ**

- **TM5-TAT** de α_1R : PGYVLFSALGSFYLP LAILVMYCYGRKKRRQRRR
- **TAT-TM6** de α_1R : RRRQRRKKRGYLGIVVGC FVLCWLPFFLVMPIGSF
- **TM7-TAT** de α_1R : TVFKIVFWLGYLNSCINPIIYPCS YGRKKRRQRRR

Estos péptidos se utilizaron para demostrar la existencia y la especificidad de los heterómeros tanto en sistemas heterólogos como en tejido. Como se ha explicado, estos péptidos están formados por la secuencia aminoacídica de cada TM, por lo que se van a unir al segmento o segmentos transmembrana del otro protómero que se encuentra implicado en la heteromerización. De este modo, ocupa el lugar donde se uniría y evita la formación del complejo y provoca la pérdida de las características bioquímicas específicas del heterómero o de la señal detectada debida a su heteromerización (BiFC).

5. Ensayos de transferencia de energía bioluminiscente por resonancia (BRET)

Los ensayos de transferencia de energía de resonancia son técnicas biofísicas basadas en la transferencia de energía desde una molécula excitada (donadora) a una molécula próxima que absorbe la energía del donador (aceptor) y emite fluorescencia a una longitud de onda característica⁴⁰⁶. Estas técnicas permiten demostrar la interacción directa entre GPCRs en células vivas. La técnica de BRET utiliza la enzima Rluc (Renilla-type luciferase; EC 1.13.12.5) que

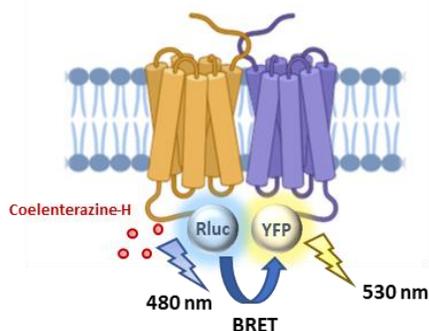


Figura 20. Representación esquemática de la técnica de BRET¹

cataliza la oxidación del sustrato coelenterazina H (PJK GmbH; Kleinblittersdorf, Alemania) y emitir así energía bioluminiscente que excitará a la proteína fluorescente YFP, siempre y cuando se encuentren suficientemente cerca (<10 nm) (Figura 20).

Para los ensayos de BRET, las células han sido cotransfectadas con una cantidad constante del cDNA correspondiente al receptor fusionado a la Rluc y con cantidades crecientes de cDNA que codifica para el receptor fusionado a YFP. Tras 48 horas de la transfección se eliminó el medio y se lavaron las células dos veces con tampón Hank's balanced salt solution (HBSS) (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, 0,4 mM, MgSO₄-7H₂O, 0,5 mM MgCl₂-6H₂O, 0,3 mM Na₂HPO₄, 0,4 mM KH₂PO₄ y 4 mM NaHCO₃, pH 7,4) suplementado con glucosa al 1%. A continuación, fueron desenganchadas de las placas, centrifugadas y resuspendidas en el mismo tampón. La concentración de proteína en cada alícuota se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad; Múnich; Alemania) utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

Para la cuantificación de la fluorescencia se distribuyeron 20 µg de proteína en placas negras de 96 pozos con fondo transparente. La fluorescencia se midió como la emisión a 530 nm tras la excitación a 480 nm en un lector de placas Mithras LB 940 (*Berthold Technologies*; Alemania). La fluorescencia del receptor-YFP se determinó como la fluorescencia de la muestra menos la fluorescencia de las células transfectadas únicamente con el receptor fusionado a Rluc. Por otro lado, para las medidas de BRET las células se distribuyeron (20 µg de proteína/pozo) en placas blancas de 96 pocillos con fondo opaco y se añadieron 5 µM de coelenterazine H (sustrato de la luciferasa, Invitrogen). Un minuto después de la adición de la coelenterazine H se realizaron las lecturas en el Mithras LB 940. La señal de BRET se determinó como la ratio entre la luz emitida por la YFP (530 nm) y la emitida por la coelenterazine H (485 nm). La expresión de Rluc se cuantificó 10 minutos después de la adición de la coelenterazine H. El BRET neto se define como $(\text{Emisión}_{530}/\text{Emisión}_{485}) - \text{Cf}$, Cf representa al valor de $(\text{Emisión}_{530}/\text{Emisión}_{485})$ para las muestras transfectadas únicamente con el receptor fusionado a Rluc. El BRET se expresa como unidades de miliBRET (mBU; BRET neto x 1.000). Los resultados fueron ajustados por regresión no lineal a la ecuación de

Langmuir mediante el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

5.1 Ensayos de BRET de activación de proteína G y reclutamiento de β arrestinas

Con el objetivo de estudiar el efecto del tratamiento con ligandos sobre la activación de distintos subtipos de proteína G α y sobre el reclutamiento de β arrestinas se realizaron variaciones de los ensayos de BRET.

Para los ensayos de activación de proteína G se transfectó el vector de expresión que codifica para la subunidad G α -Rluc8 (molécula donadora de BRET y la subunidad G γ 2-mVenus (molécula aceptora), juntamente con la subunidad G β 1 las construcciones del receptor/es de interés (Figura 21). Para el estudio del reclutamiento de β arrestinas la pareja de BRET se conforma por la proteína β arrestina-2 fusionada a Rluc8 y el receptor α 1A fusionado a YFP, y estas construcciones se cotransfectaron con el cDNA de la variante D4R de interés en cada caso.

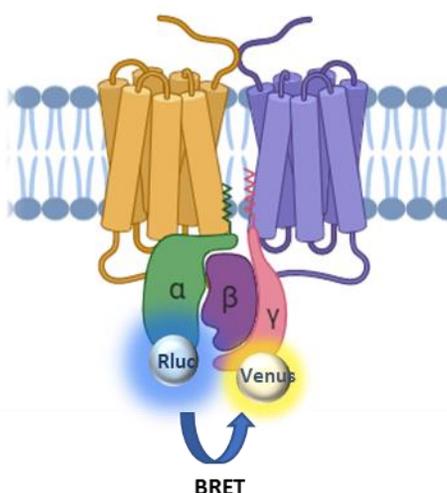


Figura 21. Representación esquemática del ensayo de BRET de activación de proteína G.

La activación de la proteína G y el reclutamiento de β arrestina-2 se cuantifican como los cambios producidos en la señal de BRET tras el tratamiento dosis-respuesta con múltiples ligandos. El reclutamiento de β arrestina-2 produce un acercamiento entre el receptor, fusionado a YFP, y la β arrestina-2, fusionada a Rluc, de modo que, tras la activación con los ligandos, debido a dicho acercamiento, se produce un incremento

cuantificable de la señal de BRET. En el caso de los ensayos de activación de proteína G, la transferencia de energía se produce entre las subunidades G_{α} -Rluc8 y $G_{\gamma 2}$ -Venus (Figura 21). Se ha descrito que la activación de la proteína G heterotrimérica produce un reordenamiento entre sus subunidades ^{349,362}, este reordenamiento da lugar a cambios cuantificables en la señal de BRET. En este caso, los cambios en la señal de BRET inducidos por ligandos pueden ser tanto positivos como negativos dependiendo de la posición en la que Rluc8 se encuentra insertada. El reordenamiento inducido por la unión del ligando puede producir que la región donde se encuentra insertada la Rluc8 en cada caso se acerque o se aleje de la subunidad $G_{\gamma 2}$ Venus (Figura 22). En el caso de las construcciones utilizadas en esta tesis, la activación de las subunidades $G_{\alpha 11}$ y $G_{\alpha 97}$ (con la Rluc8 insertada en la posición 91 y 97, respectivamente) producen una disminución en los valores de BRET y generan curvas sigmoidales de dosis-respuesta negativas. En cambio, la activación de la subunidad $G_{\alpha 67}$ (Rluc8 insertada en la posición 67) induce un incremento en dichos valores ^{362,407}.

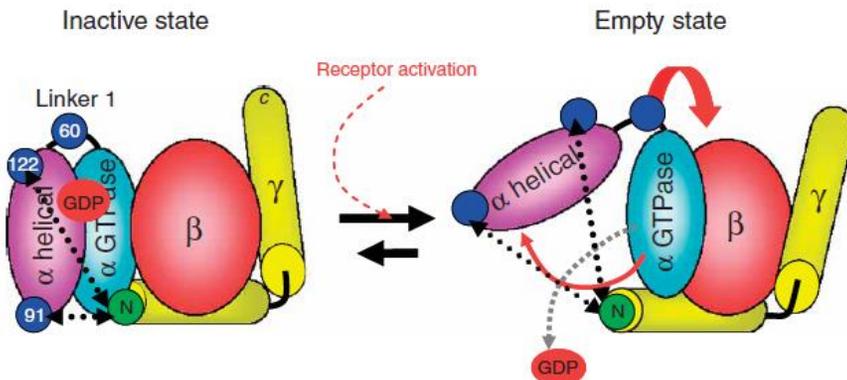


Figura 22. Representación esquemática del reordenamiento de las distintas subunidades de la proteína G heterotrimérica inducida por la activación del receptor. Extraído de Galés et al. 2006.

Para la realización de estos ensayos se siguió un protocolo similar al descrito por Sánchez-Soto¹⁰⁷. Las células fueron lavadas con HBSS 0,1% glucosa, centrifugadas para eliminar el medio de cultivo y resuspendidas en el mismo tampón. Se distribuyeron aproximadamente 200.000 células/pozo en placas de 96 pozo (blancas con fondo opaco) y se añadieron 5 μ M coelenterazine H a cada pozo. Dos minutos después de la adición de la coelenterazine H se agregaron distintas concentraciones de los agonistas con el objetivo de obtener curvas de dosis-respuesta, los antagonistas fueron agregados 10 minutos antes del tratamiento con agonistas. La fluorescencia del aceptor fue cuantificada en el lector Mithras LB 940, de igual modo que en el ensayo de BRET, para comprobar que el nivel de expresión entre experimentos se mantenía constante. Paralelamente, la señal de BRET del mismo grupo de células se determinó en un lector de placas PHERAstar Flagship (BMG Lab technologies, Offenburg, Alemania). La señal fue cuantificada como la ratio entre la luz emitida por mVenus (ensayos de activación de proteína G) o la YFP (ensayo de reclutamiento de β arrestina) (530 nm) y la señal emitida por la Rluc (485 nm). El efecto inducido por el ligando se calculó como el cambio en la señal de BRET observado tras la adición de los ligandos (ratio de BRET obtenido tras el tratamiento – ratio de BRET en ausencia de tratamiento). Las curvas de BRET fueron ajustadas a la ecuación de Lanmuir por regresión no lineal, mediante el software GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.).

6. Ensayos de complementación bimolecular fluorescente

Para la realización de los ensayos de complementación bimolecular fluorescente (BiFC) las células se cotransfectaron con los cDNA de los receptores correspondientes fusionados a las hemiproteínas C- y N-terminal de la proteína fluorescente Venus. Si los dos receptores están interaccionando, las hemiproteínas se encontrarán suficientemente cerca para que la proteína Venus sea reconstituida de manera que se podrá detectar una señal de fluorescencia

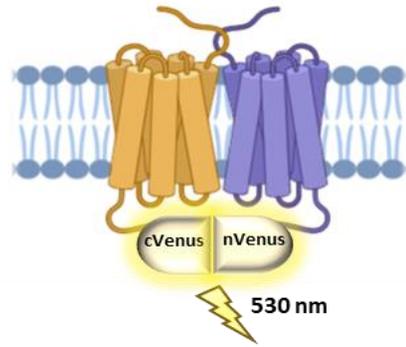


Figura 23. Representación esquemática de la técnica de BiFC.

(Figura 23). Transcurridas 48 horas de la transfección, las células fueron lavadas dos veces con tampón HBSS suplementado con glucosa al 1%. A continuación, fueron desenganchadas de la placa, centrifugadas y resuspendidas en el mismo tampón. La concentración de proteína en cada alícuota se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, EE. UU.). Para la cuantificación de la fluorescencia 20 μ g de proteína fueron distribuidos en placas negras de 96 pozos con fondo transparente. Las lecturas de fluorescencia se realizaron en un lector de placas Mithras LB 940 (Berthold Technologies; Alemania). Para el estudio del efecto de péptidos transmembrana sobre la BiFC, las células fueron tratadas con los péptidos (4 μ M) disueltos en medio DMEM sin suplementar durante 4 horas antes de iniciar el experimento.

7. Ensayos de ligación *in situ* por proximidad (PLA)

Los cerebros de rata fueron fijados mediante inmersión en una disolución de paraformaldehído (PFA; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU.) al 4% durante una hora a 4°C. A continuación, se lavaron las muestras con tampón TBS (50 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl, pH 7,8) y se criopreservaron en una disolución de sacarosa al 30% durante 48 horas a 4°C y almacenadas a -20°C. Utilizando un criostato de congelación (Leica Jung CM-3000), se seccionaron los cerebros coronalmente en cortes de 20 µm de grosor. Los cortes se montaron en portaobjetos de vidrio y fueron congelados hasta su utilización.

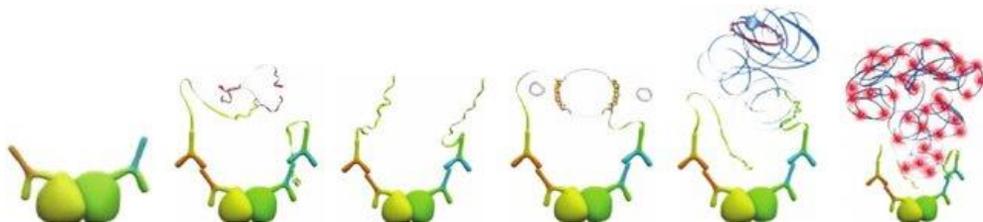


Figura 24. Esquema del funcionamiento de la técnica de PLA. Kit Duolink II (OLink; Bioscience, Uppsala, Sweden)

El ensayo de PLA nos permite detectar heterómeros en muestras de tejido nativo. Para la realización de estos ensayos, los cortes fueron descongelados a 4°C, se lavaron en PBS y permeabilizados durante 10 minutos con PBS que contenía 0,01% de Triton X-100 y fueron lavados de nuevo con PBS. Los heterómeros fueron detectados mediante la utilización del kit de detección de PLA *in situ* Duolink II (OLink; Bioscience, Uppsala, Suecia) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron anticuerpos primarios específicos para los receptores α_{1A} y D_4R [(anti- $\alpha_{1A}R$ de ratón (Thermo Scientific, Fremont, California) y anti- D_4R de cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California)], ambos a una concentración 1/100. A continuación, los cortes fueron incubados con sondas de PLA capaces detectar los anticuerpos primarios. Estas sondas están formadas por anticuerpos secundarios unidos a un oligonucleótido, uno de ellos

contiene el oligonucleótido de la secuencia PLUS y el otro MINUS que son complementarios entre sí. Las sondas utilizadas en nuestros ensayos fueron una sonda Duolink II anti-raton PLUS y una sonda Duolink II anti-cabra MINUS. Mediante la adición de una ligasa los oligonucleótidos forman una cadena DNA que, tras la acción de una polimerasa y nucleótidos marcados, se amplificará generando un producto detectable (puntos rojos de PLA; Figura 24). Las muestras se montaron utilizando un medio de montaje que contenía el marcador de núcleos DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato), un colorante fluorescente capaz de teñir el ADN (Thermo Fisher).

Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63X (N.A. 1.4) y líneas láser de 405 nm y 561 nm. Para cada campo de visión se adquirieron imágenes en dos canales distintos (uno para cada marcaje, azul para los núcleos y rojo para la señal de PLA) y siguiendo el eje Z con una distancia entre imágenes de 1 μm . Las imágenes fueron procesadas mediante el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). La cuantificación de las células que contenían uno o más puntos rojos frente al número total de células (total de núcleos azules) se determinó utilizando el programa Fiji (<https://fiji.sc/>). Se contaron el número de células que contienen uno o más puntos rojos frente al total de células (número de núcleos en azul) y la ratio (r , número de puntos rojos/célula) en las células que contienen puntos.

8. Determinación de AMPc intracelular

El ensayo de determinación de AMPc intracelular se llevó a cabo utilizando un kit LANCE® Ultra cAMP (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.) técnica se basa en la transferencia homogénea de energía de fluorescencia resuelta en el tiempo (HTRF). El principio de este ensayo es la detección de una señal TR-FRET (transferencia de energía de fluorescencia resuelta en el tiempo) entre el AMPc marcado con europio (Eu), que excitado a una longitud de onda entre 320-340 nm es capaz de emitir a radiación de 615 nm, y un fluoróforo unido a los anticuerpos contra AMPc que absorbe la energía de emisión del Eu y emite a una longitud de onda de 665 nm. Durante el experimento se produce una competición entre el AMPc-Eu y el AMPc intracelular por la unión a los anticuerpos marcados con el fluoróforo, lo que induce cambios detectables en la señal de TR-FRET (Figura 25). Se determinó la fluorescencia a 665 nm mediante un lector de microplacas PHERAstar Flagship equipado con un módulo óptico para HTRF (BMG Lab Technologies, Offenburg, Alemania).

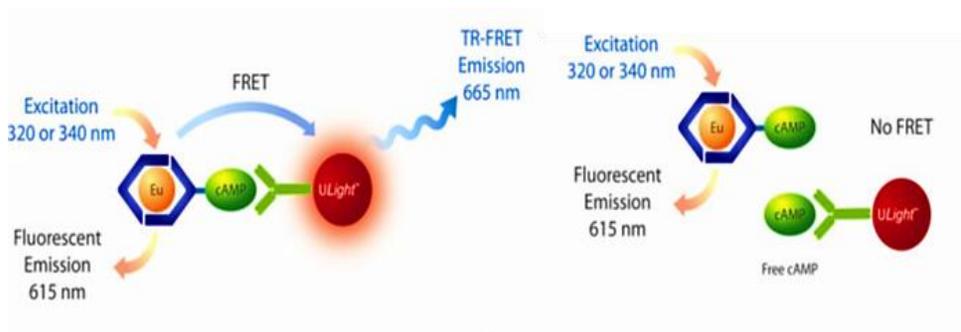


Figura 25. Fundamento del ensayo de determinación de AMPc intracelular. Extraído de Perkinelmer.com).

El experimento se realizó con células HEK-293 T transfectadas con los cDNA para los receptores de interés. El medio de cultivo de las células se cambió por medio sin suplementar 4 horas antes del inicio del ensayo. Pasado este tiempo, se disgregaron y recogieron las células y, tras su centrifugación, se resuspendieron en medio en medio

de cultivo que contenía una disolución de HEPES 5 mM, zardaverina (inhibidor selectivo de las fosfodiesterasas 3 y 4) 32 μ M y BSA 0,1%, pH 7,4. A continuación, se sembraron 1.500 células/pozo en microplacas de 384 pozos y se trataron con los ligandos correspondientes. Las células fueron pretratadas con los antagonistas/vehículo durante 15 minutos y seguidamente estimuladas con los agonistas, también durante 15 minutos. En el caso del estudio de la señalización mediada por proteína G_i las células se trataron durante 15 minutos con forskolina (activador de la adenilato ciclasa) tras el tratamiento con los agonistas. La placa se leyó en el lector PHERAstar Flagship equipado con un módulo óptico para HTRF (BMG Lab Technologies, Offenburg, Alemania) tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente con los anticuerpos específicos para AMPc.

9. Determinación de liberación de calcio intracelular

Para determinar la concentración de calcio intracelular las células HEK-293 T fueron cotransfectadas además de con el cDNA codificante para los receptores con el sensor de calcio GCaMP6 (Addgene, Cambridge, MA, EE. UU.), el cual es capaz de emitir fluorescencia tras su unión con Ca^{2+} ⁴⁰⁸. Las células se lavaron con tampón Locke's sin Mg^{2+} (NaCl 154 mM, KCl 5,6 mM, $NaHCO_3$ 3.6 mM, $CaCl_2$ 2,3 nM, glucosa 5,6 mM, HEPES 5 mM, pH 7,4) suplementado con glicina 10 μ M, se centrifugaron y resuspendieron en el mismo tampón. Se determinó la cantidad de proteína presente en las muestras mediante el método de Bradford (Bio-rad; Múnich, Alemania) utilizando diluciones de seroalbúmina bovina como patrón. Se colocaron 40 μ g de proteína/pozo en placas negras de 96 pozos con el fondo transparente y se trataron con 2 μ l de los ligandos de interés. La intensidad de emisión de fluorescencia del sensor de calcio GCaMP6 fue registrada durante 150 segundos (30 flashes/pozo) a 515 nm tras la excitación a 488 nm en un EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU). Los datos se expresan como la señal fluorescente emitida por el sensor de calcio GCaMP6 tras la activación con ligandos menos la fluorescencia basal de las células en reposo.

10. Ensayo de redistribución dinámica de masas (DMR)

La redistribución dinámica celular inducida por la activación de un receptor se determinó mediante un EnSpire® Multimode Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.) mediante una tecnología libre de marcaje. Esta tecnología utiliza biosensores ópticos integrados en el fondo de microplacas de 384 pocillos, estos biosensores son extremadamente sensibles a los cambios de densidad óptica. Los movimientos de la masa celular inducidos por la activación del receptor se detectaron mediante la iluminación de la parte inferior de biosensor con luz policromática y midiendo los cambios en la longitud de onda de la luz monocromática reflejada, que es una función del índice de refracción (Figura 26). La magnitud del cambio de longitud de onda, expresado en picómetros, es directamente proporcional a la cantidad de DMR.

El ensayo se realizó en células HEK-293 T cotransfectadas con los receptores de interés en cada caso. Las células se sembraron 24 horas después de la transfección (12.000 células/pozo) en las microplacas de 384 pozos. Con ello se generó una monocapa celular con un 70-80% de confluencia. Antes de iniciar el experimento, se lavaron las células dos veces con tampón HBSS (que contenía HEPES 20 mM, DMSO al 0,1% y BSA al 0,1%; pH 7,15) y se incubaron durante 2 horas en el lector de placas con el mismo tampón (40 µl/pozo). A continuación, se escaneó la placa y se registró la señal basal durante 10 minutos antes de la adición de 10 µl de antagonista/vehículo, entonces la señal fue registrada durante 30 minutos. Una vez superados los 30 minutos se procedió a la adición de 10 µl de agonista y a la lectura de DMR durante 60 minutos. Los resultados se analizaron mediante el software Enspire Workstation v 4.10 (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.).

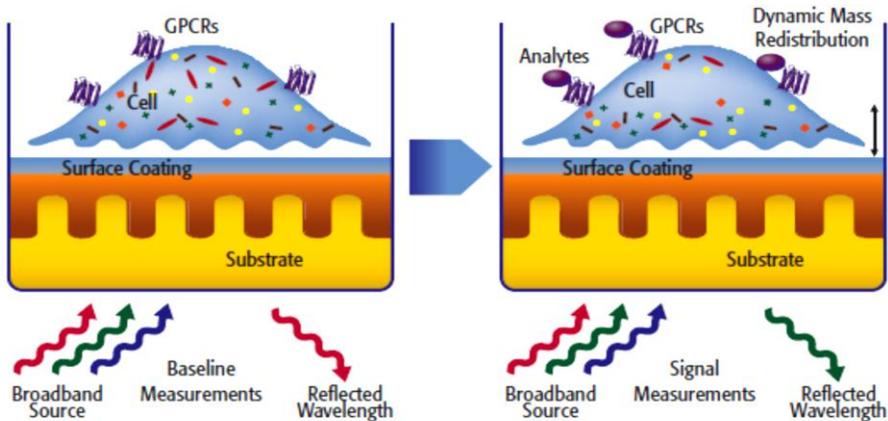


Figura 26. Fundamento de la técnica de DMR. Extraído de Perkinelmer. com

11. Western-Blot

La determinación de la fosforilación de ERK 1/2 mediante *Western-Blot* se realizó tanto en células transfectadas como en cortes cerebrales de rata. Para ello, se separaron cantidades equivalentes de proteína celular en cada muestra mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS 10%). A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno. Una vez transferidas, las membranas fueron tratadas durante una hora con la solución de bloqueo comercial Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EE.UU.). Tras una hora de incubación se añadieron los anticuerpos primarios, anti-fosfo-ERK1/2 de ratón (1:2500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y anti-ERK1/2 de conejo (1:40.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y se mantuvieron a 4°C toda la noche. Tras la eliminación del anticuerpo primario se lavaron las membranas para a continuación incubarlas dos horas con los anticuerpos secundarios IRDye800 contra ratón (1:10.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y IRDye 680 contra conejo (1:10.000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). A continuación, las bandas correspondientes a ERK1 y ERK2 (42- y 44-kDa) fueron observadas mediante el escáner infrarrojo Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln,

NE, EE.UU.). La densidad de las bandas se cuantificó con el software del escáner y los datos fueron exportados al programa Excel (Microsoft, Redmond, WA, EE.UU.). El nivel de ERK1/2 fosforiladas se normalizó a partir de la intensidad de la banda de proteínas ERK1/2 totales en cada muestra.

12. Ensayo de detección de fosforilación de ERK1/2

Durante esta tesis se realizaron determinaciones de la fosforilación de ERK 1/2 tanto en células como en tejido cerebral, la metodología para cada caso se describe a continuación.

12.1 Determinación de la fosforilación de ERK 1/2 en células HEK293-T.

Las células fueron cotransfectadas con los receptores de interés 48 horas antes de la realización del experimento. Cuatro horas antes del inicio del ensayo se substituyó el medio de cultivo por medio sin suplementar. Las células fueron tratadas con los agonistas y antagonistas correspondientes según el tiempo indicado en cada caso a 37°C en una atmósfera húmeda. Una vez transcurrido el tiempo de activación de cada ligando las células fueron colocadas rápidamente en hielo para detener el metabolismo celular y se realizaron dos lavados con PBS frío. A continuación, las células fueron lisadas mediante la adición de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, β -glicerofosfato 45 mM, Triton X-100 1%, óxido de fenilarsina 20 μ M NaVO₄ 0.4 mM y un cóctel de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich), seguidamente las células fueron recogidas. Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 4°C durante 10 minutos a 13.000 rpm. Los niveles de proteína en cada muestra fueron cuantificados mediante el método de BCA utilizando diluciones de seroalbúmina bovina como patrón. Las muestras fueron congeladas hasta su procesamiento mediante *Western Blot* como se ha explicado anteriormente.

12.2 Determinación de la fosforilación de ERK 1/2 en estriado y PFC de rata

Los animales fueron anestesiados con isoflurano (4%) y sacrificados mediante decapitación. Los cerebros fueron extraídos rápidamente y sumergidos en tampón frío de Krebs-bicarbonato que se encontraba oxigenado (O_2/CO_2 , 95%/5%) ([en mM]: NaCl 124, KCl 4, KH_2PO_4 1,25, $MgCl_2$ 1,5, $CaCl_2$ 1,5, glucosa 10 y $NaHCO_3$, pH 7,4) y a continuación fueron seccionados coronalmente (500 μm de grosor) a 4°C utilizando una matriz cerebral (Zivic Instruments, Pittsburgh, PA, EE.UU.). De cada corte, se diseccionaron las regiones que contenían la PFC o el estriado. Las regiones de interés se transfirieron a un tubo de incubación que contenía 1 ml de tampón de Krebs-bicarbonato frío. A continuación, los tubos de incubación que contenían el tejido se colocaron en un Eppendorf Thermomixer (5 Prime, Boulder, Colorado, EE.UU.) y se mantuvieron a 23°C durante 30 minutos. Tras media hora, se cambió el medio por 2 ml de tampón de Krebs-bicarbonato o bien por una disolución 4 μM de los péptidos TM en el mismo tampón. Seguidamente, se incrementó la temperatura a 30°C y las muestras fueron incubadas durante 4 horas en constante oxigenación (O_2/CO_2 , 95%/5%). Una vez finalizada la incubación, se eliminó el tampón una vez más y se substituyó por 200 μl de tampón Krebs-bicarbonato. Pasados 30 minutos tras el cambio del tampón se trataron las muestras con los ligandos apropiados durante los tiempos correspondientes en cada caso. Finalmente, tras el tratamiento con los distintos ligandos, la solución fue eliminada y los cortes de tejido fueron congelados en hielo seco y almacenados a -80°C.

El tejido fue posteriormente lisado mediante la adición de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, β -glicerofosfato 45 mM, Triton X-100 1%, óxido de fenilarsina 20 μM $NaVO_4$ 0.4 mM y un cóctel de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich), y la sonicación de las muestras. Tras este proceso, las muestras fueron tratadas de igual manera que la descrita en células hasta su procesamiento mediante Western Blot.

13. Ligandos y reactivos

A61603 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido)

A41-2997 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido)

SKF81297 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido)

SCH23390 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido)

Prazosín (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido)

L-745.297 (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido)

4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (Thermo Fisher)

Zardaverina (Tocris Bioscience; Bristol, Reino Unido)

Coelenterazine H (PJK GmbH; Kleinblittersdorf, Alemania)

Paraformaldehyde 10% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE.UU)

Cóctel de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich)

DMSO (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU)

14. Análisis estadístico

Para determinar las diferencias estadísticas se utilizó en todos los casos el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.) y se consideraron significativas cuando el P-valor < 0,05. El número de muestras (n) en cada ensayo se indica en la leyenda de las figuras, los resultados se expresan como las medias \pm SEM. Para la comparación entre dos grupos se utilizó un test de t-student, para comparaciones múltiples se utilizó un análisis *one-way ANOVA* seguido de un análisis de comparación múltiple de Dunnet o bien un análisis *two-way ANOVA* seguido de un análisis de comparación múltiple de Bonferroni cuando se desean relacionar más de dos variables.

IV. Resultados

1. Capítulo 1: Diferencias funcionales entre el receptor de dopamina D_{4.4}R y la variante asociada a TDAH- D_{4.7}R dependientes de su heteromerización con el adrenoceptor α_{1A} .

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es un trastorno del neurodesarrollo caracterizado por presentar síntomas de inatención, hiperactividad e impulsividad ⁴⁰⁹. Presenta un elevado porcentaje de comorbilidad con otros trastornos como el síndrome de Gilles de la Tourette (ST), los trastornos del espectro autista (TEA) y el trastorno obsesivo compulsivo (TOC) ^{193,194}. La etiología del TDAH y sus patologías comórbidas es multifactorial y presenta una elevada complejidad, asimismo, ha sido ampliamente relacionada con alteraciones de señalización catecolaminérgica (DA y NE) en la PFC y con la afectación de los circuitos corticoestriatales ^{195,220}. Además, se han descrito distintos factores ambientales y genéticos asociados a una mayor susceptibilidad para padecer el trastorno.

Uno de los genes más estudiados es el gen DRD4 que codifica para el receptor acoplado a proteína G (GPCR) D₄ de dopamina, concretamente la variante polimórfica D_{4.7}R ¹⁰⁵. Las diferencias funcionales entre las variantes de este receptor no están claras, algunos autores han descrito una ganancia de función en la variante D_{4.7}R en comparación con la variante más común D_{4.4}R, mientras otros reportan lo contrario ^{106,108-110}. Los GPCRs tienen la capacidad de interactuar entre sí formando complejos que adquieren nuevas propiedades farmacológicas y/o funcionales ^{397,410} y se ha propuesto que las diferencias funcionales entre las variantes de D₄R podrían estar determinadas por su interacción con otros GPCR ¹⁰⁶.

Por su parte, los receptores adrenérgicos α_1 R se relacionan generalmente con respuestas a estrés y con los déficits cognitivos asociados a este ^{153,155}. Sin embargo, se

ha descrito que también participan en la regulación de la atención sostenida, la alerta y la flexibilidad atencional, procesos que se encuentran alterados en pacientes con TDAH^{139,156,157}. Teniendo en cuenta que el α_1R participa en la regulación de procesos atencionales que se encuentran afectados en distintos trastornos y que se ha descrito la capacidad de heteromerización de D_4R con distintos adrenoceptores como α_{1B} , β_1 y α_{2A} ^{400,411}, en esta Tesis Doctoral se estudia la posibilidad de que $\alpha_{1A}R$ y D_4R formen heterómeros y que estos heterómeros modulen la señalización DAérgica y NEérgica en los circuitos corticoestriatales de la atención y que dicha modulación pueda verse afectada en presencia de la variante $D_{4.7}$.

1.1 Los receptores de dopamina, $D_{4.4}R$ y $D_{4.7}R$, forman heterómeros con los receptores adrenérgicos α_{1A} .

En primer lugar, se analizó si las distintas variantes del receptor D_4 son capaces de interactuar con los receptores α_{1A} . Para ello, se utilizaron técnicas biofísicas de BRET. Esta técnica se basa en la utilización de dos biosensores, los cuales solo pueden interactuar si se encuentran muy próximos entre ellos, cada uno de los biosensores se encuentra fusionado a uno de los posibles receptores del heterómero (véase apartado 5 de Materiales y Métodos). Estos ensayos se realizaron en células HEK293-T cotransfectadas transitoriamente con cantidades constantes del cDNA correspondiente al receptor fusionado al donador bioluminiscente (Rluc) y cantidades crecientes del cDNA que codifica para el receptor fusionado a la molécula fluorescente aceptora (YFP).

En los ensayos de BRET realizados para demostrar la heteromerización de $D_{4.4}R$ y $\alpha_{1A}R$ se utilizó $D_{4.4}R$ fusionado a Rluc ($D_{4.4}R$ -Rluc) como donador y $\alpha_{1A}R$ fusionado a YFP como molécula aceptora ($\alpha_{1A}R$ -YFP). Para el estudio de la heteromerización de la pareja $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$ se cotransfectaron los cDNA correspondientes a $\alpha_{1A}R$ -Rluc y a $D_{4.7}R$ -YFP.

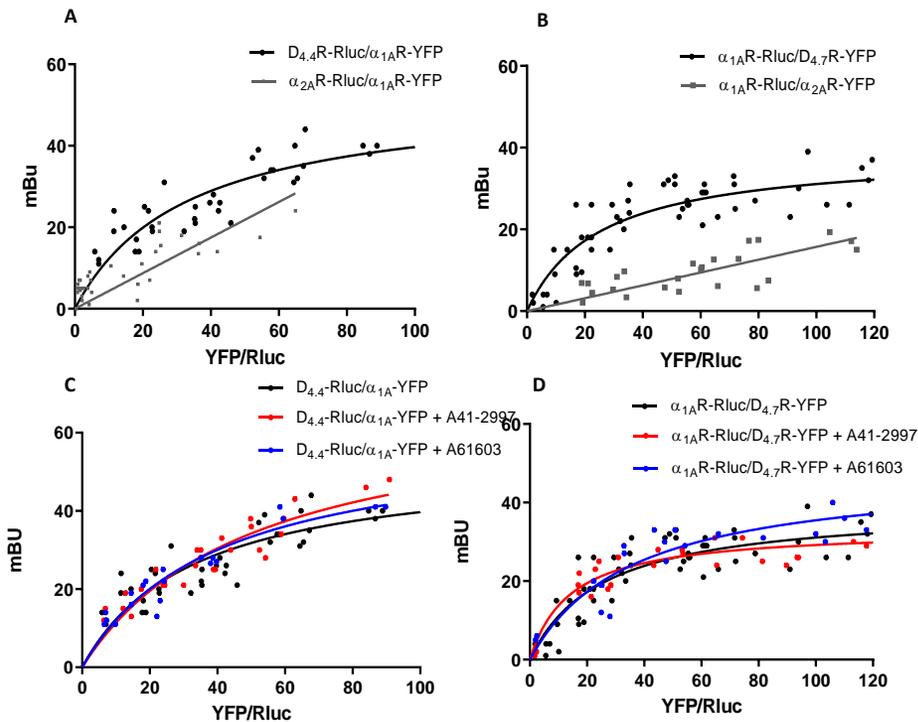


Figura 27. Identificación mediante ensayos de BRET de los heterómeros $\alpha_{1A}R$ - $D_{4.4}R$ y $\alpha_{1A}R$ - $D_{4.7}R$ en células HEK-293T. A: Se transfectoron las células con una cantidad constante del cDNA para $D_{4.4}R$ -Rluc (0,11 μ g) o para $\alpha_{2A}R$ -Rluc (0,008 μ g) como control negativo, y cantidades crecientes del cDNA para $\alpha_{1A}R$ -YFP (0,01 - 1,8 μ g). B: Las células se transfectoron con una cantidad constante del cDNA para $\alpha_{1A}R$ -Rluc (0,25 μ g) y con cantidades crecientes del cDNA para $D_{4.7}R$ -YFP (0,15-2,5 μ g) o para $\alpha_{2A}R$ -YFP (0,2-2,0 μ g) como control negativo. C-D: Se transfectoron las células con una cantidad constante del cDNA para $D_{4.4}R$ -Rluc (0,11 μ g) y cantidades crecientes del cDNA para $\alpha_{1A}R$ -YFP (0,01 -1,8 μ g) (C) o con una cantidad constante del cDNA para $\alpha_{1A}R$ -Rluc (0,25 μ g) y con cantidades crecientes del cDNA para $D_{4.7}R$ -YFP (0,15-2,5 μ g) (D) y se trataron o no (línea negra) durante 7 minutos con A61603 1 μ M (agonista $\alpha_{1A}R$; línea azul) o A41-2997 1 μ M (agonista D_4 ; línea roja). La señal de BRET se expresa en mili unidades de BRET (mBU) de un total de tres a seis experimentos independientes.

Se obtuvieron curvas de saturación de BRET en ambas parejas (Figura 27A-B) lo que indica la interacción específica entre las proteínas de fusión, y por tanto la existencia de complejos heteroméricos.

El valor estimado de $BRET_{max}$ obtenido para la pareja $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$ fue 53 ± 5 mBU, en el caso del heterómero $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$ se obtuvieron valores significativamente menores (39 ± 3 mBU) (Tabla 6). El hecho de que el heterómero $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$ presente un valor menor de $BRET_{max}$ se interpreta como una menor transferencia de energía, sin embargo, no

implica necesariamente la existencia de menos complejos ya que el estimado de $BRET_{max}$ no representa valor cuantitativo del número de heterómeros. Este valor se puede ver afectado tanto por el número de complejos, como por la distancia entre las proteínas de fusión o la orientación que adoptan éstas en el heterómero⁴¹². De acuerdo con nuestros resultados, estudios de heteromerización de las variantes de D_4R con el receptor adrenérgico α_{2A} también han mostrado valores menores de $BRET_{max}$ en presencia del polimorfismo $D_{4,7}R$ ⁴¹¹, lo que podría sugerir que $D_{4,7}R$ presenta mayor dificultad para formar heterómeros. El valor estimado de $BRET_{50}$ representa la afinidad relativa que presentan los receptores entre sí para formar el heterómero⁴¹³, este valor fue similar en ambos casos (Tabla 6) lo que sugiere que las variantes del receptor D_4 tienen la misma probabilidad de formar heterómeros con $\alpha_{1A}R$. Como control negativo se utilizaron ambas combinaciones de la pareja $\alpha_{2A}R$ - $\alpha_{1A}R$ (Figura 27), se obtuvieron gráficos lineales lo que indica colisiones aleatorias típicas de interacciones no específicas⁴¹².

