



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Paziente eskizofreniko eta
kontrolen garun kortexean D2,
CB1 eta mGlu2 hartzaileen
espresio aldakortasunaren
ikerketa**

*Jon De la Cuesta Barrutia Jon, Olga
Peñagarikano, Luis Felipe Callado,
José Javier Meana, Alfredo Ramos
Miguel eta Amaia Maite Erdozain*

53-60 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.06>



Paziente eskizofreniko eta kontrolen garun kortexean D2, CB1 eta mGlu2 hartzailen espresio aldakortasunaren ikerketa

DelaCuesta-Barrutia, J.¹, Peñagarikano, O.^{1,2}, Callado, L.F.^{1,2}, Meana, J.J.^{1,2},
Ramos, A.^{1,2} eta Erdozain, A.M.^{1,2}

¹ Farmakologia saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, UPV/EHU

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)
jon.delacuesta@ehu.eus

Laburpena

Eskizofrenia gaixotasun psikiatriko larria da, non sistema dopaminergiko, kannabinoide eta glutamatergikoaren asaldura dagoen. Ikerketa honetan sistema hauen parte diren D2 dopamina, CB1 kannabinoide eta mGlu2 glutamato hartzailen espresioa aztertzen da subjektu eskizofreniko eta kontrolen post-mortem garunen kortex prefrontalean. Honetarako, fluoreszentzian eta kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot teknika erabili da. Honenbestez, CB1 eta mGlu2 hartzailen espresio murrizpen esanguratsua aurkitu da eskizofrenikoetan, antipsikotikoen tratamenduaren eraginak ere honetan lagunduz. Alabaina, D2 hartzailarekiko ez da inolako desberdintasun esanguratsurik antzeman.

Hitz gakoak: D2, CB1, mGlu2, eskizofrenia, kortexa, Western Blot.

Abstract

Schizophrenia is a serious psychiatric disorder where dopaminergic, cannabinoid, and glutamatergic neurotransmission systems are severely affected. Expression of receptors part of these systems consisting in dopamine D2, cannabinoid CB1, and metabotropic glutamate mGlu2 are analysed in the prefrontal cortex of post-mortem brains of schizophrenia and control subjects. For this purpose, Western Blot technique based on fluorescence and chemiluminescence is employed. As result, a significant reduction in the expression of CB1 and mGlu2 receptors is found in schizophrenics, and antipsychotic treatment also contributes in this decline. Nonetheless, no significant alteration is observed for D2 receptor.

Keywords: D2, CB1, mGlu2, schizophrenia, cortex, Western Blot.

1. Sarrera eta motibazioa / momentuko egoera

Eskizofrenia gaixotasun psikiatriko ahultzaile kronikoa da, biztanleriaren % 0.4 eta % 1.2 bitartean aurkeztzen dena (Whiteford et al., 2015). Sintoma positibo, negatibo eta kognitiboetan laburbiltzen da koadro klinikoa. Sintoma positiboaren artean nabarmentzekoa dira eldarnioa, pentsamendu nahasiak eta haluzinazioak; negatiboaren artean, motibazio falta, isolatze soziala eta komunikatzeko zailtasunak; eta kognitiboaren artean, arreta defizita, ikasteko zailtasuna eta mugimendu desberdinak burutzeko ahalmen gutxitua (American Psychiatric Association, 2013). Eskizofrenia kausa anitz dituen gaixotasun multigenetiko eta multifaktoriala da, hau da, faktore genetiko eta ingurune faktore ugari baldintzatzen dute gaixotasunaren bilakaera. Hala ere, eskizofreniaren etiologia espezifikoak neurri handi batean ezezaguna da.

Eskizofreniaren bilakaeran zerikusi handia dute sistema dopaminergikoak (Howes & Kapur, 2009), serotonergikoak (Meltzer & Massey, 2011), kannabinoideak (Muguruza et al., 2019) eta glutamatergikoak (Eltokhi et al., 2020). Azkenaldian sistema oxitozinergikoaren influentzia ere dagoela proposatu da (Uhrig et al., 2016). Sistema hauetako neurotransmisoreak G proteinari akoplatutako hartzaileri (GPCR) batzen dira gehienetan. GPCR hauek mintz zelularra 7 domeinutan zeharkatzen dute eta zelula barneko seinale kaskadak aktibatzen gai dira. Oro har, GPCRak tratamendu farmakologiko guztien %30 eta %40 artekoen eta tratamendu antipsikotiko gehienetan it

terapeutikoak dira (Albizu et al., 2010). Ikerketa honetan dopamina D2, kannabinoide CB1 eta glutamato mGlu2 GPCR hartzailen forma monomerikoetan sakontzen da.

