

Quimiogenética basada en receptores acoplados a proteínas G, una plataforma para las neurociencias

Catalina **Valdés Baizabal**

La comunicación intercelular es de gran importancia para mantener la homeostasis, es decir, un equilibrio en las funciones del organismo. Pero ¿qué es lo que implica que se lleve a cabo una comunicación exitosa? La capacidad de recibir un estímulo, transmitirlo, integrarlo y emitir una respuesta.

El sistema nervioso es una pieza clave para conseguir un estado de homeostasis. Es él quien nos mantiene comunicados con el exterior y de su activación y transmisión de señales depende la respuesta que demos al medio y la forma en la que nos desarrollemos. La señalización en el sistema nervioso se produce mediante un proceso primordialmente químico; porque se liberan sustancias desde células presinápticas hacia células postsinápticas, produciendo cambios en la excitabilidad de las células postsinápticas.

Desde el punto de vista neurofisiológico, ha sido de interés conocer cómo se encuentran conectados los circuitos neuronales del sistema nervioso, que al activarse dan lugar a determinadas conductas o a la realización de funciones complejas. De alguna manera, el interés es por hacer una deconstrucción de la conducta para comprender sus bases celulares y develar un proceso completo desde los mecanismos intercelulares. Esto es motivo de estudio de las neurociencias.

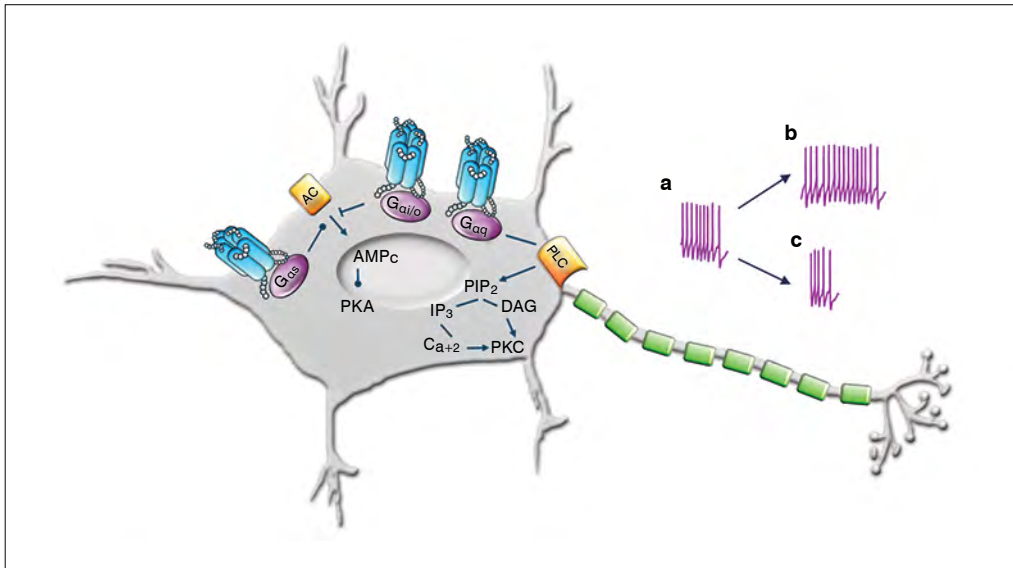


Figura 1. Representación esquemática de una neurona que expresa receptores acoplados a proteínas G de los tres subtipos. Al acoplarse a la proteína G, que es una proteína trimérica, le producen un cambio conformacional que da lugar a la activación de una vía de señalización intracelular debido a la separación de sus componentes para actuar sobre efectores específicos. De la activación de los receptores y del subtipo de proteína G depende que la actividad eléctrica de una neurona, con una actividad basal como en (a), aumente como en (b), o bien disminuya como en (c). Las líneas con terminación en bola significan estimulación, y con terminación en barra significa inhibición.

Hay dos vertientes importantes puestas en el ojo del investigador, la primera es conocer cómo están conectados los circuitos neuronales, y la segunda, cuál es el papel funcional de cada circuito neuronal.