Tabla 6. Parámetros de BRET estimados de las curvas de saturación de BRET de los $D_{4,4}R$ - $\alpha_{1A}R$ y $D_{4,7}R$ - $\alpha_{1A}R$

| Heterómero | mBU | Vehículo | A41-29977 | A61603 |
|---------------------------|--------------|-------------------------------|---|--|
| $D_{4,4}$ - α_{1A} | $BRET_{max}$ | 53*** ± 5 (38 pts, 4 exp.) | 69 [#] ± 8 (27 pts, 3 exp.) | 60 ± 6 (21 pts, 3 exp.) |
| | $BRET_{50}$ | 33 ± 7 | 50 ± 17 | 39 ± 8 |
| $D_{4,7}$ - α_{1A} | $BRET_{max}$ | 39 ± 3 (59 pts, 6 exp.) | 33 ± 2 (25 pts, 3 exp.) | 48 ^{##} ± 5 (25 pts, 3 exp.) |
| | $BRET_{50}$ | 25 ± 5 | 13 [#] ± 4 | 36 ± 10 |

Los resultados se expresan como la media ± SD. Para determinar las diferencias estadísticas entre los dos complejos se realizó un análisis de t-Student's de dos colas; *** $P < 0,001$ vs el complejo $D_{4,7}R$ - $\alpha_{1A}R$. La significación estadística entre los tratamientos de cada heterómero se determinó mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett contra los parámetros estimados en las células no tratadas (vehículo) [#] $P < 0.05$; ^{##} $P < 0.01$

A continuación, se analizó si la activación de los receptores mediante el tratamiento con agonistas específicos modificaba los parámetros de BRET. Para ello se utilizó el agonista D_4R , A41-29977 y el agonista $\alpha_{1A}R$, A61603 (Figura 27C-D, Tabla 6). En el caso de $D_{4,4}R$ -

$\alpha_{1A}R$ el tratamiento con A41-29977 produjo un incremento significativo en el valor de $BRET_{max}$ (69 ± 8 mBU), lo que sugiere una facilitación en la transferencia de energía debido a un cambio estructural en el receptor o bien a un incremento en la formación de heterómeros inducida por la activación del receptor $D_{4.4}$. No se observaron diferencias significativas tras el tratamiento con A61603, sin embargo, si se detectó un leve aumento en la señal de $BRET_{max}$ ($BRET_{max} = 60 \pm 6$ $BRET_{50} = 39 \pm 8$ mBU). El tratamiento con estos ligandos no indujo cambios en los valores de $BRET_{50}$. Por el contrario, en el heterómero $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$, la activación de $\alpha_{1A}R$ produjo un incremento significativo en el valor de $BRET_{max}$ (48 ± 5 mBU), pero no se detectaron cambios en los valores de $BRET_{50}$ (36 ± 10 mBU). Mediante la estimulación de $D_{4.7}R$ inducida por A41-29977 se estimaron valores de $BRET_{50}$ significativamente menores (13 ± 4 mBU), lo que sugiere un incremento de la afinidad de la interacción entre los receptores.

1.2 El heterómero $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ modula la activación y la señalización dependiente de proteína G.

La interacción entre GPCRs da lugar a la generación de complejos heterodiméricos o bien complejos de orden superior. En estos complejos se establecen propiedades características de la nueva entidad que conforman que pueden ser distintas a las observadas en los protómeros. La interacción entre los receptores puede modular la unión y la selectividad de ligandos, así como las propiedades funcionales y bioquímicas del otro receptor en el heterodímero. De modo que tras demostrar la existencia de los heterómeros $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$ quisimos analizar las características de dichos heterómeros mediante el estudio de distintas vías de señalización.

1.2.1 Estudio de la activación de proteína G mediada por $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$.

En este ensayo se cotransfectaron células HEK-293 T con las distintas subunidades de la proteína G heterotrimérica: $G\alpha$ a analizar ($G\alpha_{i1}$, $G\alpha_q$ o $G\alpha_s$) fusionada a Rluc8, $G\gamma_2$ fusionada a mVenus y $G\beta_1$ en su forma nativa, juntamente con el receptor $\alpha_{1A}R$, $D_{4.4}R$ o

D_{4.7}R solos o en las combinaciones D_{4.4}R- α_{1A} R y D_{4.7}R- α_{1A} R. La activación de la proteína G se cuantifica como los cambios que se producen en la señal de BRET tras el tratamiento dosis-respuesta con múltiples ligandos. Se determinó la potencia y la eficacia relativa (respecto al ligando endógeno) de distintos ligandos endógenos y exógenos para activar a G α_{i1} , G α_q o G α_s a través de su unión a α_{1A} R, D_{4.4}R, D_{4.7}R o a los heterómeros D_{4.4}R- α_{1A} R y D_{4.7}R- α_{1A} R. De este modo se pudo analizar la habilidad de estos receptores para formar interacciones funcionales y determinar posibles diferencias entre ambos heterómeros.

Los resultados obtenidos para la activación de G α_{i1} mediada por D₄R aparecen en la figura 28, los datos se ajustaron mediante regresión no lineal a curvas sigmoidales de dosis-respuesta y los parámetros estimados a partir de estas curvas se presentan en la Tabla 7. Inicialmente, se comparó la capacidad de activación de la DA y la NE. Como se ha descrito anteriormente, se observó una activación no-canónica de la NE mediada por los receptores D₄^{110,414}. La eficacia de la NE fue similar a la estimada para la DA lo que sugiere que actúa como un agonista total de los receptores D₄, sin embargo, la potencia fue significativamente menor a la de la DA. La potencia estimada para la NE fue equivalente en todos los casos (Figura 28; Tabla 7).

Distintos autores han descrito que D_{4.4}R y D_{4.7}R exhiben una capacidad similar para activar y acoplarse a G α_i , así como para inducir la inhibición de la AC^{110,115,116}. Los resultados de este ensayo fueron en la misma línea, ya que la potencia de la DA para activar G α_{i1} fue similar en el D_{4.4}R y el D_{4.7}R (Tabla 7). En cambio, la potencia estimada para la DA en el heterómero D_{4.4}R- α_{1A} R fue aproximadamente 7 veces mayor (menor valor de EC₅₀) que la observada en el D_{4.4}R lo que sugiere que la formación del heterómero podría estar afectando a la interacción entre la proteína G y el heterodímero tras la unión del ligando o bien directamente a la afinidad del propio ligando. Este efecto no se observó con D_{4.7}R, ya que no se detectaron diferencias en la activación inducida por DA entre D_{4.7}R y el complejo D_{4.7}R- α_{1A} R, lo que de este modo

demuestra la primera diferencia a nivel farmacológico entre las variantes de D₄R dependiente de heteromerización con α_{1A} R. Así, α_{1A} R modifica el comportamiento de D_{4,4}R cuando se forma el correspondiente heterómero, pero no lo hace con D_{4,7}R.

Con el objetivo de analizar más profundamente las distintas propiedades de cada

Tabla 7. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína G α_i inducida por DA y NE sobre D_{4,4}R, D_{4,7}R y los complejos D_{4,4}R- α_{1A} R and D_{4,7}R- α_{1A} R y estudio del efecto del A61603 y el prazosín sobre la activación inducida por la DA.

| G α_{i1} | DOPAMINE | | NOREPINEPHRINE | | A61603 + DOPAMINE | | PRAZOSIN + DOPAMINE | |
|-------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) |
| D _{4,4} R | 137 [#] ± 51 | 100 ± 10 | 870 ^{**} ± 255 | 91 ± 7 | 99 ± 49 | 102 ± 18 | 220 ± 87 | 95 ± 1.2 |
| D _{4,7} R | 98 ± 60 | 100 ± 20 | 870 [*] ± 350 | 86 ± 17 | 42 ± 15 | 91 ± 7 | 89 ± 74 | 83 ± 10 |
| D _{4,4} R- α_{1A} R | 20 ± 6.7 | 100 ± 16 | 412 ^{***} ± 64 | 85 ± 7 | 152 [*] ± 64 | 70 ± 12 | 163 [*] ± 42 | 88 ± 10 |
| D _{4,7} R- α_{1A} R | 60 [#] ± 10 | 100 ± 11 | 613 ^{**} ± 19 | 91 ± 15 | 43 ± 12 | 100 ± 10 | 40 ± 9 | 108 ± 18 |

Valores de potencia (valores de EC₅₀, en nM) y eficacia relativa (E_{max} los valores se representa como un % (relativo a la activación de la DA) estimados de las curvas de los ensayos de BRET de activación de proteína G mostrados en la figura 28. Los valores de EC₅₀ y E_{max} se estimaron de curvas sigmoidales de dosis-respuesta ajustadas mediante un análisis de regresión no lineal. Los valores se expresan como las medias ± S.E.M de 3 a 8 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas entre los parámetros estimados para cada tratamiento en el mismo complejo se calcularon mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett contra el ligando que exhibía la mayor potencia (valores de EC₅₀ más bajos) (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 vs DA). Las diferencias estadísticas entre los parámetros estimados para un mismo tratamiento entre los distintos complejos se calcularon mediante un análisis de t-student de dos colas (#P<0,05 vs D_{4,4}R- α_{1A} R).

heterómero y entender cómo se modulan los receptores entre sí, se evaluó el efecto del cotratamiento de los receptores. Para ello, las células se coactivaron con DA y el agonista selectivo α_{1A} R, A61603, o bien se pretrataron con prazosín (antagonista α_{1R}) o L-745.870 (antagonista selectivo D₄) previamente a la activación con DA (Figura 28; Tabla 7).

IV. Resultados

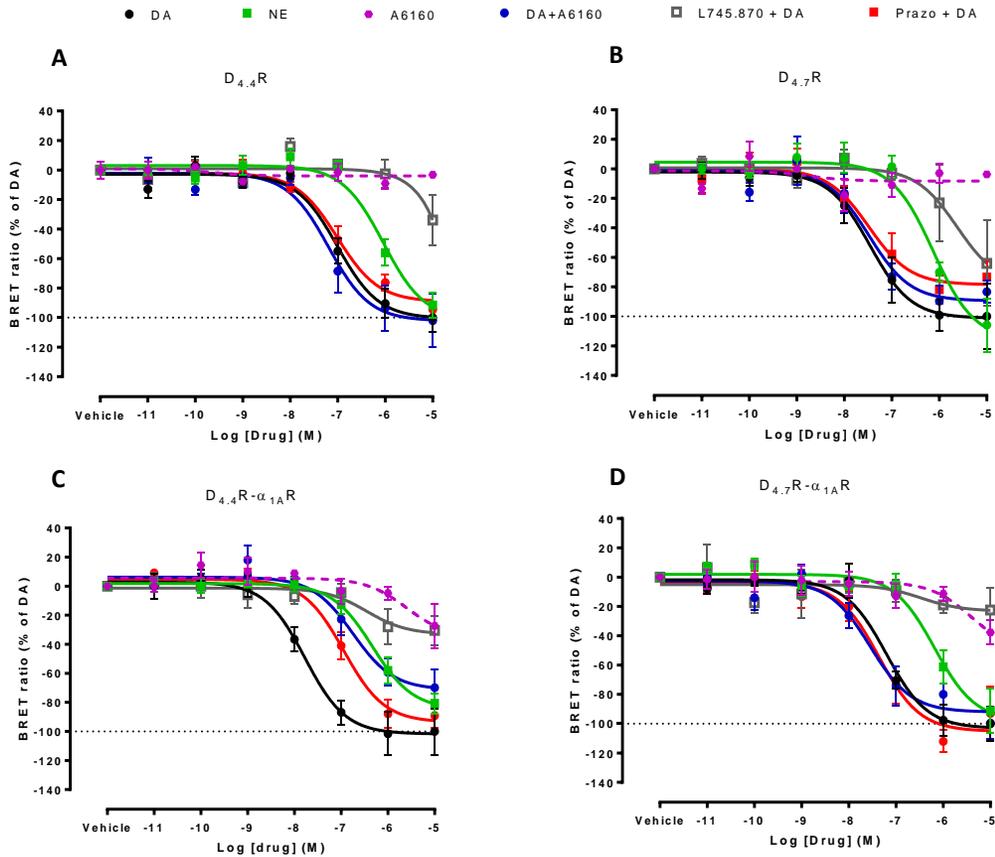


Figura 28. Activación de la proteína $G_{\alpha i1}$ mediada por los receptores D_{4R} y los complejos $D_{4R}-\alpha_{1A}R$. Se realizaron ensayos de BRET de activación de proteína $G_{\alpha i1}$ inducida por distintos ligandos adrenérgicos y dopaminérgicos. Se realizaron experimentos de dosis-respuesta de activación de proteína G inducida por DA, NE and A61603 y se evaluó el efecto del cotratamiento con A61603, L-745.870 o prazosín sobre la activación mediada por DA. Se utilizaron células HEK-293T transfectadas transitoriamente con los cDNA que codifican para $G_{\alpha i1}$ -Rluc8, γ_2 -mVenus, la subunidad β_1 y $D_{4.4}R$ (A), $D_{4.7}R$ (B), $D_{4.4}R$ y $\alpha_{1A}R$ (C) o $D_{4.7}R$ y $\alpha_{1A}R$ (D). Se trataron las células con coelenterazine H (5 μ M) y seguidamente con concentraciones crecientes de NE (verde), A61603 (lila), A61603 + DA (azul) o DA (negro) sola o en presencia de 1 μ M del antagonista de D_4R L745-870 (gris) o 1 μ M del antagonista de $\alpha_{1A}R$ prazosín (rojo). 10 minutos tras el tratamiento se cuantificó la señal de BRET entre las subunidades $G_{\alpha i1}$ -Rluc8 y γ_2 -mVenus como se ha descrito en Materiales y métodos. Los valores basales de BRET (en ausencia de ligandos) se restaron de los valores de BRET obtenidos para cada concentración de agonista. Los valores de BRET se expresan como el porcentaje del efecto máximo inducido por la DA (%DA). Los datos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal a una curva sigmoideal de dosis-respuesta y representan las medias \pm S.E.M. de 3 a 8 experimentos realizados por triplicado (en la Tabla 7 se presentan los valores de EC_{50} y E_{max} estimados a partir de cada curva y el análisis estadístico).

El pretratamiento con L-745.870 produjo la inhibición prácticamente total de la activación en todos los complejos con curvas que no se ajustaban sigmoidalmente, lo que indica que la activación dopaminérgica de $G\alpha_{i1}$ está mediada por D_4R . En el heterómero $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ la coactivación con DA+A61603 y el pretratamiento con prazosín produjeron una modulación negativa sobre la activación de la DA, con una disminución significativa de su potencia (Figura 28; Tabla 7). Ya que el tratamiento con A61603 no produjo activación en ningún tipo celular (datos no mostrados) y tratamiento con los ligandos no afectó a la activación de $G\alpha_{i1}$ mediada por los D_4R solos (Figura 28, Tabla 7), podemos deducir que los cambios producidos en el heterómero $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ se deben a modulaciones entre ambos receptores. De hecho, la adición de los ligandos adrenérgicos disminuyó la potencia de la DA a valores equivalentes a los obtenidos en el caso de $D_{4.4}R$ lo que indica una posible desconexión funcional del heterómero tras la coactivación de los receptores. Sin embargo, en el caso del heterómero $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$ no se observó ningún tipo de modulación funcional inducida por la activación del receptor α_{1A} , lo que sugiere la ausencia de interacción funcional entre estos receptores a pesar de su heteromerización. Estos resultados ponen de manifiesto una diferencia clave entre las dos variantes en el heterómero.

A continuación, se quiso estudiar la señalización mediada por $\alpha_{1A}R$ en el heterómero. Debido a que el receptor α_{1A} es capaz de acoplarse tanto a proteínas $G\alpha_{q/11}$ como $G\alpha_s$ se analizó la activación mediada por $\alpha_{1A}R$ de ambos subtipos. Las curvas obtenidas se muestran en la Figura 29 y los parámetros estimados a partir de cada una de ellas se detallan en las Tablas 8 ($G\alpha_{q/11}$) y 9 ($G\alpha_s$).

A diferencia de los resultados obtenidos anteriormente en el caso de la activación no canónica de G_{i1} inducida por NE en los receptores D_4 , en los ensayos de activación de $G\alpha_q$ y $G\alpha_s$ mediada por $\alpha_{1A}R$ prácticamente no se observó promiscuidad de la DA sobre este receptor (Figura 29). En estos ensayos, además de la utilización de la NE como agonista endógeno, también se utilizó como agonista sintético selectivo el A61603.

IV. Resultados

Debido a la capacidad de la NE de unirse a los receptores D₄ las interacciones funcionales en el heterómero se analizaron sobre la activación inducida por dicho agonista sintético junto con el agonista selectivo de D₄R, el A-412997.

Tabla 8. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína Gα_q inducida por NE y A61603 sobre α_{1A}R y los complejos D_{4,4}R-α_{1A}R y D_{4,7}R-α_{1A}R y estudio del efecto del A41.2997 y el L-745.870 sobre la activación inducida por el A61603.

| Gα _q | NOREPINEPHRINE | | A61603 | | A61603 + A-4129977 | | L-745.870 + A61603 | |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) |
| α _{1A} R | 92** ± 28 | 100 ± 5 | 2.8 ± 1.6 | 92 ± 5 | 2.7 ± 1.1 | 99 ± 5 | 4.8 ± 1.1 | 105 ± 7 |
| D _{4,4} R-α _{1A} R | 140*** ± 49 | 100 ± 9 | 0.9 ± 0.25 | 117 ± 8 | 10* ± 3 | 103 ± 10 | 16* ± 6 | 118 ± 7 |
| D _{4,7} R-α _{1A} R | 157*** ± 33 | 100 ± 3 | 3 ± 1.5 | 120 ± 14 | 2.7 ± 0.4 | 111 ± 30 | 3.7 ± 2 | 125 ± 15 |

Se representan los valores de potencia (valores de EC₅₀, en nM) y eficacia relativa (E_{max} los valores se representa como un % relativo a la activación de la NE) estimados de las curvas de los ensayos de BRET de activación de proteína G mostrados en la figura 29 (A-C). Los valores de EC₅₀ y E_{max} se estimaron de curvas sigmoidales de dosis-respuesta ajustadas mediante un análisis de regresión no lineal. Los valores se expresan como las medias ± S.E.M de 2 a 7 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas entre cada tratamiento en el mismo complejo se calcularon mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett contra el ligando que exhibía la mayor potencia (valores de EC₅₀ más bajos) (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 vs A61603).

Tabla 9. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína Gα_s inducida por NE y A61603 sobre α_{1A}R y los complejos D_{4,4}R-α_{1A}R y D_{4,7}R-α_{1A}R y estudio del efecto del A41.2997 y el L-745.870 sobre la activación inducida por el A61603.

| Gα _s | NOREPINEPHRINE | | A61603 | | A61603 + A-4129977 | | L-745.870 + A61603 | |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) |
| α _{1A} R | 58***/#### ± 10 | 100 ± 19 | 1.8 [#] ± 0.6 | 86 ± 6 | 3.8 ± 0.7 | 84 ± 10 | 1.5 ± 1.2 | 72 ± 12 |
| D _{4,4} R-α _{1A} R | 8.6* ± 3 | 100 ± 18 | 0.3 ± 0.08 | 132 ± 21 | 11* ± 6 | 106 ± 24 | 3* ± 0.2 | 50 ± 45 |
| D _{4,7} R-α _{1A} R | 40***/### ± 6 | 100 ± 17 | 1.1 ± 0.5 | 117 ± 15 | 0.6 ± 0.15 | 140 ± 30 | 1.3 ± 0.6 | 120 ± 23 |

Se representan los valores de potencia (valores de EC₅₀, en nM) y eficacia relativa (E_{max} los valores se representa como un % relativo a la activación de la NE) estimados de las curvas de los ensayos de BRET de activación de proteína G mostrados en la figura 29 (D-F). Los valores de EC₅₀ y E_{max} se estimaron de curvas sigmoidales de dosis-respuesta ajustadas mediante un análisis de regresión no lineal. Los valores se expresan como las medias ± S.E.M de 2 a 7 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas entre las potencias obtenidas para cada tratamiento en el mismo complejo se calcularon mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett contra el ligando que exhibía la mayor potencia (valores de EC₅₀ más bajos) (*P<0,05; ***P<0,001 vs A61603). Las diferencias estadísticas entre los parámetros estimados para un mismo tratamiento entre los distintos complejos se calcularon mediante un análisis de t-student de dos colas ([#]P<0,05; ^{##}P<0,01; ^{###}P<0,001 vs D_{4,4}R-α_{1A}R)

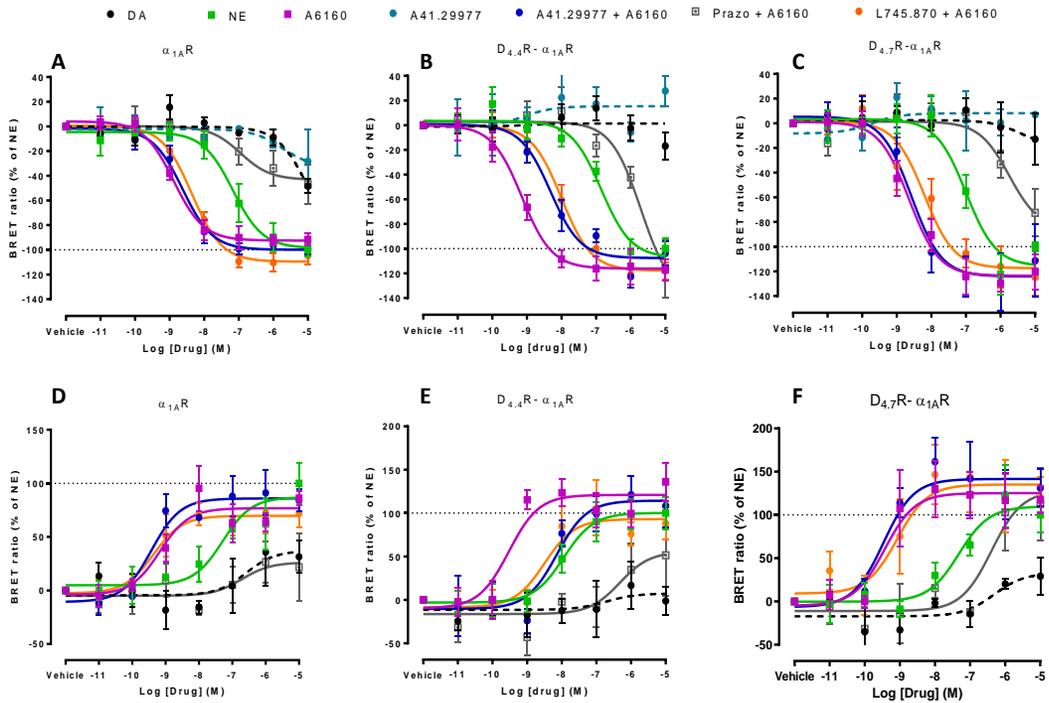


Figura 29. Activación de las proteínas $G\alpha_q$ y $G\alpha_s$ mediada por $\alpha_{1A}R$ y los complejos $D_{4x}R-\alpha_{1A}R$. Se realizaron ensayos de BRET de activación de la proteína $G\alpha_q$ o $G\alpha_s$ inducida por distintos ligandos adrenérgicos y dopaminérgicos. Se realizaron experimentos de dosis-respuesta de activación de proteína G inducida por DA, NE, A-4129977 y A61603 y se evaluó el efecto del cotratamiento con A-4129977, L-745.870 o prazosín sobre la activación mediada por A61603. Se utilizaron células HEK-293T transfectadas transitoriamente con los cDNA que codifican para $G\alpha_q$ -Rluc8 (A-C) o $G\alpha_s$ -Rluc8 (D-F), γ_2 -mVenus, la subunidad β_1 y $\alpha_{1A}R$ (A, D), $D_{4,4}R$ y $\alpha_{1A}R$ (B, E) o $D_{4,7}R$ y $\alpha_{1A}R$ (C, F). Se trataron las células con coelenterazine H (5 μ M) y seguidamente con concentraciones crecientes de NE (verde), A-4129977 (azul claro), DA (negro) A-4129977 + A61603 (azul) o A61603 (lila) solo o en presencia de 1 μ M del antagonista de D_4R L745-870 (naranja) o 1 μ M del antagonista de $\alpha_{1A}R$ prazosín (gris). 10 minutos tras el tratamiento se cuantificó la señal de BRET entre las subunidades $G\alpha_q$ -Rluc8 o $G\alpha_s$ -Rluc8 y γ_2 -mVenus como se ha descrito en Materiales y métodos. Los valores basales de BRET (en ausencia de ligandos) se restaron de los valores de BRET obtenidos para cada concentración de agonista. Los valores de BRET se expresan como el porcentaje del efecto máximo inducido por la NE (100%; NE). Los datos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal a una curva sigmoideal de dosis-respuesta y representan las medias \pm S.E.M. de 2 a 8 experimentos realizados por triplicado (en las Tablas 8 y 9 se presentan los valores de EC_{50} y E_{max} estimados a partir de cada curva y el análisis estadístico).

La activación de $G\alpha_q$ y $G\alpha_s$ inducida por A61603 fue inhibida por el antagonista α_{1R} , prazosín, en todos los casos, lo que demuestra la especificidad de la activación (Figura 29). Los resultados observados para la activación de ambos subtipos de proteína G exhibieron un perfil farmacológico similar al descrito para la activación de $G\alpha_{i1}$. La

coactivación con A-4129977 y el pretratamiento con L-745.870 (antagonista selectivo D₄R) no produjo ningún efecto sobre potencia de A61603 en α_{1A} R ni en D_{4.7}R- α_{1A} R. De acuerdo con los resultados anteriores, la coactivación dopaminérgica produjo una disminución significativa de la potencia de A61603 en ambas proteínas G en el heterómero D_{4.4}R- α_{1A} R (Figura 29; Tablas 8 y 9).

Otros datos interesantes se observaron al comparar los resultados estimados para la activación de las proteínas G α_q y G α_s (Tabla 10). Mientras en el α_{1A} R se estimaron valores de potencia similares para la NE y el A61603 en el estudio de la activación de ambas subunidades, en el caso de D_{4.4}R- α_{1A} R las potencias de ambos agonistas fueron significativamente mayores para la activación de G α_s . Esto podría indicar un cambio en la selectividad del receptor α_{1A} R entre las proteínas G tras la heteromerización con D_{4.4}R. En cuanto a D_{4.7}R- α_{1A} R se pudo observar un incremento en la potencia de la NE, pero no del A61603, en la activación de G α_s comparado con la de G α_q . Este incremento, sin embargo, fue mucho menor que el observado en el heterómero D_{4.4}R- α_{1A} R.

Tabla 10. Potencias estimadas para la NE y el A6160 para la activación de G α_q y G α_s mediada por α_{1A} R y los complejos D_{4.4}R- α_{1A} R y D_{4.7}R- α_{1A} R.

| Subunidad G α | α_{1A} R | | D _{4.4} R- α_{1A} R | | D _{4.7} R- α_{1A} R | |
|-------------------------------|-----------------------|-----------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-----------|
| | EC ₅₀ (nM) | | | | | |
| | NE | A61603 | NE | A61603 | NE | A61603 |
| Gα_q | 92 ± 28 | 2.8 ± 1.6 | 140 ± 49 | 0.88 ± 0.25 | 157 ± 33 | 3 ± 1.5 |
| Gα_s | 58 ± 10 | 1.8 ± 0.6 | 8.6* ± 3 | 0.3* ± 0.08 | 40* ^{###} ± 6 | 1.1 ± 0.5 |

Potencia (valores de EC₅₀, en nM) de la NE y el A6160 de activación de las proteínas G α_q y G α_s (véase figura 29 y tablas 8 y 9). Las diferencias estadísticas entre las potencias de un mismo tratamiento para las distintas subunidades en un mismo complejo (*P<0,05 vs G α_q) o para la misma subunidad entre complejos (^{###}P<0,01 D_{4.4}R- α_{1A} R) se calcularon mediante un análisis de t-student de dos colas.

Estos resultados demuestran la interacción funcional de los receptores D_{4.4} y α_{1A} y definen el *fingerprint*, las características bioquímicas específicas, asociadas su heteromerización. La formación de este heterómero ha producido cambios en la potencia de activación y selectividad de la proteína G, así como una modulación

negativa entre los receptores que lo conforman. Estas propiedades características parecen ser prácticamente inexistentes en presencia de la variante D_{4.7}R lo que sugiere diferencias de comportamiento entre las variantes del receptor D₄R dependientes de su heteromerización.

1.2.2 Evaluación de la señalización dependiente de proteína G mediada por los complejos D_{4.4}R- α_{1A} R y D_{4.7}R- α_{1A} R

A continuación, quisimos determinar si el *fingerprint*, así como las diferencias detectadas entre las variantes de D₄R en el heterómero descritas en los ensayos de activación de proteína G eran detectables al nivel de señalización. La activación de G α_s produce la activación de la adenilato ciclasa (AC) mientras G α_i induce su inhibición provocando el incremento y la disminución, respectivamente, de los niveles de AMPc. Para analizar el efecto de la activación de estas proteínas G examinamos los niveles de AMPc tras la activación de los receptores en células cotransfectadas con D_{4.4}R- α_{1A} R y con D_{4.7}R- α_{1A} R.

De acuerdo con la proteína G asociada a cada receptor, el tratamiento con A61603 estimuló la producción de AMPc por otro lado, la activación con A-4129977 produjo una disminución de los niveles de AMPc inducidos por forskolina (FK) (Figura 29 A-B). Debido a que el antagonista L-745.870 en sí mismo produce la inhibición de la AC (datos no mostrados) no se utilizó este ligando en el presente ensayo. Conforme a los resultados descritos en los experimentos de activación de proteína G, en este ensayo se observó la modulación negativa únicamente en las células D_{4.4}R- α_{1A} R (Figura 30A). La coactivación con A-4129977 abolió la producción de AMPc inducida por A61603 y el prazosín bloqueó completamente la inhibición de la AC inducida por A-4129977 (Figura 30A). De nuevo, no se observó ninguna interacción funcional entre D_{4.7}R y α_{1A} R (Figura 30B).

El receptor α_{1A} también es capaz de acoplarse a G α_q de modo que su activación da lugar a un incremento de los niveles de calcio intracelular. Por este motivo analizamos la

liberación de calcio intracelular en células transfectadas con el sensor de calcio GCaMP6 y las parejas $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$ (Figura 30C-D). La activación con A61603 produjo un pico de liberación de calcio intracelular que disminuyó con el cotratamiento con A-4129977 y por el pretratamiento con L-745.870 solo en presencia de la variante $D_{4.4}R$ (Figura 30C). La coactivación dopaminérgica no tuvo ningún efecto en las células $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$. De modo que el receptor $D_{4.7}$ es capaz de formar heterómeros con $\alpha_{1A}R$, no obstante, no parece existir una modulación funcional recíproca en este complejo, a diferencia del *fingerprint* detectado en el caso de la variante $D_{4.4}R$ en todas las vías analizadas.

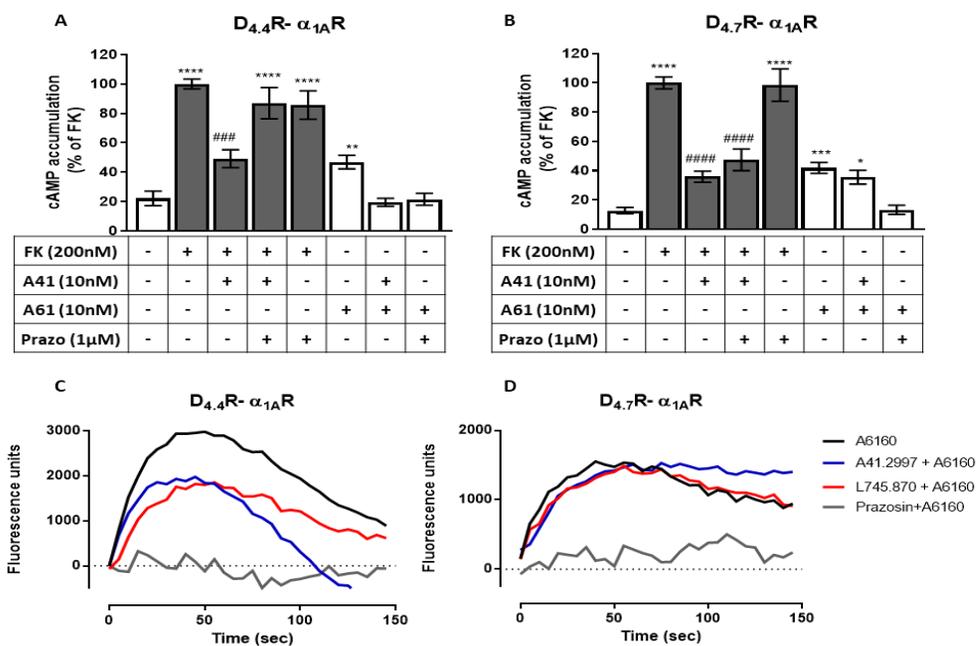


Figura 30. La coactivación del heterómero $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$ produce una modulación negativa en su señalización, pero no la coactivación del heterómero $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$. Se analizó la modulación de la adenilato ciclasa (A-B) y la movilización de calcio intracelular (C-D) en respuesta a ligandos adrenérgicos y dopaminérgicos en células HEK-293T transfectadas con el receptor α_{1A} y $D_{4.4}R$ (A-C) o $D_{4.7}R$ (B-D). A-B: Las células fueron tratadas con el agonista $\alpha_{1A}R$, A61603 (10 nM), en presencia y en ausencia del antagonista de $\alpha_{1A}R$, prazosín (1 μ M), o co-activadas con A61603 y el agonista D_4 , A41-2997 (10 nM) (barras blancas). O bien, las células fueron pretratadas o no con prazosín (1 μ M) antes del tratamiento con A41-2997 (10 nM) en presencia de forskolina (200 nM) (barras grises). Los valores representan la media \pm S.E.M de 3 a 5 experimentos y se expresan como un % del AMPc inducido por la forskolina. Las diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos se evaluaron mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un análisis *post-hoc* de comparación múltiple de Dunnett (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$ vs basal; ### $P < 0,001$; #### $P < 0,0001$ vs forskolina).

C-D: Además de con los receptores $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ (C) y $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$ (D) las células se cotransfectaron con el sensor de calcio GCaMP6. Las células se activaron con el agonista A61603 (20 nM) solo (línea negra) o en combinación con A41.2997 (A41-2997), o bien fueron pretratadas con prazosín (60 nM, línea gris) o el antagonista D_4R L-745.870 (60 nM, línea roja) antes de la activación con A61603. C y D muestran curvas representativas de liberación de calcio intracelular a lo largo del tiempo de 4 experimentos realizados por triplicado.

1.3 Los complejos $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$ modulan la señalización independiente de proteína G.

Se ha descrito que múltiples GPCRs son capaces de señalizarte mediante vías independientes de proteína G. Por ejemplo, mediante el reclutamiento de β arrestinas se induce la desensibilización del receptor a la vez que se activan diversas cascadas de señalización como la vía de las MAPK^{347,415}. Debido a las diferencias funcionales detectadas entre ambos heterómeros tanto a nivel de activación de la proteína G como en las vías asociadas a dicha activación se quiso profundizar más en las características bioquímicas de estos complejos. Para ello, analizamos la capacidad de reclutamiento de la proteína β arrestina-2, así como la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la activación de los receptores en el complejo.

El ensayo de reclutamiento de β arrestinas se realizó siguiendo un protocolo similar al descrito para el ensayo de activación de proteína G. Se cotransfectaron las células con los receptores $D_{4.4}$ o $D_{4.7}$, con $\alpha_{1A}R$ fusionada a YFP y la proteína β arrestina-2 fusionada a Rluc de modo que, la transferencia de energía se produce entre el $\alpha_{1A}R$ y la β arrestina-2. El reclutamiento de β arrestina-2 se cuantificó como cambios en la señal de BRET inducidos por distintos ligandos de manera dosis-dependiente. La estimulación de los receptores mediante el tratamiento con ligandos endógenos y exógenos indujo el reclutamiento de β arrestina-2 y se obtuvieron curvas sigmoideas dosis-dependientes (Figura 31), los parámetros deducidos de cada curva se detallan en la Tabla 11.

Tabla 11. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de reclutamiento de β Arrestina-2 mediado por los complejos $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$.

| Treatment | $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$ | | $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$ | |
|----------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) |
| DOPAMINE | 3 ± 0.9 | 64 ± 9.6 | 3.8 ± 1.5 | 110 ± 29 |
| NOREPINEPHRINE | 215 ^{###} ± 55 | 83 ± 24 | 600 ^{###} ± 120 | 91 ± 9 |
| A6160 | 1.1 ± 0.9 | 100 ± 28 | 1.1 ± 0.8 | 100 ± 26 |
| A6160 + DOPAMINE | 56 ^{###} ± 14 | 94 ± 15 | 30 [#] ± 11 | 80 ± 30 |
| L-745+ DOPAMINE | 315* ± 60 | 40 ± 21 | 1600* ± 770 | 53 ± 10 |
| PRAZOSIN + DOPAMINE | 711* ± 196 | 58 ± 8.7 | 1100* ± 250 | 97 ± 9 |
| L-745+ A6160 | 14* ± 4.5 | 104 ± 14 | 44* ± 13 | 65 ± 24 |
| PRAZOSIN + A6160 | 130 ^{****} ± 4 | 42 ± 23 | 300 ^{***} ± 24 | 89 ± 9 |

Potencias (valores de EC₅₀, en nM) y eficacias relativas (E_{max}, los valores se representan como un % relativo a la activación de A61603) estimadas de las curvas de los ensayos de BRET de reclutamiento de β Arrestina-2 mostrados en la figura 31. Los valores de EC₅₀ y E_{max} se estimaron de curvas sigmoidales de dosis-respuesta ajustadas mediante un análisis de regresión no lineal. Los valores se expresan como las medias ± S.E.M de 2 a 8 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas se calcularon mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett) (*P < 0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001 vs ligando sin antagonista; #P<0,05 ###P<0,001 vs A61603.