Eskizofrenian eragiten duen GPCR garrantzitsua D2 hartzaila da, eskizofreniarekin erlazionatu zen lehenengoa delako eta antipsikotiko guztiak honi lotzen direlako. Hipotesi dopaminergikoa gaixotasunaren oinarri biomolekular gisa ezarri da, D2 hartzailaren antagonista den klorpromazina antipsikotiko tipikoaren eraginkortasunari buruzko lehen aurkikuntzek bultzatuta, batez ere sintomatologia positiboa hobetzerako orduan. Metabolito, irudi teknika, animalia eredu eta post-mortem laginekin egindako ikerketek ere sendotu dute hipotesia (Howes & Kapur, 2009; Seeman et al., 1975). Antipsikotiko tipikoak eta gero, atipiko edo bigarren belaunaldikoak sortu ziren, D2 hartzaila antagonizatzeaz gain, gehienak 5-HT_{2A} hartzaila ere antagonizatzen dutenak, gaixotasunaren sintomatologia negatiboa tipikoek baino hobeto kontrolatuz (Meltzer & Massey, 2011).

CB1 hartzailari dagokionez, eskizofrenia eta beste prozesu neuropatologiko ugarian parte hartzen duela frogatu da. Alde batetik, kalamuaren erabilera goiztiarrak eskizofrenia garatzeko arriskua handitu dezake pertsona batzuetan, eta CB1 hartzailaren polimorfismo genetiko konkretu batzuek areagotu egiten dute arrisku hori (Chase et al., 2016). Bestetik, CB1 hartzailaren asaldurak deskribatu dira eskizofrenia duten post-mortem giza garunetan, CB1 hartzailaren mRNA maila urrituta egonik subjektu eskizofrenikoetan kontrolekin alderatuta (Muguruza et al., 2019; Tao et al., 2020). Murrizpen hau tratamendu antipsikotikoari esleitu diote beste artikulua batetan (Urigüen et al., 2009), eta mRNA mailak aldatu gabe baina hartzailaren lotura aldatuta aurkitu dute beste autore batzuek (Dalton et al., 2011).

Bestalde, mGlu2 hartzailaren eta eskizofreniaren inguruan ebidentzia mota desberdinak aurkitu dira ere, esaterako, eskizofrenikoen mGlu2ren mRNA adierazpena murriztuta aurkitu da kortex prefrontalean (González-Maeso et al., 2008) eta zerebeloan (Bullock et al., 2008).

2. Ikerketaren helburuak

Ikerketa lerro hau zehazki D2, CB1 eta mGlu2 hartzailen forma monomerikoen espresioa gaixo eskizofrenikoen eta subjektu kontrolen (patologia gabekoak) post-mortem giza garunetan desberdina den aztertzea fokatzen da, zehazki, kortex prefrontal dortsolateralean. Ikerlan hau ikerketa proiektu itxaropentsu baten lehenengo pausua da, non eskizofrenikoen eta kontrolen garuneko GPCR hartzailen monomeroen baturaz osatutako heteromeroen arteko desberdintasunak bilatzen eta aztertzen diren, ondoren eskizofrenian desberdintasunak aurkeztu dituzten heteromeroak modulatzu itxaropentsu terapeutiko berriak aurkitzeko xedez.

3. Ikerketaren muina

Helburua gauzatzeko Western Blot teknika erabili da, eta gizakien kohortea 27 subjektu eskizofreniko eta 27 subjektu kontrolen osatu dute, sexuaren, adinaren eta post-mortem denboraren arabera parekatuta. Adin tarte desberdinetako 44 gizonezko eta 10 emakumezko dira. Horrez gain, bi azpitaldetan banatu dira heriotzaren momentuan odolean antipsikotikorik zutenaren arabera, 20 gaixo izanik antipsikotikoak zituztenak. Kontrolak ez zuten tratamendu antipsikotikorik hartzen. Garunak Bilboko Auzitegiko Medikuntzako Euskal Institutuan egindako autopsietatik lortu dira, ikerketa eta berrikuspen etikoen batzordeen politikak betez.