Existen herramientas que se emplean para llevar a cabo estudios fisiológicos del sistema nervioso que han satisfecho, al menos parcialmente, esa búsqueda de respuestas a los cuestionamientos establecidos. Por ejemplo, las técnicas bioquímicas han permitido, mediante el uso de aminoácidos radiactivos, peroxidasa de rábano, o mediante el uso de virus como el herpes simplex, marcar retrógradamente un circuito lo cual permite, en principio, conocer cuáles son las proyecciones de una neurona o un grupo de neuronas. El uso de la proteína fluorescente verde, por otra parte, ha servido para marcar sinapsis activas y así ver el desarrollo neuronal tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Se han diseñado animales genéticamente modificados, los cuales carecen de un gen que interesa estudiar (denominados *knock-out*), que son

hoy en día una herramienta que permite conocer la participación de vías de neurotransmisión en diversas funciones, o la funcionalidad de alguna proteína específica.

En la búsqueda de la función que tiene algún determinado grupo de neuronas es posible silenciarlas mediante la inyección del aminoácido Gamma-Amino-Butírico (GABA), que es el neurotransmisor inhibitorio más abundante del sistema nervioso central, o mediante *cooling*, que consiste en disminuir la temperatura de una proporción de tejido y de este modo reducir su metabolismo; dicho tejido pierde funcionalidad, de manera que el investigador puede determinar la función en la cual participaba.

La farmacología también es una herramienta fundamental, pues permite activar de manera arbitraria y muy aproximada grupos celulares. Otra técnica es aquella que se basa en la estimulación eléctrica, es rápida y es de las más utilizadas, pero no es específica y activa todas las neuronas que tiene al alcance el campo eléctrico. La técnica con microelectrodos es más precisa, pero no puede activar circuitos enteros que determinen alguna función, sino solamente una neurona.

Una de las limitantes en la investigación en neurociencias son las propias limitaciones de las técnicas actuales. Si bien se puede conseguir desarrollar líneas de investigación con una tasa de éxito alta, no dejan de tener algunos inconvenientes que pueden superarse, ya sea mejorando la técnica o mediante el uso cooperativo con alguna técnica adicional que coadyuve para responder esas preguntas que hay pendientes, no solo en neurociencias sino también en otras disciplinas. La farmacología, por ejemplo, en muchos casos carece de la especificidad suficiente no solo en estudios *in vivo*, sino incluso en estudios *in vitro*, conduciendo a errores en la interpretación de los resultados.

En el caso de los ratones *knock-out*, la eliminación del gen de interés se hace en estados muy tempranos del desarrollo, lo cual da la posibilidad de que se compense de alguna manera la carencia de dicho gen por fenómenos plásticos conforme el ratón se desarrolla (Crick, 1999). La estimulación eléctrica, ya está dicho.

Francis Crick, en 1999, publicó en un artículo que:

Para comprender un sistema biológico complejo, uno debe ser capaz de interferir con este de manera precisa y delicada, probablemente a todos los niveles, pero especialmente a los niveles celular y molecular.

Tenemos herramientas que, si bien son muy buenas y han permitido el desarrollo de líneas experimentales en neurociencias, medicina, biología, fisiología, etc., nos llevan a la siguiente pregunta: ¿se puede interferir en un sistema biológico de modo más "preciso y delicado" como sugiere Crick? Sin duda es realmente importante conseguir una mayor precisión y especificidad.

TECNOLOGÍA QUIMIOMENÉTICA

Actualmente se incorporaron nuevas herramientas para la disección de circuitos neuronales y la dilucidación de sus funciones. Estas son las plataformas quimioménéticas.

La quimioménética es un método mediante el cual se diseñan proteínas para interactuar con pequeñas moléculas químicas "especiales". En el grupo de las proteínas que se han diseñado están las denominadas proteínas kinasas, los canales iónicos activados por ligando y los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés, *G-Protein Coupled Receptor*), que son en los que me enfocaré porque son los usados más ampliamente dentro de las proteínas diseñadas quimioménéticamente.