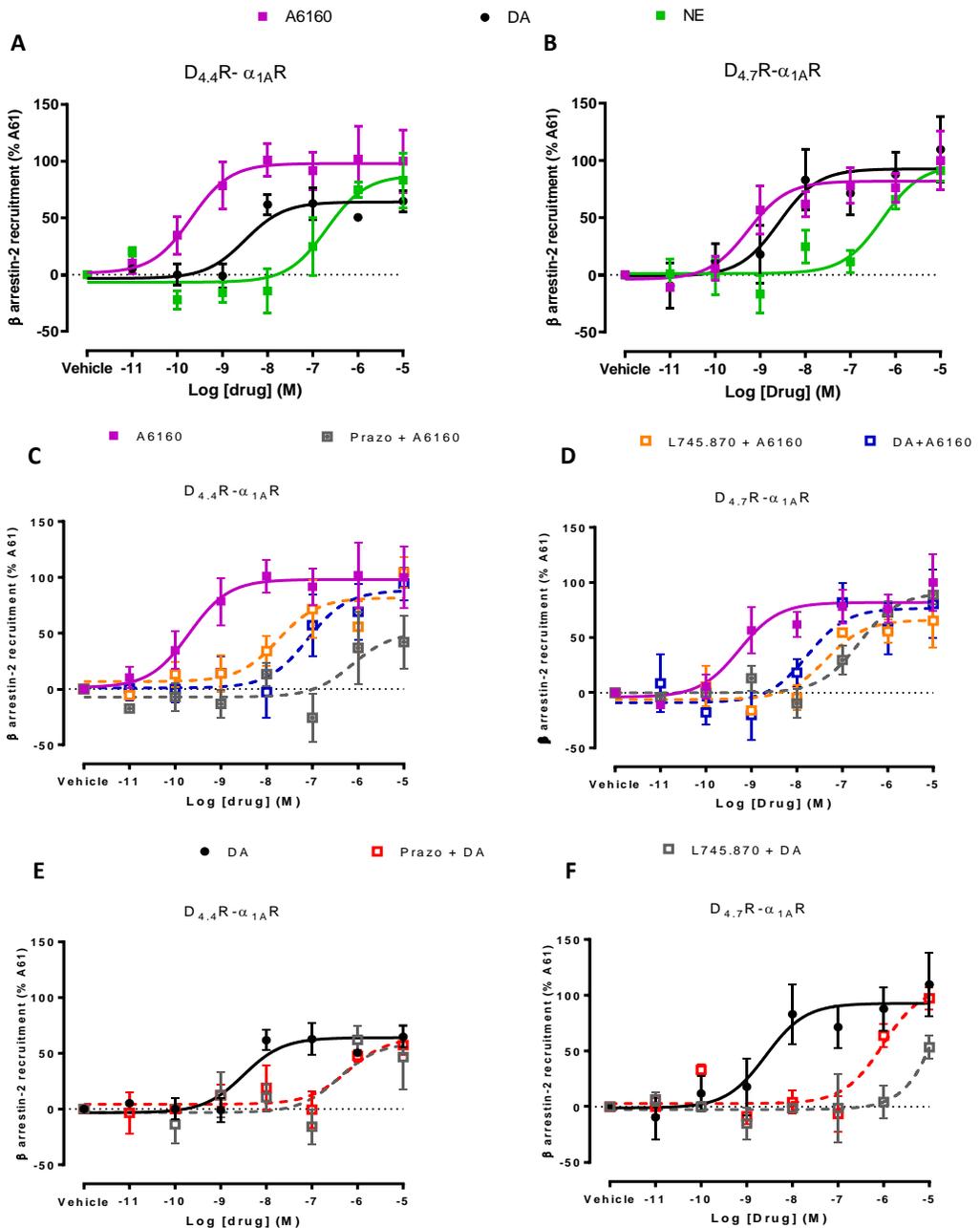


Figura 31. Evaluación del reclutamiento de β arrestina-2 en células HEK-293 T cotransfectadas con $D_{4.4R}-\alpha_{1A}R$ y $D_{4.7R}-\alpha_{1A}R$. Curvas dosis-respuesta de distintos ligandos obtenidas de los experimentos de BRET de reclutamiento de β arrestina-2 en células HEK-293T transfectadas transitoriamente con β arrestina-2 -Rluc8, $\alpha_{1A}R$ -YFP y $D_{4.4}R$ (A, C, E) o $D_{4.7}R$ (B, D, F). A-B: Se trataron las células con coelenterazine H (5 μ M) y seguidamente con concentraciones crecientes de DA (negro), NE (verde) o A61603 (lila). C-D: Se analizó el efecto del pretratamiento con los antagonistas selectivos (1 μ M) prazosín (gris) y L-745.870 (naranja) y de la coactivación con DA en el reclutamiento

de β arrestina-2 inducido por A61603 (lila). E-F: Se estudió el efecto del pretratamiento con los antagonistas selectivos ($1 \mu\text{M}$) prazosín (rojo) y L-745.870 (gris) sobre el reclutamiento inducido por DA (negro). Los valores basales de BRET (en ausencia de ligandos) se restaron de los valores de BRET obtenidos para cada concentración de agonista. Los datos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal a una curva sigmoideal de dosis-respuesta y representan las medias \pm S.E.M de 2 a 8 experimentos realizados por triplicados. Los valores de BRET se expresan como un porcentaje relativo al efecto máximo inducido por A61603. (En la Tablas 11 se muestran los valores de EC_{50} y E_{max} estimados a partir de cada curva y el análisis estadístico).

Las células se trataron con distintos agonistas y se coactivaron con DA y A61603 y se pretrataron con prazosín o L-745.870 antes de la activación con DA o A61603. Inesperadamente, se observó una modulación negativa tanto en las células $\text{D}_{4.4}\text{R}-\alpha_{1\text{A}}\text{R}$ como en las $\text{D}_{4.7}\text{R}-\alpha_{1\text{A}}\text{R}$. La coactivación con DA y A61603 produjo la disminución significativa de la potencia obtenida por los ligandos por separado y a su vez, ambos antagonistas (prazosín y L-745.870) fueron capaces de bloquear el reclutamiento inducido no solo por el agonista del mismo receptor, sino también por el agonista de la pareja (Figura 31; Tabla 11).

Los resultados obtenidos en el análisis de la fosforilación de ERK1/2 fueron de acuerdo con los descritos en el reclutamiento de β arrestina-2 (Figura 32). En ambos sistemas heterólogos la coactivación con agonistas selectivos de los receptores, A-412997 y A61603, dio lugar a un nivel de fosforilación menor que la suma de los efectos inducidos por cada uno de los agonistas solos, lo que pone de manifiesto un proceso de modulación negativa. El antagonista selectivo para cada receptor fue capaz de inhibir la señal mediada por el agonista de la pareja en el heterómero, lo que demuestra de nuevo la modulación negativa en estos complejos (Fig. 32A-B).

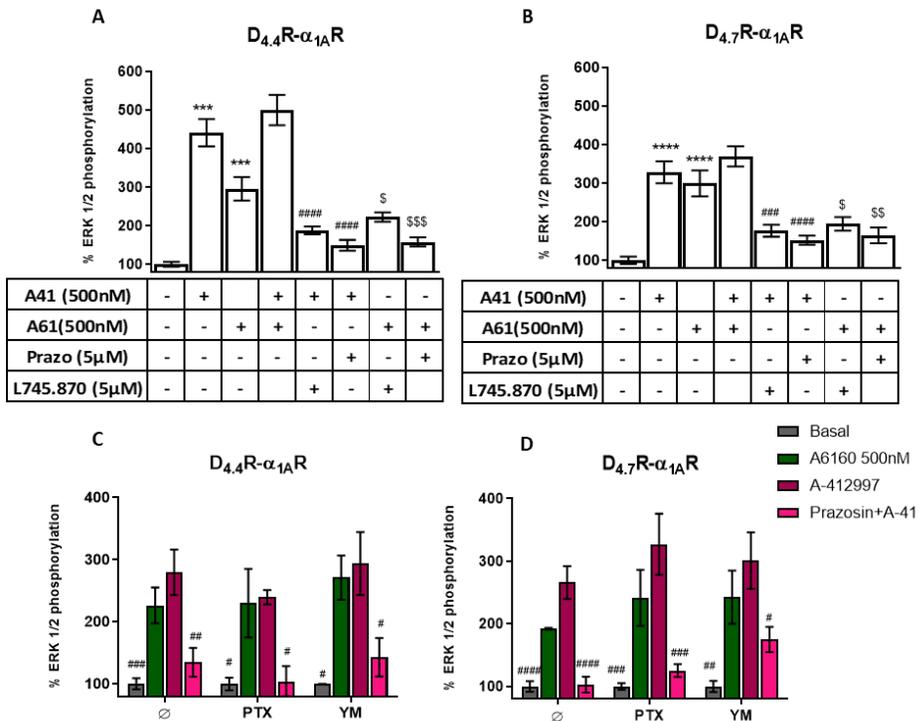


Figura 32. Evaluación de la fosforilación de ERK 1/2 inducida por la activación de los complejos $D_{4,4}R-\alpha_{1A}R$ y $D_{4,7}R-\alpha_{1A}R$. Fosforilación de ERK1/2 en células HEK-293 T cotransfectadas con el cDNA de los receptores α_{1A} y $D_{4,4}R$ (A, C) o $D_{4,7}R$ (B, D). A-B: Se trataron las células con 500 nM de los agonistas A41.2997 y A61603 solo o en combinación durante 7 minutos a 37°C o se pretrataron con 5 μ M de los antagonistas L-745.870 o prazosin durante 10 minutos previo al tratamiento con los agonistas. (C-D) Se incubaron las células con vehículo (\emptyset), con 10 ng/ml de toxina pertussis (PTX) *overnight* o con 1 μ M del inhibidor YM-254890 (YM) durante 30 minutos a continuación, las células fueron tratadas con los 500 nM de los agonistas (A61603 o A41-2997) durante 7 minutos o pretratadas durante 10 minutos con prazosin 5 μ M antes del tratamiento con A41.2997. Se cuantificaron las bandas inmunorreactivas correspondientes a ERK 1/2 y los valores representan la media \pm S.E.M de 4 a 8 experimentos y se expresan como un porcentaje de la ratio pERK1/2 versus ERK1/2 totales en función de los niveles basales de fosforilación (células no tratadas; 100%).(A-B) Se utilizó un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett (**P <0,001; ****P<0,0001 vs células no tratadas; ###P<0,001; ####P<0,0001 vs tratamiento con A41-2997; \$P<0,05; \$\$P<0,01; \$\$\$P<0,001 vs tratamiento con A61603).(C-D) Según un análisis *two-way* ANOVA seguido de un test *post-hoc* de comparación múltiple de Bonferroni el tratamiento con PTX o YM-254890 no afectó a la fosforilación inducida por los agonistas frente al vehículo (\emptyset). Las diferencias estadísticas contra la activación inducida por A41-2997 se calcularon mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett (#P <0,05; ## P <0,01; ### P <0,001; #### P <0.0001).

A pesar de que estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de reclutamiento de β arrestina-2, se ha descrito que tanto la activación de proteínas G como el reclutamiento de β arrestinas puede producir la activación de la vía de las

MAPK⁴¹⁶. En base a esto, quisimos determinar si la fosforilación de ERK1/2 en nuestros sistemas era independiente de la activación de proteína G. Para ello, las células fueron tratadas con toxina pertussis (PTX), una toxina capaz de inhibir a proteína $G\alpha_i$, o con un inhibidor de la proteína $G\alpha_q$ (YM-254890) antes de la activación con los ligandos. La inhibición de las proteínas G no afectó a los niveles de fosforilación de ERK1/2 inducidos por los agonistas, A61603 y A-412997, ni a la modulación negativa ejercida por el antagonista α_1R , prazosín, sobre la activación de D_4R (Fig. 32C-D). De modo que la activación de la vía de las MAPK en estos complejos se produciría de manera independiente de la activación de la proteína G. Estos resultados sugieren que las diferencias funcionales descritas entre los heterómeros $D_{4,4}R$ - $\alpha_{1A}R$ y $D_{4,7}R$ - $\alpha_{1A}R$ se encuentran vinculadas a la señalización inducida por proteínas G.

1.4 Detección y caracterización funcional del heterómero D_4R - $\alpha_{1A}R$ en tejido de rata

Por último, quisimos comprobar la expresión de heterómeros D_4R - $\alpha_{1A}R$ en la corteza y el estriado de rata, y si estos complejos mostraban un patrón funcional similar al observado en células. La presencia de heterómeros D_4R - $\alpha_{1A}R$ en dichas regiones se analizó mediante la utilización de anticuerpos específicos para estos receptores en un ensayo de ligación por proximidad (PLA; *proximity ligation assay*). El ensayo de PLA requiere que los dos receptores del heterómero se encuentren suficientemente cerca (<17 nm) de modo que los diferentes anticuerpos sean capaces de ligarse entre ellos (véase materiales y métodos). Si los receptores están interaccionando se detecta una señal fluorescente en forma de punto rojo mediante microscopía confocal. Los resultados mostraron puntos rojos alrededor de los núcleos celulares marcados con DAPI tanto en cortes estriatales como corticales (Figura 33 C, D). Como control negativo se incubaron los cortes únicamente con un anticuerpo primario y ambos anticuerpos secundarios (Figura 33A, B).

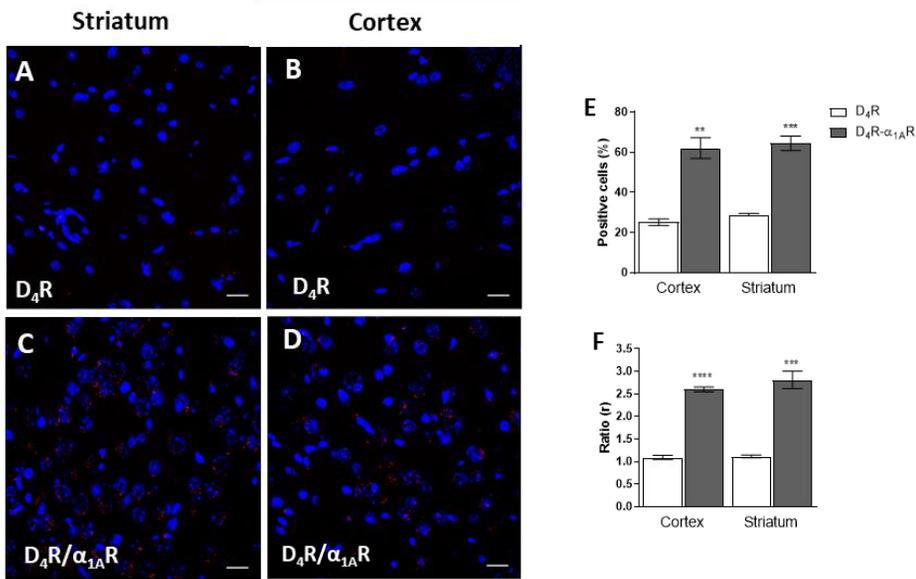


Figura 33. Identificación de heterómeros de receptores D₄ y α_{1A} en corteza prefrontal y estriado de rata. Se realizó un ensayo *in situ* de ligación por proximidad (PLA) en cortes de PFC y estriado de rata. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI (azul) y los heterómeros se detectan como puntos rojos alrededor de los núcleos (C-D). En los controles negativos (A, B) se excluyó el anticuerpo primario para α_{1A}R. (E): SE muestra el porcentaje de células que contienen uno o más puntos rojos, expresado respecto al número total de células. (F): Muestra los valores de r (número de puntos rojos / número de células que tienen puntos rojos). Los datos son la media ± S.E.M del recuento de 3 experimentos diferentes. Las diferencias estadísticas entre regiones y contra el control negativo se analizaron mediante un análisis de t-Student de dos colas no apareada (** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001 vs control negativo). Barra de escala: 20 μm

Una vez confirmada la presencia del heterómero en tejido y con el objetivo de determinar si la funcionalidad del heterómero seguía el mismo patrón descrito *in vitro* analizamos su señalización mediante el estudio de la fosforilación de ERK1/2 inducida por el tratamiento con agonistas en cortes estriales y corticales (Figura 34A-B).

De acuerdo con los resultados descritos en células transfectadas, en tejido se observó el mismo patrón de modulación negativa, de modo que los antagonistas de cada receptor fueron capaces de inhibir la fosforilación inducida por la activación de la pareja. Asimismo, la coactivación con ambos agonistas produjo una señal inferior a la suma de las activaciones individuales (Figura 34A-B).

IV. Resultados

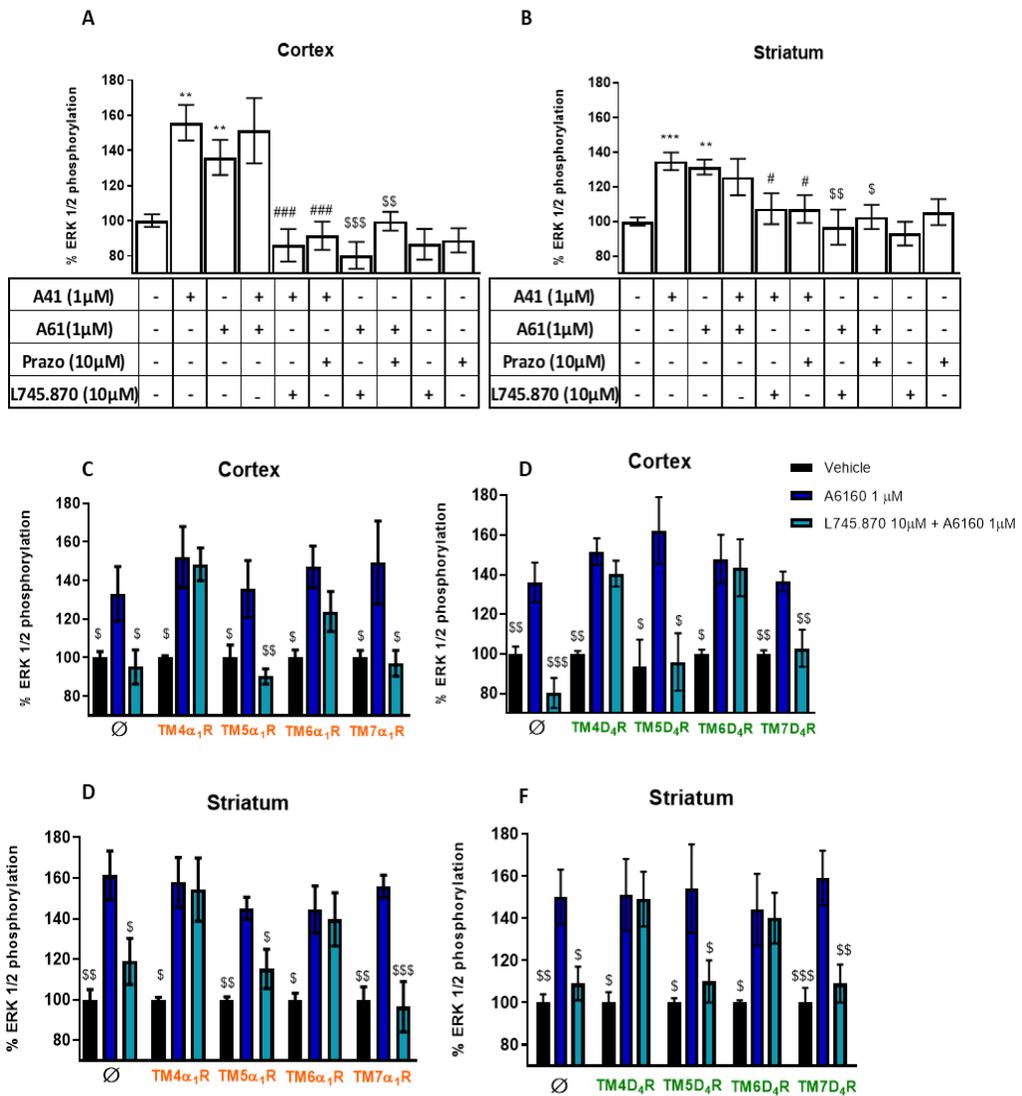


Figura 34. Efecto del bloqueo de la formación del complejo $D_4R-\alpha_{1A}R$ sobre la fosforilación de ERK 1/2 en corteza y estriado de rata. Se analizó el nivel de fosforilación de ERK 1/2 en cortes cerebrales de rata como se explica en Materiales y métodos. A-B: Los cortes de corteza (A) y estriado (B) se trataron o no durante 10 minutos con los agonistas A41-2997 y A61603 (1 μ M) solos o en combinación, o bien fueron pretratados durante 20 minutos con el antagonista L-745.870 o prazosín (10 μ M) antes de la activación con los agonistas. C-F: Los cortes fueron incubados durante 4 horas con vehículo (\emptyset) o con los péptidos TM (4 μ M) correspondientes a los dominios TM 4-7 del receptor D_4 o α_{1A} . A continuación, se trataron durante 10 minutos con vehículo (barras negras) o con A61603 (1 μ M) o bien se pretrataron durante 20 minutos con L-745.870 (10 μ M) previo a la activación con A61603. Se cuantificaron las bandas inmunorreactivas correspondientes a ERK 1/2. Los valores representan la media \pm S.E.M de 2 experimentos realizados por cuadruplicado y se expresan como un porcentaje de la ratio pERK1/2 versus ERK1/2 totales en función de los niveles basales de fosforilación (cortes no tratados con ligandos; 100%). A-B: Se analizó la significación

estadística mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett (**P <0,01; ***P<0,001 vs cortes no tratados; #P<0,05; ###P<0,001 vs tratamiento con A41-2997; \$P<0,05; \$\$P<0,01; \$\$\$P<0,001 vs tratamiento con A61603). C-F: Según un análisis *two-way* ANOVA seguido de un test *post-hoc* de comparación múltiple de Bonferroni el tratamiento con los péptidos transmembrana no influyó a la fosforilación inducida por los agonistas en comparación a los cortes tratados con vehículo (\emptyset). Las diferencias estadísticas contra la activación inducida por A61603 se calcularon mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett (\$P<0,05; \$\$P<0,01; \$\$\$P<0,001).

A continuación, quisimos demostrar la especificidad de las interacciones descritas. Para ello, se utilizaron péptidos sintéticos con la secuencia aminoacídica correspondiente a los segmentos transmembrana (TM) 4-7 de los receptores D_4 y α_1 . La adición de los péptidos TM implicados en la heteromerización evita la formación del heterómero y, por tanto, la modulación entre los receptores que lo conforman. Se analizó el efecto de cada péptido TM sobre la modulación negativa ejercida por el antagonista D_4R (L-745.870) en la fosforilación de ERK1/2 inducida por el agonista de α_{1A} (A61603) en cortes de estriado y corteza de rata (Figura 34 C-F). La adición de los péptidos no produjo ninguna interferencia en la fosforilación de ERK1/2 inducida por los agonistas. Los resultados mostraron que el tratamiento con los péptidos correspondientes a TM4 y TM6 tanto de D_4R como de α_1R produce la pérdida del *fingerprint* de heterómero, es decir, en presencia de estos péptidos, el pretratamiento con L-745.870 no produjo el bloqueo de la señal inducida α_{1A} . Ya que el tratamiento con el resto de los péptidos TM no produjo ningún efecto en la interacción funcional del heterómero, estos resultados sugieren que la interacción entre los receptores se produce a través de los segmentos TM 4 y 6 de cada receptor.

2. Capítulo 2: Implicación de los heterómeros formados por los receptores de adrenalina α_{1A} y de dopamina D_1 en la modulación de la atención.

La atención es un proceso vital para la supervivencia y la cognición humana mediante el cual se selecciona cierta información relevante al mismo tiempo que se inhiben señales irrelevantes tanto internas como externas. La PFC representa el punto neurálgico de la regulación de la atención gracias a sus numerosas conexiones recíprocas con regiones sensoriales y subcorticales que se regulan mediante complejos sistemas de neurotransmisores⁸². En concreto, la PFC y sus conexiones son especialmente sensible a los niveles DA y la NE^{92,147,417}. Alteraciones en su señalización se han asociado con distintos trastornos comórbidos a déficits atencionales y cognitivos^{122,418,419}.

El receptor de dopamina D_1 (D_1R) es capaz de estabilizar la activación de la PFC mediante la supresión de las respuestas a señales irrelevantes y así disminuyendo el “ruido”^{126,127}. Por otra parte, la sobreestimulación de este receptor, como ocurre en situaciones de estrés, se ha relacionado con el deterioro de las funciones de la PFC^{128,149}. Como se ha explicado en el capítulo anterior, la activación de los receptores α_1R también media respuesta al estrés además de regular otros procesos atencionales. Múltiples evidencias sugieren la existencia de algún tipo de interacción entre los receptores D_1 y α_1 en la PFC. Por ejemplo, los antagonistas de α_1R son capaces de inhibir la hipersensibilidad de D_1R en la PFC y también pueden bloquear la liberación de DA en respuesta al estrés^{420,421}. Diversos estudios han reportado la capacidad de D_1R y otros receptores de DA de formar heterómeros, lo que indica que la formación de estructuras más complejas que la de la simple molécula de un receptor tiene un papel clave en la regulación de la señalización DAérgica. Hemos descrito que $\alpha_{1A}R$ es capaz de interaccionar y modular funcionalmente a D_4R (capítulo 1), por lo que es plausible que este receptor también sea capaz de formar

un heterómero con el receptor D_1 y mediar así los efectos sobre este receptor descritos anteriormente.

2.1 El receptor de dopamina D_1 forma heterómeros con el receptor adrenérgico $\alpha_{1A}R$.

La interacción entre los receptores D_1 y $\alpha_{1A}R$ se demostró mediante la utilización de técnicas biofísicas de BRET. Para ello células HEK-293 T fueron transfectadas transitoriamente con cantidades constantes del cDNA correspondiente a D_1R fusionado a Rluc como molécula donadora y cantidades crecientes del cDNA que codifica para el receptor $\alpha_{1A}R$ fusionado a YFP como aceptor. Los resultados estimados mostraron curvas de saturación de BRET que demuestran la interacción específica entre los receptores ($BRET_{max} = 60 \pm 4$ mBU; $BRET_{50} = 21 \pm 4$ mBU) (Figura 35A). Como control negativo se transfectó la pareja $\alpha_{2A}R$ -Rluc/ $\alpha_{1A}R$ -YFP, y se obtuvieron gráficas lineales indicativas de interacciones no específicas debidas a colisiones aleatorias⁴¹². A continuación, se quiso determinar el efecto de la activación de los receptores mediante la utilización de agonistas de ambos receptores. Se trataron las células con SKF81297, agonista de $D_{1/5}$ o con A61603, agonista de $\alpha_{1A}R$, durante 10 minutos y se procedió a efectuar las lecturas de BRET. El tratamiento con cualquiera de los dos agonistas produjo un incremento significativo en los valores de $BRET_{max}$ (SKF81297 = 93 ± 8 mBU; A61603 = 92 ± 11 mBU) comparado con las células sin tratar (Figura 35B) lo que indica que los cambios conformacionales producidos por la activación de los receptores facilitan la transferencia de energía entre ellos. Destaca el hecho que las células tratadas con A61603 proporcionaron valores más elevados de $BRET_{50}$ (33 ± 8 mBU) lo que sugiere que la activación de este receptor tiene un efecto negativo sobre su afinidad para heteromerizar con D_1R .

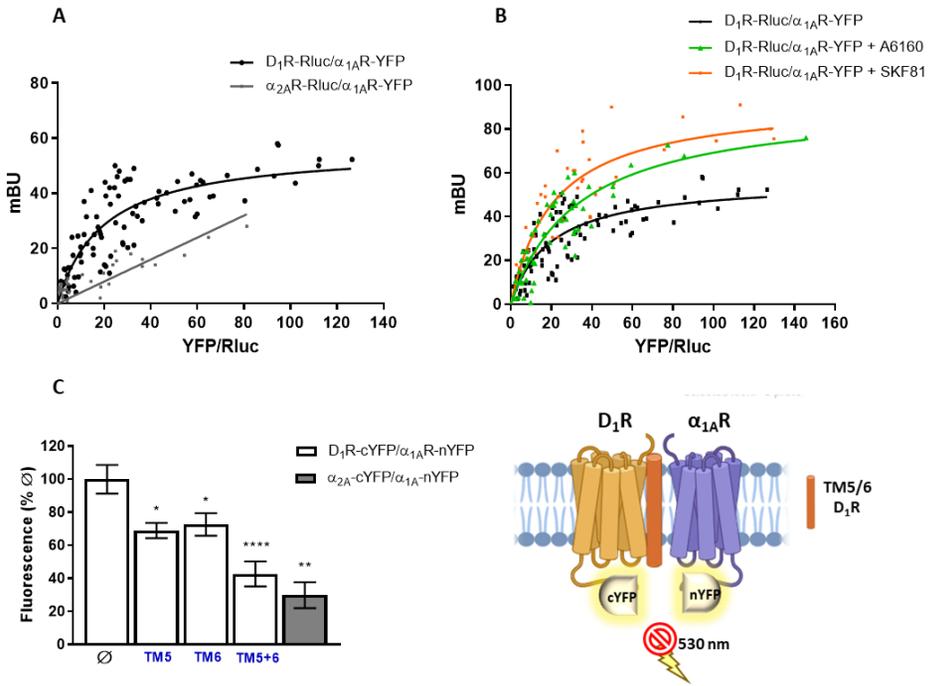


Figura 35. Identificación de heterómeros de receptores α_{1A} y D₁ en células HEK-293 T. A: El ensayo de BRET se realizó en células HEK-293 T transfectadas con una cantidad constante de cDNA para D₁R-Rluc (0,18 μ g) o α_{2A} R-Rluc (0,008 μ g) como control negativo y con cantidades crecientes de cDNA para α_{1A} R-YFP (0,05-2 μ g). C: Las células transfectadas con cantidad constante D₁R-Rluc (0,18 μ g) y con cantidades crecientes de α_{1A} R-YFP (0,05-2 μ g) se trataron durante 10 minutos con vehículo (línea negra) o con 1 μ M del agonista selectivo de α_{1A} R (A61603; línea verde) o con el agonista de D₁ SKF81297; línea naranja). La señal de BRET se expresa en miliunidades de BRET (mBU) de un total de tres a seis experimentos independientes. C: Los ensayos de complementación bimolecular fluorescente se realizaron en células HEK-293T cotransfectadas con el cDNA para D₁R-cYFP (1,5 μ g) y el cDNA para α_{1A} R-nYFP (3 μ g) (barras blancas) o con el cDNA para α_{2A} R-nYFP (1,5 μ g) y el cDNA para α_{1A} R-nYFP (3 μ g) como control negativo (barra gris). Las células se trataron durante 4 horas con vehículo (\emptyset) o con los péptidos TM (4 μ M) 5 y 6 del receptor D₁ solos o en combinación. Los valores basales de fluorescencia (células sin transfectar) se restaron de los valores de fluorescencia obtenidos para cada condición. Los resultados representan la media \pm S.E.M de 3 a 5 experimentos realizados por duplicado y se expresan como el porcentaje de la fluorescencia obtenida en las células D₁R-cYFP/ α_{1A} R-nYFP tratadas con vehículo. La significación estadística se determinó mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett. *P<0,05; **P<0,01; ****P<0,0001 vs \emptyset .

Los datos obtenidos que muestran la formación del heterómero D₁R- α_{1A} R fueron corroborados mediante el ensayo de complementación bimolecular fluorescente (BiFC). Tal como se ha indicado en Materiales y métodos (véase apartado 6), este ensayo se basa en la división de la proteína fluorescente YFP en dos hemiproteínas para a continuación fusionar uno de los fragmentos a cada uno de los receptores de interés.

La detección de señal fluorescente implica la reconstitución de la YFP debida a la interacción entre ambos receptores. Las células se transfectaron con el cDNA correspondiente a D₁R fusionado al extremo c-terminal de la YFP (cYFP) y con α_{1A} R fusionado con la hemiproteína n-terminal (n-YFP). Como control negativo se cotransfectaron las células con los cDNAs para α_{2A} R-cYFP y α_{1A} R-nYFP. Únicamente se pudo detectar señal de fluorescencia en las células cotransfectadas con D₁R-cYFP/ α_{1A} R-nYFP lo que de nuevo pone de manifiesto que estos receptores son capaces de formar complejos entre ellos (Figura 35C).

La especificidad de esta señal fluorescente se comprobó mediante la utilización de péptidos sintéticos con la secuencia aminoacídica de los dominios transmembrana (TM) 5 y 6 de D_{1/5}R. Además, mediante la utilización de estos péptidos TM podemos caracterizar más profundamente el heterodímero mediante la determinación de los dominios TM que participan en la interacción receptor-receptor. La adición de los péptidos TM implicados en la heteromerización impedirán la formación del complejo y por tanto la reconstitución de la YFP y la detección de su fluorescencia. El tratamiento con ambos péptidos produjo una disminución significativa de la señal fluorescente detectada y esta reducción fue incluso mayor cuando las células se trataron con ambos péptidos a la vez (Figura 35C). Estos resultados indican que la interacción entre D₁R y α_{1A} R se produce a través de los dominios transmembrana 5 y 6 del receptor D₁.

2.2 Caracterización funcional del complejo D₁R- α_{1A} R *in vitro*

Una vez demostrada la heteromerización de los receptores se procedió a investigar las consecuencias funcionales y bioquímicas de esta interacción con el objetivo de caracterizar las propiedades específicas de la nueva entidad (*fingerprint*).

2.2.1 Evaluación de la activación de la proteína G mediada por D₁R- α _{1A}R

Para ello realizamos ensayos de BRET de activación de proteína G para identificar posibles modulaciones entre D₁R y α _{1A}R en la activación de sus respectivas proteínas G canónicas, G α _s para ambos y G α _q para α _{1A}R. Se siguió el mismo protocolo descrito en el capítulo anterior. Se cotransfectaron células HEK-293 T con las distintas subunidades de la proteína G heterotrimérica, G α _{s/q}-Rluc8 G γ ₂-Venus y G β ₁ en su forma nativa junto con distintas combinaciones de los receptores de interés (D₁R, α _{1A}R y D₁R- α _{1A}R). Se utilizaron distintos ligandos y se analizaron los cambios sobre sus valores de potencia o eficacia producidos por la interacción entre los protómeros en el heterómero. La activación de la proteína G se cuantificó como los cambios en la señal de BRET producidos por el tratamiento dosis-respuesta del ligando a estudiar.

De acuerdo con lo esperado el agonista selectivo de α _{1A}R, el A61603, y la NE provocaron la activación de G α _q (Figura 36; Tabla 12) y de G α _s (Figura 37A y 3C; Tabla 13) tanto en las células que expresaban α _{1A}R como en las que expresaban D₁R- α _{1A}R. Por su parte, el agonista selectivo de D₁R, el SKF81297, y la DA únicamente indujeron la activación de G α _s a través del receptor D₁ (Figura 37B y D; Tabla 13). La NE mostró cierta promiscuidad ya que también fue capaz de inducir la activación de G α _s mediante la activación de D₁R con una eficacia prácticamente del 100%, pero con una potencia muy baja (Figura 37B; Tabla 13). La especificidad de la activación de cada receptor se comprobó mediante el tratamiento con antagonistas selectivos, SCH23390 para D₁, y prazosín para α _{1A}R, que fueron capaces de bloquear la activación de la proteína G inducida por el respectivo agonista selectivo (Figura 36 y figura 37A-B; 37D-E).

IV. Resultados

Tabla 12. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína G_{α_q} mediada por $\alpha_{1A}R$ y el heterómero $D_1R-\alpha_{1A}R$.

| G_{α_q} | NOREPINEPHRINE | | A6160 | | A6160 + SKF81 | | SCH + A6160 | |
|---------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) |
| $\alpha_{1A}R$ | 80* ± 24 | 100 ± 4 | 1.7 [#] ± 0.12 | 90 ± 7 | 3.2 ± 1 | 98 ± 8 | 2.9 ± 0.7 | 102 ± 1.5 |
| $D_1R-\alpha_{1A}R$ | 158** ± 33 | 100 ± 13 | 5 ± 1.1 | 112 ± 12 | 98* ± 22 | 116 ± 12 | 124** ± 45 | 104 ± 7 |

Potencias (valores de EC₅₀, en nM) y eficacias relativas (E_{max} los valores se representa como un % relativo a la activación de la NE estimadas de las curvas de los ensayos de BRET de activación de G_{α_q} presentadas en la figura 36. Los valores de EC₅₀ y E_{max} se estimaron de curvas sigmoidales de dosis-respuesta ajustadas mediante un análisis de regresión no lineal. Los valores se expresan como las medias ± S.E.M de 2 a 7 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas entre los parámetros estimados para cada tratamiento en el mismo complejo se calcularon mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett contra el ligando que exhibía la mayor potencia (valores de EC₅₀ más bajos) (*P<0,05; ***P<0,001 vs A61603). Las diferencias estadísticas entre los parámetros para un mismo tratamiento entre los distintos complejos se calcularon mediante un análisis de t-student de dos colas ([#]P<0,05 vs $D_1R-\alpha_{1A}R$).

Tabla 13. Parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína G_{α_s} mediada por $\alpha_{1A}R$, D_1R y $D_1R-\alpha_{1A}R$ en respuesta a agonistas adrenérgicos y dopaminérgicos.

| G_{α_s} | DOPAMINE | | NOREPINEPHRINE | | A6160 | | SKF81 | |
|---------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) |
| $\alpha_{1A}R$ | - | - | 58* ± 10 | 100 ± 22 | 1.8 ± 0.6 | 81 ± 6 | - | - |
| D_1R | 167* ± 50 | 100 ± 6 | 4800* ± 1100 | 83 ± 4 | - | - | 5.4 ± 1.4 | 106 ± 24 |
| $D_1R-\alpha_{1A}R$ | 430 ± 25 | 100 ± 13 | 156 ± 32 | 56 ± 19 | 0.36 ± 0.1 | 72 ± 9.5 | 1.8 ± 1 | 61 ± 8 |

Potencias (valores de EC₅₀, en nM) y eficacias relativas (E_{max} los valores se representa como un % relativo a la activación de la DA o la NE ($\alpha_{1A}R$)) estimadas de las curvas de los ensayos de BRET de activación de G_{α_s} presentadas en la figura 37 (A-C). Los valores de EC₅₀ y E_{max} se estimaron de curvas sigmoidales de dosis-respuesta ajustadas mediante un análisis de regresión no lineal. Los valores se expresan como las medias ± S.E.M de 2 a 8 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias estadísticas entre los parámetros estimados para un mismo tratamiento se calcularon mediante un análisis de t-student de dos colas (*P<0,05; **P<0,01 vs $D_1R-\alpha_{1A}R$).

Al comparar la potencia y la eficacia relativa de los distintos ligandos en el heterómero $D_1R-\alpha_{1A}R$ con los valores estimados para D_1R o $\alpha_{1A}R$ se observó un patrón de modulación negativa inducido por la presencia del otro protómero del complejo. Si bien la NE muestra una ligera disminución de su potencia de activación de G_{α_q} en el heterómero en comparación con $\alpha_{1A}R$, estas diferencias no fueron significativas, en cambio sí se

observó un empeoramiento significativo de la potencia de A61603 en las células que expresa el heterómero con respecto a las que expresan $\alpha_{1A}R$ (Figura 36; tabla 12). En la activación de G_{α_s} se produjo una reducción de la potencia tanto de la DA como de la NE respecto a D_1R y $\alpha_{1A}R$, respectivamente, pero no en el caso de los agonistas selectivos, A61603 y SKF81297 (Figura 37; Tabla 13). Cabe destacar que no se observaron modificaciones significativas en las eficacias relativas de los ligandos entre los distintos sistemas de receptores. Estos resultados podrían justificarse por la presencia de una modulación funcional selectiva dependiente del ligando.

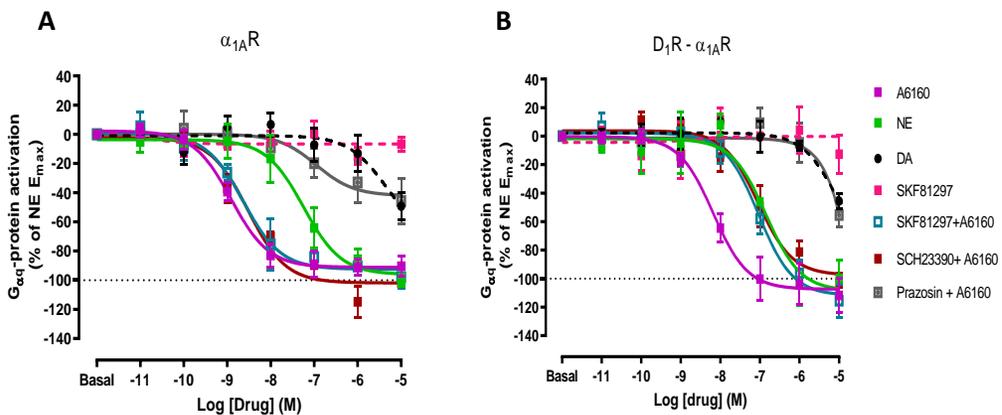


Figura 36. Evaluación de la activación de la proteína G_{α_q} mediada por $\alpha_{1A}R$ y $D_1R-\alpha_{1A}R$. Se realizaron ensayos de BRET de activación dosis-respuesta de la proteína G_{α_q} inducida por distintos ligandos adrenérgicos y dopaminérgicos. Los ensayos se llevaron a cabo en células HEK-293T transfectadas transitoriamente con las subunidades de la proteína G_{α_q} -Rluc8, γ_2 -mVenus y β_1 y el receptor α_{1A} (A) o $\alpha_{1A}R$ y D_1R (B). Se trataron las células con coelenterazine H (5 μ M) y seguidamente con concentraciones crecientes de A61603 (lila), NE (verde), DA (negro), SKF81297 (rosa) solo o en combinación con A61603 (azul). O bien fueron pretratadas con 1 μ M del antagonista D_1R , SCH23390 (rojo) o del antagonista $\alpha_{1A}R$, prazosín (gris), antes del tratamiento con A61603. 10 minutos después del tratamiento se cuantificó la señal de BRET entre las subunidades $G_{\alpha_{i1}}$ -Rluc8 y γ_2 -mVenus como se ha descrito en Materiales y métodos. Los valores basales de BRET (en ausencia de ligandos) se restaron de los valores de BRET obtenidos para cada concentración de agonista. Los valores de BRET se expresan como el porcentaje del efecto máximo inducido por la NE (100%; NE). Los datos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal a una curva sigmoideal de dosis-respuesta y representan las medias \pm S.E.M. de 2 a 7 experimentos realizados por triplicado (en la Tabla 12 se presentan los valores de EC_{50} y E_{max} estimados a partir de cada curva y el análisis estadístico).