3.1. D2 hartzailen alderapena fluoreszentsian oinarritutako Western Blot bidez

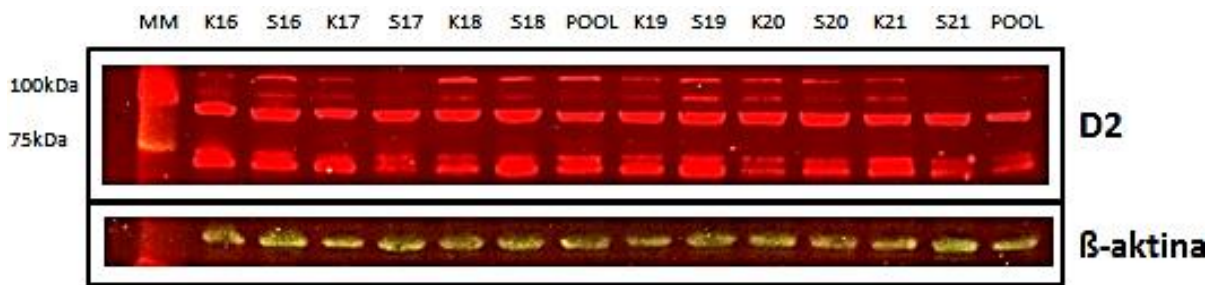
Western Blot teknikaren bitartez, D2 hartzailen adierazpena modu semikuantitatibo batean aztertu da. Lehenengo, lagineko proteinak pisu molekularren arabera banatzen dira. Ondoren, intereseko proteina, hau da, D2 hartzaila, hura zehazki ezagutzen duen antigorputz batekin, primarioa deritzona, markatzen da. Kasu honetan Merck Millipore AB5084P D2 hartzaila ezagutzen duen antigorputza, D2 hartzaila ez espresatzeko genetikoki eraldatutako saguetan, hau da, D2 Knock Out saguetan, frogatua izan da espezifikoa dela (Stojanovic et al., 2017). Jarraian, primario honi batuko den beste

antigorputz batekin, sekundarioa deritzona, inkubazioa burutzen da. Sekundarioa mutur batetik antigorputz primarioa lotuta egongo da, eta beste muturrean fluoreszentzia igortzen duten fluorokromoak izango ditu, fluoreszentzia infragorri irudi sistema baten bidez D2 hartzailaren seinale immunoerreaktiboa detektatzea ahalbidetuko dutena.

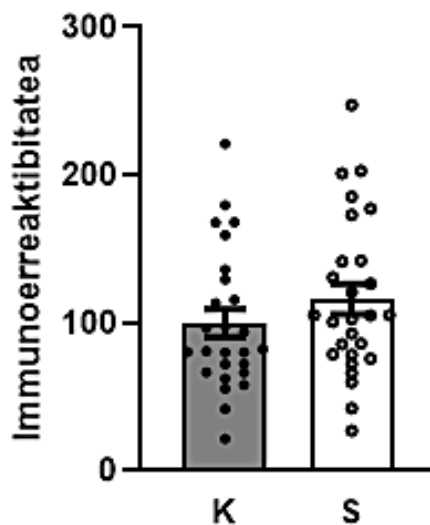
Lagin guztiak kantitate berean erabiliak izan direla ziurtatzeko β -aktina erabili da kontrol moduan. Honen espresioak aldakortasun gutxi aurkezten duenez, intereseko proteina, kasu honetan D2 hartzaila, normalizatzeko erabiltzen da β -aktinaren seinale immunoerreaktiboa. Esperimentu desberdinetako gelak alderatzeko erreferentziarako lagin bat erabili da, kontrol guztiarekin eginiko nahaste edo pool-a.

Ondoren aipatzen da ikerketan ikusi duguna. Lehendabizi, hiru banda desberdin ikusi eta kuantifikatu dira, 70kDa, 95kDa eta 125kDa tamainetan (1.irudia). Heteromerizazio, egestura aldaketa edo glikosilazioak izan daitezke D2 hartzaila tamaina desberdinetan banatu izanaren arrazoiak. Eskizofrenian aldaketarik ote dagoen aztertzerakoan, ikusi dugu banda hauek batean ere ez dagoela D2 hartzailaren espresioan desberdintasun esanguratsurik eskizofrenia dutenen eta ez dutenen artean ($p=0.4057$), nahiz eta eskizofrenikoen espresioaren igoera %10koa izan kontrolekin alderatuta (1.grafikoa). Bestetik, tratamendu farmakologikoak ere D2aren espresioan eraginik ez duela ematen du, honen espresioa ez delako esanguratsuki aldatu heriotza momentuan odolean antipsikotikoak zituztenen ($p=0.0809$) eta ez zituztenen artean ($p=0.1716$).