Los GPCRs son una gran familia de receptores que están distribuidos por todo el sistema nervioso central y periférico y que son activados por sustancias ligando sintetizadas dentro del propio organismo. Las proteínas G, a las cuales se acoplan, tienen una ubicuidad tal, que desde luego nos da una idea de su participación en múltiples funciones. Una vez activado el receptor, las proteínas G se encargan de desencadenar la señalización intracelular. Existe un amplio repertorio de proteínas G, de modo que se han clasificado de acuerdo a su función. De manera general, hay tres subtipos de proteínas G a las que se acoplan los receptores: proteínas G_s , $G_{i/o}$ y G_q . Las proteínas G_s y la $G_{i/o}$ se definieron con base en la acción que ejercen sobre la adenilato ciclasa y el AMPc, de tal modo que la G_s es excitadora (estimula la adenilato ciclasa con un consecuente aumento en los niveles de AMPc) y la $G_{i/o}$ es inhibitoria (inhibe la formación de AMPc por bloqueo de la adenilato ciclasa). Estos cambios influyen activando o inhibiendo la proteína cinasa A y, por lo tanto, modifican la actividad eléctrica de la célula ya sea aumentando o disminuyendo su excitabilidad (ver Figura 1).

Las proteínas G_q activan a la proteína cinasa C, lo cual modifica también la excitabilidad de la célula. Esta es una clasificación de acuerdo a mecanismos canónicos, pero no significa que sean los únicos mecanismos que transcurren a la activación de los GPCRs. Así, las proteínas G modulan la excitabilidad neuronal de acuerdo al subtipo que sea.

Los GPCRs, estructuralmente, están formados por siete segmentos transmembranales unidos entre sí por asas intra y extracelulares, y suelen tener sitios específicos para la unión con un ligando que los activa (dopamina, histamina, serotonina, péptidos opioides, cannabinoides, acetilcolina, etcétera). Al ser la mayor clase de moléculas de transducción de señales, representan uno de los blancos terapéuticos principales en el proteoma. La mayoría de los fármacos diseñados para el tratamiento de enfermedades como la esquizofrenia, depresión, ansiedad, etc., tienen como blanco algún subtipo de GPCR.

Como puede entenderse, la función primaria de los GPCRs es transducir los estímulos extracelulares en señales intracelulares y de este modo participan en múltiples funciones.

Usando la tecnología quimiogenética fue posible diseñar GPCRs con el objetivo de controlar la señalización que estos median y así “encender” o “apagar” circuitos usando moléculas farmacológicamente inertes, pero capaces de activarlos a ellos consiguiendo así una gran especificidad. Estos son los llamados DREADDs (por sus siglas en inglés *Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drug*).

EVOLUCIÓN DE LOS RECEPTORES DE DISEÑO HACIA LOS DREADDs

Existen tres generaciones de quimiogenética basada en GPCRs. La primera generación (diseñada alrededor de 1991 por Strader y sus colaboradores) consistió en el diseño de un mutante de receptor β_2 -adrenérgico que no se unía a la adrenalina, que es su ligando nativo, pues tenía una mutación justo en el sitio de unión, pero que podía ser activado por L-185,870, que es un ligando sintético. Realmente el L-185,870 tuvo poca potencia para activar al receptor diseñado, pero representó una buena aproximación a los receptores de diseño.

La segunda generación surgió en 1998 (Coward y cols., 1998), fue apodada como RASSLs (receptor

activado solamente por un ligando sintético). Este era un receptor opioide que no se activaba con los péptidos nativos pero que sí se activaba con un agonista sintético, la espiradolina.

Hay una característica primordial en la tecnología quimiogenética que es que los receptores diseñados, idealmente no deben ser activados por sus ligandos nativos, sino por un agonista sintético para permitir un mejor control de variables en el estudio que se emprenda, porque eso permitiría “encender” o “apagar” un circuito de manera “artificial” con mucha especificidad. Las dos generaciones mencionadas arriba tuvieron un problema esencial que fue la actividad constitutiva del receptor. Esto se refiere a una activación de proteínas G por parte del receptor aun en ausencia del ligando, de manera que se perdía el control de la señalización asociada a los GPCRs diseñados.