Cuando las células $D_1R-\alpha_{1A}R$ se coactivaron con ambos agonistas selectivos se hizo evidente la modulación negativa existente entre estos receptores. El agonista D_1R disminuyó la potencia de activación de G_{α_q} del A61603 (Figura 36B, Tabla 12). Del

mismo modo, el tratamiento simultáneo de ambos receptores para la activación de G_{α_s} mostró una reducción significativa de la potencia obtenida para el SKF81297 o el A61603 (Fig. 37D-E, Tabla 14)

Tabla 14. Efecto del cotratamiento del heterómero D_1R - $\alpha_{1A}R$ con antagonistas y agonistas sobre los parámetros estimados mediante ensayos de BRET de activación de proteína G_{α_s} .

| G_{α_s} | A6160 | | SKF81 | | A6160 + SKF81 | | SCH + A6160 | | Prazo + SKF | |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| | EC ₅₀ (nM) | E _{max} (%) |
| $\alpha_{1A}R$ | 1.8 ± 0.6 | 81 ± 6 | - | - | 0.4 ± 0.9 | 115 ± 16 | 0.8 ± 0.2 | 87 ± 14 | - | - |
| D_1R | - | - | 5.4 ± 1.4 | 106 ± 24 | 6.6 ± 1.7 | 84 ± 15 | | | 11 ± 5.5 | 70 ± 20 |
| D_1R - $\alpha_{1A}R$ | 0.36 ± 0.1 | 72 ± 9.5 | 1.8 ± 1 | 61 ± 8 | 47** ± 0.7 | 55 ± 13 | 1 ± 0.5 | 51 ± 15 | 90 [#] ± 34 | 22* ± 3 |

Potencias (valores de EC₅₀, en nM) y eficacias relativas (E_{max} los valores se representa como un % relativo a la activación de la DA o la NE ($\alpha_{1A}R$)) estimadas de las curvas de los ensayos de BRET de activación de G_{α_s} presentadas en la figura 37 (A, B, D, E). Los valores de EC₅₀ y E_{max} se estimaron de curvas sigmoidales de dosis-respuesta ajustadas mediante un análisis de regresión no lineal. Los valores se expresan como las medias ± S.E.M de 2 a 8 experimentos realizados por triplicado. El efecto del tratamiento con antagonistas o de la coactivación con agonistas se calculó mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un análisis *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett contra el tratamiento con el agonista **P<0,01 vs A61603; #P<0,05 vs SKF.

Con el objetivo de comprobar si la modulación negativa del heterómero se producía de manera bidireccional se estudió el efecto del tratamiento con antagonistas selectivos sobre la activación de la pareja en el heterómero. El antagonista de D_1 SCH23390 bloqueó significativamente la activación de G_{α_q} inducida por A61603 (Figura 37; Tabla 12), así como el prazosín (antagonista de α_1R) abolió casi completamente la activación de G_{α_s} mediada por SKF81297 (Figura 37E; Tabla 14). Curiosamente, el SCH23390 no produjo ningún efecto sobre la activación de G_{α_s} en respuesta a A61603 (Figura 37D; Tabla 14). A pesar de que mediante esta técnica no es posible discernir entre los efectos mediados por los heterómeros o por posibles monómeros o homodímeros de los receptores de interés, el hecho de que los cotratamientos no produzcan ningún efecto en presencia de un solo protómero (Fig. 36A, 37A-B; Tablas 12 y 14) indica que D_1R y $\alpha_{1A}R$ ejercen una modulación negativa entre sí a través de interacciones directas entre ellos.

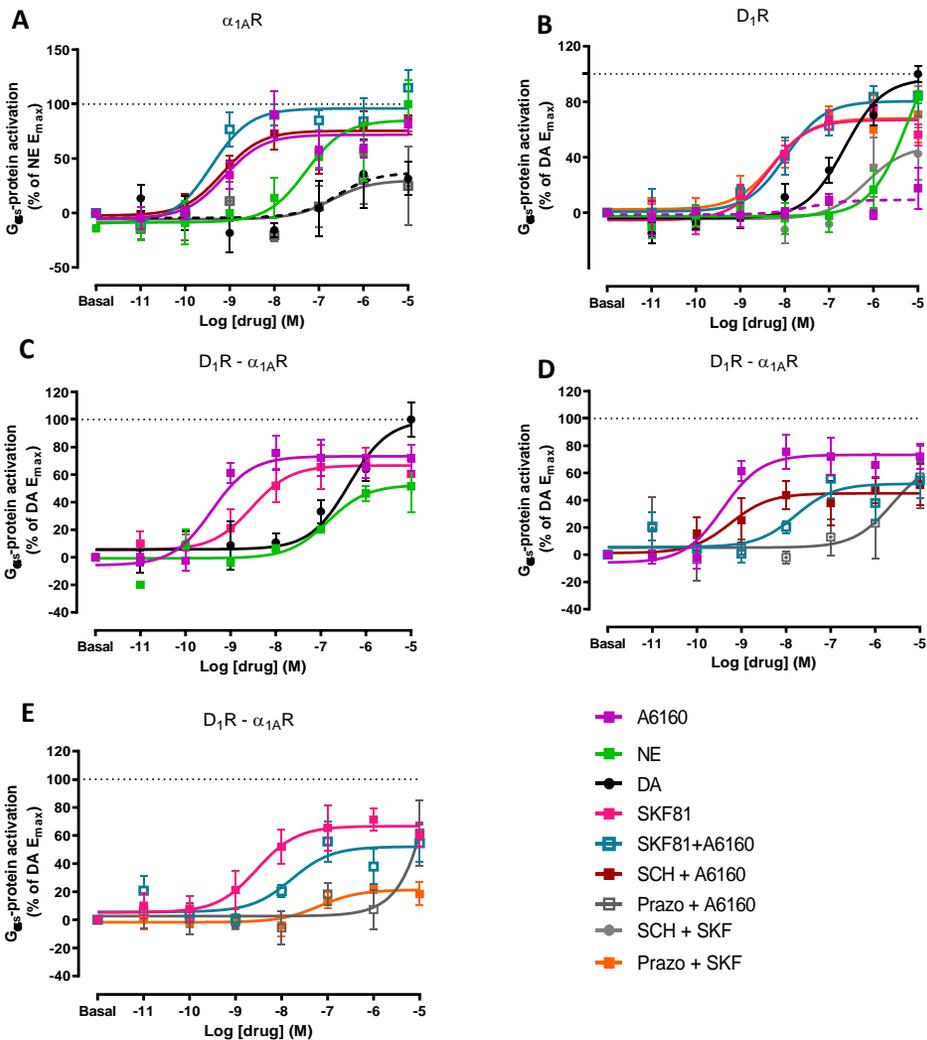


Figura 37. Evaluación de la activación de la proteína G α_s mediada por $\alpha_{1A}R$, D $_1$ R y D $_1$ R- $\alpha_{1A}R$. Se realizaron ensayos de BRET de activación dosis-respuesta de la proteína G α_s inducida por distintos ligandos adrenérgicos y dopaminérgicos. Los ensayos se llevaron a cabo en células HEK-293T transfectadas con las subunidades de la proteína G: G α_s -Rluc8, γ_2 -mVenus y β_1 junto con el receptor α_{1A} (A), D $_1$ (B) o ambos (α_{1A} R-D $_1$ R) (C-E). Se trataron las células con coelenterazine H (5 μ M) y seguidamente con concentraciones crecientes de A61603 (lila), NE (verde), DA (negro), SKF81297 (rosa) solo o en combinación con A61603 (azul). O bien con A61603 en presencia de 1 μ M del antagonista D $_1$ R, SCH23390 (rojo) o del antagonista α_{1A} R, prazosín (gris) (A y D) o SKF81297 en presencia de 1 μ M SCH23390 (gris) o de prazosín (naranja) (B y E). 10 minutos después del tratamiento se cuantificó la señal de BRET entre las subunidades G α_{i1} -Rluc8 y γ_2 -mVenus como se ha descrito en Materiales y métodos. Los valores basales de BRET (en ausencia de ligandos) se restaron de los valores de BRET obtenidos para cada concentración de agonista. Los valores de BRET se expresan como el porcentaje del efecto máximo inducido por la NE (NE E $_{max}$ =100%) (A) o la DA (DA E $_{max}$ = 100%) (B-E). Los datos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal a una curva sigmoideal de dosis-respuesta y representan las medias \pm S.E.M. de 2 a 8 experimentos realizados por triplicado (en las Tablas 8 y 9 se muestran los valores de EC $_{50}$ y E $_{max}$ estimados a partir de cada curva y el análisis estadístico).

2.2.2 Modulación negativa recíproca de vías de señalización del heterómero D₁R- α _{1A}R.

2.2.2.1 Activación de la adenilato ciclasa y movilización de calcio intracelular

A continuación, se caracterizaron las distintas vías de señalización asociadas con la activación de los receptores en el heterómero. El D₁R y el α _{1A}R son capaces de acoplarse e inducir la activación de G α _s (véase apartado anterior). Esta proteína produce la activación canónica de la adenilato ciclasa promoviendo la producción de AMPc intracelular⁴¹⁷. Además, α _{1A}R también es capaz de producir la activación de G α _q, e inducir la liberación de Ca²⁺ intracelular¹³⁹.

En estos ensayos se utilizaron de nuevo células HEK-293 T transfectadas transitoriamente con los cDNAs correspondientes a los receptores de interés. Inicialmente, investigamos el *fingerprint* detectado en los ensayos de activación de proteína G α _s mediante ensayos de acumulación de AMPc. Acorde a los resultados obtenidos en el apartado anterior, los agonistas selectivos A61603 y SKF81297 promovieron la formación de AMPc en células transfectadas con α _{1A}R o D₁R, respectivamente (Figura 38A-B) y ambos fueron capaces de activar la AC en las células transfectadas con ambos receptores (Figura 38C). Por su parte, el tratamiento con A61603 produjo un pico de liberación de calcio intracelular (Figura 38D-E).

La coactivación con agonistas y antagonistas selectivos puso de manifiesto el *fingerprint* del heterómero descrito en el apartado anterior. De nuevo, los cotratamientos no causaron ningún efecto en presencia de un solo protómero lo que demuestra que los posibles efectos son provocados por interacciones receptor-receptor (Figura 38A, B, D). El cotratamiento con A61603+SKF81297 produjo niveles de AMPc intracelular menores que la suma del efecto individual de cada ligando, lo que indica de nuevo la presencia de una modulación negativa entre los receptores (Figura 38C). Igualmente, la activación

del receptor D_1 disminuyó la liberación de calcio intracelular mediada por $\alpha_{1A}R$ (Figura 38E). El antagonista selectivo de D_1R , SCH23390, bloqueó la producción de AMPc inducida por la activación de D_1R , lo que confirma la especificidad de la señal (Figura 38B-C). Al mismo tiempo, el SCH23390 fue capaz de inhibir la liberación de calcio intracelular en el heterómero inducida por A61603, pero no la producción de AMPc intracelular (Figura 38C, 4E). Estos resultados coinciden con los obtenidos en los ensayos de activación de proteína G, y de nuevo sugieren la selectividad funcional del SCH23390 en la modulación del heterómero. Por último, el prazosín (antagonista de α_1R) bloqueó la liberación de calcio intracelular (Figura 38D-E) y la producción de AMPc inducida por A61603 (Figura 38A, 38C), así como la activación de la AC en respuesta a la estimulación con SKF812997 en el heterómero (Figura 38C).

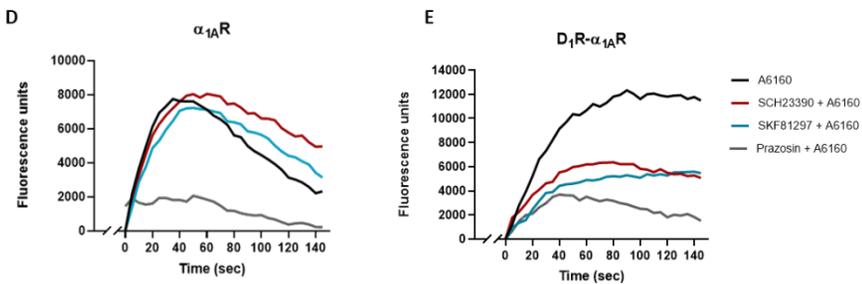
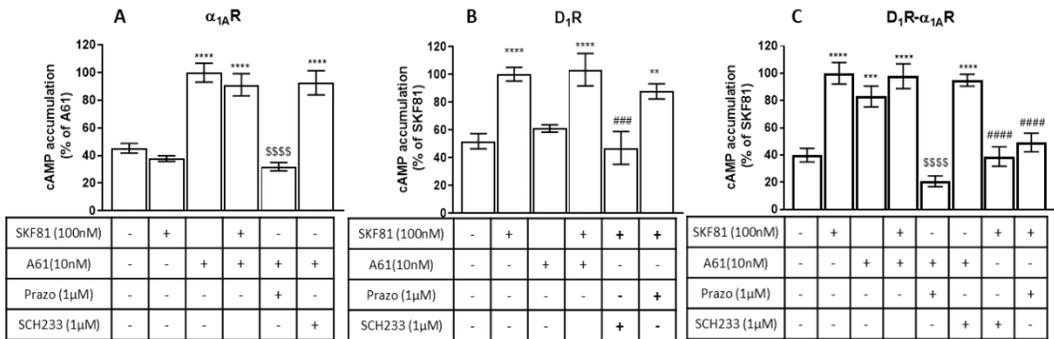


Figura 38. La coactivación del heterómero D₁R- α_{1A} R modula negativamente su señalización. Se analizó la modulación de la adenilato ciclasa (A-C) y la movilización de calcio intracelular (D-E) en respuesta a ligandos adrenérgicos y dopaminérgicos en células HEK-293T transfectadas con el cDNA de los receptores α_{1A} (A y D), D₁ (B) o α_{1A} y D₁ (C y E)). A-C: Las células fueron tratadas con el agonista α_{1A} R, A61603 (10 nM) o con el agonista D₁, SKF81297 (100 nM) en presencia y en ausencia del antagonista de α_{1A} R, prazosín (1 μ M) o del antagonista D₁ SCH23390 o bien fueron coactivadas con A61603+SKF81297. Los valores representan la media \pm S.E.M de 3 a 5 experimentos y se expresan como un % del AMPc inducido por A6160 (A) o SKF81297 (B-C). Las diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos se evaluaron mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un análisis *post-hoc* de comparación múltiple de Dunnett (**P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001 vs células no tratadas; ###P<0,001; ####P<0,0001 vs SKF81297; §§§§P<0,0001 vs A61603). D-E: Además de con los receptores D₁ y α_{1A} las células se cotransfectaron con el sensor de calcio GCaMP6. Las células se activaron con el agonista A61603 (20 nM) solo (línea negra) o en combinación con SKF81297 (azul), o bien fueron pretratadas con 60 nM de SCH23390 (60 nM, línea roja) prazosín (línea gris) antes de la activación con A61603. D y E muestran curvas representativas de liberación de calcio intracelular a lo largo del tiempo de un N = 3-5 experimentos.

2.2.2.2 Estudio de la respuesta celular global mediante DMR

Para finalizar con la caracterización de la señalización dependiente de proteína G se evaluó la respuesta celular global mediada por la activación del heterómero D₁R- α_{1A} R. Para ello se transfectaron las células HEK-293 T con los cDNAs correspondientes para los receptores D₁ y α_{1A} y se realizó un ensayo de distribución dinámica de masa (DMR) siguiendo el protocolo detallado en Materiales y métodos. Los resultados mostraron el *fingerprint* característico que se ha descrito en los apartados anteriores, la coactivación con los agonistas no produjo un efecto aditivo de las señales obtenidas para cada agonista solo (Figura 39A). El prazosín fue capaz de bloquear la activación inducida por el SKF81297 (Figura 39C) en cambio, el SCH23390 solo produjo una leve inhibición de la activación producida por A61603 (Figura 39B).

Mediante este ensayo se analiza la respuesta celular global, es decir que la señal detectada tras el tratamiento con A61603 engloba la activación tanto de proteínas G α_q como G α_s , de modo que la leve modulación negativa producida por el SCH23390 se asociaría a la capacidad de este antagonista del receptor D₁ de inhibir la señalización mediada por G α_q en el heterómero. El hecho de que esta modulación sea mínima podría sugerir que el A61603, en este caso, está activando principalmente la proteína G α_s , lo que sugiere que este ligando presenta también cierta selectividad funcional. Esto sería

consistente con las potencias obtenidas para este ligando en cada una de las subunidades de la proteína G, 0,36 nM para la subunidad $G\alpha_s$ y 5 nM para $G\alpha_q$.

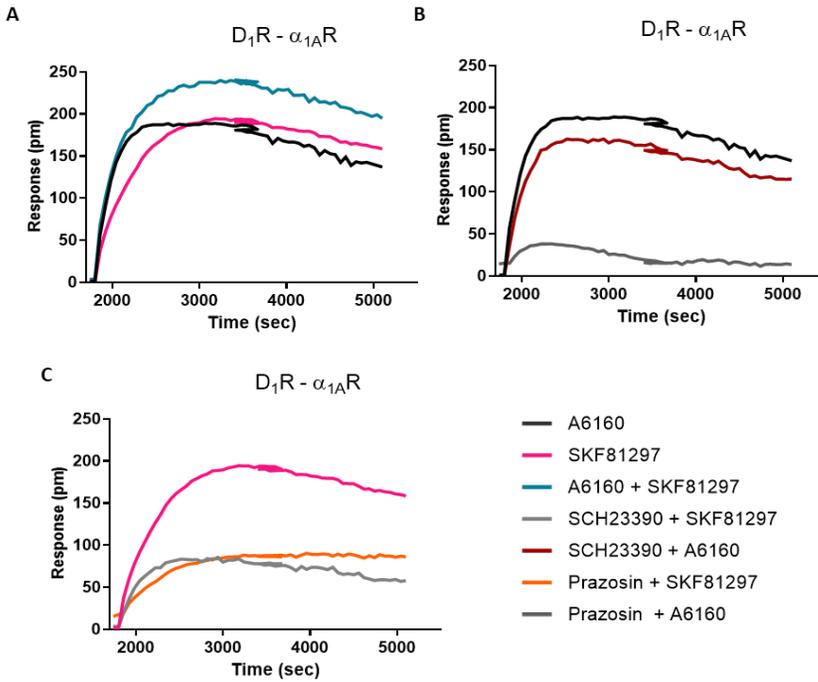


Figura 39. Efecto de la coactivación del heterómero $D_1R - \alpha_{1A}R$ en la activación celular global. El ensayo de DMR se llevó a cabo en células HEK-293 T transfectadas transitoriamente con los cDNAs correspondientes al receptor D_1 y α_{1A} . A: Se trataron las células con los agonistas A61603 (1 nM, negro) y SKF81297 (rosa) solos o en combinación (azul). B: Las células se pretrataron durante 30 minutos con 1 μ M de prazosín (gris) o de SCH23390 (rojo) antes de la activación con A61603 (negro). C: Se pretrataron las células 30 minutos con 1 μ M de prazosín (naranja) o de SCH23390 (gris) antes de la activación con SKF81297 (rosa). Las gráficas muestran curvas representativas de 4 experimentos diferentes realizados por triplicado.

2.2.2.3 Estudio de la activación de la vía de las MAPK

Por último, estudiamos las interacciones funcionales entre D₁R y α_{1A} R en la activación de la vía de las MAPK. Para ello se utilizaron células cotransfectadas con ambos receptores y se determinó el nivel de fosforilación de ERK1/2 (pERK 1/2) inducido por la activación con ligandos selectivos (Figura 40). El tratamiento con los agonistas selectivos, A61603 y SKF81297, provocó la activación de la vía de las MAPK, y dio lugar al incremento de los niveles de pERK 1/2. El tratamiento simultáneo del heterómero D₁R- α_{1A} R con ambos agonistas proporcionó el mismo patrón de modulación negativa recíproca reportado para las vías de señalización asociadas a proteína G. La coactivación A61603 + SKF81297 provocó una fuerte modulación negativa ya que se generaron niveles de pERK 1/2 significativamente menores a los obtenidos mediante el tratamiento con cada uno de los agonistas por separado. Del mismo modo, los antagonistas selectivos, SCH23390 y prazosín, fueron capaces de inhibir la activación de MAPK inducida tanto por el agonista del su mismo receptor como por el agonista de la pareja (Figura 40).

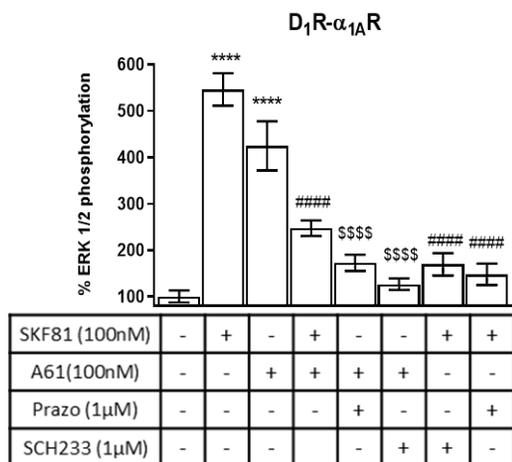


Figura 40. Evaluación de la fosforilación de ERK 1/2 inducida por la activación del heterómero D₁R- α_{1A} R.

La fosforilación de ERK1/2 se analizó en células HEK-293 T cotransfectadas con el cDNA de los receptores α_{1A} y D₁R. Se trataron las células con 100 nM de los agonistas SKF81297 y A61603 solos o combinados durante 10 minutos a 37°C o se pretrataron con 1 µM de los antagonistas SCH23390 o prazosín durante 15 minutos previos al tratamiento con los agonistas. Se cuantificaron las bandas inmunorreactivas correspondientes a ERK 1/2 y los valores representan la media \pm S.E.M de 4 a 8 experimentos y se expresan como un porcentaje de la ratio pERK1/2 versus ERK1/2 totales en función de los niveles basales de fosforilación (células no tratadas; 100%). Para realizar en análisis estadístico se utilizó un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett (****P<0,0001 vs células no tratadas; ####P<0,0001 vs tratamiento con SKF81297; \$\$\$\$P<0,0001 vs tratamiento con A61603).

2.3 Caracterización funcional *ex vivo* de los complejos D_{1/5}R- α _{1A}R en tejido cerebral de rata

Tras haber caracterizado funcionalmente el heterómero D₁R- α _{1A}R *in vitro* quisimos demostrar la existencia de estos heterómeros en tejido cerebral nativo, concretamente en la corteza prefrontal y el estriado de rata, dos regiones altamente interconectadas entre ellas y críticas para la regulación de los procesos atencionales. Se evaluó la activación de MAPK en cortes estriatales y corticales de rata en busca de los patrones funcionales descritos *in vitro*, es decir, del *fingerprint* del heterómero que nos permita corroborar la presencia del complejo. Debido a la gran homología estructural existente entre los receptores de la familia D₁-like, actualmente no se dispone de ligandos específicos para D₁R o D₅R por lo que los estudios farmacológicos llevados a cabo *ex vivo* o *in vivo* no permiten discernir entre ambos receptores.

El tratamiento de los cortes cerebrales con los agonistas A61603 o SKF81297 provocó un incremento de los niveles de pERK1/2, lo que demuestra la presencia de los receptores de interés en las regiones estudiadas (Figura 41A-B). Se detectó el *fingerprint* descrito para el heterómero tanto en estriado como en la corteza de rata. La activación de MAPK inducida por los agonistas fue abolida tanto por el antagonista del mismo receptor como por el antagonista de la pareja y la coactivación con ambos agonistas produjo una activación menor que la suma de las señales individuales (Figura 41A-B).

Para comprobar que las modulaciones detectadas están mediadas por la interacción directa entre los receptores en el heterómero, se trataron los cortes estriatales y corticales con péptidos transmembrana con la secuencia aminoacídica correspondiente a los dominios transmembrana 4-6 de D_{1/5}R y α ₁R. El tratamiento con el péptido/s implicados en la interacción entre los receptores evitará la formación del heterómero y, por consiguiente, del *fingerprint*. Se analizó el efecto de los distintos péptidos sobre la modulación negativa ejercida por D_{1/5}R sobre α _{1A}R mediante el tratamiento con

IV. Resultados

SCH23390 + A61603. El tratamiento con los distintos péptidos no produjo ninguna interferencia en la activación de MAPK mediada por los agonistas. De acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro* en los ensayos de complementación bimolecular fluorescente, los péptidos TM5 y TM6 de $D_{1/5}R$ evitan la formación del heterómero, lo que se traduce en la pérdida de la modulación negativa ejercida por el SCH23390 (Figura 41C-F). Coincidiendo con estos resultados, el tratamiento con los péptidos TM5 y TM6 de α_1R también evitó la formación del heterómero y la pérdida del *fingerprint* en el estriado, en cambio, solo el TM5 provocó la ruptura del heterómero en la corteza (Figura 41C-F).

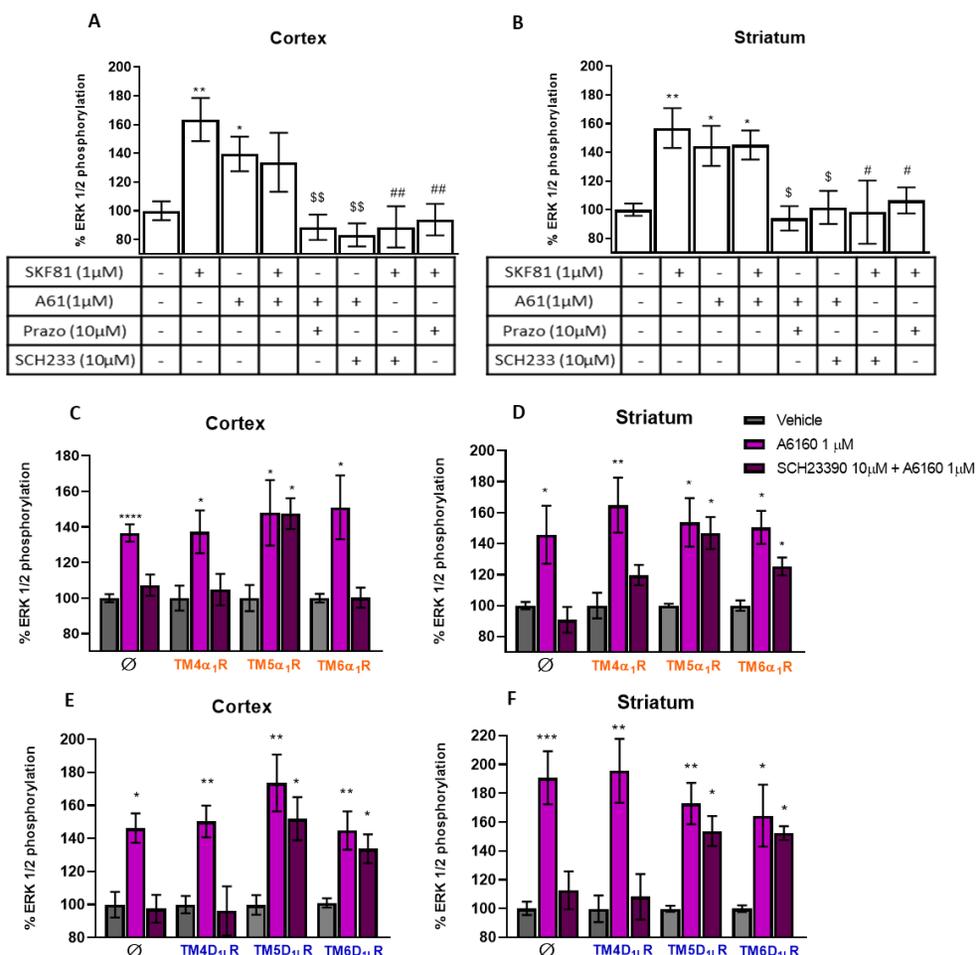


Figura 41. Caracterización funcional del complejo D_{1/5}R- α _{1A}R en estriado y corteza de rata. Se analizó el nivel de fosforilación de ERK 1/2 en cortes cerebrales de rata como se explica en Materiales y métodos. A-B: Los cortes de corteza (A) y estriado (B) se trataron o no durante 10 minutos con los agonistas SKF81297 y A61603 (1 μ M) solos o en combinación, o bien fueron pretratados durante 20 minutos con el antagonista SCH23390 o prazosín (10 μ M) antes de la activación con los agonistas. C-F: Los cortes fueron incubados durante 4 horas con vehículo (\emptyset) o con los péptidos TM (4 μ M) correspondientes a los dominios TM 4-7 de los receptores D_{1like} o α ₁. A continuación, se trataron durante 10 minutos con vehículo (barras negras) o con A61603 (1 μ M) solo o en presencia de SCH23390 (10 μ M, durante 20 min). Se cuantificaron las bandas inmunorreactivas correspondientes a ERK 1/2. Los valores representan la media \pm S.E.M de 2 experimentos realizados por cuadruplicado y se expresan como un porcentaje de la ratio pERK1/2 versus ERK1/2 totales en función de los niveles basales de fosforilación (cortes no tratados con ligandos; 100%). A-B: Se analizó la significación estadística mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett (*P <0,05; **P<0,01 vs cortes no tratados; #P<0,05; ##P<0,01 vs tratamiento con SKF81297; \$P<0,05; \$\$P<0,01; vs tratamiento con A61603). C-F: Según un análisis *two-way* ANOVA seguido de un test *post-hoc* de comparación múltiple de Bonferroni el tratamiento con los péptidos transmembrana no influyó a la fosforilación inducida por los agonistas en comparación a los cortes tratados con vehículo (\emptyset). Las diferencias estadísticas contra la activación inducida por A61603 se calcularon mediante un análisis *one-way* ANOVA seguido de un test *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001).

2.4 El receptor D₅ forma heterómeros funcionales con α _{1A}R

Tras haber detectado funcionalmente la formación de complejos entre los receptores D_{1/5} y α _{1A}R quisimos estudiar si el receptor D₅ también era capaz de interactuar funcionalmente con α _{1A}R para poder determinar su implicación en los resultados obtenidos *ex vivo*.

La interacción entre los receptores D₅ y α _{1A} se demostró mediante ensayos de BRET. Se transfectaron células HEK-293 T con cantidades constantes del cDNA correspondiente a D₅R-Rluc y cantidades crecientes del cDNA que codifica para el receptor α _{1A}R-YFP y se obtuvieron curvas de saturación de BRET (BRET_{max} = 41 \pm 3; BRET₅₀ = 22 \pm 5) indicativas de la interacción específica entre los receptores (Figura 42A). Una vez demostrada la formación del heterómero D₅R- α _{1A}R procedimos con la evaluación funcional de este complejo mediante el estudio de la activación de la vía de las MAPK en células HEK-293 T transfectadas transitoriamente con ambos receptores. Los resultados mostraron una modulación negativa recíproca similar a la descrita en el heterómero D₁- α _{1A}. El tratamiento con antagonistas selectivos (SCH23390 o prazosín) fueron capaces de bloquear tanto la señalización inducida por el agonista del mismo receptor como la

inducida por el agonista de la pareja. Sin embargo, al estimular conjuntamente ambos receptores con los agonistas (A61603 + SKF81297) no se observó la modulación negativa característica del heterómero $D_1\text{-}\alpha_{1A}$; esto es, se generaron niveles de pERK1/2 equivalentes a la suma de las señales individuales de cada agonista (Figura 42B). Estos datos indican que los resultados observados tanto en estriado y corteza de rata estarían mediados en gran parte por el complejo $D_1\text{-}\alpha_{1A}$, ya que, aunque la modulación negativa producida por coactivación con agonistas es menor a la observada en células, la respuesta es mucho menor a la suma de las señales individuales. Sin embargo, no se puede descartar la participación del heterómero $D_5R\text{-}\alpha_{1A}R$ en la regulación de la señalización corticoestriatal.

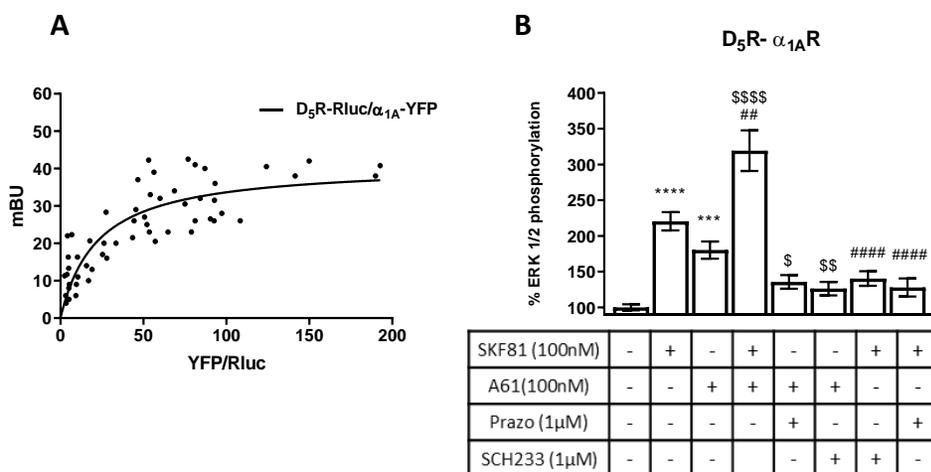


Figura 42. Identificación y caracterización funcional del heterómero $D_5R\text{-}\alpha_{1A}R$ en células HEK-293 T. A:

El ensayo de BRET se llevó a cabo en células HEK-293 T transfectadas con una cantidad constante de cDNA para $D_5R\text{-Rluc}$ (0.35 μ g) y cantidades crecientes de cDNA para $\alpha_{1A}R\text{-YFP}$ (0.05-1.5 μ g). La señal de BRET se expresa en mili unidades de BRET (mBU) de un total de tres a seis experimentos independientes. **B:** La fosforilación de ERK1/2 se analizó en células HEK-293 T cotransfectadas con el cDNA de los receptores α_{1A} y D_5R . Se trataron las células con 100 nM de los agonistas SKF81297 y A61603 solos o en combinación durante 10 minutos a 37°C o se pretrataron con 1 μ M de los antagonistas SCH23390 o prazosín durante 15 minutos previos al tratamiento con los agonistas. Se cuantificaron las bandas inmunorreactivas correspondientes a ERK 1/2 y los valores representan la media \pm S.E.M de 4 a 8 experimentos y se expresan como un porcentaje de la ratio pERK1/2 versus ERK1/2 totales en función de los niveles basales de fosforilación (células no tratadas; 100%). Para realizar en análisis estadístico se utilizó un análisis one-way ANOVA seguido de un test post hoc de comparación múltiple de Dunnett (**P < 0,001; ****P < 0,0001 vs células no tratadas; #####P < 0,0001 vs tratamiento con SKF81297; \$P < 0,05; \$\$\$P < 0,01 vs tratamiento con A61603).

V. Discusión

La atención es un proceso cognitivo básico que nos otorga la capacidad de seleccionar aquella información interna (pensamientos o recuerdos) o externa que es relevante para la toma de decisiones y el control del comportamiento¹⁻³. El control de atencional y de otras habilidades cognitivas esenciales como el control de la conducta cognitiva y motora y de la memoria de trabajo se orquesta esencialmente desde la PFC a través de múltiples conexiones corticales y subcorticales. La PFC mantiene activamente las representaciones de nuestros objetivos, las cuales van siendo actualizadas en función de nueva información o nuevos objetivos. Fallos en la actualización de dichas representaciones se traducen en comportamientos perseverantes, mientras que los fallos en su mantenimiento producen distraibilidad.

La dopamina (DA) y norepinefrina (NE) son catecolaminas que inervan múltiples regiones cerebrales, entre las que se encuentra la PFC. Los sistemas DAérgico y NEérgico se encuentran altamente relacionados y actúan de manera cooperativa en la regulación de múltiples procesos tales como la atención, las funciones ejecutivas, la motivación, la recompensa y el control motor. La desregulación de los sistemas de catecolaminas, especialmente alteraciones DAérgicas, se han relacionado con un elevado número de patologías neuropsiquiátricas como ciertos trastornos del neurodesarrollo, como el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), el síndrome de Gilles de la Tourette (SGT), los trastornos del espectro autista (TEA) o el trastorno obsesivo compulsivo (TOC).

La DA y la NE ejercen sus efectos fisiológicos a través de la unión a distintos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) pre- y postsinápticos. Los GPCRs son proteínas de membrana capaces de ser activadas por una amplia variedad de estímulos que incluyen fotones, iones, moléculas odorantes, gustantes, hormonas y neurotransmisores³⁴⁷. Estos receptores son capaces de transducir señales extracelulares y modular diversas vías de señalización mediante su interacción con

distintas proteínas efectoras que regulan, en última instancia, múltiples procesos fisiológicos, por lo resultan de gran interés terapéutico.

Actualmente está ampliamente aceptado que los miembros de esta familia de receptores tienen la capacidad de interactuar entre ellos, así como con otras proteínas, a nivel de la membrana plasmática para formar complejos homodiméricos, heterodiméricos u oligoméricos. La oligomerización constituye un proceso clave para la modulación de la transducción de señales ya que estas interacciones pueden afectar a las propiedades básicas de los protómeros, como a su conformación, a sus propiedades bioquímicas o funcionales o a su internalización. Así, la interacción entre GPCRs genera una nueva entidad funcional distinta a los receptores que la conforman la cual presenta propiedades farmacológicas y/o funcionales específicas (*fingerprint*).

Los resultados que se presentan en esta Tesis demuestran la importancia de la formación de oligómeros en la regulación de la señalización y la selectividad funcional de los receptores de DA y NE. La señalización adecuada de estos sistemas de neurotransmisores es esencial para correcto funcionamiento de la PFC y de sus conexiones intra- y subcorticales. Los datos obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis podrían ser relevantes para la comprensión de la regulación y el control de procesos cognitivos superiores y de su posible papel en la fisiopatología de distintos trastornos del neurodesarrollo.

El gen del receptor de dopamina D_4 (*DRD4*) humano exhibe numerosos polimorfismos que dan lugar a distintas variantes de dicho receptor, siendo los más comunes aquellos que presentan cuatro o siete ($D_{4.4R}$ y $D_{4.7R}$) repeticiones de una secuencia de 16 aminoácidos en su tercer bucle intracelular (ICL3). Numerosas investigaciones han vinculado este polimorfismo con una mayor susceptibilidad para padecer TDAH^{102,105} y en menor medida con el TEA²⁴⁶, el TOC^{249,250} y el SGT^{255,318}.

A pesar de la existencia de diversos estudios^{106,108–110,112,114,116} para determinar relevancia funcional de la variante de riesgo $D_{4.7}R$, no se han descrito diferencias funcionales evidentes entre ambas variantes del receptor D_4 que expliquen su relación con los trastornos del neurodesarrollo. Debido a ello, ciertos autores se han centrado en evaluar la interacción de este receptor con distintos sistemas de neurotransmisión^{400,422,423}, y en base a ello han postulado que las principales diferencias entre ambos polimorfismos serían dependientes de la heteromerización de los mismos con otros receptores^{106,107}.