1. irudia. 6 subjektu eskizofreniko eta 6 subjektu kontrolen fluoreszentzian oinarritutako Western Blot irudia. Gorriz D2 hartzailaren bandak, 70kDa, 95kDa eta 125kDa tamainetan, eta berdez β -aktinaren bandak. Markatzaile molekularra (MM), kontrolak (K), eskizofrenikoak (S) eta pool-a ageri dira



1. grafikoa. 27 subjektu kontrolen (K) eta 27 subjektu eskizofrenikoen (S) arteko D2 hartzailaren immunoerreaktibitatearen alderapena

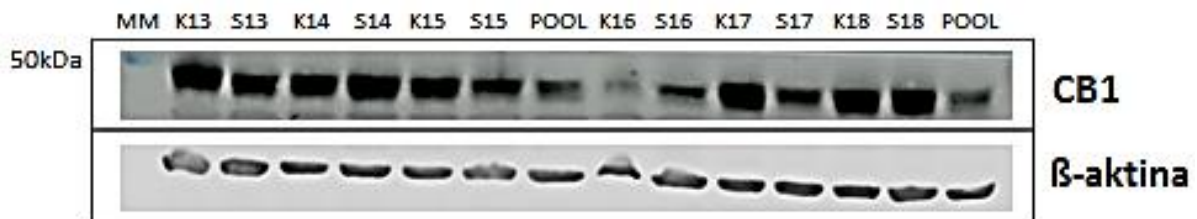


3.2. CB1 eta mGlu2 hartzaileen alderapena kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot bidez

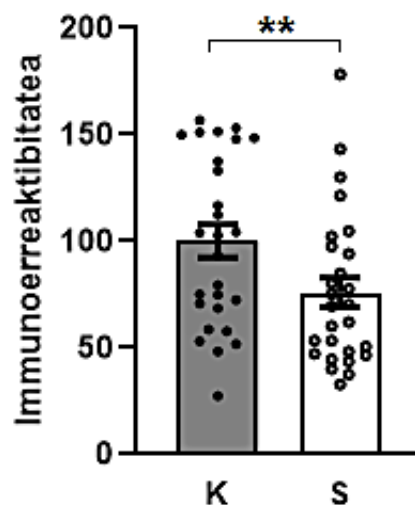
Western Blot teknikaren bitartez, CB1 eta mGlu2 hartzaileen adierazpena ere modu semikuantitatibo batean aztertu da, baina kasu honetan aldaera kimioluminiszentea erabiliz. CB1 eta mGlu2 hartzaileak ezagutzen dituzten antigorputzak, Abcameko ab23703 eta ab15672 hurrenez hurren, hartzaileak ez espresatzeko genetikoki eraldatutako saguetan, hau da, CB1 Knock Out eta mGlu2 Knock Out saguetan, espezifikoki direla frogatuta dago (Moreno et al., 2012; von Rüden et al., 2015). Teknika honetan, antigorputz sekundarioa ezberdina da: antigorputz primarioarekin lotzen ez den beste muturrean entzima bat izango du, eta substratu konkretu batekin kontaktuan jartzean, sortzen den erreakzioak argi espektro konkretu bat igorriko du. Seinale hau detektatzen duen kimioluminiszentzia aparatuaren bidez CB1 eta mGlu2 hartzaileen seinale immunoerreaktiboa detektatzea posible da. Hemen ere, lagin kantitatearen normalizazioa β -aktinaren seinale immunoerreaktiboaren bidez burutzen da, eta gel desberdinen alderaketa pool bidez.

Alde batetik, CB1 hartzailearen bandak 50kDa inguruan kuantifikatu dira (2.irudia). Interesgarria izan da hartzailearen espresioa nabarmen murriztuta agertu izana eskizofrenikoetan kontrolekin alderatuta ($p=0.0026$), %24ko jaitsiera izanik (2.grafikoa). Bestetik, tratamendu farmakologikoa kontuan edukita, antipsikotiko hartzaile eskizofrenikoen taldeak esanguratsua den espresio baxuagoa du kontrolekin alderatuta ($p=0.0071$), aldiz, antipsikotikoak hartzen ez zituen eskizofrenikoen taldeak ez du aldaketa esanguratsurik aurkezten kontrolekin alderatzean ($p=0.2229$).