Como una necesidad de mitigar la actividad constitutiva, surge una tercera generación desarrollada entre 2007 y 2009 (Armbruster y cols., 2007; Alexander y cols., 2009), que incorpora la utilización de moléculas que, si bien activan los receptores diseñados, son farmacológicamente inertes. Estos se denominan receptores de diseño activados exclusivamente por drogas de diseño, DREADDs. Más allá de las primeras generaciones, son ampliamente usados como herramienta en múltiples estudios que mencionaré adelante.

Para activar la señalización mediada por proteína G_q se usaron DREADDs basados en receptores muscarínicos humanos 1, 3 y 5: hM1Dq, hM3Dq y hM5Dq, respectivamente (Armbruster y cols., 2007), siendo el hM3Dq el más usado. Así mismo, hay tres G_i -DREADDs, dos basados también en receptores muscarínicos humanos, hM2Di y hM4Di, y uno basado en receptores opioides KORD. El más usado es el hM4Di. Finalmente, para crear los DREADDs acoplados a proteínas G_s , se intercambiaron regiones intracelulares de receptores β -adrenérgicos (que es la región del receptor que une a la proteína G_i en este caso a la G_s) de eritrocitos de pavo por regiones equivalentes de un DREADD M3 de rata. Cabe mencionar que a diferencia de los G_i -DREADDs y de los G_q -DREADDs,

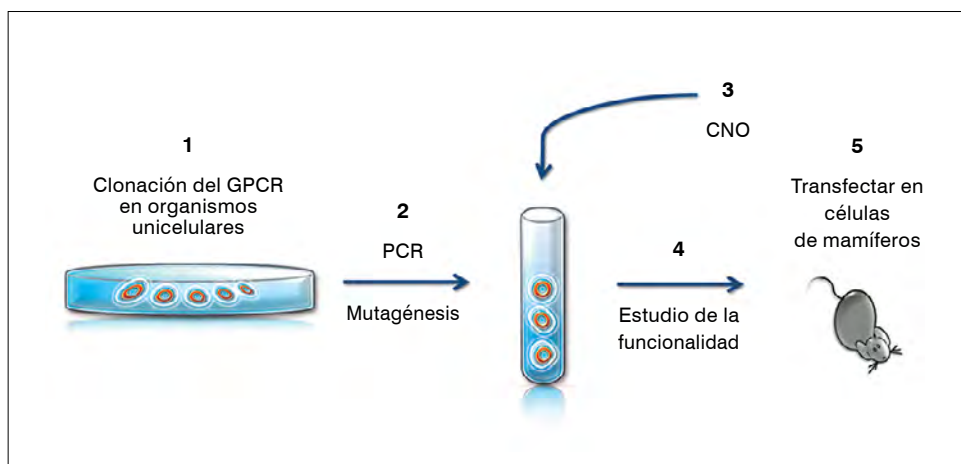


Figura 2. Representación esquemática del proceso para la generación de los DREADDs.

los G_s -DREADDs tienen un pequeño nivel de actividad constitutiva, demostrado en células transfectadas (Roth, 2016).

Como había mencionado antes, los DREADDs se activan por pequeñas moléculas que son farmacológicamente inertes, de esta forma, una vez que se administran van a activar exclusivamente dichos receptores y no interactúan con ningún otro blanco. La molécula más usada es la clozapina N-óxido (CNO), que por estudios realizados en ratones se sabe que tiene una rápida penetración y distribución en el sistema nervioso central (Bender y cols., 1994).

A diferencia de otros fármacos usados para el estudio de la señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G endógenas, o a diferencia de estudios optogenéticos que utilizan la luz de determinadas longitudes de onda para activar o inactivar receptores, el uso de los DREADDs tiene varias ventajas. Una de ellas es que la CNO cruza la barrera hemato-encefálica por lo que se puede administrar sistemáticamente mediante inyección intraperitoneal o por vía oral, por ejemplo en el agua que se bebe, de modo que no representa un método invasivo. Su cinética predice una duración relativamente prolongada de la activación, inhibición o modulación, que puede ir de minutos hasta horas, haciendo clara la visualización de los efectos. Además, la activación de DREADDs mediada por CNO no requiere de

un equipo especializado y es fácil disponer de él (Sternson y Roth, 2014). Hay otras moléculas que también se han usado para activar los DREADDs, como la perlapina, el compuesto 21 y la salvinoirina B, pero hasta ahora el CNO es el que mejor ha funcionado.