El año 2012 González y colaboradores describieron la capacidad del receptor D_4 para formar heterodímeros con distintos GPCRs^{400,422}. Por una parte, identificaron mediante técnicas bioquímicas y biofísicas en sistemas de transfección heterólogos, y mediante experimentos *ex vivo* en la glándula pineal, la existencia de heterodímeros D_4R - $\alpha_{1B}R$ y D_4R - β_1 . Establecieron que la DA es capaz de inhibir la señalización adrenérgica mediante su acción sobre estos complejos, bloqueando así la síntesis de melatonina y participando en la regulación del ciclo circadiano⁴⁰⁰. Por otra parte, describieron importantes diferencias entre las variantes de D_4R que pueden ser esenciales para una mejor comprensión del riesgo asociado a al polimorfismo $D_{4.7}R$ para padecer TDAH⁴²². Así, definieron la formación de heterómeros $D_{4.4}R$ - $D_{2s}R$ en células transfectadas y estriado de ratón. Funcionalmente, la interacción entre $D_{4.4}R$ y $D_{2s}R$ dio lugar a la potenciación de la señalización mediada por MAPK en experimentos *in vitro* y *ex vivo* en el estriado de ratón donde actuarían regulando negativamente la liberación de glutamato. Sin embargo, la variante de riesgo $D_{4.7}R$ resultó ser incapaz de formar heterómeros funcionales con $D_{2s}R$ *in vitro* y en tejido nativo de estriado proveniente de un modelo de ratón *knock-in* portador del receptor humano $D_{4.7}$ ⁴²². Cabe destacar que un estudio reciente ha puesto en evidencia la incapacidad de $D_{4.7}R$ para interactuar funcionalmente con $D_{2s}R$ mediante ensayos de CODA-RET (complemented donor-

acceptor resonance energy transfer), experimentos basados en ensayos de BRET que permiten la cuantificación de los cambios inducidos por la unión de un ligando en la interacción ente un homo- o heterómero con su proteína G⁴²⁴. Igualmente, se han reportado diferencias funcionales clave dependientes de isoforma que muestran un efecto diferencial de las isoformas sobre la actividad constitutiva de D_{2s}R, y un incremento y una disminución tras la interacción directa con D_{4.7}R o D_{4.4}R, respectivamente.¹⁰⁷

El descubrimiento de la habilidad de heteromerización del receptor D₄ con otros receptores, junto con las diferencias funcionales descritas entre sus polimorfismos dependientes de su heterodimerización y su capacidad para regular la señalización noradrenérgica plantea la posibilidad de que estas isoformas interaccionen diferencialmente con otros GPCRs y sea a través de estas interacciones receptor-receptor donde se vislumbre la relevancia funcional de la variante D_{4.7}R. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro primer objetivo fue elucidar la existencia y las posibles consecuencias funcionales de la interacción directa entre los receptores D_{4.4}R y D_{4.7}R con el receptor adrenérgico α_{1A} R.

Los resultados expuestos en el primer capítulo titulado, **“Diferencias funcionales entre el receptor de dopamina D_{4.4}R y la variante asociada a TDAH- D_{4.7}R dependientes de su heteromerización con el adrenoceptor α_{1A} ”** demuestran, por primera vez, mediante técnicas biofísicas y bioquímicas, la existencia de heterodímeros funcionales formados por el receptor adrenérgico α_{1A} R y ambas variantes del receptor D₄, D_{4.4}R y D_{4.7}R. Además, se describen diferencias funcionales entre ambas variantes dependientes, no solo en su heteromerización con α_{1A} R, sino de la vía de señalización estudiada (Figura 43).

Mediante ensayos de BRET se demostró la capacidad de interacción entre ambas variantes de D₄R con α_{1A} R. Los parámetros estimados a partir de las curvas de BRET

revelaron una disminución del valor de $BRET_{max}$ en el heterómero $D_{4.7}R-\alpha_{1A}R$ en comparación con la pareja $D_{4.4}R-\alpha_{1A}R$. Este dato, se relaciona con una menor transferencia de energía, sin embargo, no implica necesariamente la existencia de un menor número de complejos ya que este parámetro no representa un valor cuantitativo del número de heterómeros. El valor de $BRET_{max}$ mide la transferencia de energía y esta se puede ver afectada tanto por el número de complejos formados, como por la distancia entre las proteínas de fusión o la orientación que adoptan éstas en el heterómero ⁴¹². En nuestro caso esta distancia también podría verse alterada por la mayor longitud del tercer bucle intracelular de la variante $D_{4.7}R$. Estudios recientes de heteromerización de las variantes de D_4R con el receptor adrenérgico α_{2A} revelaron una menor afinidad relativa (valores más elevado de $BRET_{50}$) del polimorfismo $D_{4.7}R$ para formar heterómeros con α_{2A} en comparación con $D_{4.4}R$ ⁴¹¹. Asimismo también se ha reportado una menor tendencia de $D_{4.7}R$ para formar homodímeros en comparación con las variantes más cortas¹²⁰, así como la incapacidad de esta variante para formar heterómeros con $D_{25}R$ ⁴²². Estos datos junto con la disminución de la B_{max} descrita en esta Tesis sugiere que el ICL3 más largo presente en el $D_{4.7}R$, en cierto modo, entorpece su capacidad para establecer interacciones receptor-receptor. Paralelamente, se quiso explorar la relevancia biológica de estas interacciones para lo que se demostró la existencia de complejos $D_4R-\alpha_{1A}R$ *ex vivo* mediante ensayos de PLA en la corteza y el estriado de rata. De esta manera se pone de manifiesto la relevancia fisiológica de los resultados descritos en este capítulo.

Mediante ensayos de BRET por activación de proteína G se definió el patrón de activación de los receptores individuales y se demostró la existencia de complejos funcionales capaces de activar diversas proteínas G en sistemas de transfección heterólogos. Por una parte, las variantes de D_4R presentan el mismo perfil bioquímico y potencias equivalentes para la activación de la proteína $G\alpha_{i1}$ en

respuesta a los ligandos endógenos, DA y NE. Como se ha descrito anteriormente, los resultados sobre las diferencias en las propiedades bioquímicas entre las isoformas del receptor D_4 han resultado ser contradictorias^{106,110,379} (véase Tabla 1). Los estudios más recientes apoyan que las variantes del receptor D_4 no muestran diferencias en su habilidad para reclutar proteínas β -arrestina¹¹⁰ ni para inducir la activación de su proteína G canónica¹⁰⁷ tras la estimulación con ligandos. Nuestros resultados aportan nuevas evidencias que confirman que los receptores individuales no presentan diferencias en su capacidad de activación de la proteína G^{107,115,116} y que las diferencias funcionales observadas entre las isoformas podrían depender de su heteromerización¹⁰⁶.

Por otro lado, hemos descrito que la variante $D_{4.4}R$ presenta un perfil funcional único asociado a su heteromerización con $\alpha_{1A}R$. Se ha comprobado que $\alpha_{1A}R$ es capaz de unirse no solo a la proteína $G\alpha_q$, sino también a $G\alpha_s$ y que el perfil de potencias, tanto de la NE como del ligando sintético selectivo A61603, es similar en ambos casos. En la interacción directa entre el $\alpha_{1A}R$ y $D_{4.4}R$, $D_{4.4}R$ actúa como un modulador alostérico e induce un cambio en la selectividad funcional de $\alpha_{1A}R$, que se pone de manifiesto por un marcado incremento de la potencia de dichos ligandos para la activación de $G\alpha_s$ en comparación con $G\alpha_q$. Este hecho indica que, en el complejo $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$, la activación de $\alpha_{1A}R$ señala preferencialmente vía $G\alpha_s$. Además, la interacción receptor-receptor también incrementó la potencia de la DA para activar a la proteína $G\alpha_i$ mediante su unión a $D_{4.4}R$. En el heterómero $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$ este fenómeno se observa únicamente en el caso de la activación inducida por NE y en niveles significativamente menores que en el complejo $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$, lo que indica que la variante $D_{4.7}R$ podría estar produciendo una modulación alostérica menor sobre el receptor adrenérgico. En concordancia con nuestros resultados, la pérdida de modulación alostérica por parte de la variante $D_{4.7}R$ también se hace patente tras su heteromerización con el receptor adrenérgico α_{2A} ⁴¹¹. En este estudio, se define la

capacidad de la variante D_{4,4}R para modular alostéricamente a α_{2A} R e impedir la activación de G α_i inducida por los ligandos adrenérgicos sintéticos guanfacina, dexmetomidina y clonidina. Por el contrario, el perfil de funcional descrito para complejo D_{4,7}R- α_{2A} R fue equivalente al obtenido para el homómero α_{2A} R- α_{2A} R⁴¹¹.

Los mecanismos que determinan la selectividad de los GPCRs para interactuar con una proteína G presentan un gran interés, sobre todo en los receptores capaces de activar distintos subtipos de proteína G. Se ha descrito que la dimensión del movimiento de la hélice transmembrana 6 (TM6) del GPCRs activado por un agonista es capaz de modular el acceso de la proteína G, y junto con la secuencia aminoacídica de la cola C-terminal de la proteína G determinan fundamentalmente la selectividad de los GPCRs⁴²⁵⁻⁴²⁸. Nuestros resultados *ex vivo* demuestran que los dominios TM4 y TM6 de D₄R y α_{1A} R participan en la interacción del complejo. Estos resultados coinciden con los previamente descritos para los heterodímeros D₄R- α_{2A} R, para los que se ha descrito que la interfaz de interacción se produce a través del TM4 de D₄R. Desafortunadamente en aquel estudio no se evaluó la posible participación del TM6⁴¹¹. La capacidad de heteromerización del receptor D₂ con el receptor de adenosina A_{2A} ha sido ampliamente estudiada debido a su posible participación en distintos trastornos neurodegenerativos^{429,430}. Funcionalmente, la interacción molecular entre estos receptores se caracteriza por la presencia de una modulación alostérica negativa⁴³⁰, en la que los efectos alostéricos derivados de la interacción receptor-receptor en este complejo son abolidos tras la inserción de mutaciones específicas en el IL3 de D₂R. Este hecho indica que esta región juega un papel clave en las interacciones alostéricas del complejo D₂-A_{2A}⁴²⁹. Debido a la elevada similitud entre los receptores de la familia D_{2-like} a nivel tanto estructural como funcional, la región del IL3 del receptor D₄ también podría jugar un papel esencial en su interacción con otros receptores. De hecho, se ha descrito que el tercer bucle intracelular más largo de la variante D_{4,7}R genera un incremento del índice de desorden presente en esta región en comparación con las isoformas más

cortas ¹¹³. Esta mayor longitud y desorden podrían interferir en su capacidad de modular alostéricamente a $\alpha_{1A}R$ o entorpecer la magnitud del movimiento de su TM6 implicado en la selectividad de los GPCRs.

Inicialmente se describió que la activación de α_1R se producía como respuesta a situaciones de estrés, debido a su baja afinidad relativa por la NE, dando lugar a la inhibición de la activación neuronal asociada a déficits cognitivos. Sin embargo, estudios recientes han descrito que los receptores α_1 pueden producir efectos excitadores en la PFC lo que incrementa la liberación de glutamato ¹⁵⁷ y se sabe que la activación de α_1R va más allá de mediar respuestas a estrés. De hecho, se ha descrito que su activación es esencial en procesos de atención sostenida y flexible¹⁴⁸. El cambio observado en la potencia de la NE para activar la proteína $G\alpha_s$ en el heterómero $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$ respecto a la observada en ausencia de $D_{4.4}R$ podría implicar un aumento de la afinidad la NE por $\alpha_{1A}R$. Este hecho permitiría su activación en respuesta a una menor concentración de NE que en su estado individual, mediando así dichos procesos atencionales. La menor, o incluso la ausencia, de modulación por parte del complejo $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$ se asociaría a los déficits atencionales presentes en los trastornos del neurodesarrollo, sobre todo en el caso del TDAH.

Además de las modificaciones alostéricas producidas por la mera interacción de los receptores, la activación con ligandos específicos de uno de los receptores del heterodímero $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$, es capaz de inducir cambios funcionales sobre la activación del protómero asociado. Los resultados obtenidos mediante BRET por activación de proteína G tras la coactivación del heterómero muestran la existencia de una modulación negativa entre los receptores del complejo, lo que se traduce en una disminución de las potencias de activación de la proteína G correspondiente. La presencia de dicha modulación negativa en la activación de las proteínas G, a su vez, se tradujo en interacciones funcionales negativas en las vías de señalización

asociadas, es decir en la capacidad de activar o inhibir la adenilato ciclasa (AC) y en la inducción de la liberación de calcio intracelular. Estos resultados definen el *fingerprint* molecular o huella bioquímica específica del heterómero y sugieren que la heteromerización de $D_{4.4}R$ y $\alpha_{1A}R$ tiene un papel relevante en la regulación de la señalización catecolaminérgica y en su actividad coordinada en el cerebro. Sin embargo, con la variante $D_{4.7}R$ no se observó ningún tipo de modulación funcional tras la coactivación de los receptores en la activación de las proteínas G y tampoco en la señalización asociada a estas. Estudios anteriores han descrito la incapacidad de esta variante para formar interacciones funcionales con otros receptores. Por ejemplo, se ha descrito una modulación positiva o sinergia tras la coactivación con agonistas en el heterómero $D_{4.4}R$ - D_2R y la ausencia de dicha sinergia en presencia de la variante $D_{4.7}R$ ^{118,423}. Y en la misma línea de nuestros resultados, los complejos $D_{4.4}R$ - $\alpha_{2A}R$ también exhiben una modulación negativa en su señalización, pero, de nuevo, no la variante $D_{4.7}R$ ⁴¹¹. Del mismo modo, se ha descrito un patrón de modulación negativa en los complejos D_4R - $\alpha_{1B}R$ y D_4R - β_1 que ejerce una modulación fundamental sobre la liberación de melatonina y los ciclos circadianos⁴⁰⁰. Las posibles consecuencias funcionales de la presencia del polimorfismo $D_{4.7}R$ en los heterodímeros D_4R - $\alpha_{1B}R$ y D_4R - β_1 no ha sido evaluada, sin embargo, el TDAH cursa en numerosas ocasiones con importantes alteraciones en el ciclo circadiano⁴³¹. Extrapolando los resultados presentados en esta tesis y los descritos para el complejo D_4R - $\alpha_{2A}R$ ⁴¹¹ es plausible pensar que la participación del polimorfismo $D_{4.7}R$ en los heterómeros D_4R - $\alpha_{1B}R$ y D_4R - β_1 pueda conllevar la pérdida de la modulación alostérica característica alterando la síntesis de melatonina y afectando a los procesos de sueño y vigilia.

Los GPCRs son proteínas versátiles capaces de regular diversas cascadas de señalización por mecanismos independientes de su interacción con proteínas G heterotriméricas. Al analizar la señalización independiente de proteína G

(reclutamiento de β -arrestinas y la activación de la vía de las MAPK), observamos de nuevo la modulación negativa descrita anteriormente tras la coactivación con agonistas o mediante el pretratamiento con antagonista del otro protómero en el heterómero $D_{4.4}R$ - $\alpha_{1A}R$. Resulta especialmente interesante el hecho de que, en este caso, se observe el mismo patrón de modulación negativa recíproca en el heterómero $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$. Estos resultados demuestran que las diferencias funcionales entre las variantes del receptor D_4 ciertamente serían dependientes de su heteromerización. En el caso de la heteromerización con $\alpha_{1A}R$ las diferencias funcionales entre isoformas han demostrado ser dependientes de vía de señalización, de modo que en el complejo $D_{4.7}R$ - $\alpha_{1A}R$ se observa un *fingerprint* selectivo presente únicamente en las vías independientes de proteína G. Los mecanismos o los distintos cambios conformacionales que determinan que la señalización se produzca de manera dependiente o independiente de proteína G no están del todo claros. Aun así, distintos estudios de la estructura cristalizada de complejos formados por GPCRs unidos bien a proteína G o bien a β -arrestina han permitido determinar ciertas diferencias entre el reclutamiento de unas u otras proteínas. Las diferencias conformacionales que gobiernan la selectividad funcional, es decir, que dirigen la unión de un GPCR a su proteína G canónica o bien el reclutamiento de β -arrestina, se basan principalmente en un menor movimiento del TM6, junto con TM5 y ICL3, que da lugar un bolsillo de unión más pequeño en el caso de β -arrestina que para el de la proteína G^{354,432}. Además, la unión de la proteína β -arrestina precisa también de la fosforilación y de un cambio conformacional en el extremo C-terminal del receptor, que permiten la interacción del TM7 y la hélice 8 del receptor con la β -arrestina para su completa asociación y activación^{377,433}. La interacción principal entre GPCR- β -arrestina se produce a través del TM7, en cambio la proteína G no interacciona directamente con esta región³⁴⁹. Los diferentes cambios conformacionales y las distintas regiones de unión entre los GPCRs y la proteína G o la β -arrestina permitiría que el ICL3 de la variante $D_{4.7}R$ no

afecte a la interacción funcional del complejo $D_{4,7}R-\alpha_{1A}R$. Ciertas hipótesis han sugerido que la señalización mediada β -arrestina es esencial para la regulación del comportamiento guiada por dopamina. Estas teorías se basan en la hiperactividad inducida tras el tratamiento con agonistas de D_2R la cual se ve substancialmente reducida en ratones *knock-out* para β -arrestina ²⁴³⁴. Además, se ha reportado que diversos fármacos antipsicóticos actúan bloqueando la interacción entre D_2R y β -arrestina controlando episodios maníacos^{435,436}. A su vez, la ablación ERK1 en ratones produce un patrón de excitación conductual caracterizado por un incremento de comportamientos guiados por objetivos y comportamientos hiperactivos⁴³⁷. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales se regula y estabiliza el comportamiento precisa una mayor evaluación. En el contexto de nuestros resultados surge la incógnita de cuál es la participación de cada una de las vías de señalización en el caso de los receptores D_4 y α_{1A} y de los heterodímeros que conforman.

En este capítulo se han descrito diversas propiedades bioquímicas específicas del complejo $D_{4,4}R-\alpha_{1A}R$ y la ausencia parcial de ellas en presencia de la isoforma $D_{4,7}R$ en sistemas de transfección heterólogos. Asimismo, también se exponen los resultados que demuestran la interacción física y funcional de los complejos $D_4R-\alpha_{1A}R$ *ex vivo* en tejido nativo de rata. Su interacción se ha demostrado mediante ensayos de PLA en PFC y estriado y se ha confirmado el *fingerprint* bioquímico mediante el estudio de la vía de las MAPK en ambas regiones. La especificidad de los resultados de señalización *ex vivo* se comprobó mediante la utilización de péptidos específicos para los receptores. Los resultados mostraron que tanto el TM4 como el TM6 son capaces de impedir la formación del complejo $D_4R-\alpha_{1A}R$, lo que abole la modulación recíproca entre los receptores y demuestra que esta se produce debido a su interacción directa.

Los receptores D_4 y α_1 se localizan en neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas donde actúan modulando de manera directa e indirecta la liberación de glutamato^{104,138}. Los α_1R actúan presinápticamente para incrementar la liberación de glutamato y disminuir la liberación GABAérgica^{438,439}. Por el contrario, los D_4R actúan inversamente regulando negativamente la señalización glutamatérgica^{106,118}. Puesto que estos receptores llevan a cabo acciones contrarias, su heteromerización determinaría un nuevo nivel de regulación de la señalización glutamatérgica mediada por la acción coordinada entre la DA y la NE. Múltiples resultados apuntan a una disminución de la inhibición GABAérgica y a un incremento en los niveles de glutamato en la fisiopatología del TDAH, SGT, TOC y TEA^{104,440–443}. Todo ello sugiere un desajuste en la modulación ejercida por la señalización catecolaminérgica que culminaría con un desbalance entre la señalización GABA y glutamatérgica. Además, se ha descrito¹¹⁰ y evidencian nuestros resultados que los receptores D_4 son capaces de señalar en respuesta a la NE y estos, al modular negativamente la señalización inducida α_{1A} , serían capaces de prevenir respuestas exacerbadas tras la liberación de una concentración elevada de NE, como los que se producen durante procesos de estrés, que darían lugar a un incremento desproporcionado de liberación de glutamato. Esto podría explicar que se haya descrito que los portadores del polimorfismo $D_{4.7}R$ presentan una mayor sensibilidad en situaciones adversas asociadas a estrés^{444,445}. A su vez, situaciones hipodopaminérgicas^{239,240}, como la descrita en paciente de TDAH, producirían una menor regulación por parte de D_4R de la excitabilidad mediada por α_{1A} , a la vez que su función inhibitoria se vería menguada. Esto junto a la presencia de la variante $D_{4.7}R$ incapaz, al menos parcialmente, de regular la actividad del receptor adrenérgico, produciría un incremento aún mayor en la liberación de glutamato.

En resumen, en este estudio se demuestra la existencia de complejos D_4R - $\alpha_{1A}R$ funcionales en la PFC y el estriado de rata, los cuales participarían en la regulación

de procesos atencionales y de las funciones ejecutivas. Estos resultados confirman que los heterómeros representan un nivel superior en la regulación de la señalización y la cooperatividad DAérgica i NEérgica esencial para el correcto funcionamiento de la PFC y sus conexiones. A su vez, se describen alteraciones clave en la señalización de dicho complejo dependientes de la isoforma de D₄R que conducen a una mayor comprensión de la participación de D_{4,7}R en la fisiopatología de los trastornos del neurodesarrollo.

Los receptores de DA en la PFC regulan tres aspectos esenciales del control ejecutivo, permiten la entrada sensorial, mantienen y manipulan el contenido sensorial (memoria de trabajo) y transmiten las respuestas apropiada hacia áreas premotoras. La DA en la PFC actúa como un neuromodulador incrementando o disminuyendo la transmisión sináptica de información en función de la entrada de información. El mecanismo de entrada sensorial implica a los D₁R que se encuentran en estructuras postsinápticas como espinas dendríticas. Su activación disminuye las corrientes postsinápticas excitadoras inducidas por glutamato y reducen la actividad neuronal en respuesta a estímulos irrelevantes^{126,127}. Los D₁R producen la apertura de canales iónicos en espinas dendríticas que reciben señales irrelevantes, lo que disminuye sus conexiones y reduce la entrada de “ruido”. Esta reducción, a su vez, aumenta la fuerza relativa de las señales relevantes^{92,128}. Sin embargo, la activación de D₁R debe producirse en niveles óptimos ya que su sobreactivación, como sucede en situaciones de estrés, puede suprimir el procesamiento de todos los estímulos debido un colapso de los circuitos provocado por concentraciones demasiado elevadas de AMPc¹²⁸. De modo que en condiciones normales D₁R es capaz de estabilizar la activación de la PFC, así como en el control motor mediante su activación en el estriado. Debido al papel clave del D₁R en estos procesos, su disfunción se ha relacionado con un elevado número de trastornos

neuropsiquiátricos que cursan con déficits atencionales y/o alteraciones motoras^{323,446,447}.

El D₁R tanto en la PFC como en el estriado se encuentra en gran parte regulado y a su vez es capaz de regular a otros receptores. De hecho, la capacidad de heteromerización de este receptor es fundamental para la regulación de su señalización, D₁R es capaz de sufrir la disminución o potenciación de su activación e incluso modificar su selectividad funcional hacia ciertas proteínas G mediante su oligomerización con otros receptores⁴⁴⁸.

Se han reportado ciertas evidencias fisiológicas que sugieren algún tipo de interacción entre D₁R y receptores de la familia α_1 R en regiones corticales y subcorticales, que mostraban la capacidad de ciertos ligandos adrenérgicos para regular la activación de D₁R en distintas regiones cerebrales^{420,421,449}. Por otra parte, en los resultados presentados en el capítulo 1 de esta Tesis se describe la capacidad de α_{1A} R para interactuar con D₄R *in vivo* y *ex vivo* la presencia de una modulación funcional bidireccional en el complejo lo que nos indica que la heteromerización de receptores NEérgicos y DAérgicos participa en la regulación de la PFC y media, hasta cierto punto, los efectos coordinados entre estos neurotransmisores. Teniendo en cuenta estos datos abordamos en el segundo objetivo de esta Tesis, determinar si existe una interacción molecular directa entre D₁R y α_{1A} R y evaluar las consecuencias funcionales del heterodímero en potencia.

En el capítulo 2 titulado **“Implicación de los heterómeros formados por los receptores de adrenalina α_{1A} y de dopamina D₁ en la modulación de la atención”** se ha demostrado por primera vez, la existencia de heterómeros formados por los receptores de la familia D_{1-like} y α_{1A} tanto en células transfectadas como en tejido nativo. Además, se ha puesto de manifiesto que el heterómero D₁R- α_{1A} R presenta nuevas características y mecanismos bioquímicos asociados a su interacción directa

(Figura 44), que de manera similar al complejo $D_4R-\alpha_{1A}R$ se caracterizan por la presencia de una modulación negativa recíproca tras el co-tratamiento de los receptores en el complejo. Por último, se ha evidenciado la presencia de complejos $D_{1-like}-\alpha_{1A}$ como en el estriado y en la PFC de rata mediante el estudio de su *fingerprint* molecular en dichas regiones.

Hasta el momento no se había reportado la capacidad del receptor D_1 para formar heterómeros con ningún receptor adrenérgico, sin embargo, en esta Tesis se ha demostrado mediante ensayos de BRET y BiFC la existencia de heterómeros $D_1-\alpha_{1A}$ en sistemas celulares de expresión heteróloga. El tratamiento con agonistas de los receptores tuvo un efecto sobre los niveles de transferencia de energía en los ensayos de BRET ($BRET_{max}$), lo que indica que los cambios conformacionales de los receptores producidos por dichas activaciones provocan el acercamiento y facilitan la transferencia de energía entre la proteína donadora y aceptora. Destaca el hecho de que el tratamiento con el agonista adrenérgico disminuye su afinidad para heteromerizar con D_1R . Algunos autores han descrito que la adición de ligandos no debería afectar a los parámetros de BRET debido al carácter constitutivo de los complejos oligoméricos^{450,451}, sin embargo, otros investigadores han reportado que la adición de ligandos puede favorecer la heteromerización o movilización de receptores hacia la membrana, así como su homodimerización modificando la probabilidad relativa de interactuar⁴⁵². La existencia de los complejos fue corroborada mediante ensayos de BiFC, donde se ha confirmado la especificidad de los resultados mediante el tratamiento con péptidos específicos del receptor D_1 , hecho que demuestra que la interacción entre estos receptores se produce a través del TM5 y TM6 de D_1R . Estas mismas interfaces del receptor D_1 participan en la formación de complejos tanto con el receptor D_3 como con el receptor de adenosina A_1R ^{453,454}, lo que indica que D_1R adopta una disposición similar para interactuar con otros GPCRs.

Estudios previos han descrito la capacidad de D_1R de inducir la activación de G_{α_q} cuando se encuentra interaccionando con el D_2R ^{455,456} u otras proteínas⁴⁵⁷. En este estudio, mediante ensayos de BRET por activación de proteína G se ha demostrado que este fenómeno no ocurre en el complejo D_1R - $\alpha_{1A}R$. Aun así, las modulaciones alostéricas producidas por la heteromerización de los receptores indujeron variaciones en las potencias de activación de las proteínas G de los distintos ligandos endógenos y exógenos. Además, coincidiendo con el patrón de modulación funcional negativa bidireccional descrito para otros heterómeros de receptores DAérgicos y NEérgicos como D_4R - $\alpha_{1A}R$ (véase capítulo 1), D_4R - $\alpha_{2A}R$ ⁴¹¹, D_4R - $\alpha_{1B}R$ ⁴⁰⁰ y D_4R - β_1R ⁴⁰⁰, la coactivación de los protómeros en el complejo D_1R - $\alpha_{1A}R$ también mostró un perfil de regulación funcional negativa recíproca. Ambos receptores mantuvieron la activación canónica de sus proteínas G asociadas, sin embargo, la potencia de los ligandos adrenérgicos para activar G_{α_q} se vio disminuida en presencia de D_1R . Del mismo modo, respecto a la activación de G_{α_s} mediada por ambos protómeros, la DA mostró un empeoramiento de su potencia, pero no el agonista sintético (SKF81297) que presentó una potencia ligeramente mayor a la obtenida para el D_1R individual. El perfil de activación de G_{α_s} en el caso de α_{1A} fue similar, ya que la potencia que se obtuvo para el ligando endógeno, NE, fue peor y solo fue ligeramente superior en el caso A61603. Estos resultados contrastan con los descritos para el complejo D_4R - $\alpha_{1A}R$, donde las modulaciones alostéricas receptor-receptor promovieron un incremento en las potencias de activación de G_{α_s} y G_{α_i} . En concordancia con nuestros resultados, Evans y colaboradores describieron la ausencia de selectividad por parte de la NE para activar vías de señalización dependiente de G_{α_s} (acumulación de AMPc) o bien de G_{α_q} (liberación de calcio intracelular) en células CHO-K1 transfectadas con el receptor α_{1A} ⁴⁵⁸, por lo que la activación de una u otra vía de señalización podría depender de la distribución regional y/o disponibilidad de las proteínas G. Contrariamente a los resultados obtenidos en esta Tesis, en dicho estudio también se reportó que el ligando sintético

A61603 mostraba cierta selectividad funcional en las vías de señalización dependientes de AMPc en comparación con la liberación de calcio intracelular⁴⁵⁸. Sin embargo, en nuestro modelo experimental dicho sesgo funcional fue dependiente de la co-expresión de $\alpha_{1A}R$ con D₁R.

Mediante la coactivación del heterómero se ha evidenciado que este alosterismo receptor-receptor se caracteriza por la presencia de una modulación recíproca negativa entre los protómeros, inducida por el ligando, es decir tanto por el agonista como por el antagonista, de la pareja a nivel de: activación de las proteínas G, acumulación de AMPc, liberación de Ca²⁺ intracelular, fosforilación de ERK1/2 y ensayos de redistribución dinámica de masa. Este fenómeno es específico de la nueva entidad que conforman los receptores y no puede atribuirse a la falta de especificidad de los ligandos puesto que en células transfectadas únicamente con uno de los dos receptores no se detecta ningún efecto de los ligandos del otro protómero. Esta modulación se observó en todos los casos a excepción del SCH23390, antagonista selectivo de la familia D_{1-like}, el cual no fue capaz de modular negativamente la activación de $\alpha_{1A}R$ mediada por G α_s a nivel de su activación ni de acumulación de AMPc. Este fenómeno podría deberse a un proceso de selectividad funcional del ligando.

Como consecuencia de la similitud estructural existente entre los receptores de la familia D_{1-like}, actualmente no se dispone de ligandos específicos que permitan discernir entre ambos receptores en estudios *in vivo* o *ex vivo*. En cuanto a los α_{1R} tampoco existen agentes farmacológicos completamente selectivos, pero A61603 ha mostrado ser altamente selectivo por el $\alpha_{1A}R$ en comparación con las otras especies de la misma familia⁴⁵⁹. Gracias a ello, también se pudo demostrar la capacidad de D₅R para interactuar con $\alpha_{1A}R$ y examinar la presencia de modulaciones recíprocas en la vía de fosforilación de ERK1/2 en sistemas de transfección heterólogos con el objetivo de detectar diferencias en comparación

con el *fingerprint* observado en el caso de D₁R- α _{1A}R que permitan distinguir ambos complejos en tejido nativo. El complejo D₅R- α _{1A}R mostró una mínima modulación negativa en respuesta a la coactivación de los protómeros con agonistas, hecho que contrasta con la potente disminución de fosforilación de ERK 1/2 observada en el heterómero D₁R- α _{1A}R. Mediante la detección del *fingerprint* bioquímico descrito en la fosforilación de ERK1/2 *in vitro* se demostró funcionalmente la existencia de heterómeros D_{1-like}R- α ₁R en tejido nativo de rata (PFC y estriado).

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la interacción y la estructura de los complejos, se evaluó el efecto de distintos péptidos sintéticos con la secuencia homóloga a los segmentos transmembrana de ambos receptores y se analizó su efecto sobre el *fingerprint*. Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos *in vitro* en los ensayos de BiFC, lo que corrobora que los fragmentos transmembrana TM5 y TM6 de ambos receptores forman parte de las interfaces de interacción del complejo y demuestran que el efecto del antagonista se produce mediante la interacción directa entre los receptores.

Años atrás distintos autores describieron evidencias fisiológicas de la interacción de D₁R con receptores de la familia α ₁R en regiones corticales y subcorticales^{420,421,449}. La función específica de cada uno de los receptores de la familia α ₁R aún se están dilucidando ya que la falta de agentes farmacológicos específicos ha complicado la comprensión de su funcionalidad *in vivo*. Se ha reportado que el tratamiento con antagonistas α ₁R es capaz de contrarrestar la hipersensibilidad del D₁R inducida por la ablación dopaminérgica en la PFC⁴²¹ y de bloquear la respuesta dopaminérgica inducida por señales de estrés en el NAcc⁴²⁰. Gioanni y colaboradores, a su vez, demostraron que la activación cortical de α ₁R es capaz de inhibir la actividad funcional de D₁R en ratas⁴⁴⁹. Por otra parte, un estudio reciente ha descrito la capacidad de los receptores α ₁ para modular diferencialmente las oscilaciones theta y gamma en la corteza motora M1 en respuesta a DA⁴⁶⁰. Puesto que determinados

autores han reportado cierta promiscuidad de la DA para activar α_1R ^{461,462} se ha postulado la posibilidad de una acción directa de la DA sobre α_1R o bien que esta regulación se produzca a través de complejos de estos receptores con receptores de dopamina D_1 o D_2 ⁴⁶⁰. Los resultados presentados en esta Tesis ponen en evidencia que $\alpha_{1A}R$ participe en la activación promiscua de la DA descrita para la familia α_1R ^{461,462}, ya que nuestros resultados muestran que $\alpha_{1A}R$ no es activado en respuesta a la activación con DA. Por lo que los resultados descritos para la región M1 probablemente sean mediados o bien por otros subtipos de la familia α_1R capaces de ser activados por la DA o bien por otros complejos de estos receptores con características farmacológicas y bioquímicas aún por elucidar. Aun así, la modulación negativa bidireccional descrita en este capítulo para el heterómero D_1R - $\alpha_{1A}R$ establece un nuevo avance en la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a los eventos fisiológicos descritos inicialmente entre ambos sistemas.

Existe una gran evidencia experimental sobre la implicación de la sobreactivación de los receptores D_1 y α_1 postsinápticos en la inhibición de la activación neuronal en la PFC. Esta activación provoca la pérdida de control atencional y de la memoria de trabajo, la aparición de déficits cognitivos y la pérdida parcial de las funciones ejecutivas en respuesta a situaciones de estrés^{20,128,149,154}. Numerosos estudios han descrito el estrés tanto prenatal como postnatal como un factor de riesgo para la aparición de trastornos del neurodesarrollo^{215-218,463}. Además, el bloqueo farmacológico de los receptores α_1 ha resultado ser útil para el tratamiento de numerosas patologías como las de estrés postraumático (PTSD)⁴⁶⁴ y trastornos de abusos de sustancias^{465,466}, mientras que el bloqueo de receptores dopaminérgicos mediante la utilización de antipsicóticos es la primera vía de acción en trastornos debidos a déficits cognitivos y de las funciones ejecutivas como el SGT, el TEA, el TOC o la esquizofrenia^{320,340,467,468}. Cabe destacar la capacidad de gran cantidad de antipsicóticos para bloquear, a su vez, la activación de α_1R ^{469,470}, lo que pone de

manifiesto o bien su participación en los anteriores trastornos y/o su capacidad de modular la señalización dopaminérgica. Estos datos junto con el hecho de que estos receptores se encuentran colocalizando en las dendritas de PFC⁴⁷¹ y el patrón de modulación negativa recíproca descrito en esta Tesis sugieren que el complejo D₁R- α _{1A}R podría ser una diana terapéutica prometedora para tratar los déficits relacionados con la sobreactivación de estos receptores.

En este capítulo se ha demostrado, por primera vez, la existencia de complejos D₁-likeR- α _{1A}R funcionales en la PFC y el estriado de rata cuya activación y modulación podría ser relevante en la respuesta a situaciones de estrés y a los déficits cognitivos vinculados con dichas situaciones, lo que lo convierte en una diana terapéutica prometedora para el diseño de ligandos más específicos, dirigidos a regular y restaurar la activación neuronal adecuada para el correcto funcionamiento cognitivo.

En conjunto, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la relevancia de la heteromerización de receptores dopaminérgicos con los receptores adrenérgicos α _{1A} en la regulación de las acciones complementarias de la DA y la NE para mediar funciones cognitivas superiores como la atención, la memoria de trabajo y las funciones ejecutivas. Nuestros resultados indican que el α _{1A}R tendría una capacidad diferencial para mediar distintos procesos según sea su localización celular y su interacción molecular y funcional con los receptores dopaminérgicos. La estequiometría propuesta para otros complejos de GPCRs basada en estudios de modelaje estructural reportan una estructura heterotetramérica formada por dos homodímeros los cuales presentarían su proteína G canónica preensamblada e inactiva^{472,473}. Resulta factible que los complejos D₄R- α _{1A}R y D₁R- α _{1A}R interactúen dinámicamente para formar tetrámeros puesto que se ha descrito la capacidad de todos ellos para formar homodímeros^{120,454,474} y se ha postulado que los receptores de aminas biogénicas se

encuentran predominantemente en forma de homodímeros y no de monómeros⁴⁷⁵. Todo ello sugiere que lo más probable es que los heterómeros de estos receptores estén formados por parejas de homodímeros que formarían complejos tetraméricos. De hecho, este fenómeno se ha descrito tanto en complejo $D_4R-\alpha_{2A}R$ ⁴¹¹ como D_1R-D_3R ⁴⁵⁴. Sin embargo, la hipótesis de la existencia de complejos preensamblados GPCR-proteína G suscita desde hace largo tiempo una elevada controversia. Otros autores defienden un modelo de asociación por colisión⁴⁷⁶, sin embargo, existen datos que apoyan tanto una como otra teoría según el receptor concreto evaluado. Lohse atribuye estas discrepancias a la existencia de ambos fenómenos, de modo que existirían ciertos receptores preacoplados a sus proteínas G canónicas mientras otros receptores seguirían el modelo de colisión, y que ambas posibilidades podrían generar las distintas afinidades que presentan los GPCRs por las proteínas G⁴⁷⁷. Puesto que los heterómeros $D_4R-\alpha_{1A}R$ y $D_1R-\alpha_{1A}R$ han demostrado ser capaces de activar tres subtipos de proteínas G, estequiométricamente resulta poco probable la existencia de complejos GPCR-proteína G preensamblados en estos complejos.