2. irudia. 6 subjektu eskizofreniko eta 6 subjektu kontrolen kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot irudia. Goiko aldean CB1 hartzailearen bandak 50kDa inguruko tamainan, eta beheko aldean β -aktinaren bandak. Markatzaile molekularra (MM), kontrolak (K), eskizofrenikoak (S) eta pool-a ageri dira

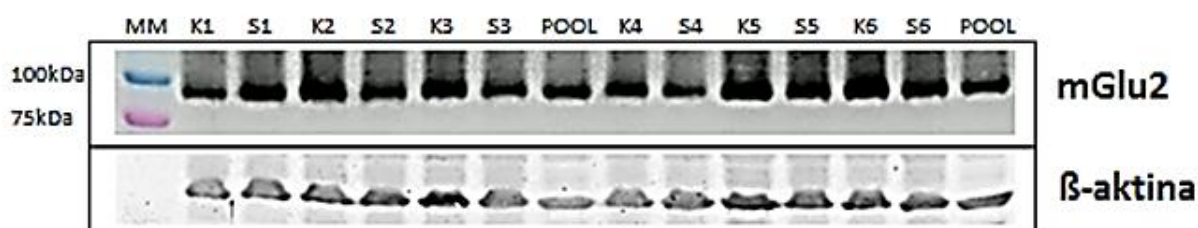


2. grafikoa. 27 subjektu kontrolen (K) eta 27 subjektu eskizofrenikoen (S) arteko CB1 hartzailearen immunoerreaktibitatearen alderapena

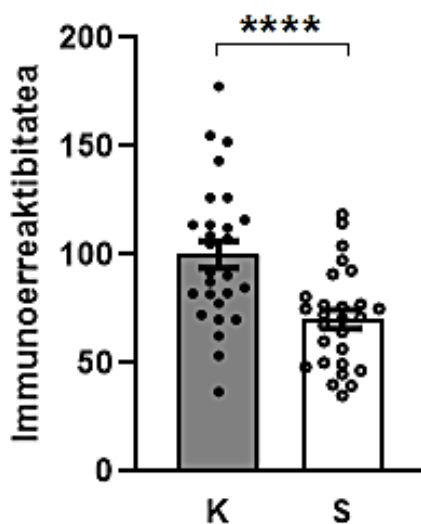


Halaber, mGlu2 hartzaileari dagokionez, banda immunoerreaktiboak 100kDa inguruan kuantifikatu dira (3.irudia). CB1arekin ikusten zen moduan, mGlu2 hartzailearen espresioa ere nabarmen murriztuta dago eskizofrenikoetan kontrolekin alderatuta ($p < 0.0001$), %30ko jaitsiera izanik (3.grafikoa). Horrez gain, tratamendu farmakologikoa kontuan edukita, murrizpenaren esangura handiagoa da eskizofreniko tratatuetan ($p < 0.0001$) ez tratatuetan baino ($p = 0.0101$) kontrolekin alderatuta.

3. irudia. 6 subjektu eskizofreniko eta 6 subjektu kontrolen kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot irudia. Goiko aldean mGlu2 hartzailearen bandak 100kDa inguruko tamainan, eta beheko aldean β -aktinaren bandak. Markatzaile molekularra (MM), kontrolak (K), eskizofrenikoak (S) eta pool-a ageri dira



3. grafikoa. 27 subjektu kontrolen (K) eta 27 subjektu eskizofrenikoen (S) arteko mGlu2 hartzailearen immunoerreaktibilitatearen alderapena



4. Ikerketaren ondorioak

Eskizofrenian D2 hartzailearen adierazpenaren desberdintasun esanguratsurik ez da aurkitu, beraz, forma monomerikoaren espresioaren eragina ez da nabarmengarria. Haatik, D2 hartzailearen influentzia eskizofrenian justifikatzen duen ebidentzia sakona onartuta dago, batez ere antipsikotikoen itxura farmakologiko garrantzitsua delako. Nahiz eta hartzailearen forma monomerikoaren espresio totalan aldaketarik ez egon, funtzioa aldatuta egon daiteke, eta honen arrazoi bat eskizofrenian heteromeroak modu ezberdinean sortzen dituela izan daiteke. Bestalde, CB1 hartzailearen espresioaren murrizpen esanguratsua eskizofrenikoetan bat dator literaturako beste emaitzekin, non lehen aipatu bezala CB1 hartzailearen mRNA maila urrituta dagoen subjektu eskizofrenikoen kortexean kontrolekin alderatuta (Muguruza et al., 2019; Tao et al., 2020). Horrez gain, badirudi eskizofrenia gaixotasun bera baino gehiago, emaitzek iradokitzen dutela tratamendu antipsikotikoa izan daitekeela CB1 hartzailearen espresioaren jaitsieraren arrazoa, tratamendu antipsikotiko gabeko kontrol eta eskizofrenikoak alderatzean ez baitago esangurarik eta tratatuen artean bai. Halaber, mGlu2 hartzailearen espresioa esanguratsuki jaitsita egotea subjektu eskizofrenikoetan ere koherentea da