De cualquier manera cabe mencionar que es de crucial importancia que en cada serie experimental usando DREADDs se realicen controles apropiados mediante el uso de animales silvestres, es decir, que no tengan DREADDs, pues se sabe que a pesar de las ventajas antes mencionadas de la CNO, es posible que la molécula se reconvierta a clozapina, que es un antipsicótico atípico del cual la CNO es un metabolito. Si bien, la CNO se considera biológicamente inerte (tomando con cuidado esta aseveración), su reconversión a clozapina supone un riesgo, pues dicha molécula podría actuar sobre una variedad de receptores. El equipo de trabajo del doctor Duncan y sus colaboradores en la Universidad de Búfalo, Nueva York, demostraron que la administración de CNO tiene efectos conductuales *in vivo* y se convierte en clozapina y N-desmetilocapina (N-Des), que también es farmacológicamente activa (Duncan y cols., 2016). De ahí la importancia de realizar un diseño experimental con animales controles libres de DREADDs.

¿CÓMO SE HACE Y CÓMO SE INTRODUCE UN DREADD EN UN SISTEMA BIOLÓGICO?

El grupo del doctor Roth usó la Evolución Molecular Dirigida (EMD) para diseñar los DREADDs (Dong y cols., 2010). Dicho de una manera general, esta es una herramienta que permite reproducir un proceso de selección natural, pero en el laboratorio, con el objetivo de mejorar las propiedades de una proteína en algún aspecto específico que se desee. Eso se consigue mediante un procedimiento que implica mutagénesis aleatorias, cribado y selección (Dong y cols., 2010). Originalmente se emplean organismos unicelulares que expresen alguna proteína G_a y en ellos se clona el GPCR. Posteriormente, a esos GPCRs se les induce mutagénesis aleatoria basada en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) propensa a errores y se prueba *in vitro* su capacidad para ser activados por el ligando sintético (usualmente CNO). Esos receptores ya funcionales son los DREADDs y están listos para llevarlos a células de mamíferos para estudios *in vivo* (ver Figura 2).

La forma de introducir los DREADDs dentro de un modelo animal para estudios *in vivo* también ha tenido su evolución. En 2011 se utilizó la técnica Cre-On DIO (*Double-floxed Inverse Orientation*), que es una mezcla de transfección viral y de transgénesis. Este sistema se basa en la capacidad de la recombinasa Cre que es una enzima derivada de bacteriófago, para reconocer y realizar combinación entre unas secuencias llamadas lox: una secuencia transgénica orientada inversa, flanqueada por secuencias lox, que en presencia de la recombinasa Cre experimenta recombinación. Esto cambia su orientación y, a su vez, inicia la transcripción del transgén (o sea, de los genes transferidos). Este sistema es importante por tres características, ya que 1) es altamente selectivo para células que expresan la Cre recombinasa, 2) se consigue un alto nivel de expresión del transgén y 3) es cada vez más sencillo acceder a líneas tanto de ratas como de ratones que

expresen la Cre recombinasa (Dobrzanski y Kosut, 2016).

Aunque la primera característica es una ventaja respecto a la transfección viral (que implicaría una expresión menos específica), el sistema Cre-On DIO no deja de introducir los receptores en todas las células de un tipo particular, así que su activación resulta en un efecto conductual general, que en términos de selectividad podría ser considerado como una desventaja bajo algunas condiciones experimentales (Dobrzanski y Kossut, 2017).