Asimismo, desde un punto de vista funcional se ha revelado un patrón de modulación negativa recíproca entre la DA y la NE en los complejos estudiados en esta Tesis, un patrón que ha demostrado ser consistente en diferentes heterómeros de receptores DAérgicos y NEérgicos como los complejos $D_4R-\alpha_{1B}R$ y $D_4R-\beta_1R$ en la glándula pineal⁴⁰⁰ o bien $D_4R-\alpha_{2A}R$ en PFC y estriado⁴¹¹. El sistema DAérgico y NEérgicos se encuentra estrechamente relacionados y actúan cooperativamente para regular la correcta funcionalidad y conectividad de la PFC. Debido a ello, el sistema catecolaminérgico una de las principales dianas terapéuticas para el tratamiento de distintos trastornos neuropsiquiátricos. Sin embargo, las evidencias sobre alteraciones directas del sistema NEérgicos son limitadas y su participación se asume debido a la utilidad en el tratamiento de los trastornos de la atención de los

fármacos dirigidos a la regulación de este sistema. Los resultados presentados en esta Tesis atribuyen a la heteromerización de $D_4R-\alpha_{1A}R$ y $D_1R-\alpha_{1A}R$ un papel clave en la regulación coordinada de la NE y la DA en la PFC. Asimismo, la efectividad de los fármacos NEérgicos en el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos podría en parte atribuirse a la interacción directa de sus receptores con receptores DAérgicos. Teniendo en cuenta la posibilidad de modular funcionalmente los complejos heteroméricos $D_4R-\alpha_{1A}R$ y $D_1R-\alpha_{1A}R$ mediante la utilización de antagonistas o bien agonistas, y las diferencias funcionales dependientes de la isoforma $D_{4.7}R$, el diseño de nuevos fármacos debería considerar la posibilidad de actuar de manera selectiva sobre complejos heteroméricos. O bien tener en cuenta las nuevas propiedades farmacológicas y bioquímicas, como cambios en la afinidad, potencia y selectividad de las vías de señalización en los protómeros que participan en los complejos.

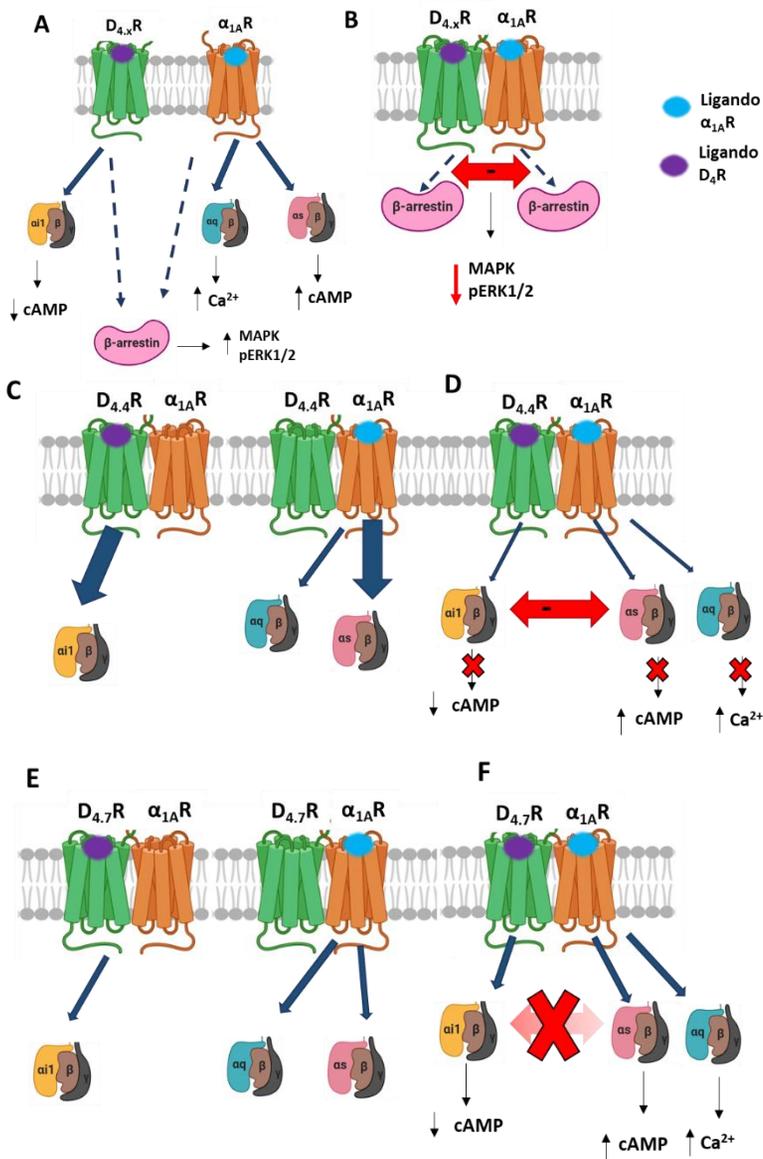


Figura 43. Representación esquemática de las consecuencias funcionales de la heterodimerización entre los receptores D_4R y $\alpha_{1A}R$. A: En su estado individual (monomérico/homodimérico) D_4R y $\alpha_{1A}R$ activan vías dependientes e independientes de proteína G tras la unión de un ligando. B: La coactivación de los receptores en los complejos $D_{4,4}R$ - $\alpha_{1A}R$ y $D_{4,7}R$ - $\alpha_{1A}R$ con agonistas o antagonistas de la pareja induce una modulación negativa recíproca en la señalización independiente de proteína G. C y E: En los complejos D_4R - $\alpha_{1A}R$, $D_{4,4}R$ (C), pero no $D_{4,7}R$ (E), actúa como un modulador alostérico e induce un cambio en la selectividad funcional de $\alpha_{1A}R$ potenciando su señalización vía G_{aq} , $\alpha_{1A}R$ actúa de manera recíproca incrementando la potencia de $D_{4,4}R$ para activar G_{aq} , pero no de $D_{4,7}R$. D y F: La coactivación de los receptores en el complejo $D_{4,4}R$ - $\alpha_{1A}R$ (D) con agonistas o antagonistas de la pareja induce una modulación negativa recíproca en la señalización dependiente de proteína G, esta modulación negativa bidireccional no se observa en el complejo $D_{4,7}R$ - $\alpha_{1A}R$ (F). Imágenes diseñadas con <https://biorender.com>.

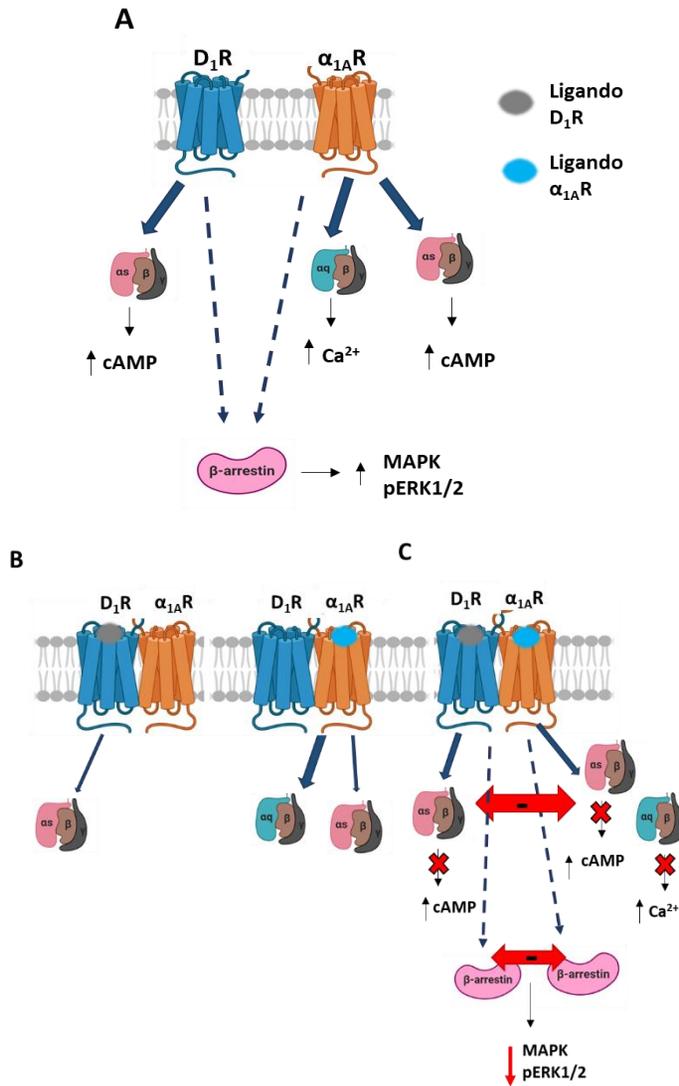


Figura 44. Representación esquemática de las consecuencias funcionales de la heteodimerización entre los receptores D₁R y α_{1A}R. **A:** En su estado individual (monomérico/homodimérico) D₁R y α_{1A}R activan vías dependientes e independientes de proteína G tras la unión de un ligando. **B:** En el heterodímero D₁R-α_{1A}R cada receptor actúa como un modulador alostérico de la pareja empeorando la potencia de los ligandos endógenos para inducir la activación de las proteínas G_{αs} y G_{αq}. **C:** El cotratamiento tanto con el agonista como con el antagonista de la pareja en el heterómero D₁R-α_{1A}R produce una modulación cruzada negativa bidireccional entre los protómeros en la señalización dependiente e independiente de proteína G. Imágenes diseñadas con <https://biorender.com>.

VII. Conclusiones

De los resultados obtenidos al abordar el primer Objetivo de esta Tesis se pueden desprender las siguientes conclusiones:

- Se ha demostrado la existencia, tanto en células vivas como en corteza y estriado de rata, de heterómeros funcionales formados por D₄R y α_{1A} R. En la interacción directa del complejo D₄R- α_{1A} R, D_{4.4}R, pero no D_{4.7}R, actúa como un modulador alostérico e induce un cambio en la selectividad funcional de α_{1A} R que potencia su señalización vía G α_s . Por su parte, α_{1A} R actúa de manera recíproca e incrementa la potencia de la DA para activar G α_i a través de D_{4.4}R, pero no de D_{4.7}R.
- El complejo D₄R- α_{1A} R, presente tanto en células transfectadas como en tejido nativo, exhibe nuevas propiedades funcionales (*fingerprint*) caracterizadas por una modulación negativa recíproca tras la coactivación de los receptores tanto con agonistas como con antagonistas del otro protómero en el complejo. Estas nuevas propiedades resultan ser dependientes de la variante de D₄R, así como de la vía de señalización. De manera que el receptor D_{4.7}R solo es capaz de modular la señalización mediada por α_{1A} R, y viceversa, en aquellas vías independientes de proteína G.
- La presencia de la variante D_{4.7}R incapaz, al menos parcialmente, de regular y ser regulada por α_{1A} R produciría alteraciones en la modulación de la liberación de glutamato, lo que se puede relacionar con los niveles exacerbados de este neurotransmisor en ciertas patologías como el TDAH, el SGT, el TOC o los TEA.

De los resultados obtenidos al abordar el objetivo dos de esta Tesis se extraen las siguientes conclusiones:

- Se ha demostrado en células vivas y en tejido nativo de rata la formación de heterodímeros de los receptores $D_{1\text{-like}}$ (D_1R y D_5R) y α_{1A} . En la interacción molecular entre los receptores D_1R y $\alpha_{1A}R$ en células, cada receptor actúa como un modulador alostérico de la pareja empeorando la potencia de los ligandos endógenos, DA y NE, para mediar la activación de las proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_q$.
- En ensayos *in vitro*, el alosterismo producido por la interacción receptor-receptor en el complejo D_1R - $\alpha_{1A}R$ se caracteriza por la presencia de una modulación recíproca negativa entre los protómeros inducida por el cotratamiento tanto con el agonista como con el antagonista de la pareja a nivel de: activación de las proteínas G, acumulación de AMPc, liberación de Ca^{2+} intracelular, fosforilación de ERK1/2 y ensayos de redistribución dinámica de masa. Por su parte, la coactivación de células D_5R - $\alpha_{1A}R$ con agonistas muestran una modulación negativa más modesta en ensayos de fosforilación de ERK1/2.
- Se ha demostrado la existencia de heterodímeros $D_{1\text{-like}}R$ - $\alpha_{1A}R$ en tejido nativo mediante la detección del patrón de modulación negativa bidireccional descrita *in vitro* en el estudio de la fosforilación de ERK1/2, para los heterodímeros D_1R - $\alpha_{1A}R$ y D_5R - $\alpha_{1A}R$. Este hecho pone de manifiesto la relevancia biológica de los resultados obtenidos en los ensayos celulares e indica que los heterómeros $D_{1\text{-like}}R$ - $\alpha_{1A}R$ juegan un papel relevante en la regulación de la señalización DAérgica y la NEérgica en estas regiones sobre todo durante situaciones de estrés.

Por último, del conjunto de resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se obtiene la siguiente conclusión global:

La heteromerización de receptores adrenérgicos y dopaminérgicos constituye un nivel superior y más complejo de la regulación funcional de los efectos complementarios de las catecolaminas en la PFC y el estriado. Hemos demostrado la existencia de heterodímeros funcionales $D_4R-\alpha_{1A}R$ y $D_{1-like}R-\alpha_{1A}R$ *in vitro* y *ex vivo* en tejido cerebral de rata. Estos complejos exhiben un patrón común de modulación negativa bidireccional. Este hecho indica que la interacción molecular entre receptores catecolaminérgicos de distinta familia actúa atenuando la respuesta de los protómeros en el complejo. Los receptores D_4 , D_1 y α_{1A} participan diferencialmente en la modulación de la atención, las funciones ejecutivas y el control motor, estos procesos se encuentran afectados en distintas patologías neuropsiquiátricas. En base a esto, nuestros resultados sugieren que los heterodímeros de estos receptores pueden ser dianas terapéuticas prometedoras para el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos.

VII. Bibliografía

1. Deth RC. *Molecular Origins of Human Attention: The Dopamine-Folate Connection*. Springer Science & Business Media; 2012.
2. James W. *The Principles of Psychology*. New York : Holt; 1890.
3. Ríos M, Periañez JA, Muñoz-Céspedes JM. Attentional control and slowness of information processing after severe traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2004;18(3):257-272. doi:10.1080/02699050310001617442
4. Rosenberg MD, Finn ES, Scheinost D, Constable RT, Chun MM. Characterizing Attention with Predictive Network Models. *Trends Cogn Sci*. 2017;21(4):290-302. doi:10.1016/j.tics.2017.01.011
5. Mesulam M-M. Large-scale neurocognitive networks and distributed processing for attention, language, and memory. *Annals of Neurology*. doi:10.1002/ana.410280502
6. Petersen SE, Posner MI. The Attention System of the Human Brain: 20 Years After. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35(1):73-89. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150525
7. Posner MI, Petersen SE. The Attention System of the Human Brain. *Annu Rev Neurosci*. 1990;13(1):25-42. doi:10.1146/annurev.ne.13.030190.000325
8. Corbetta M, Shulman GL. Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(3):201-215. doi:10.1038/nrn755
9. Fan J, McCandliss BD, Sommer T, Raz A, Posner MI. Testing the efficiency and independence of attentional networks. *J Cogn Neurosci*. 2002;14(3):340-347. doi:10.1162/089892902317361886
10. Parasuraman R, Warm JS, See JE. Brain systems of vigilance. In: *The Attentive Brain*. Cambridge, MA, US: The MIT Press; 1998:221-256.
11. Périn B, Godefroy O, Fall S, de Marco G. Alertness in young healthy subjects: An fMRI study of brain region interactivity enhanced by a warning signal. *Brain Cogn*. 2010;72(2):271-281. doi:10.1016/j.bandc.2009.09.010
12. Yanaka HT, Saito DN, Uchiyama Y, Sadato N. Neural substrates of phasic alertness: A functional magnetic resonance imaging study. *Neurosci Res*. 2010;68(1):51-58. doi:10.1016/j.neures.2010.05.005
13. Xuan B, Mackie M-A, Spagna A, et al. The activation of interactive attentional networks. *NeuroImage*. 2016;129:308-319. doi:10.1016/j.neuroimage.2016.01.017
14. Katsuki F, Constantinidis C. Bottom-Up and Top-Down Attention: Different Processes and Overlapping Neural Systems. *The Neuroscientist*. 2014;20(5):509-521. doi:10.1177/1073858413514136
15. Brosch T, Scherer KR, Grandjean D, Sander D. The impact of emotion on perception, attention, memory, and decision-making. *Swiss Med Wkly*. 2013;143:w13786. doi:10.4414/smw.2013.13786
16. Lee K-M, Keller EL. Symbolic Cue Driven Activity in Superior Colliculus Neurons in a Peripheral Visual Choice Task. *J Neurophysiol*. 2006;95(6):3585-3595. doi:10.1152/jn.01071.2005
17. Sui J, Rotshtein P. Self-prioritization and the attentional systems. *Curr Opin Psychol*. 2019;29:148-152. doi:10.1016/j.copsyc.2019.02.010
18. Sarter M, Gehring WJ, Kozak R. More attention must be paid: The neurobiology of attentional effort. *Brain Res Rev*. 2006;51(2):145-160. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.11.002

VII. Bibliografía

19. Fan J, McCandliss BD, Fossella J, Flombaum JI, Posner MI. The activation of attentional networks. *NeuroImage*. 2005;26(2):471-479. doi:10.1016/j.neuroimage.2005.02.004
20. Arnsten AFT. The Emerging Neurobiology of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: The Key Role of the Prefrontal Association Cortex. *J Pediatr*. 2009;154(5):l-S43. doi:10.1016/j.jpeds.2009.01.018
21. Smith ER, DeCoster J. Dual-Process Models in Social and Cognitive Psychology: Conceptual Integration and Links to Underlying Memory Systems. *Personal Soc Psychol Rev*. 2000;4(2):108-131. doi:10.1207/S15327957PSPRO402_01
22. Berga D, Otazu X. Modeling Bottom-Up and Top-Down Attention with a Neurodynamic Model of V1. *bioRxiv*. July 2019:590174. doi:10.1101/590174
23. Connor CE, Egeth HE, Yantis S. Visual Attention: Bottom-Up Versus Top-Down. *Curr Biol*. 2004;14(19):R850-R852. doi:10.1016/j.cub.2004.09.041
24. Theeuwes J. Visual Selection: Usually Fast and Automatic; Seldom Slow and Volitional. *J Cogn*. 2018;1(1):29. doi:10.5334/joc.13
25. Posner MI. Orienting of attention. *Q J Exp Psychol*. 1980;32(1):3-25. doi:10.1080/00335558008248231
26. Kurtz P, Shapcott KA, Kaiser J, Schmiedt JT, Schmid MC. The Influence of Endogenous and Exogenous Spatial Attention on Decision Confidence. *Sci Rep*. 2017;7(1):6431. doi:10.1038/s41598-017-06715-w
27. Sohlberg MM, Mateer CA. Effectiveness of an attention-training program. *J Clin Exp Neuropsychol*. 1987;9(2):117-130. doi:10.1080/01688638708405352
28. Sohlberg MM, Mateer CA. *Introduction to Cognitive Rehabilitation: Theory and Practice*. New York, NY, US: Guilford Press; 1989.
29. Ríos Lago M, Muñoz Céspedes JM, Paúl Lapedriza N. Alteraciones de la atención tras daño cerebral traumático: evaluación y rehabilitación. *Rev Neurol*. 2007;44(05):291. doi:10.33588/rn.4405.2006208
30. Shah P, Miyake A. Models of Working Memory: An Introduction. In: Miyake A, Shah P, eds. *Models of Working Memory*. Cambridge: Cambridge University Press; 1999:1-27. doi:10.1017/CBO9781139174909.004
31. Diamond A. Executive Functions. *Annu Rev Psychol*. 2013;64(1):135-168. doi:10.1146/annurev-psych-113011-143750
32. Stöckel T, Mau-Moeller A. Cognitive control processes associated with successful gait performance in dual-task walking in healthy young adults. *Psychol Res*. April 2019. doi:10.1007/s00426-019-01184-4
33. Burchi E, Makris N, Lee M, Pallanti S, Hollander E. Compulsivity in alcohol use disorder and obsessive compulsive disorder: Implications for neuromodulation. *Front Behav Neurosci*. 2019;13:70. doi:10.3389/fnbeh.2019.00070
34. Lubrini G, Morales JAP, Ríos-Lago M. Estimulación cognitiva y rehabilitación neuropsicológica de la atención. :60.
35. Marchetti G. Attention and working memory: two basic mechanisms for constructing temporal experiences. *Front Psychol*. 2014;5. doi:10.3389/fpsyg.2014.00880
36. Oberauer K. Chapter 2 Design for a Working Memory. In: *Psychology of Learning and Motivation*. Vol 51. Elsevier; 2009:45-100. doi:10.1016/S0079-7421(09)51002-X

37. Dajani DR, Uddin LQ. Demystifying cognitive flexibility: Implications for clinical and developmental neuroscience. *Trends Neurosci.* 2015;38(9):571-578. doi:10.1016/j.tins.2015.07.003
38. Prado VF, Janickova H, Al-Onaizi MA, Prado MAM. Cholinergic circuits in cognitive flexibility. *Neuroscience.* 2017;345:130-141. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.09.013
39. Posner MI, Rothbart MK. Research on Attention Networks as a Model for the Integration of Psychological Science. *Annu Rev Psychol.* 2007;58(1):1-23. doi:10.1146/annurev.psych.58.110405.085516
40. Asanowicz D, Marzecová A. Differential effects of phasic and tonic alerting on the efficiency of executive attention. *Acta Psychol (Amst).* 2017;176:58-70. doi:10.1016/j.actpsy.2017.03.004
41. Ortuño F, Ojeda N, Arbizu J, et al. Sustained Attention in a Counting Task: Normal Performance and Functional Neuroanatomy. *NeuroImage.* 2002;17(1):411-420. doi:10.1006/nimg.2002.1168
42. Sturm W, Longoni F, Fimm B, et al. Network for auditory intrinsic alertness: a PET study. *Neuropsychologia.* 2004;42(5):563-568. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2003.11.004
43. Sturm W, de Simone A, Krause BJ, et al. Functional anatomy of intrinsic alertness: evidence for a fronto-parietal-thalamic-brainstem network in the right hemisphere. *Neuropsychologia.* 1999;37(7):797-805.
44. Beane M, Marrocco RT. Norepinephrine and acetylcholine mediation of the components of reflexive attention: implications for attention deficit disorders. *Prog Neurobiol.* 2004;74(3):167-181. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.001
45. Aston-Jones G, Cohen JD. Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance. *J Comp Neurol.* 2005;493(1):99-110. doi:10.1002/cne.20723
46. Samuels ER, Szabadi E. Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal and Autonomic Function Part I: Principles of Functional Organisation. *Curr Neuropharmacol.* 2008;6(3):235-253. doi:10.2174/157015908785777229
47. Wang H, Fan J. Human Attentional Networks: A Connectionist Model. *J Cogn Neurosci.* 2007;19(10):1678-1689. doi:10.1162/jocn.2007.19.10.1678
48. Staub B, Doignon-Camus N, Després O, Bonnefond A. Sustained attention in the elderly: What do we know and what does it tell us about cognitive aging? *Ageing Res Rev.* 2013;12(2):459-468. doi:10.1016/j.arr.2012.12.001
49. Coull JT, Nobre AC, Frith CD. The Noradrenergic $\alpha 2$ Agonist Clonidine Modulates Behavioural and Neuroanatomical Correlates of Human Attentional Orienting and Alerting. *Cereb Cortex.* 2001;11(1):73-84. doi:10.1093/cercor/11.1.73
50. Posner MI, Sheese BE, Odludaş Y, Tang Y. Analyzing and shaping human attentional networks. *Neural Netw.* 2006;19(9):1422-1429. doi:10.1016/j.neunet.2006.08.004
51. Zhao X, Chen H, Liu X, Cang J. Orientation-selective Responses in the Mouse Lateral Geniculate Nucleus. *J Neurosci.* 2013;33(31):12751-12763. doi:10.1523/JNEUROSCI.0095-13.2013

52. Kusunoki M, Gottlieb J, Goldberg ME. The lateral intraparietal area as a salience map: the representation of abrupt onset, stimulus motion, and task relevance. *Vision Res.* 2000;40(10):1459-1468. doi:10.1016/S0042-6989(99)00212-6
53. Raz A, Buhle J. Typologies of attentional networks. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(5):367-379. doi:10.1038/nrn1903
54. Knudsen EI. Neural Circuits That Mediate Selective Attention: A Comparative Perspective. *Trends Neurosci.* 2018;41(11):789-805. doi:10.1016/j.tins.2018.06.006
55. Fecteau JH, Munoz DP. Saliency, relevance, and firing: a priority map for target selection. *Trends Cogn Sci.* 2006;10(8):382-390. doi:10.1016/j.tics.2006.06.011
56. Colby CL, Duhamel JR, Goldberg ME. Visual, presaccadic, and cognitive activation of single neurons in monkey lateral intraparietal area. *J Neurophysiol.* 1996;76(5):2841-2852. doi:10.1152/jn.1996.76.5.2841
57. Corbetta M, Patel G, Shulman GL. The Reorienting System of the Human Brain: From Environment to Theory of Mind. *Neuron.* 2008;58(3):306-324. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.017
58. Folk CL, Remington RW, Johnston JC. Involuntary covert orienting is contingent on attentional control settings. *J Exp Psychol Hum Percept Perform.* 1992;18(4):1030-1044. doi:10.1037/0096-1523.18.4.1030
59. Kayser C, Petkov CI, Lippert M, Logothetis NK. Mechanisms for Allocating Auditory Attention: An Auditory Saliency Map. *Curr Biol.* 2005;15(21):1943-1947. doi:10.1016/j.cub.2005.09.040
60. Seiffert AE, Somers DC, Dale AM, Tootell RBH. Functional MRI Studies of Human Visual Motion Perception: Texture, Luminance, Attention and After-effects. *Cereb Cortex.* 2003;13(4):340-349. doi:10.1093/cercor/13.4.340
61. Wang W, Shen J. Deep Visual Attention Prediction. *IEEE Trans Image Process.* 2018;27(5):2368-2378. doi:10.1109/TIP.2017.2787612
62. Schall JD. The neural selection and control of saccades by the frontal eye field. Parker A, Derrington A, Blakemore C, eds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002;357(1424):1073-1082. doi:10.1098/rstb.2002.1098
63. White BJ, Berg DJ, Kan JY, Marino RA, Itti L, Munoz DP. Superior colliculus neurons encode a visual saliency map during free viewing of natural dynamic video. *Nat Commun.* 2017;8:14263. doi:10.1038/ncomms14263
64. Iannaccone R, Hauser TU, Staempfli P, Walitza S, Brandeis D, Brem S. Conflict monitoring and error processing: New insights from simultaneous EEG-fMRI. *NeuroImage.* 2015;105:395-407. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.10.028
65. Kerns JG. Anterior Cingulate Conflict Monitoring and Adjustments in Control. *Science.* 2004;303(5660):1023-1026. doi:10.1126/science.1089910
66. Borsa VM, Della Rosa PA, Catricalà E, et al. Interference and conflict monitoring in individuals with amnesic mild cognitive impairment: A structural study of the anterior cingulate cortex. *J Neuropsychol.* 2018;12(1):23-40. doi:10.1111/jnp.12105
67. Swick D, Turken AU. Dissociation between conflict detection and error monitoring in the human anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(25):16354-16359. doi:10.1073/pnas.252521499
68. Leue A, Weber B, Elger CE, Trautner P, Beauducel A. *Cognitive Demand and Error Feedback: fMRI Evidence for Individual Differences of Conflict Monitoring in Rostral versus Dorsal ACC Activity.* PsyArXiv; 2018. doi:10.31234/osf.io/gz9rt

69. Shapira-Lichter I, Strauss I, Oren N, et al. Conflict monitoring mechanism at the single-neuron level in the human ventral anterior cingulate cortex. *NeuroImage*. 2018;175:45-55. doi:10.1016/j.neuroimage.2018.03.028
70. Heekeren HR, Marrett S, Ruff DA, Bandettini PA, Ungerleider LG. Involvement of human left dorsolateral prefrontal cortex in perceptual decision making is independent of response modality. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(26):10023-10028. doi:10.1073/pnas.0603949103
71. Wagner AD, Maril A, Bjork RA, Schacter DL. Prefrontal Contributions to Executive Control: fMRI Evidence for Functional Distinctions within Lateral Prefrontal Cortex. *NeuroImage*. 2001;14(6):1337-1347. doi:10.1006/nimg.2001.0936
72. Avenanti A, Paracampo R, Annella L, Tidoni E, Aglioti SM. Boosting and Decreasing Action Prediction Abilities Through Excitatory and Inhibitory tDCS of Inferior Frontal Cortex. *Cereb Cortex*. 2018;28(4):1282-1296. doi:10.1093/cercor/bhx041
73. Rubia K, Smith AB, Brammer MJ, Taylor E. Right inferior prefrontal cortex mediates response inhibition while mesial prefrontal cortex is responsible for error detection. *NeuroImage*. 2003;20(1):351-358. doi:10.1016/S1053-8119(03)00275-1
74. Duann J-R, Ide JS, Luo X, Li CR. Functional Connectivity Delineates Distinct Roles of the Inferior Frontal Cortex and Presupplementary Motor Area in Stop Signal Inhibition. *J Neurosci*. 2009;29(32):10171-10179. doi:10.1523/JNEUROSCI.1300-09.2009
75. Swann NC, Cai W, Conner CR, et al. Roles for the pre-supplementary motor area and the right inferior frontal gyrus in stopping action: Electrophysiological responses and functional and structural connectivity. *NeuroImage*. 2012;59(3):2860-2870. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.09.049
76. Bouret S, Richmond BJ. Ventromedial and orbital prefrontal neurons differentially encode internally and externally driven motivational values in monkeys. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2010;30(25):8591-8601. doi:10.1523/JNEUROSCI.0049-10.2010
77. Cameron CD, Reber J, Spring VL, Tranel D. Damage to the ventromedial prefrontal cortex is associated with impairments in both spontaneous and deliberative moral judgments. *Neuropsychologia*. 2018;111:261-268. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2018.01.038
78. Davidson RJ. Dysfunction in the Neural Circuitry of Emotion Regulation--A Possible Prelude to Violence. *Science*. 2000;289(5479):591-594. doi:10.1126/science.289.5479.591
79. Schneider B, Koenigs M. Human lesion studies of ventromedial prefrontal cortex. *Neuropsychologia*. 2017;107:84-93. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2017.09.035
80. Haber SN. Corticostriatal circuitry. *Dialogues Clin Neurosci*. 2016;18(1):7-21.
81. Krebs RM, Boehler CN, Roberts KC, Song AW, Woldorff MG. The Involvement of the Dopaminergic Midbrain and Cortico-Striatal-Thalamic Circuits in the Integration of Reward Prospect and Attentional Task Demands. *Cereb Cortex*. 2012;22(3):607-615. doi:10.1093/cercor/bhr134
82. Zhang Y, Pan X, Wang R, Sakagami M. Functional connectivity between prefrontal cortex and striatum estimated by phase locking value. *Cogn Neurodyn*. 2016;10(3):245-254. doi:10.1007/s11571-016-9376-2

83. Cools R, Ivry RB, D'Esposito M. The human striatum is necessary for responding to changes in stimulus relevance. *J Cogn Neurosci*. 2006;18(12):1973-1983. doi:10.1162/jocn.2006.18.12.1973
84. van Schouwenburg MR, den Ouden HEM, Cools R. The Human Basal Ganglia Modulate Frontal-Posterior Connectivity during Attention Shifting. *J Neurosci*. 2010;30(29):9910-9918. doi:10.1523/JNEUROSCI.1111-10.2010
85. Eslinger PJ, Grattan LM. Frontal lobe and frontal-striatal substrates for different forms of human cognitive flexibility. *Neuropsychologia*. 1993;31(1):17-28. doi:10.1016/0028-3932(93)90077-D
86. Leunissen I, Coxon JP, Caeyenberghs K, Michiels K, Sunaert S, Swinnen SP. Subcortical volume analysis in traumatic brain injury: The importance of the fronto-striato-thalamic circuit in task switching. *Cortex*. 2014;51:67-81. doi:10.1016/j.cortex.2013.10.009
87. Swainson R, Robbins TW. Rule-abstraction deficits following a basal ganglia lesion. *Neurocase*. 2001;7(5):433-443. doi:10.1076/neur.7.5.433.16248
88. Yehene E, Meiran N, Soroker N. Basal Ganglia Play a Unique Role in Task Switching within the Frontal-Subcortical Circuits: Evidence from Patients with Focal Lesions. *J Cogn Neurosci*. 2008;20(6):1079-1093. doi:10.1162/jocn.2008.20077
89. Pandey P, Mersha MD, Dhillon HS. A synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interactions. *J Mol Signal*. 2013;8:13. doi:10.1186/1750-2187-8-13
90. Tritsch NX, Sabatini BL. Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron*. 2012;76(1):33-50. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.023
91. Beaulieu J-M, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev*. 2011;63(1):182-217. doi:10.1124/pr.110.002642
92. Ott T, Nieder A. Dopamine and Cognitive Control in Prefrontal Cortex. *Trends Cogn Sci*. 2019;23(3):213-234. doi:10.1016/j.tics.2018.12.006
93. Santana N, Mengod G, Artigas F. Quantitative Analysis of the Expression of Dopamine D1 and D2 Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of the Rat Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex*. 2009;19(4):849-860. doi:10.1093/cercor/bhn134
94. Ciliax BJ, Nash N, Heilman C, et al. Dopamine D(5) receptor immunolocalization in rat and monkey brain. *Synap N Y N*. 2000;37(2):125-145. doi:10.1002/1098-2396(200008)37:2<125::AID-SYN7>3.0.CO;2-7
95. Mueller A, Shepard SB, Moore T. Differential Expression of Dopamine D5 Receptors across Neuronal Subtypes in Macaque Frontal Eye Field. *Front Neural Circuits*. 2018;12. doi:10.3389/fncir.2018.00012
96. Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS. Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci*. 1995;15(12):7821-7836. doi:10.1523/JNEUROSCI.15-12-07821.1995
97. Rivera A, Alberti I, Martín AB, Narváez JA, Calle ADL, Moratalla R. Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur J Neurosci*. 2002;16(11):2049-2058. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02280.x
98. Usiello A, Baik J-H, Rougé-Pont F, et al. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*. 2000;408(6809):199-203. doi:10.1038/35041572

99. Hurd YL, Suzuki M, Sedvall GC. D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *J Chem Neuroanat.* 2001;22(1):127-137. doi:10.1016/S0891-0618(01)00122-3
100. Mukhopadhyay P, Dutt A, Kumar Das S, et al. Identification of neuroanatomical substrates of set-shifting ability: evidence from patients with focal brain lesions. In: Banerjee R, Chakrabarti BK, eds. *Progress in Brain Research.* Vol 168. Models of Brain and Mind. Elsevier; 2007:95-104. doi:10.1016/S0079-6123(07)68008-X
101. Ford CP. The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission. *Neuroscience.* 2014;282:13-22. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.025
102. Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J. Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry.* 2001;158(7):1052-1057. doi:10.1176/appi.ajp.158.7.1052
103. Noaín D, Avale ME, Wedemeyer C, Calvo D, Peper M, Rubinstein M. Identification of brain neurons expressing the dopamine D4 receptor gene using BAC transgenic mice. *Eur J Neurosci.* 2006;24(9):2429-2438. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05148.x
104. Rubinstein M, Cepeda C, Hurst RS, et al. Dopamine D4 receptor-deficient mice display cortical hyperexcitability. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2001;21(11):3756-3763.
105. Li D, Sham PC, Owen MJ, He L. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet.* 2006;15(14):2276-2284. doi:10.1093/hmg/ddl152
106. Bonaventura J, Quiroz C, Cai N-S, Rubinstein M, Tanda G, Ferré S. Key role of the dopamine D4 receptor in the modulation of corticostriatal glutamatergic neurotransmission. *Sci Adv.* 2017;3(1). doi:10.1126/sciadv.1601631
107. Sánchez-Soto M, Yano H, Cai N-S, et al. Revisiting the Functional Role of Dopamine D4 Receptor Gene Polymorphisms: Heteromerization-Dependent Gain of Function of the D4.7 Receptor Variant. *Mol Neurobiol.* November 2018. doi:10.1007/s12035-018-1413-1
108. Zhong P, Liu W, Yan Z. Aberrant regulation of synchronous network activity by the attention-deficit/hyperactivity disorder-associated human dopamine D4 receptor variant D4.7 in the prefrontal cortex. *J Physiol.* 2016;594(1):135-147. doi:10.1113/JP271317
109. Qin L, Liu W, Ma K, et al. The ADHD-linked Human Dopamine D4 Receptor Variant D4.7 Induces Over-Suppression of NMDA Receptor Function in Prefrontal Cortex. *Neurobiol Dis.* 2016;95:194-203. doi:10.1016/j.nbd.2016.07.024
110. Sánchez-Soto M, Bonifazi A, Cai NS, et al. Evidence for Noncanonical Neurotransmitter Activation: Norepinephrine as a Dopamine D2-Like Receptor Agonist. *Mol Pharmacol.* 2016;89(4):457-466. doi:10.1124/mol.115.101808
111. Skieterska K, Rondou P, Lintermans B, Craenenbroeck KV. KLHL12 Promotes Non-Lysine Ubiquitination of the Dopamine Receptors D4.2 and D4.4, but Not of the ADHD-Associated D4.7 Variant. *PLOS ONE.* 2015;10(12):e0145654. doi:10.1371/journal.pone.0145654
112. Mulligan RC, Kristjansson SD, Reiersen AM, Parra AS, Anokhin AP. Neural correlates of inhibitory control and functional genetic variation in the dopamine D4 receptor

- gene. *Neuropsychologia*. 2014;62:306-318. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2014.07.033
113. Woods AS. The dopamine D₄ receptor, the ultimate disordered protein. *J Recept Signal Transduct*. 2010;30(5):331-336. doi:10.3109/10799893.2010.513842
 114. Cho D-I, Beom S, Tol HHMV, Caron MG, Kim K-M. Characterization of the desensitization properties of five dopamine receptor subtypes and alternatively spliced variants of dopamine D2 and D4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350(3):634-640. doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.090
 115. Czermak C, Lehofer M, Liebmann PM, Traynor J. [35S]GTPgammaS binding at the human dopamine D4 receptor variants hD4.2, hD4.4 and hD4.7 following stimulation by dopamine, epinephrine and norepinephrine. *Eur J Pharmacol*. 2006;531(1-3):20-24. doi:10.1016/j.ejphar.2005.11.063
 116. Kazmi MA, Snyder LA, Cypess AM, Graber SG, Sakmar TP. Selective Reconstitution of Human D4 Dopamine Receptor Variants with G α Subtypes. *Biochemistry*. 2000;39(13):3734-3744. doi:10.1021/bi992354c
 117. Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem*. 1995;65(3):1157-1165.
 118. González S, Rangel-Barajas C, Peper M, et al. Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol Psychiatry*. 2012;17(6):650-662. doi:10.1038/mp.2011.93
 119. Borroto-Escuela DO, Craenenbroeck KV, Romero-Fernandez W, et al. Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(4):928-934. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.083
 120. Van Craenenbroeck K, Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, et al. Dopamine D4 receptor oligomerization - contribution to receptor biogenesis: Dopamine D4 receptor oligomerization. *FEBS J*. 2011;278(8):1333-1344. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08052.x
 121. Floresco SB, Magyar O. Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006;188(4):567-585. doi:10.1007/s00213-006-0404-5
 122. Thiele A, Bellgrove MA. Neuromodulation of Attention. *Neuron*. 2018;97(4):769-785. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.008
 123. Boekhoudt L, Omrani A, Luijendijk MCM, et al. Chemogenetic activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area, but not substantia nigra, induces hyperactivity in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016;26(11):1784-1793. doi:10.1016/j.euroneuro.2016.09.003
 124. Lohani S, Martig AK, Deisseroth K, Witten IB, Moghaddam B. Dopamine Modulation of Prefrontal Cortex Activity Is Manifoldd and Operates at Multiple Temporal and Spatial Scales. *Cell Rep*. 2019;27(1):99-114.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.012
 125. Jacob SN, Ott T, Nieder A. Dopamine Regulates Two Classes of Primate Prefrontal Neurons That Represent Sensory Signals. *J Neurosci*. 2013;33(34):13724-13734. doi:10.1523/JNEUROSCI.0210-13.2013