sarreran aipatutako ikerketen emaitzekin, hots, zerebeloko eta kortexeko hartzailearen mRNA mailen murrizpenarekin (Bullock et al., 2008; González-Maeso et al., 2008). Gainera, badirudi mGlu2ren murrizpen hau eskizofrenia gaixotasunaren berezkoa dela, eta tratamendu antipsikotikoak murrizpen hori handitzen duela, tratamendu antipsikotikodun eskizofrenikoak haien kontrolekin alderatzean, esangura tratamendu antipsikotiko gabekoetan baino handiagoa delako. Ikerketa lerro honek dagoeneko lortu ditu eskizofrenian D2, CB1 eta mGlu2 hartzaileen forma monomerikoen eraginaren froga berriak, eta nahiz eta hiru GPCR hartzaile hauek eskizofreniaren bilakaeran eragina dutenaren ebidentzia gehiago badagoen ere, ikerketa gehiago behar dira, batez ere giza laginetan eta heteromerizazioa aztertzen duten teknikekin.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Hurrengo pausua 5-HT2A eta OXT hartzaileen forma monomerikoak kimioluminiszentzian oinarritutako Western Blot bidez ikertzea da. Baina lehenik eta behin GPCR hartzaile hauek espezifikoki detektatuko dituzten antigorputz primarioak aurkitu eta karakterizatu behar dira.

Ondoren, heteromerizazioak eskizofrenian eduki dezakeen inpaktuan sakonduko da, patologiaren garapenean faktore garrantzitsua izan baitaiteke ikerketa proiektu honen hipotesiaren arabera. GPCRak elkarrekin batu daitezkeela heteromeroak osatzeko dagoeneko onartuta dago gaur egungo ebidentzia kontuan edukita, eta propietate biologiko desberdinak aurkezten dituzte forma monomerikoekin alderatuta (Farran, 2017; Jones et al., 1998; Moreno et al., 2013). Ildo berean, ikerketa lerro honetan monomerikoki aztertutako GPCR hauen arteko heteromero batzuek eskizofrenian eta psikosian eragin zuzena dagoeneko aurkeztu duten ikerketak daude; esaterako, 5-HT2A-mGlu2 hartzaile heteromeroak (González-Maeso et al., 2008) eta D2-5HT2A hartzaile heteromeroak (Albizu et al., 2011; Borroto-Escuela et al., 2014). Horrez gain, antipsikotiko batzuen itxura farmakologikoak direla ere frogatu da (Bagher et al., 2020; Borroto-Escuela et al., 2014; Maggio & Millan, 2010; Zhang et al., 2020). Hala eta guztiz ere, eskizofreniarekin erlazioa duten beste asaldura neuropsikiatrikoetan ere paper garrantzitsua jorratzen dute GPCR hauen arteko beste heteromero batzuek, adibidez, suminkortasunean CB1-D2 hartzaile heteromeroak (Marcellino et al., 2008), antsietatean D1-D2 hartzaile heteromeroak (Hasbi et al., 2020) eta antsietate eta depresioan D2-OXT hartzaile heteromeroak (Kohli et al., 2019).

Hipotesi hau frogatzeko xedez, D2, CB1, mGlu2, 5-HT2A eta OXT hartzaileek eratu ditzaketen heteromeroen forma natiboa errespetatuko duen Blue Native Western Blot teknika erabiliz, subjektu eskizofreniko eta kontrolen artean heteromero espresioan desberdintasunik dagoen ikertuko da. Desberdintasunik aurkituz gero, eskizofrenia animalia ereduetan desberdintasun hauek erreplikatzeko diren aztertuko da, eta horrela izanez gero, eskizofrenian espresio desberdina aurkeztu duen intereseko heteromeroa interferentzia peptido batekin banatuko da, itxura terapeutiko berriak aurkitu nahian, eskizofreniaren sintomatologia hobetzen duen edo ez aztertuko.