126. Moore AR, Zhou W-L, Potapenko ES, Kim E-J, Antic SD. Brief Dopaminergic Stimulations Produce Transient Physiological Changes in Prefrontal Pyramidal Neurons. *Brain Res.* 2011;1370:1-15. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.111
127. Urban NN, González-Burgos G, Henze DA, Lewis DA, Barrionuevo G. Selective reduction by dopamine of excitatory synaptic inputs to pyramidal neurons in primate prefrontal cortex. *J Physiol.* 2002;539(Pt 3):707-712. doi:10.1113/jphysiol.2001.015024
128. Vijayraghavan S, Wang M, Birnbaum SG, Williams GV, Arnsten AFT. Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nat Neurosci.* 2007;10(3):376-384. doi:10.1038/nn1846
129. Wang Y, Goldman-Rakic PS. D2 receptor regulation of synaptic burst firing in prefrontal cortical pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(14):5093-5098. doi:10.1073/pnas.0400954101
130. Floresco SB, Magyar O, Ghods-Sharifi S, Vexelman C, Tse MTL. Multiple dopamine receptor subtypes in the medial prefrontal cortex of the rat regulate set-shifting. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2006;31(2):297-309. doi:10.1038/sj.npp.1300825
131. Logue SF, Gould TJ. The Neural and Genetic Basis of Executive Function: Attention, Cognitive Flexibility, and Response Inhibition. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;0:45-54. doi:10.1016/j.pbb.2013.08.007
132. Sara SJ, Bouret S. Orienting and Reorienting: The Locus Coeruleus Mediates Cognition through Arousal. *Neuron.* 2012;76(1):130-141. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.011
133. Shibata K, Katsuma S, Koshimizu T, et al. α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes Differentially Control the Cell Cycle of Transfected CHO Cells through a cAMP-dependent Mechanism Involving p27^{Kip1}. *J Biol Chem.* 2003;278(1):672-678. doi:10.1074/jbc.M201375200
134. Shinoura H, Shibata K, Hirasawa A, Tanoue A, Hashimoto K, Tsujimoto G. Key amino acids for differential coupling of α_1 -adrenergic receptor subtypes to Gs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299(1):142-147. doi:10.1016/S0006-291X(02)02589-5
135. Day HEW, Campeau S, Jr SJW, Akil H. Distribution of h1a-, h1b- and h1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat.* 1997;25.
136. Nalepa I, Kreiner G, Bielawski A, Rafa-Zabłocka K, Roman A. α_1 -Adrenergic receptor subtypes in the central nervous system: insights from genetically engineered mouse models. *Pharmacol Rep PR.* 2013;65(6):1489-1497.
137. Papay R, Gaivin R, Jha A, et al. Localization of the mouse alpha1A-adrenergic receptor (AR) in the brain: alpha1AAR is expressed in neurons, GABAergic interneurons, and NG2 oligodendrocyte progenitors. *J Comp Neurol.* 2006;497(2):209-222. doi:10.1002/cne.20992
138. Santana N, Mengod G, Artigas F. Expression of α_1 -adrenergic receptors in rat prefrontal cortex: cellular co-localization with 5-HT2A receptors. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16(05):1139-1151. doi:10.1017/S1461145712001083
139. Sirviö J, MacDonald E. Central alpha1-adrenoceptors: their role in the modulation of attention and memory formation. *Pharmacol Ther.* 1999;83(1):49-65.
140. Chen Z, Minneman KP. Recent progress in alpha1-adrenergic receptor research. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(11):1281-1287. doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00224.x

141. Holmberg M, Fagerholm V, Scheinin M. Regional distribution of α 2C-adrenoceptors in brain and spinal cord of control mice and transgenic mice overexpressing the α 2C-subtype: an autoradiographic study with [3H]RX821002 and [3H]rauwolscine. *Neuroscience*. 2003;117(4):875-898. doi:10.1016/S0306-4522(02)00966-1
142. Lehto J, Virta JR, Oikonen V, et al. Test–retest reliability of 11C-ORM-13070 in PET imaging of α 2C-adrenoceptors in vivo in the human brain. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015;42(1):120-127. doi:10.1007/s00259-014-2899-z
143. MacDonald E, Scheinin M. Distribution and pharmacology of alpha 2-adrenoceptors in the central nervous system. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 1995;46(3):241-258.
144. Nicholas AP, Hökfelt T, Pieribone VA. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17(7):245-255.
145. Summers RJ, Papaioannou M, Harris S, Evans BA. Expression of beta 3-adrenoceptor mRNA in rat brain. *Br J Pharmacol*. 1995;116(6):2547-2548. doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb17205.x
146. Totah NKB, Logothetis NK, Eschenko O. Noradrenergic ensemble-based modulation of cognition over multiple timescales. *Brain Res*. 2019;1709:50-66. doi:10.1016/j.brainres.2018.12.031
147. Arnsten AFT. Catecholamine Influences on Dorsolateral Prefrontal Cortical Networks. *Biol Psychiatry*. 2011;69(12):e89-e99. doi:10.1016/j.biopsych.2011.01.027
148. Berridge CW, Spencer RC. Differential cognitive actions of norepinephrine α 2 and α 1 receptor signaling in the prefrontal cortex. *Brain Res*. 2016;1641:189-196. doi:10.1016/j.brainres.2015.11.024
149. Datta D, Arnsten AFT. Loss of Prefrontal Cortical Higher Cognition with Uncontrollable Stress: Molecular Mechanisms, Changes with Age, and Relevance to Treatment. *Brain Sci*. 2019;9(5):113. doi:10.3390/brainsci9050113
150. Wang M, Ramos BP, Paspalas CD, et al. Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell*. 2007;129(2):397-410. doi:10.1016/j.cell.2007.03.015
151. Ma C-L, Arnsten AFT, Li B-M. Locomotor hyperactivity induced by blockade of prefrontal cortical alpha2-adrenoceptors in monkeys. *Biol Psychiatry*. 2005;57(2):192-195. doi:10.1016/j.biopsych.2004.11.004
152. Ma C-L, Qi X-L, Peng J-Y, Li B-M. Selective deficit in no-go performance induced by blockade of prefrontal cortical alpha 2-adrenoceptors in monkeys. *Neuroreport*. 2003;14(7):1013-1016. doi:10.1097/01.wnr.0000070831.57864.7b
153. Arnsten AFT. Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. *Nat Neurosci*. 2015;18(10):1376-1385. doi:10.1038/nn.4087
154. Birnbaum S, Gobeske KT, Auerbach J, Taylor JR, Arnsten AFT. A role for norepinephrine in stress-induced cognitive deficits: α -1-adrenoceptor mediation in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*. 1999;46(9):1266-1274. doi:10.1016/S0006-3223(99)00138-9
155. Birnbaum SG, Yuan PX, Wang M, et al. Protein kinase C overactivity impairs prefrontal cortical regulation of working memory. *Science*. 2004;306(5697):882-884. doi:10.1126/science.1100021

156. Berridge CW, Shumsky JS, Andrzejewski ME, et al. Differential Sensitivity to Psychostimulants Across Prefrontal Cognitive Tasks: Differential Involvement of Noradrenergic α 1- and α 2-Receptors. *Biol Psychiatry*. 2012;71(5):467-473. doi:10.1016/j.biopsych.2011.07.022
157. Zhang Z, Cordeiro Matos S, Jego S, Adamantidis A, Séguéla P. Norepinephrine Drives Persistent Activity in Prefrontal Cortex via Synergistic α 1 and α 2 Adrenoceptors. *PLoS ONE*. 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0066122
158. Puumala T, Riekkinen P, Sirviö J. Modulation of Vigilance and Behavioral Activation by Alpha-1 Adrenoceptors in the Rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997;56(4):705-712. doi:10.1016/S0091-3057(96)00408-X
159. Lapiz MDS, Morilak DA. Noradrenergic modulation of cognitive function in rat medial prefrontal cortex as measured by attentional set shifting capability. *Neuroscience*. 2006;137(3):1039-1049. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.09.031
160. Salgado H, Garcia-Oscos F, Martinolich L, et al. Pre- and postsynaptic effects of norepinephrine on γ -aminobutyric acid-mediated synaptic transmission in layer 2/3 of the rat auditory cortex. *Synapse*. 2012;66(1):20-28. doi:10.1002/syn.20979
161. Datta D, Yang S-T, Galvin VC, et al. Noradrenergic α 1-Adrenoceptor Actions in the Primate Dorsolateral Prefrontal Cortex. *J Neurosci*. 2019;39(14):2722-2734. doi:10.1523/JNEUROSCI.2472-18.2019
162. Parikh V, Kozak R, Martinez V, Sarter M. Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple time scales. *Neuron*. 2007;56(1):141-154. doi:10.1016/j.neuron.2007.08.025
163. Sarter M, Lustig C, Howe WM, Gritton H, Berry AS. Deterministic functions of cortical acetylcholine. *Eur J Neurosci*. 2014;39(11):1912-1920. doi:10.1111/ejn.12515
164. Poorthuis RB, Mansvellder HD. Nicotinic acetylcholine receptors controlling attention: Behavior, circuits and sensitivity to disruption by nicotine. *Biochem Pharmacol*. 2013;86(8):1089-1098. doi:10.1016/j.bcp.2013.07.003
165. Proulx E, Piva M, Tian MK, Bailey CDC, Lambe EK. Nicotinic acetylcholine receptors in attention circuitry: the role of layer VI neurons of prefrontal cortex. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(7):1225-1244. doi:10.1007/s00018-013-1481-3
166. Li X, Yu B, Sun Q, et al. Generation of a whole-brain atlas for the cholinergic system and mesoscopic projectome analysis of basal forebrain cholinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(2):415-420. doi:10.1073/pnas.1703601115
167. Gielow MR, Zaborszky L. The Input-Output Relationship of the Cholinergic Basal Forebrain. *Cell Rep*. 2017;18(7):1817-1830. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.060
168. Kozak R, Bruno JP, Sarter M. Augmented Prefrontal Acetylcholine Release during Challenged Attentional Performance. *Cereb Cortex*. 2006;16(1):9-17. doi:10.1093/cercor/bhi079
169. Dalley JW, Theobald DE, Bouger P, Chudasama Y, Cardinal RN, Robbins TW. Cortical Cholinergic Function and Deficits in Visual Attentional Performance in Rats Following 192 IgG-Saporin-induced Lesions of the Medial Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex*. 2004;14(8):922-932. doi:10.1093/cercor/bhh052
170. Hayward A, Adamson L, Neill JC. Partial agonism at the α 7 nicotinic acetylcholine receptor improves attention, impulsive action and vigilance in low attentive rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2017;27(4):325-335. doi:10.1016/j.euroneuro.2017.01.013

171. Rezvani AH, Levin ED. Cognitive effects of nicotine. *Biol Psychiatry*. 2001;49(3):258-267. doi:10.1016/S0006-3223(00)01094-5
172. Thiel CM, Zilles K, Fink GR. Nicotine modulates reorienting of visuospatial attention and neural activity in human parietal cortex. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2005;30(4):810-820. doi:10.1038/sj.npp.1300633
173. Herrero JL, Roberts MJ, Delicato LS, Giesemann MA, Dayan P, Thiele A. Acetylcholine contributes through muscarinic receptors to attentional modulation in V1. *Nature*. 2008;454(7208):1110-1114. doi:10.1038/nature07141
174. Švob Štrac D, Pivac N, Mück-Šeler D. The serotonergic system and cognitive function. *Transl Neurosci*. 2016;7(1). doi:10.1515/tnsci-2016-0007
175. Daly E, D. Tricklebank M, Wichers R. Neurodevelopmental roles and the serotonin hypothesis of autism spectrum disorder. In: *The Serotonin System*. Elsevier; 2019:23-44. doi:10.1016/B978-0-12-813323-1.00002-5
176. Polleux F, Lauder JM. Toward a developmental neurobiology of autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2004;10(4):303-317. doi:10.1002/mrdd.20044
177. Grace AA. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(8):524-532. doi:10.1038/nrn.2016.57
178. Nisenbaum L, Downing A, Zhao F, et al. Serotonin 2A Receptor SNP rs7330461 Association with Treatment Response to Pomaglumetad Methionil in Patients with Schizophrenia. *J Pers Med*. 2016;6(1):9. doi:10.3390/jpm6010009
179. van Dijk A, Klompmakers A, Denys D. The Serotonergic System in Obsessive-Compulsive Disorder. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Vol 21. Elsevier; 2010:547-563. doi:10.1016/S1569-7339(10)70100-4
180. Kim H, Ährlund-Richter S, Wang X, Deisseroth K, Carlén M. Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention. *Cell*. 2016;164(1-2):208-218. doi:10.1016/j.cell.2015.11.038
181. Matias S, Lottem E, Dugué GP, Mainen ZF. Activity patterns of serotonin neurons underlying cognitive flexibility. *eLife*. 2017;6:e20552. doi:10.7554/eLife.20552
182. Baker PM, Thompson JL, Sweeney JA, Ragozzino ME. Differential effects of 5-HT2A and 5-HT2C receptor blockade on strategy-switching. *Behav Brain Res*. 2011;219(1):123-131. doi:10.1016/j.bbr.2010.12.031
183. Riedel WJ, Eikmans K, Heldens A, Schmitt JAJ. Specific serotonergic reuptake inhibition impairs vigilance performance acutely and after subchronic treatment. *J Psychopharmacol (Oxf)*. 2005;19(1):12-20. doi:10.1177/0269881105048887
184. Schmitt J, Wingen M, Ramaekers J, Evers E, Riedel W. Serotonin and Human Cognitive Performance. *Curr Pharm Des*. 2006;12(20):2473-2486. doi:10.2174/138161206777698909
185. Wingen M, Kuypers KPC, van de Ven V, Formisano E, Ramaekers JG. Sustained attention and serotonin: a pharmaco-fMRI study. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*. 2008;23(3):221-230. doi:10.1002/hup.923
186. Tian MK, Schmidt EF, Lambe EK. Serotonergic Suppression of Mouse Prefrontal Circuits Implicated in Task Attention. *eneuro*. 2016;3(5):ENEURO.0269-16.2016. doi:10.1523/ENEURO.0269-16.2016
187. van de Ven V, Wingen M, Kuypers KPC, Ramaekers JG, Formisano E. Escitalopram Decreases Cross-Regional Functional Connectivity within the Default-Mode

- Network. Hayasaka S, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e68355. doi:10.1371/journal.pone.0068355
188. Schmitt JAJ, Ramaekers JG, Kruizinga MJ, van Boxtel MPJ, Vuurman EFPM, Riedel WJ. Additional dopamine reuptake inhibition attenuates vigilance impairment induced by serotonin reuptake inhibition in man. *J Psychopharmacol (Oxf)*. 2002;16(3):207-214. doi:10.1177/026988110201600303
189. American Psychiatric Association. *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales: DSM-5*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2018.
190. El Malhany N, Gulisano M, Rizzo R, Curatolo P. Tourette syndrome and comorbid ADHD: causes and consequences. *Eur J Pediatr*. 2015;174(3):279-288. doi:10.1007/s00431-014-2417-0
191. de Lacy N, Kodish I, Rachakonda S, Calhoun VD. Novel in silico multivariate mapping of intrinsic and anticorrelated connectivity to neurocognitive functional maps supports the maturational hypothesis of ADHD. *Hum Brain Mapp*. 2018;39(8):3449-3467. doi:10.1002/hbm.24187
192. Lombroso PJ, Scahill L. Tourette syndrome and obsessive-compulsive disorder. *Brain Dev*. 2008;30(4):231-237. doi:10.1016/j.braindev.2007.09.001
193. Darrow SM, Grados M, Sandor P, et al. Autism Spectrum Symptoms in a Tourette Syndrome Sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2017;56(7):610-617.e1. doi:10.1016/j.jaac.2017.05.002
194. Groth C, Mol Debes N, Rask CU, Lange T, Skov L. Course of Tourette Syndrome and Comorbidities in a Large Prospective Clinical Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2017;56(4):304-312. doi:10.1016/j.jaac.2017.01.010
195. Mogadam A, Keller AE, Arnold PD, et al. Magnetoencephalographic (MEG) brain activity during a mental flexibility task suggests some shared neurobiology in children with neurodevelopmental disorders. *J Neurodev Disord*. 2019;11(1):19. doi:10.1186/s11689-019-9280-2
196. Hirschtritt ME, Lee PC, Pauls DL, et al. Lifetime Prevalence, Age of Risk, and Etiology of Comorbid Psychiatric Disorders in Tourette Syndrome. *JAMA Psychiatry*. 2015;72(4):325-333. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.2650
197. Khalifa N, Knorrung A-LV. Psychopathology in a Swedish Population of School Children With Tic Disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2006;45(11):1346-1353. doi:10.1097/01.chi.0000251210.98749.83
198. Rizzo R, Gulisano M, Domini CN, Ferro MC, Curatolo P. The Relationship between Autism Spectrum Disorder and Tourette Syndrome in Childhood: An Overview of Shared Characteristics. *J Pediatr Neurol*. 2017;15(3):115-122. doi:10.1055/s-0037-1602821
199. Kaat AJ, Gadow KD, Lecavalier L. Psychiatric symptom impairment in children with autism spectrum disorders. *J Abnorm Child Psychol*. 2013;41(6):959-969. doi:10.1007/s10802-013-9739-7
200. Joshi G, Faraone SV, Wozniak J, et al. Symptom Profile of ADHD in Youth With High-Functioning Autism Spectrum Disorder: A Comparative Study in Psychiatrically Referred Populations. *J Atten Disord*. 2017;21(10):846-855. doi:10.1177/1087054714543368

201. Canals J, Hernández-Martínez C, Cosi S, Voltas N. The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in Spanish school children. *J Anxiety Disord.* 2012;26(7):746-752. doi:10.1016/j.janxdis.2012.06.003
202. Lebowitz ER, Motlagh MG, Katsovich L, et al. Tourette syndrome in youth with and without obsessive compulsive disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2012;21(8):451-457. doi:10.1007/s00787-012-0278-5
203. Lewin AB, Chang S, McCracken J, McQueen M, Piacentini J. Comparison of clinical features among youth with tic disorders, obsessive-compulsive disorder (OCD), and both conditions. *Psychiatry Res.* 2010;178(2):317-322. doi:10.1016/j.psychres.2009.11.013
204. Guzick AG, McNamara JPH, Reid AM, et al. The link between ADHD-like inattention and obsessions and compulsions during treatment of youth with OCD. *J Obsessive-Compuls Relat Disord.* 2017;12:1-8. doi:10.1016/j.jocrd.2016.11.004
205. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Lee SH, Ripke S, et al. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet.* 2013;45(9):984-994. doi:10.1038/ng.2711
206. Abramovitch A, Dar R, Mittelman A, Wilhelm S. Comorbidity Between Attention Deficit/Hyperactivity Disorder and Obsessive-Compulsive Disorder Across the Lifespan: A Systematic and Critical Review. *Harv Rev Psychiatry.* 2015;23(4):245-262. doi:10.1097/HRP.0000000000000050
207. Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. The familial risk of autism. *JAMA.* 2014;311(17):1770-1777. doi:10.1001/jama.2014.4144
208. Pettersson E, Lichtenstein P, Larsson H, et al. Genetic influences on eight psychiatric disorders based on family data of 4 408 646 full and half-siblings, and genetic data of 333 748 cases and controls. *Psychol Med.* 2019;49(07):1166-1173. doi:10.1017/S0033291718002039
209. Albin RL, Mink JW. Recent advances in Tourette syndrome research. *Trends Neurosci.* 2006;29(3):175-182. doi:10.1016/j.tins.2006.01.001
210. Martin J, Walters RK, Demontis D, et al. A Genetic Investigation of Sex Bias in the Prevalence of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry.* 2018;83(12):1044-1053. doi:10.1016/j.biopsych.2017.11.026
211. van der Plas E, Dupuis A, Arnold P, Crosbie J, Schachar R. Association of Autism Spectrum Disorder with Obsessive-Compulsive and Attention-Deficit/Hyperactivity Traits and Response Inhibition in a Community Sample. *J Autism Dev Disord.* 2016;46(9):3115-3125. doi:10.1007/s10803-016-2853-y
212. Delorme R, Goussé V, Roy I, et al. Shared executive dysfunctions in unaffected relatives of patients with autism and obsessive-compulsive disorder. *Eur Psychiatry.* 2007;22(1):32-38. doi:10.1016/j.eurpsy.2006.05.002
213. Comings DE. Clinical and Molecular Genetics of ADHD and Tourette Syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;931(1):50-83. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb05773.x
214. Lopresti AL. Oxidative and nitrosative stress in ADHD: possible causes and the potential of antioxidant-targeted therapies. *ADHD Atten Deficit Hyperact Disord.* 2015;7(4):237-247. doi:10.1007/s12402-015-0170-5
215. Henry J, Sloane M, Black-Pond C. Neurobiology and Neurodevelopmental Impact of Childhood Traumatic Stress and Prenatal Alcohol Exposure. *Lang Speech Hear Serv Sch.* 2007;38(2):99-108. doi:10.1044/0161-1461(2007/010)

216. Van den Bergh BRH, Dahnke R, Mennes M. Prenatal stress and the developing brain: Risks for neurodevelopmental disorders. *Dev Psychopathol.* 2018;30(3):743-762. doi:10.1017/S0954579418000342
217. Banerjee TD, Middleton F, Faraone SV. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatr.* 2007;96(9):1269-1274. doi:10.1111/j.1651-2227.2007.00430.x
218. Short AK, Baram TZ. Early-life adversity and neurological disease: age-old questions and novel answers. *Nat Rev Neurol.* September 2019:1-13. doi:10.1038/s41582-019-0246-5
219. Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology.* 2006;13(3):171-181. doi:10.1016/j.pathophys.2006.05.007
220. Huisman-van Dijk HM, van de Schoot R, Rijkeboer MM, Mathews CA, Cath DC. The relationship between tics, OC, ADHD and autism symptoms: A cross-disorder symptom analysis in Gilles de la Tourette syndrome patients and their family members. *Psychiatry Res.* 2016;237:138-146. doi:10.1016/j.psychres.2016.01.051
221. Donovan APA, Basson MA. The neuroanatomy of autism - a developmental perspective. *J Anat.* 2017;230(1):4-15. doi:10.1111/joa.12542
222. Huey ED, Zahn R, Krueger F, et al. A Psychological and Neuroanatomical Model of Obsessive-Compulsive Disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2008;20(4):390-408. doi:10.1176/jnp.2008.20.4.390
223. Ursu S, Carter CS. An initial investigation of the orbitofrontal cortex hyperactivity in obsessive-compulsive disorder: exaggerated representations of anticipated aversive events? *Neuropsychologia.* 2009;47(10):2145-2148. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2009.03.018
224. Ducharme S, Dougherty DD, Drevets WC. Neuroimaging and Neurocircuitry of Obsessive-Compulsive Disorder and Major Depressive Disorder. In: Camprodon JA, Rauch SL, Greenberg BD, Dougherty DD, eds. *Psychiatric Neurotherapeutics.* New York, NY: Springer New York; 2016:51-77. doi:10.1007/978-1-59745-495-7_3
225. Ecker C. The neuroanatomy of autism spectrum disorder: An overview of structural neuroimaging findings and their translatability to the clinical setting. *Autism.* 2017;21(1):18-28. doi:10.1177/1362361315627136
226. Dickstein SG, Bannon K, Xavier Castellanos F, Milham MP. The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry.* 2006;47(10):1051-1062. doi:10.1111/j.1469-7610.2006.01671.x
227. Klein M, Souza-Duran FL, Menezes AKPM, Alves TM, Busatto G, Louzã MR. Gray Matter Volume in Elderly adults With ADHD: Associations of Symptoms and Comorbidities With Brain Structures. *J Atten Disord.* July 2019:108705471985568. doi:10.1177/1087054719855683
228. Wu W, McAnulty G, Hamoda HM, et al. Detecting microstructural white matter abnormalities of frontal pathways in children with ADHD using advanced diffusion models. *Brain Imaging Behav.* April 2019. doi:10.1007/s11682-019-00108-5
229. Hoogman M, Muetzel R, Guimaraes JP, et al. Brain Imaging of the Cortex in ADHD: A Coordinated Analysis of Large-Scale Clinical and Population-Based Samples. *Am J Psychiatry.* 2019;176(7):531-542. doi:10.1176/appi.ajp.2019.18091033

230. Lerner A, Bagic A, Boudreau EA, et al. Neuroimaging of neuronal circuits involved in tic generation in patients with Tourette syndrome. *Neurology*. 2007;68(23):1979-1987. doi:10.1212/01.wnl.0000264417.18604.12
231. Neuner I, Werner CJ, Arrubla J, et al. Imaging the where and when of tic generation and resting state networks in adult Tourette patients. *Front Hum Neurosci*. 2014;8. doi:10.3389/fnhum.2014.00362
232. Fitzgerald KD, Welsh RC, Stern ER, et al. Developmental Alterations of Frontal-Striatal-Thalamic Connectivity in Obsessive-Compulsive Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2011;50(9):938-948.e3. doi:10.1016/j.jaac.2011.06.011
233. Paul S, Beucke JC, Kaufmann C, et al. Amygdala–prefrontal connectivity during appraisal of symptom-related stimuli in obsessive–compulsive disorder. *Psychol Med*. 2019;49(2):278-286. doi:10.1017/S003329171800079X
234. Posner J, Park C, Wang Z. Connecting the dots: A review of resting connectivity MRI studies in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neuropsychol Rev*. 2014;24(1):3-15. doi:10.1007/s11065-014-9251-z
235. Antshel KM, Zhang-James Y, Wagner KE, Ledesma A, Faraone SV. An update on the comorbidity of ADHD and ASD: a focus on clinical management. *Expert Rev Neurother*. 2016;16(3):279-293. doi:10.1586/14737175.2016.1146591
236. Hull JV, Dokovna LB, Jacokes ZJ, Torgerson CM, Irimia A, Van Horn JD. Resting-State Functional Connectivity in Autism Spectrum Disorders: A Review. *Front Psychiatry*. 2017;7:205. doi:10.3389/fpsyt.2016.00205
237. Conti E, Mitra J, Calderoni S, et al. Network over-connectivity differentiates autism spectrum disorder from other developmental disorders in toddlers: A diffusion MRI study. *Hum Brain Mapp*. 2017;38(5):2333-2344. doi:10.1002/hbm.23520
238. Jiang X, Liu L, Ji H, Zhu Y. Association of Affected Neurocircuitry With Deficit of Response Inhibition and Delayed Gratification in Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Narrative Review. *Front Hum Neurosci*. 2018;12:506. doi:10.3389/fnhum.2018.00506
239. Volkow ND, Wang G-J, Kollins SH, et al. Evaluating dopamine reward pathway in ADHD: clinical implications. *JAMA*. 2009;302(10):1084-1091. doi:10.1001/jama.2009.1308
240. Hinshaw SP. Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Controversy, Developmental Mechanisms, and Multiple Levels of Analysis. *Annu Rev Clin Psychol*. 2018;14(1):291-316. doi:10.1146/annurev-clinpsy-050817-084917
241. Huss M, Dirks B, Gu J, Robertson B, Newcorn JH, Ramos-Quiroga JA. Long-term safety and efficacy of guanfacine extended release in children and adolescents with ADHD. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2018;27(10):1283-1294. doi:10.1007/s00787-018-1113-4
242. Shier AC, Reichenbacher T, Ghuman HS, Ghuman JK. Pharmacological Treatment of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents: Clinical Strategies. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2012;5:1-17. doi:10.4137/JCNSD.S6691
243. Hong JH, Hwang IW, Lim MH, Kwon HJ, Jin HJ. Genetic associations between ADHD and dopaminergic genes (DAT1 and DRD4) VNTRs in Korean children. *Genes Genomics*. 2018;40(12):1309-1317. doi:10.1007/s13258-018-0726-9

244. Gehricke J-G, Swanson JM, Duong S, et al. Increased brain activity to unpleasant stimuli in individuals with the 7R allele of the DRD4 gene. *Psychiatry Res Neuroimaging*. 2015;231(1):58-63. doi:10.1016/j.psychres.2014.10.021
245. Wu J, Xiao H, Sun H, Zou L, Zhu L-Q. Role of Dopamine Receptors in ADHD: A Systematic Meta-analysis. *Mol Neurobiol*. 2012;45(3):605-620. doi:10.1007/s12035-012-8278-5
246. Kamal M, Nady G, Abushady A, Khalil M. Association of dopamine D4 receptor gene variants with autism. *Int J Res Med Sci*. 2015;2658-2663. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20150809
247. Cruz C, Camarena B, King N, et al. Increased prevalence of the seven-repeat variant of the dopamine D4 receptor gene in patients with obsessive-compulsive disorder with tics. *Neurosci Lett*. 1997;231(1):1-4. doi:10.1016/S0304-3940(97)00523-5
248. Taj. M. J RJ, Viswanath B, Purushottam M, Kandavel T, Janardhan Reddy YC, Jain S. DRD4 gene and obsessive compulsive disorder: Do symptom dimensions have specific genetic correlates? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013;41:18-23. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.10.023
249. Walitza S, Scherag A, Renner TJ, et al. Transmission disequilibrium studies in early onset of obsessive-compulsive disorder for polymorphisms in genes of the dopaminergic system. *J Neural Transm Vienna Austria 1996*. 2008;115(7):1071-1078. doi:10.1007/s00702-008-0051-6
250. Millet B, Chabane N, Delorme R, et al. Association between the dopamine receptor D4 (DRD4) gene and obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 2003;116B(1):55-59. doi:10.1002/ajmg.b.10034
251. Hemmings SMJ, Kinnear CJ, Lochner C, et al. Early- versus late-onset obsessive-compulsive disorder: investigating genetic and clinical correlates. *Psychiatry Res*. 2004;128(2):175-182. doi:10.1016/j.psychres.2004.05.007
252. Hemmings SMJ, Kinnear CJ, Niehaus DJH, et al. Investigating the role of dopaminergic and serotonergic candidate genes in obsessive-compulsive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol*. 2003;13(2):93-98.
253. Frisch A, Michaelovsky E, Rockah R, et al. Association between obsessive-compulsive disorder and polymorphisms of genes encoding components of the serotonergic and dopaminergic pathways. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol*. 2000;10(3):205-209.
254. Tarnok Z, Ronai Z, Gervai J, et al. Dopaminergic candidate genes in Tourette syndrome: Association between tic severity and 3' UTR polymorphism of the dopamine transporter gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144B(7):900-905. doi:10.1002/ajmg.b.30517
255. Díaz-Anzaldúa A, Joober R, Rivière J-B, et al. Tourette syndrome and dopaminergic genes: a family-based association study in the French Canadian founder population. *Mol Psychiatry*. 2004;9(3):272-277. doi:10.1038/sj.mp.4001411
256. Huang Y, Liu X, Li T, et al. [Transmission disequilibrium test of DRD4 exon III 48bp variant number tandem repeat polymorphism and tic disorder]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin J Med Genet*. 2002;19(2):100-103.

257. Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;57(11):1313-1323. doi:10.1016/j.biopsych.2004.11.024
258. Klein M, Berger S, Hoogman M, et al. Meta-analysis of the DRD5 VNTR in persistent ADHD. *Eur Neuropsychopharmacol J Eur Coll Neuropsychopharmacol*. 2016;26(9):1527-1532. doi:10.1016/j.euroneuro.2016.06.012
259. Taurines R, Grünblatt E, Schecklmann M, et al. Altered mRNA expression of monoaminergic candidate genes in the blood of children with attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *World J Biol Psychiatry*. 2011;12(sup1):104-108. doi:10.3109/15622975.2011.600297
260. Philippe A, Guilloud-Bataille M, Martinez M, et al. Analysis of ten candidate genes in autism by association and linkage. *Am J Med Genet*. 2002;114(2):125-128. doi:10.1002/ajmg.10041
261. Feng J, Sobell JL, Heston LL, Cook EH, Goldman D, Sommer SS. Scanning of the dopamine D1 and D5 receptor genes by REF in neuropsychiatric patients reveals a novel missense change at a highly conserved amino acid. *Am J Med Genet*. 1998;81(2):172-178.
262. Barr CL, Wigg KG, Zovko E, Sandor P, Tsui LC. No evidence for a major gene effect of the dopamine D4 receptor gene in the susceptibility to Gilles de la Tourette syndrome in five Canadian families. *Am J Med Genet*. 1996;67(3):301-305. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19960531)67:3<301::AID-AJMG6>3.0.CO;2-P
263. Ferrari M, Termine C, Franciotta D, et al. Dopaminergic receptor D5 mRNA expression is increased in circulating lymphocytes of Tourette syndrome patients. *J Psychiatr Res*. 2008;43(1):24-29. doi:10.1016/j.jpsychires.2008.01.014
264. Brett PM, Curtis D, Robertson MM, Gurling HM. The genetic susceptibility to Gilles de la Tourette syndrome in a large multiple affected British kindred: linkage analysis excludes a role for the genes coding for dopamine D1, D2, D3, D4, D5 receptors, dopamine beta hydroxylase, tyrosinase, and tyrosine hydroxylase. *Biol Psychiatry*. 1995;37(8):533-540. doi:10.1016/0006-3223(94)00161-U
265. Satoh H, Suzuki H, Saitow F. Downregulation of Dopamine D1-like Receptor Pathways of GABAergic Interneurons in the Anterior Cingulate Cortex of Spontaneously Hypertensive Rats. *Neuroscience*. 2018;394:267-285. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.10.039
266. Misener VL, Luca P, Azeke O, et al. Linkage of the dopamine receptor D1 gene to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2004;9(5):500-509. doi:10.1038/sj.mp.4001440
267. Hettlinger JA, Liu X, Schwartz CE, Michaelis RC, Holden JJA. A DRD1 haplotype is associated with risk for autism spectrum disorders in male-only affected sib-pair families. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 2008;147B(5):628-636. doi:10.1002/ajmg.b.30655
268. Olver JS, O'Keefe G, Jones GR, et al. Dopamine D1 receptor binding in the anterior cingulate cortex of patients with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Res Neuroimaging*. 2010;183(1):85-88. doi:10.1016/j.psychresns.2010.04.004
269. Chou I-C, Tsai C-H, Lee C-C, et al. Association analysis between Tourette's syndrome and dopamine D1 receptor gene in Taiwanese children. *Psychiatr Genet*. 2004;14(4):219-221.

270. Kollins SH, Anastopoulos AD, Lachiewicz AM, et al. SNPs in dopamine D2 receptor gene (DRD2) and norepinephrine transporter gene (NET) are associated with continuous performance task (CPT) phenotypes in ADHD children and their families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B(8):1580-1588. doi:10.1002/ajmg.b.30876
271. Denys D, van der Wee N, Janssen J, De Geus F, Westenberg HGM. Low level of dopaminergic D2 receptor binding in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry.* 2004;55(10):1041-1045. doi:10.1016/j.biopsych.2004.01.023
272. Lee C-C, Chou I-C, Tsai C-H, Wang T-R, Li T-C, Tsai F-J. Dopamine receptor D2 gene polymorphisms are associated in Taiwanese children with Tourette syndrome. *Pediatr Neurol.* 2005;33(4):272-276. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2005.05.005
273. Herzberg I, Valencia-Duarte AV, Kay VA, et al. Association of DRD2 variants and Gilles de la Tourette syndrome in a family-based sample from a South American population isolate. *Psychiatr Genet.* 2010;20(4):179-183. doi:10.1097/YPG.0b013e32833a215a
274. Retz W, Rösler M, Supprian T, Retz-Junginger P, Thome J. Dopamine D3 receptor gene polymorphism and violent behavior: relation to impulsiveness and ADHD-related psychopathology. *J Neural Transm.* 2003;110(5):561-572. doi:10.1007/s00702-002-0805-5
275. Barr CL, Wigg KG, Wu J, et al. Linkage study of two polymorphisms at the dopamine D3 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet.* 2000;96(1):114-117. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(20000207)96:1<114::AID-AJMG22>3.0.CO;2-R
276. Staal WG, de Krom M, de Jonge MV. Brief report: the dopamine-3-receptor gene (DRD3) is associated with specific repetitive behavior in autism spectrum disorder (ASD). *J Autism Dev Disord.* 2012;42(5):885-888. doi:10.1007/s10803-011-1312-z
277. Catalano M, Sciuto G, Bella DD, Novelli E, Nobile M, Bellodi L. Lack of association between obsessive-compulsive disorder and the dopamine D3 receptor gene: Some preliminary considerations. *Am J Med Genet.* 1994;54(3):253-255. doi:10.1002/ajmg.1320540312
278. Roman T, Polanczyk GV, Zeni C, Genro JP, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* 2006;11(1):8-10. doi:10.1038/sj.mp.4001743
279. da Silva TL, Pianca TG, Roman T, et al. Adrenergic alpha2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. *J Neural Transm Vienna Austria 1996.* 2008;115(2):341-345. doi:10.1007/s00702-007-0835-0
280. Schmitz M, Denardin D, Silva TL, et al. Association between alpha-2a-adrenergic receptor gene and ADHD inattentive type. *Biol Psychiatry.* 2006;60(10):1028-1033. doi:10.1016/j.biopsych.2006.02.035
281. Mazei-Robison MS, Couch RS, Shelton RC, Stein MA, Blakely RD. Sequence variation in the human dopamine transporter gene in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropharmacology.* 2005;49(6):724-736. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.08.003

282. Chen C-K, Chen S-L, Mill J, et al. The dopamine transporter gene is associated with attention deficit hyperactivity disorder in a Taiwanese sample. *Mol Psychiatry*. 2003;8(4):393-396. doi:10.1038/sj.mp.4001238
283. Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, et al. Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 2005;134B(1):67-72. doi:10.1002/ajmg.b.30142
284. Hamilton PJ, Campbell NG, Sharma S, et al. De novo mutation in the dopamine transporter gene associates dopamine dysfunction with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*. 2013;18(12):1315-1323. doi:10.1038/mp.2013.102
285. Nakamura K, Sekine Y, Ouchi Y, et al. Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(1):59-68. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2009.137
286. DiCarlo GE, Aguilar JI, Matthies HJ, et al. Autism-linked dopamine transporter mutation alters striatal dopamine neurotransmission and dopamine-dependent behaviors. *J Clin Invest*. 2019;129(8):3407-3419. doi:10.1172/JCI127411
287. Gadow KD, Roohi J, DeVincent CJ, Hatchwell E. Association of ADHD, tics, and anxiety with dopamine transporter (*DAT1*) genotype in autism spectrum disorder. *J Child Psychol Psychiatry*. 2008;49(12):1331-1338. doi:10.1111/j.1469-7610.2008.01952.x
288. Zhang S, Jiang W, Tang X, et al. Association study of dopamine transporter gene (*DAT1*) variable tandem repeat sequence (VNTR) with obsessive-compulsive disorder in Chinese Han Population. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(3):4606-4610.
289. Yoon DY, Rippel CA, Kobets AJ, et al. Dopaminergic polymorphisms in Tourette syndrome: association with the *DAT* gene (*SLC6A3*). *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet*. 2007;144B(5):605-610. doi:10.1002/ajmg.b.30466
290. Hesse S, Ulke C, Rullmann M, et al. Prefrontal-thalamic noradrenaline transporter availability is reduced in adults with ADHD. In: *Nuklearmedizin*. Vol 58. Georg Thieme Verlag KG; 2019;V21. doi:10.1055/s-0039-1683515
291. Sigurdardottir HL, Kranz GS, Rami-Mark C, et al. Effects of norepinephrine transporter gene variants on NET binding in ADHD and healthy controls investigated by PET. *Hum Brain Mapp*. 2016;37(3):884-895. doi:10.1002/hbm.23071
292. Park S, Park J-E, Cho S-C, et al. No association of the norepinephrine transporter gene (*SLC6A2*) and cognitive and behavioural phenotypes of patients with autism spectrum disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2014;264(6):507-515. doi:10.1007/s00406-013-0480-6
293. Miguita K, Cordeiro Q, Shavitt RG, Miguel EC, Vallada H. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1516-44462006000200017&lng=en&nrm=iso&tlng=es. *Braz J Psychiatry*. 2006;28(2):158-159. doi:10.1590/S1516-44462006000200017
294. Rippel CA, Kobets AJ, Yoon DY, et al. Norepinephrine transporter polymorphisms in Tourette syndrome with and without attention deficit hyperactivity disorder: no evidence for significant association. *Psychiatr Genet*. 2006;16(5):179. doi:10.1097/01.ypg.0000218622.96127.71
295. Retz W, Rösler M, Kissling C, et al. Norepinephrine transporter and catecholamine-O-methyltransferase gene variants and attention-deficit/hyperactivity disorder

- symptoms in adults. *J Neural Transm.* 2008;115(2):323-329. doi:10.1007/s00702-007-0822-5
296. Sun H, Yuan F, Shen X, Xiong G, Wu J. Role of COMT in ADHD: a Systematic Meta-Analysis. *Mol Neurobiol.* 2014;49(1):251-261. doi:10.1007/s12035-013-8516-5
297. Eisenberg J, Mei-Tal G, Steinberg A, et al. Haplotype relative risk study of catechol-O-methyltransferase (COMT) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): Association of the high-enzyme activity val allele with adhd impulsive-hyperactive phenotype. *Am J Med Genet.* 1999;88(5):497-502. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19991015)88:5<497::AID-AJMG12>3.0.CO;2-F
298. Hawi Z, Millar N, Daly G, Fitzgerald M, Gill M. No association between catechol-O-methyltransferase (COMT) gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample. *Am J Med Genet.* 2000;96(3):282-284. doi:10.1002/1096-8628(20000612)96:3<282::AID-AJMG9>3.0.CO;2-R
299. Hidding E, Swaab H, de Sonnevile LMJ, van Engeland H, Vorstman J a. S. The role of COMT and plasma proline in the variable penetrance of autistic spectrum symptoms in 22q11.2 deletion syndrome. *Clin Genet.* 2016;90(5):420-427. doi:10.1111/cge.12766
300. Radoeva PD, Coman IL, Salazar CA, et al. Association between autism spectrum disorder in individuals with velocardiofacial (22q11.2 deletion) syndrome and PRODH and COMT genotypes. *Psychiatr Genet.* 2014;24(6):269-272. doi:10.1097/YPG.0000000000000062
301. Alsobrook JP, Zohar AH, Leboyer M, Chabane N, Ebstein RP, Pauls DL. Association between the COMT locus and obsessive-compulsive disorder in females but not males. *Am J Med Genet.* 2002;114(1):116-120. doi:10.1002/ajmg.10040
302. Melo-Felippe FB, de Salles Andrade JB, Giori IG, Vieira-Fonseca T, Fontenelle LF, Kohlrausch FB. Catechol-O-Methyltransferase Gene Polymorphisms in Specific Obsessive-Compulsive Disorder Patients' Subgroups. *J Mol Neurosci.* 2016;58(1):129-136. doi:10.1007/s12031-015-0697-0
303. Nyman ES, Ogdie MN, Loukola A, et al. ADHD Candidate Gene Study in a Population-Based Birth Cohort: Association with DBH and DRD2. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2007;46(12):1614-1621. doi:10.1097/chi.0b013e3181579682
304. Kopecková M, Paclt I, Petrášek J, Pacltová D, Malíková M, Zagatová V. Some ADHD polymorphisms (in genes DAT1, DRD2, DRD3, DBH, 5-HTT) in case-control study of 100 subjects 6-10 age. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008;29(2):246-251.
305. Barkley RA, Smith KM, Fischer M, Navia B. An examination of the behavioral and neuropsychological correlates of three ADHD candidate gene polymorphisms (DRD4 7+, DBH TaqI A2, and DAT1 40 bp VNTR) in hyperactive and normal children followed to adulthood. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006;141B(5):487-498. doi:10.1002/ajmg.b.30326
306. Tassone F, Qi L, Zhang W, Hansen RL, Pessah IN, Hertz-Picciotto I. MAOA, DBH and SLC6A4 variants in CHARGE: A case control study of autism spectrum disorders. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res.* 2011;4(4):250-261. doi:10.1002/aur.196
307. Jones MB, Palmour RM, Zwaigenbaum L, Szatmari P. Modifier effects in autism at the MAO-A and DBH loci. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004;126B(1):58-65. doi:10.1002/ajmg.b.20172

VII. Bibliografía

308. Ozbay F, Wigg KG, Turanli ET, et al. Analysis of the dopamine beta hydroxylase gene in Gilles de la Tourette syndrome. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet Off Publ Int Soc Psychiatr Genet.* 2006;141B(6):673-677. doi:10.1002/ajmg.b.30393
309. Comings DE, Wu S, Chiu C, et al. Polygenic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder: the additive and subtractive effect of the three dopaminergic genes--DRD2, D beta H, and DAT1. *Am J Med Genet.* 1996;67(3):264-288. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19960531)67:3<264::AID-AJMG4>3.0.CO;2-N
310. Liu L, Cheng J, Su Y, et al. Deficiency of Sustained Attention in ADHD and Its Potential Genetic Contributor MAOA. *J Atten Disord.* 2018;22(9):878-885. doi:10.1177/1087054715574832
311. Ko C-H, Hsieh T-J, Wang P-W, Lin W-C, Chen C-S, Yen J-Y. The Altered Brain Activation of Phonological Working Memory, Dual Tasking, and Distraction Among Participants With Adult ADHD and the Effect of the MAOA Polymorphism. *J Atten Disord.* 2018;22(3):240-249. doi:10.1177/1087054715572609
312. Karmakar A, Goswami R, Saha T, et al. Pilot study indicate role of preferentially transmitted monoamine oxidase gene variants in behavioral problems of male ADHD probands. *BMC Med Genet.* 2017;18(1):109. doi:10.1186/s12881-017-0469-5
313. Camarena B, Rinetti G, Cruz C, Gómez A, Fuente JR de la, Nicolini H. Additional evidence that genetic variation of MAO-A gene supports a gender subtype in obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet.* 2001;105(3):279-282. doi:10.1002/ajmg.1323
314. Monuteaux MC, Seidman LJ, Faraone SV, et al. A preliminary study of dopamine D4 receptor genotype and structural brain alterations in adults with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008;147B(8):1436-1441. doi:10.1002/ajmg.b.30870
315. Langley K, Marshall L, van den Bree M, et al. Association of the dopamine D4 receptor gene 7-repeat allele with neuropsychological test performance of children with ADHD. *Am J Psychiatry.* 2004;161(1):133-138. doi:10.1176/appi.ajp.161.1.133
316. Kieling C, Roman T, Doyle AE, Hutz MH, Rohde LA. Association between DRD4 gene and performance of children with ADHD in a test of sustained attention. *Biol Psychiatry.* 2006;60(10):1163-1165. doi:10.1016/j.biopsych.2006.04.027
317. Reiersen AM, Todorov AA. Association between DRD4 genotype and Autistic Symptoms in DSM-IV ADHD. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2011;20(1):15-21.
318. Grice DE, Leckman JF, Pauls DL, et al. Linkage disequilibrium between an allele at the dopamine D4 receptor locus and Tourette syndrome, by the transmission-disequilibrium test. *Am J Hum Genet.* 1996;59(3):644-652.
319. Gadud KD, DeVincent CJ, Olvet DM, Pisarevskaya V, Hatchwell E. Association of DRD4 polymorphism with severity of oppositional defiant disorder, separation anxiety disorder and repetitive behaviors in children with autism spectrum disorder: DRD4 genotype in ASD. *Eur J Neurosci.* 2010;32(6):1058-1065. doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07382.x
320. Maia TV, Conceição VA. Dopaminergic Disturbances in Tourette Syndrome: An Integrative Account. *Biol Psychiatry.* 2018;84(5):332-344. doi:10.1016/j.biopsych.2018.02.1172
321. Martino D, Leckman JF. *Tourette Syndrome.* OUP USA; 2013.

322. Wong DF, Brašić JR, Singer HS, et al. Mechanisms of Dopaminergic and Serotonergic Neurotransmission in Tourette Syndrome: Clues from an in vivo Neurochemistry Study with PET. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2008;33(6):1239-1251. doi:10.1038/sj.npp.1301528
323. Lee Y, Kim H, Kim J-E, et al. Excessive D1 Dopamine Receptor Activation in the Dorsal Striatum Promotes Autistic-Like Behaviors. *Mol Neurobiol*. 2018;55(7):5658-5671. doi:10.1007/s12035-017-0770-5
324. Scott-Van Zeeland AA, Dapretto M, Ghahremani DG, Poldrack RA, Bookheimer SY. Reward processing in autism. *Autism Res Off J Int Soc Autism Res*. 2010;3(2):53-67. doi:10.1002/aur.122
325. Mundy P. Annotation: The neural basis of social impairments in autism: the role of the dorsal medial-frontal cortex and anterior cingulate system. *J Child Psychol Psychiatry*. 2003;44(6):793-809. doi:10.1111/1469-7610.00165
326. Gordon I, Jack A, Pretzsch CM, et al. Intranasal Oxytocin Enhances Connectivity in the Neural Circuitry Supporting Social Motivation and Social Perception in Children with Autism. *Sci Rep*. 2016;6:35054. doi:10.1038/srep35054
327. Pavál D. A Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Dev Neurosci*. 2017;39(5):355-360. doi:10.1159/000478725
328. Bast N, Poustka L, Freitag CM. The locus coeruleus-norepinephrine system as pacemaker of attention - a developmental mechanism of derailed attentional function in autism spectrum disorder. *Eur J Neurosci*. 2018;47(2):115-125. doi:10.1111/ejn.13795
329. Arnold LE, Aman MG, Cook AM, et al. Atomoxetine for Hyperactivity in Autism Spectrum Disorders: Placebo-Controlled Crossover Pilot Trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2006;45(10):1196-1205. doi:10.1097/01.chi.0000231976.28719.2a
330. Aman MG, Farmer CA, Hollway J, Arnold LE. Treatment of Inattention, Overactivity, and Impulsiveness in Autism Spectrum Disorders. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2008;17(4):713-738. doi:10.1016/j.chc.2008.06.009
331. Wood J, LaPalombara Z, Ahmari SE. Monoamine abnormalities in the SAPAP3 knockout model of obsessive-compulsive disorder-related behaviour. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2018;373(1742):20170023. doi:10.1098/rstb.2017.0023
332. Berridge KC, Aldridge JW, Houchard KR, Zhuang X. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biol*. 2005;3:4. doi:10.1186/1741-7007-3-4
333. Sesia T, Bizup B, Grace AA. Evaluation of Animal Models of Obsessive-Compulsive Disorder: Correlation with Phasic Dopamine Neuron Activity. *Int J Neuropsychopharmacol Off Sci J Coll Int Neuropsychopharmacol CINP*. 2013;16(6):1295-1307. doi:10.1017/S146114571200154X
334. Korff S, Stein DJ, Harvey BH. Stereotypic behaviour in the deer mouse: pharmacological validation and relevance for obsessive compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008;32(2):348-355. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.08.032
335. Bystritsky A, Ackerman DL, Rosen RM, et al. Augmentation of serotonin reuptake inhibitors in refractory obsessive-compulsive disorder using adjunctive olanzapine: a

- placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*. 2004;65(4):565-568. doi:10.4088/jcp.v65n0418
336. Komossa K, Depping AM, Meyer M, Kissling W, Leucht S. Second-generation antipsychotics for obsessive compulsive disorder. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(12). doi:10.1002/14651858.CD008141.pub2
337. Dold M, Aigner M, Lanzenberger R, Kasper S. Antipsychotic augmentation of serotonin reuptake inhibitors in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder: a meta-analysis of double-blind, randomized, placebo-controlled trials. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16(3):557-574. doi:10.1017/S1461145712000740
338. Veale D, Miles S, Smallcombe N, Ghezai H, Goldacre B, Hodsoll J. Atypical antipsychotic augmentation in SSRI treatment refractory obsessive-compulsive disorder: a systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*. 2014;14(1):317. doi:10.1186/s12888-014-0317-5
339. Hirschtritt ME, Bloch MH, Mathews CA. Obsessive-Compulsive Disorder: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA*. 2017;317(13):1358-1367. doi:10.1001/jama.2017.2200
340. Pittenger C, Kelmendi B, Bloch M, Krystal JH, Coric V. Clinical Treatment of Obsessive Compulsive Disorder. *Psychiatry Edgmont*. 2005;2(11):34-43.
341. Hollander E, Friedberg J, Wasserman S, Allen A, Birnbaum M, Koran LM. Venlafaxine in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry*. 2003;64(5):546-550. doi:10.4088/jcp.v64n0508
342. Dell'Osso B, Nestadt G, Allen A, Hollander E. Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors in the treatment of obsessive-compulsive disorder: A critical review. *J Clin Psychiatry*. 2006;67(4):600-610. doi:10.4088/jcp.v67n0411
343. Atmaca M. Treatment-refractory obsessive compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;70:127-133. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.12.004
344. Prazeres DMF, Martins SAM. G protein-coupled receptors: an overview of signaling mechanisms and screening assays. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2015;1272:3-19. doi:10.1007/978-1-4939-2336-6_1
345. Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett*. 2002;520(1-3):97-101. doi:10.1016/S0014-5793(02)02775-8
346. Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, et al. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(8):4903-4908. doi:10.1073/pnas.0230374100
347. Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 2018;25(1):4-12. doi:10.1038/s41594-017-0011-7
348. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(12):829-842. doi:10.1038/nrd.2017.178
349. Weis WI, Kobilka BK. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem*. 2018;87:897-919. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-033910

350. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 2000;289(5480):739-745. doi:10.1126/science.289.5480.739
351. Jaakola V-P, Griffith MT, Hanson MA, et al. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*. 2008;322(5905):1211-1217. doi:10.1126/science.1164772
352. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*. 2007;318(5854):1258-1265. doi:10.1126/science.1150577
353. Park JH, Scheerer P, Hofmann KP, Choe H-W, Ernst OP. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*. 2008;454(7201):183-187. doi:10.1038/nature07063
354. Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, et al. Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*. 2011;477(7366):549-555. doi:10.1038/nature10361
355. Koehl A, Hu H, Maeda S, et al. Structure of the μ -opioid receptor-Gi protein complex. *Nature*. 2018;558(7711):547-552. doi:10.1038/s41586-018-0219-7
356. Schiöth HB, Fredriksson R. The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *Gen Comp Endocrinol*. 2005;142(1):94-101. doi:10.1016/j.ygcen.2004.12.018
357. Hu G-M, Mai T-L, Chen C-M. Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Sci Rep*. 2017;7(1):15495. doi:10.1038/s41598-017-15707-9
358. Papac DI, Thornburg KR, Büllsbach EE, Crouch RK, Knapp DR. Palmitoylation of a G-protein coupled receptor. Direct analysis by tandem mass spectrometry. *J Biol Chem*. 1992;267(24):16889-16894.
359. Kennedy ME, Limbird LE. Mutations of the alpha 2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein coupling. *J Biol Chem*. 1993;268(11):8003-8011.
360. Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*. 2006;1(8):761-782. doi:10.1002/cmdc.200600134
361. de Graaf C, Song G, Cao C, et al. Extending the Structural View of Class B GPCRs. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(12):946-960. doi:10.1016/j.tibs.2017.10.003
362. Galés C, Van Durm JJJ, Schaak S, et al. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(9):778-786. doi:10.1038/nsmb1134
363. Nestler EJ, Duman RS. Heterotrimeric G Proteins. *Basic Neurochem Mol Cell Med Asp 6th Ed*. 1999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28116/>. Accessed October 16, 2019.
364. Schmidt CJ, Thomas TC, Levine MA, Neer EJ. Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J Biol Chem*. 1992;267(20):13807-13810.
365. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang X-Y. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol*. 2016;428(19):3850-3868. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.002
366. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):60-71. doi:10.1038/nrm2299

367. Carty J, Hildebrandt D. Distinct Guanine Nucleotide Binding and Release Properties of the Three Gi Proteins. :7.
368. Caltabiano G, Gonzalez A, Cordero A, Campillo M, Pardo L. The role of hydrophobic amino acids in the structure and function of the rhodopsin family of G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol.* 2013;520:99-115. doi:10.1016/B978-0-12-391861-1.00005-8
369. Senarath K, Kankanamge D, Samaradivakara S, Ratnayake K, Tennakoon M, Karunarathne A. Regulation of G Protein $\beta\gamma$ Signaling. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;339:133-191. doi:10.1016/bs.ircmb.2018.02.008
370. Pierce KL, Lefkowitz RJ. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(10):727-733. doi:10.1038/35094577
371. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and β -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17(4):159-165. doi:10.1016/j.tem.2006.03.008
372. Gurevich VV, Gurevich EV. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Front Pharmacol.* 2019;10. doi:10.3389/fphar.2019.00125
373. Mores KL, Cassell RJ, van Rijn RM. Arrestin recruitment and signaling by G protein-coupled receptor heteromers. *Neuropharmacology.* 2019;152:15-21. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.11.010
374. Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(2):1261-1273. doi:10.1074/jbc.M506576200
375. Jean-Charles P-Y, Kaur S, Shenoy SK. GPCR signaling via β -arrestin-dependent mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2017;70(3):142-158. doi:10.1097/FJC.0000000000000482
376. Jones BW, Song GJ, Greuber EK, Hinkle PM. Phosphorylation of the endogenous thyrotropin-releasing hormone receptor in pituitary GH3 cells and pituitary tissue revealed by phosphosite-specific antibodies. *J Biol Chem.* 2007;282(17):12893-12906. doi:10.1074/jbc.M610854200
377. Nobles KN, Xiao K, Ahn S, et al. Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci Signal.* 2011;4(185):ra51. doi:10.1126/scisignal.2001707
378. Wootten D, Christopoulos A, Marti-Solano M, Babu MM, Sexton PM. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(10):638-653. doi:10.1038/s41580-018-0049-3
379. Agnati LF, Fuxe K, Zini I, Lenzi P, Hökfelt T. Aspects on receptor regulation and isoreceptor identification. *Med Biol.* 1980;58(4):182-187.
380. Fuxe K, Agnati LF, Benfenati F, et al. Modulation by cholecystokinins of 3H-spiroperidol binding in rat striatum: evidence for increased affinity and reduction in the number of binding sites. *Acta Physiol Scand.* 1981;113(4):567-569. doi:10.1111/j.1748-1716.1981.tb06942.x
381. Fuxe K, Agnati LF, Benfenati F, et al. Evidence for the existence of receptor-receptor interactions in the central nervous system. Studies on the regulation of monoamine receptors by neuropeptides. *J Neural Transm Suppl.* 1983;18:165-179.

382. Maggio R, Vogel Z, Wess J. Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular “cross-talk” between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(7):3103-3107. doi:10.1073/pnas.90.7.3103
383. Gurevich VV, Gurevich EV. How and why do GPCRs dimerize? *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(5):234-240. doi:10.1016/j.tips.2008.02.004
384. Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, Bai M. The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J Biol Chem*. 2001;276(7):5316-5322. doi:10.1074/jbc.M005958200
385. Botelho AV, Huber T, Sakmar TP, Brown MF. Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. *Biophys J*. 2006;91(12):4464-4477. doi:10.1529/biophysj.106.082776
386. Guidolin D, Marcoli M, Tortorella C, Maura G, Agnati LF. Receptor-Receptor Interactions as a Widespread Phenomenon: Novel Targets for Drug Development? *Front Endocrinol*. 2019;10. doi:10.3389/fendo.2019.00053
387. Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SGF, et al. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18):7682-7687. doi:10.1073/pnas.0611448104
388. Jastrzebska B, Maeda T, Zhu L, et al. Functional Characterization of Rhodopsin Monomers and Dimers in Detergents. *J Biol Chem*. 2004;279(52):54663-54675. doi:10.1074/jbc.M408691200
389. Kuszak AJ, Pitchiaya S, Anand JP, Mosberg HI, Walter NG, Sunahara RK. Purification and Functional Reconstitution of Monomeric μ -Opioid Receptors. *J Biol Chem*. 2009;284(39):26732-26741. doi:10.1074/jbc.M109.026922
390. Hillion J, Canals M, Torvinen M, et al. Coaggregation, Cointernalization, and Codesensitization of Adenosine A2A Receptors and Dopamine D2Receptors. *J Biol Chem*. 2002;277(20):18091-18097. doi:10.1074/jbc.M107731200
391. Albizu L, Moreno JL, González-Maeso J, Sealfon SC. Heteromerization of G Protein-Coupled Receptors: Relevance to Neurological Disorders and Neurotherapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010;9(5):636-650.
392. Reddy PS, Corley RB. Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 1998;20(7):546-554. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199807)20:7<546::AID-BIES5>3.0.CO;2-I
393. Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep*. 2004;5(1):30-34. doi:10.1038/sj.embor.7400052
394. Marshall FH, Jones KA, Kaupmann K, Bettler B. GABAB receptors – the first 7TM heterodimers. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(10):396-399. doi:10.1016/S0165-6147(99)01383-8
395. Margeta-Mitrovic M, Jan YN, Jan LY. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*. 2000;27(1):97-106. doi:10.1016/S0896-6273(00)00012-x
396. Milligan G. The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(1):23-29. doi:10.1016/j.coph.2009.09.010

397. Ferré S, Casadó V, Devi LA, et al. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol Rev.* 2014;66(2):413-434. doi:10.1124/pr.113.008052
398. Laroche G, Lépine M-C, Thériault C, et al. Oligomerization of the alpha and beta isoforms of the thromboxane A2 receptor: relevance to receptor signaling and endocytosis. *Cell Signal.* 2005;17(11):1373-1383. doi:10.1016/j.cellsig.2005.02.008
399. George SR, Fan T, Xie Z, et al. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem.* 2000;275(34):26128-26135. doi:10.1074/jbc.M000345200
400. González S, Moreno-Delgado D, Moreno E, et al. Circadian-Related Heteromerization of Adrenergic and Dopamine D4 Receptors Modulates Melatonin Synthesis and Release in the Pineal Gland. *PLoS Biol.* 2012;10(6). doi:10.1371/journal.pbio.1001347
401. Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol.* 2005;67(5):1697-1704. doi:10.1124/mol.104.006882
402. George SR, O'Dowd BF. A Novel Dopamine Receptor Signaling Unit in Brain: Heterooligomers of D1 And D2 Dopamine Receptors. *The Scientific World Journal.* doi:10.1100/tsw.2007.223
403. Ferrada C, Moreno E, Casadó V, et al. Marked changes in signal transduction upon heteromerization of dopamine D1 and histamine H3 receptors. *Br J Pharmacol.* 2009;157(1):64-75. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00152.x
404. Casadó V, Cortés A, Mallol J, et al. GPCR homomers and heteromers: a better choice as targets for drug development than GPCR monomers? *Pharmacol Ther.* 2009;124(2):248-257. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.07.005
405. Pei L, Li S, Wang M, et al. Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant-like effects. *Nat Med.* 2010;16(12):1393-1395. doi:10.1038/nm.2263
406. Busnelli M, Mauri M, Parenti M, Chini B. Analysis of GPCR Dimerization Using Acceptor Photobleaching Resonance Energy Transfer Techniques. In: *Methods in Enzymology.* Vol 521. Elsevier; 2013:311-327. doi:10.1016/B978-0-12-391862-8.00017-X
407. Yano H, Provasi D, Cai NS, Filizola M, Ferré S, Javitch JA. Development of novel biosensors to study receptor-mediated activation of the G-protein α subunits Gs and Golf. *J Biol Chem.* 2017;292(49):19989-19998. doi:10.1074/jbc.M117.800698
408. Chen T-W, Wardill TJ, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature.* 2013;499(7458):295-300. doi:10.1038/nature12354
409. Gallo EF, Posner J. Moving towards causality in attention-deficit hyperactivity disorder: overview of neural and genetic mechanisms. *Lancet Psychiatry.* 2016;3(6):555-567. doi:10.1016/S2215-0366(16)00096-1
410. Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(4):274. doi:10.1038/35067575
411. Casadó-Anguera Verònica. *Allosteric Interactions between Catecholamine Receptors and Other G Protein-Coupled Receptors: Pharmacological and Functional Characterization (Tesis Doctoral).* University of Barcelona <http://hdl.handle.net/2445/123434>.

412. Borroto-Escuela DO, Flajolet M, Agnati LF, Greengard P, Fuxe K. Bioluminescence Resonance Energy Transfer Methods to Study G Protein-Coupled Receptor–Receptor Tyrosine Kinase Heteroreceptor Complexes. In: *Methods in Cell Biology*. Vol 117. Elsevier; 2013:141-164. doi:10.1016/B978-0-12-408143-7.00008-6
413. Drinovec L, Kubale V, Nøhr Larsen J, Vrecl M. Mathematical Models for Quantitative Assessment of Bioluminescence Resonance Energy Transfer: Application to Seven Transmembrane Receptors Oligomerization. *Front Endocrinol*. 2012;3. doi:10.3389/fendo.2012.00104
414. Lanau F, Zenner MT, Civelli O, Hartman DS. Epinephrine and norepinephrine act as potent agonists at the recombinant human dopamine D4 receptor. *J Neurochem*. 1997;68(2):804-812.
415. Luttrell LM, Gesty-Palmer D. Beyond Desensitization: Physiological Relevance of Arrestin-Dependent Signaling. *Pharmacol Rev*. 2010;62(2):305-330. doi:10.1124/pr.109.002436
416. Eishingdrelo H, Kongsamut S. Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Curr Chem Genomics Transl Med*. 2013;7:9-15. doi:10.2174/2213988501307010009
417. Xing B, Li Y-C, Gao W-J. Norepinephrine versus dopamine and their interaction in modulating synaptic function in the prefrontal cortex. *Brain Res*. 2016;1641:217-233. doi:10.1016/j.brainres.2016.01.005
418. Robertson MM, Eapen V, Singer HS, et al. Gilles de la Tourette syndrome. *Nat Rev Dis Primer*. 2017;3(1):16097. doi:10.1038/nrdp.2016.97
419. Rubenstein JLR, Merzenich MM. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav*. 2003;2(5):255-267. doi:10.1034/j.1601-183X.2003.00037.x
420. NicNiocaill B, Gratton A. Medial prefrontal cortical alpha1 adrenoreceptor modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress in Long–Evans rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;191(3):835-842. doi:10.1007/s00213-007-0723-1
421. Tassin J-P. Norepinephrine-Dopamine Interactions in the Prefrontal Cortex and the Ventral Tegmental Area: Relevance to Mental Diseases. In: *Advances in Pharmacology*. Vol 42. Elsevier; 1997:712-716. doi:10.1016/S1054-3589(08)60847-9
422. González S, Rangel-Barajas C, Peper M, et al. Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol Psychiatry*. 2012;17(6):650-662. doi:10.1038/mp.2011.93
423. Borroto-Escuela DO, Craenenbroeck KV, Romero-Fernandez W, et al. Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor–receptor interactions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(4):928-934. doi:10.1016/j.bbrc.2010.12.083
424. Urizar E, Yano H, Kolster R, Galés C, Lambert N, Javitch JA. CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. *Nat Chem Biol*. 2011;7(9):624-630. doi:10.1038/nchembio.623
425. Inoue A, Raimondi F, Kadji FMN, et al. Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell*. 2019;177(7):1933-1947.e25. doi:10.1016/j.cell.2019.04.044

426. Flock T, Hauser AS, Lund N, Gloriam DE, Balaji S, Babu MM. Selectivity determinants of GPCR-G protein binding. *Nature*. 2017;545(7654):317-322. doi:10.1038/nature22070
427. Van Eps N, Altenbach C, Caro LN, et al. G_i- and G_s-coupled GPCRs show different modes of G-protein binding. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115(10):2383-2388. doi:10.1073/pnas.1721896115
428. Rose AS, Elgeti M, Zachariae U, et al. Position of Transmembrane Helix 6 Determines Receptor G Protein Coupling Specificity. *J Am Chem Soc*. 2014;136(32):11244-11247. doi:10.1021/ja5055109
429. Fernández-Dueñas V, Gómez-Soler M, Jacobson KA, et al. MOLECULAR DETERMINANTS OF A2AR-D2R ALLOSTERISM: ROLE OF THE INTRACELLULAR LOOP 3 OF THE D2R. *J Neurochem*. 2012;123(3):373-384. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07956.x
430. Ferré S, Ciruela F, Quiroz C, et al. Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *ScientificWorldJournal*. 2007;7:74-85. doi:10.1100/tsw.2007.211
431. Coogan AN, Baird AL, Popa-Wagner A, Thome J. Circadian rhythms and attention deficit hyperactivity disorder: The what, the when and the why. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;67:74-81. doi:10.1016/j.pnpbp.2016.01.006
432. Zhou XE, Melcher K, Xu HE. Understanding the GPCR biased signaling through G protein and arrestin complex structures. *Curr Opin Struct Biol*. 2017;45:150-159. doi:10.1016/j.sbi.2017.05.004
433. Kang Y, Zhou XE, Gao X, et al. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*. 2015;523(7562):561-567. doi:10.1038/nature14656
434. Beaulieu J-M, Sotnikova TD, Marion S, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Caron MG. An Akt/ β -Arrestin 2/PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior. *Cell*. 2005;122(2):261-273. doi:10.1016/j.cell.2005.05.012
435. Komatsu H, Fukuchi M, Habata Y. Potential Utility of Biased GPCR Signaling for Treatment of Psychiatric Disorders. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3207. doi:10.3390/ijms20133207
436. Sahlholm K, Valle-León M, Fernández-Dueñas V, Ciruela F. Dopamine receptor heteromers: biasing antipsychotics. *Future Med Chem*. 2018;10(23):2675-2677. doi:10.4155/fmc-2018-0335
437. Engel S, Creson T, Hao Y, et al. The extracellular signal-regulated kinase pathway contributes to the control of behavioral excitement. *Mol Psychiatry*. 2009;14(4):448-461. doi:10.1038/sj.mp.4002135
438. Chen Q, Li D-P, Pan H-L. Presynaptic alpha1 adrenergic receptors differentially regulate synaptic glutamate and GABA release to hypothalamic presympathetic neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316(2):733-742. doi:10.1124/jpet.105.094797
439. Velásquez-Martínez MC, Vázquez-Torres R, Rojas LV, Sanabria P, Jiménez-Rivera CA. ALPHA-1 ADRENORECEPTORS MODULATE GABA RELEASE ONTO VENTRAL TEGMENTAL AREA DOPAMINE NEURONS. *Neuropharmacology*. 2015;88:110-121. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.09.002

440. Naaijen J, Forde NJ, Lythgoe DJ, et al. Fronto-striatal glutamate in children with Tourette's disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder. *NeuroImage Clin.* 2017;13:16-23. doi:10.1016/j.nicl.2016.11.013
441. Naaijen J, Zwiers MP, Amiri H, et al. Fronto-Striatal Glutamate in Autism Spectrum Disorder and Obsessive Compulsive Disorder. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2017;42(12):2456-2465. doi:10.1038/npp.2016.260
442. Purkayastha P, Malapati A, Sriram PY and D. A Review on GABA/Glutamate Pathway for Therapeutic Intervention of ASD and ADHD. *Current Medicinal Chemistry.* <http://www.eurekaselect.com/128337/article>. Published May 1, 2015. Accessed November 4, 2019.
443. Ende G, Cackowski S, Eijk JV, et al. Impulsivity and Aggression in Female BPD and ADHD Patients: Association with ACC Glutamate and GABA Concentrations. *Neuropsychopharmacology.* 2016;41(2):410-418. doi:10.1038/npp.2015.153
444. Belcher AM, Lejuez CW, Moeller FG, Volkow ND, Ferré S. *Choice Impulsivity.* Routledge Handbooks Online; 2018. doi:10.4324/9781315689197-24
445. Su J, Leerkes EM, Augustine ME. DRD4 Interacts with Adverse Life Events in Predicting Maternal Sensitivity via Emotion Regulation. *J Fam Psychol JFP J Div Fam Psychol Am Psychol Assoc Div 43.* 2018;32(6):783-792. doi:10.1037/fam0000454
446. Heijtz RD, Kolb B, Forsberg H. Motor inhibitory role of dopamine D1 receptors: implications for ADHD. *Physiol Behav.* 2007;92(1-2):155-160. doi:10.1016/j.physbeh.2007.05.024
447. Abi-Dargham A, Moore H. Prefrontal DA Transmission at D1 Receptors and the Pathology of Schizophrenia. *The Neuroscientist.* 2003;9(5):404-416. doi:10.1177/1073858403252674
448. Casadó-Anguera V, Cortés A, Casadó V, Moreno E. Targeting the receptor-based interactome of the dopamine D1 receptor: looking for heteromer-selective drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 2019;14(12):1297-1312. doi:10.1080/17460441.2019.1664469
449. Gioanni Y, Thierry AM, Glowinski J, Tassin JP. Alpha1-adrenergic, D1, and D2 receptors interactions in the prefrontal cortex: implications for the modality of action of different types of neuroleptics. *Synap N Y N.* 1998;30(4):362-370. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199812)30:4<362::AID-SYN3>3.0.CO;2-W
450. Conn PM. *Receptor-Receptor Interactions.* Academic Press; 2013.
451. Issafras H, Angers S, Bulenger S, et al. Constitutive Agonist-independent CCR5 Oligomerization and Antibody-mediated Clustering Occurring at Physiological Levels of Receptors. *J Biol Chem.* 2002;277(38):34666-34673. doi:10.1074/jbc.M202386200
452. Kufareva I, Stephens B, Gilliland CT, et al. A Novel Approach for Quantifying GPCR Dimerization Equilibrium Using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013;1013:93-127. doi:10.1007/978-1-62703-426-5_7
453. Rivera-Oliver M, Moreno E, Álvarez-Bagnarol Y, et al. Adenosine A1-Dopamine D1 Receptor Heteromers Control the Excitability of the Spinal Motoneuron. *Mol Neurobiol.* 2019;56(2):797-811. doi:10.1007/s12035-018-1120-y
454. Guitart X, Navarro G, Moreno E, et al. Functional Selectivity of Allosteric Interactions within G Protein-Coupled Receptor Oligomers: The Dopamine D1-D3 Receptor Heterotetramer. *Mol Pharmacol.* 2014;86(4):417-429. doi:10.1124/mol.114.093096

455. Lee SP, So CH, Rashid AJ, et al. Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35671-35678. doi:10.1074/jbc.M401923200
456. Rashid AJ, So CH, Kong MMC, et al. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(2):654-659. doi:10.1073/pnas.0604049104
457. Kisilevsky AE, Mulligan SJ, Altier C, et al. D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron*. 2008;58(4):557-570. doi:10.1016/j.neuron.2008.03.002
458. Evans BA, Broxton N, Merlin J, et al. Quantification of Functional Selectivity at the Human α_{1A} -Adrenoceptor. *Mol Pharmacol*. 2011;79(2):298-307. doi:10.1124/mol.110.067454
459. Yong KJ, Vaid TM, Shilling PJ, et al. Determinants of Ligand Subtype-Selectivity at α_{1A} -Adrenoceptor Revealed Using Saturation Transfer Difference (STD) NMR. *ACS Chem Biol*. 2018;13(4):1090-1102. doi:10.1021/acscchembio.8b00191
460. Özkan M, Johnson NW, Sehirli US, Woodhall GL, Stanford IM. Dopamine acting at D1-like, D2-like and α_1 -adrenergic receptors differentially modulates theta and gamma oscillatory activity in primary motor cortex. Lytton WW, ed. *PLOS ONE*. 2017;12(7):e0181633. doi:10.1371/journal.pone.0181633
461. Lin Y, Quartermain D, Dunn AJ, Weinschenker D, Stone EA. Possible dopaminergic stimulation of locus coeruleus α_1 -adrenoceptors involved in behavioral activation. *Synapse*. 2008;62(7):516-523. doi:10.1002/syn.20517
462. Zhang W-P, Ouyang M, Thomas SA. Potency of catecholamines and other l-tyrosine derivatives at the cloned mouse adrenergic receptors. *Neuropharmacology*. 2004;47(3):438-449. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.04.017
463. Konstenius M, Leifman A, van Emmerik-van Oortmerssen K, et al. Childhood trauma exposure in substance use disorder patients with and without ADHD. *Addict Behav*. 2017;65:118-124. doi:10.1016/j.addbeh.2016.10.016
464. Green B. Prazosin in the treatment of PTSD. *J Psychiatr Pract*. 2014;20(4):253-259. doi:10.1097/01.pra.0000452561.98286.1e
465. Haass-Koffler CL, Swift RM, Leggio L. NORADRENERGIC TARGETS FOR THE TREATMENT OF ALCOHOL USE DISORDER. *Psychopharmacology (Berl)*. 2018;235(6):1625-1634. doi:10.1007/s00213-018-4843-6
466. Blanc G, Trovero F, Vezina P, et al. Blockade of Prefronto-cortical α_1 -Adrenergic Receptors Prevents Locomotor Hyperactivity Induced by Subcortical D-Amphetamine Injection. *Eur J Neurosci*. 1994;6(3):293-298. doi:10.1111/j.1460-9568.1994.tb00272.x
467. Kumar B, Prakash A, Sewal RK, Medhi B, Modi M. Drug therapy in autism: a present and future perspective. *Pharmacol Rep PR*. 2012;64(6):1291-1304.
468. Haddad PM, Correll CU. The acute efficacy of antipsychotics in schizophrenia: a review of recent meta-analyses. *Ther Adv Psychopharmacol*. 2018;8(11):303-318. doi:10.1177/2045125318781475
469. Minzenberg MJ, Yoon JH. An index of relative central α -adrenergic receptor antagonism by antipsychotic medications. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2011;19(1):31-39. doi:10.1037/a0022258

470. Cohen BM, Lipinski JF. In vivo potencies of antipsychotic drugs in blocking alpha 1 noradrenergic and dopamine D2 receptors: implications for drug mechanisms of action. *Life Sci.* 1986;39(26):2571-2580. doi:10.1016/0024-3205(86)90111-6
471. Mitrano DA, Pare J-F, Smith Y, Weinschenker D. D1-dopamine and α 1-adrenergic receptors co-localize in dendrites of the rat prefrontal cortex. *Neuroscience.* 2014;258:90-100. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.11.002
472. Navarro G, Cordero A, Casadó-Anguera V, et al. Evidence for functional pre-coupled complexes of receptor heteromers and adenylyl cyclase. *Nat Commun.* 2018;9(1):1-12. doi:10.1038/s41467-018-03522-3
473. Navarro G, Cordero A, Zelman-Femiak M, et al. Quaternary structure of a G-protein-coupled receptor heterotetramer in complex with Gi and Gs. *BMC Biol.* 2016;14(1):26. doi:10.1186/s12915-016-0247-4
474. Stanasila L, Perez J-B, Vogel H, Cotecchia S. Oligomerization of the alpha 1a- and alpha 1b-adrenergic receptor subtypes. Potential implications in receptor internalization. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40239-40251. doi:10.1074/jbc.M306085200
475. Herrick-Davis K, Grinde E, Cowan A, Mazurkiewicz JE. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of serotonin, adrenergic, muscarinic, and dopamine receptor dimerization: the oligomer number puzzle. *Mol Pharmacol.* 2013;84(4):630-642. doi:10.1124/mol.113.087072
476. Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse MJ, Bünemann M. Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *EMBO J.* 2005;24(23):4106-4114. doi:10.1038/sj.emboj.7600870
477. Lohse MJ, Nikolaev VO, Hein P, Hoffmann C, Vilardaga J-P, Bünemann M. Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(3):159-165. doi:10.1016/j.tips.2007.12.002