6. Erreferentziak

- Albizu, L., Holloway, T., González-Maeso, J., & Sealfon, S. C. (2011). Functional crosstalk and heteromerization of serotonin 5-HT2A and dopamine D2 receptors. *Neuropharmacology*, 61, 770–777.
- Albizu, L., L. Moreno, J., Gonzalez-Maeso, J., & C. Sealfon, S. (2010). Heteromerization of G Protein-Coupled Receptors: Relevance to Neurological Disorders and Neurotherapeutics. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 9, 636–650.
- American Psychiatric Association (Ed.). (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5* (5th ed). American Psychiatric Association.
- Bagher, A. M., Young, A. P., Laprairie, R. B., Toguri, J. T., Kelly, M. E. M., & Denovan-Wright, E. M. (2020). Heteromer formation between cannabinoid type 1 and dopamine type 2 receptors is altered by combination cannabinoid and antipsychotic treatments. *Journal of Neuroscience Research*, 98, 2496-2509.

- Borroto-Escuela, D. O., Romero-Fernandez, W., Narvaez, M., Oflijan, J., Agnati, L. F., & Fuxe, K. (2014). Hallucinogenic 5-HT_{2A}R agonists LSD and DOI enhance dopamine D_{2R} protomer recognition and signaling of D₂-5-HT_{2A} heteroreceptor complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443, 278–284.
- Bullock, W. M., Cardon, K., Bustillo, J., Roberts, R. C., & Perrone-Bizzozero, N. I. (2008). Altered Expression of Genes Involved in GABAergic Transmission and Neuromodulation of Granule Cell Activity in the Cerebellum of Schizophrenia Patients. *American Journal of Psychiatry*, 165, 1594–1603.
- Chase, K. A., Feiner, B., Rosen, C., Gavin, D. P., & Sharma, R. P. (2016). Characterization of peripheral cannabinoid receptor expression and clinical correlates in schizophrenia. *Psychiatry Research*, 245, 346–353.
- Dalton, V. S., Long, L. E., Weickert, C. S., & Zavitsanou, K. (2011). Paranoid Schizophrenia is Characterized by Increased CB₁ Receptor Binding in the Dorsolateral Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 36, 1620–1630.
- Eltokhi, A., Santuy, A., Merchan-Perez, A., & Sprengel, R. (2020). Glutamatergic Dysfunction and Synaptic Ultrastructural Alterations in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorder: Evidence from Human and Rodent Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 59.
- Farran, B. (2017). An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers. *Pharmacological Research*, 117, 303–327.
- González-Maeso, J., Ang, R. L., Yuen, T., Chan, P., Weisstaub, N. V., López-Giménez, J. F., Zhou, M., Okawa, Y., Callado, L. F., Milligan, G., Gingrich, J. A., Filizola, M., Meana, J. J., & Sealfon, S. C. (2008). Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature*, 452, 93–97.
- Hasbi, A., Nguyen, T., Rahal, H., Manduca, J. D., Miksys, S., Tyndale, R. F., Madras, B. K., Perreault, M. L., & George, S. R. (2020). Sex difference in dopamine D₁-D₂ receptor complex expression and signaling affects depression- and anxiety-like behaviors. *Biology of Sex Differences*, 11, 8.
- Howes, O. D., & Kapur, S. (2009). The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III--The Final Common Pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 35, 549–562.
- Jones, K. A., Borowsky, B., Tamm, J. A., Craig, D. A., Durkin, M. M., Dai, M., Yao, W.-J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.-Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J. A., Morse, K., Laz, T., Smith, K. E., Nagarathnam, D., Noble, S. A., Branchek, T. A., & Gerald, C. (1998). GABAB receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABABR1 and GABABR2. *Nature*, 396, 674–679.
- Kohli, S., King, M. V., Williams, S., Edwards, A., Ballard, T. M., Steward, L. J., Alberati, D., & Fone, K. C. F. (2019). Oxytocin attenuates phencyclidine hyperactivity and increases social interaction and nucleus accumbens dopamine release in rats. *Neuropsychopharmacology*, 44, 295–305.
- Maggio, R., & Millan, M. J. (2010). Dopamine D₂-D₃ receptor heteromers: Pharmacological properties and therapeutic significance. *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 100–107.
- Marcellino, D., Carriba, P., Filip, M., Borgkvist, A., Frankowska, M., Bellido, I., Tanganelli, S., Müller, C. E., Fisone, G., Lluís, C., Agnati, L. F., Franco, R., & Fuxe, K. (2008). Antagonistic cannabinoid CB₁/dopamine D₂ receptor interactions in striatal CB₁/D₂ heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology*, 54, 815–823.
- Meltzer, H., & Massey, B. (2011). The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Current Opinion in Pharmacology*, 11, 59–67.
- Moreno, J. L., Holloway, T., & González-Maeso, J. (2013). G Protein-Coupled Receptor Heterocomplexes in Neuropsychiatric Disorders. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 117, 187–205). Elsevier.
- Moreno, J. L., Muguruza, C., Umali, A., Mortillo, S., Holloway, T., Pilar-Cuéllar, F., Mocci, G., Seto, J., Callado, L. F., Neve, R. L., Milligan, G., Sealfon, S. C., López-Giménez, J. F., Meana, J. J., Benson, D. L., & González-Maeso, J. (2012). Identification of Three Residues Essential for 5-Hydroxytryptamine 2A-Metabotropic Glutamate 2 (5-HT_{2A}-mGlu₂) Receptor Heteromerization and Its Psychoactive Behavioral Function. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 44301–44319.
- Muguruza, C., Morentin, B., Meana, J. J., Alexander, S. P., & Callado, L. F. (2019). Endocannabinoid system imbalance in the postmortem prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology*, 33, 1132–1140.
- Seeman, P., Chau-Wong, M., Tedesco, J., & Wong, K. (1975). Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: Direct binding assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 4376–4380.

- Stojanovic, T., Orlova, M., Sialana, F. J., Höger, H., Stuchlik, S., Milenkovic, I., Aradska, J., & Lubec, G. (2017). Validation of dopamine receptor DRD1 and DRD2 antibodies using receptor deficient mice. *Amino Acids*, 49, 1101–1109.
- Tao, R., Li, C., Jaffe, A. E., Shin, J. H., Deep-Soboslay, A., Yamin, R., Weinberger, D. R., Hyde, T. M., & Kleinman, J. E. (2020). Cannabinoid receptor CNR1 expression and DNA methylation in human prefrontal cortex, hippocampus and caudate in brain development and schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 10, 158.
- Uhrig, S., Hirth, N., Broccoli, L., von Wilmsdorff, M., Bauer, M., Sommer, C., Zink, M., Steiner, J., Frodl, T., Malchow, B., Falkai, P., Spanagel, R., Hansson, A. C., & Schmitt, A. (2016). Reduced oxytocin receptor gene expression and binding sites in different brain regions in schizophrenia: A post-mortem study. *Schizophrenia Research*, 177, 59–66.
- Urigüen, L., García-Fuster, M. J., Callado, L. F., Morentin, B., La Harpe, R., Casadó, V., Lluís, C., Franco, R., García-Sevilla, J. A., & Meana, J. J. (2009). Immunodensity and mRNA expression of A2A adenosine, D2 dopamine, and CB1 cannabinoid receptors in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: Effect of antipsychotic treatment. *Psychopharmacology*, 206, 313–324.
- von Rüden, E. L., Jafari, M., Bogdanovic, R. M., Wotjak, C. T., & Potschka, H. (2015). Analysis in conditional cannabinoid 1 receptor-knockout mice reveals neuronal subpopulation-specific effects on epileptogenesis in the kindling paradigm. *Neurobiology of Disease*, 73, 334–347.
- Whiteford, H. A., Ferrari, A. J., Degenhardt, L., Feigin, V., & Vos, T. (2015). The Global Burden of Mental, Neurological and Substance Use Disorders: An Analysis from the Global Burden of Disease Study 2010. *PLOS ONE*, 10, e0116820.
- Zhang, C., Li, Q., Meng, L., & Ren, Y. (2020). Design of novel dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{2A} receptors dual antagonists toward schizophrenia: An integrated study with QSAR, molecular docking, virtual screening and molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38, 860–885.

7. Eskerrak

Ikerketa lan honek Estatuko Industria, Zientzia eta Unibertsitate ministerioaren (RTI2018-094414-A-I00) eta Eusko jaurlaritzaren (IT1211-19) diru-laguntzak jaso ditu. DelaCuesta-Barrutia Jon Euskal Herriko Unibertsitatearen Doktoratu Aurreko Programaren laguntza baten jabea da.