Era preciso encontrar una forma de controlar circuitos y poblaciones neuronales de un modo más específico, por lo que surgió el método retro-DREADD que también usa líneas que expresan CRE y está basado en la combinación de inyección viral estereotáctica y expresión de un transgén con un promotor específico. Esta técnica consiste en la inyección estereotáctica de dos vectores virales: el primero expresa los DREADDs de manera dependiente de Cre y se inyecta dentro de la región que contiene los cuerpos celulares de las neuronas de interés, mientras el segundo es un adenovirus canino 2 (CAV-2) que expresa Cre recombinasa y se introduce en las proyecciones terminales. El CAV-2 viaja retrógradamente hacia el soma donde está expresada la Cre recombinasa y esto resulta en la expresión de DREADDs dependiente de Cre dentro de los cuerpos celulares.

Una vez que los DREADDs son introducidos en un sitio de interés, la administración de la molécula que los activa (CNO) lleva a cambios en la actividad celular y es importante saber que, según el sitio en el que estén expresados, permitirán un control espacio-temporal preciso de la señalización por GPCRs. En la Figura 3 hay una comparación entre un GPCR y un DREADD obtenido mediante EMD.

DREADDs ¿PARA QUÉ SE HAN USADO YA? Y ¿CUÁL ES SU POTENCIAL?

Solos o en combinación con otras herramientas, los DREADDs se han usado para diferentes estudios. Algunos ejemplos son los siguientes:

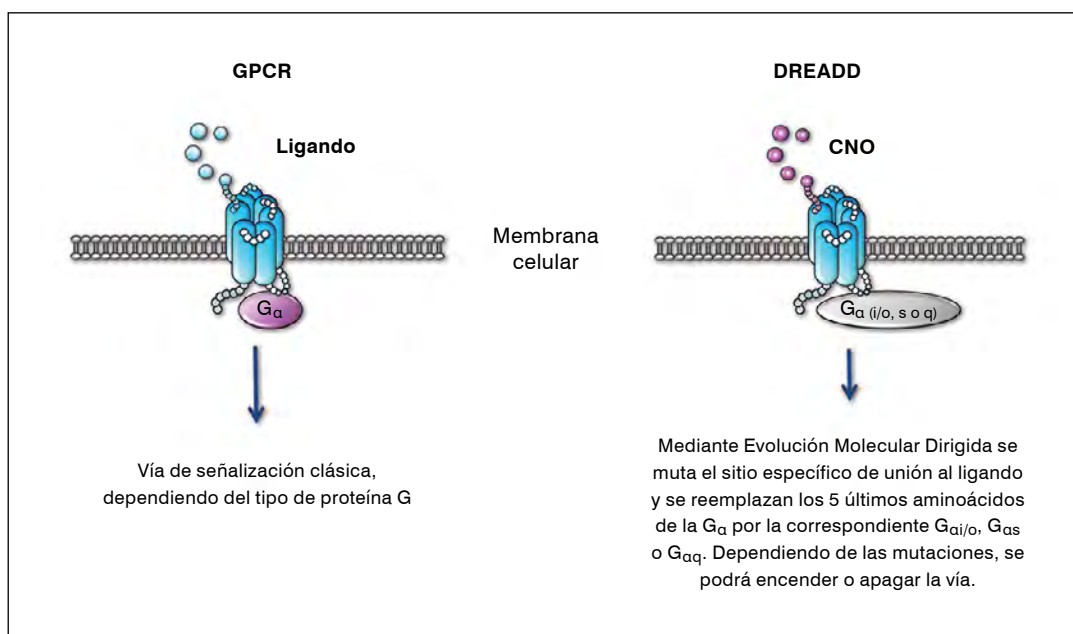


Figura 3. Comparación entre un GPCR activado por un ligando nativo que desencadena una vía de señalización clásica y un DREADD diseñado mediante EMD, que se activa mediante una molécula farmacológicamente inerte (CNO) y apaga o enciende la vía, según las mutaciones que tenga el sistema. De este modo podrá excitar o inhibir a la célula o favorecer funciones tales como la liberación de neurotransmisor, etcétera.

Hablando de placebos, se sabe que las expectativas positivas que se tienen contribuyen a sus efectos benéficos y que esas expectativas positivas son mediadas por el sistema de recompensa del cerebro. El área ventral tegmental es una estructura que se considera un componente clave del sistema de recompensa, así que se usaron los DREADDs para activar neuronas dopaminérgicas de dicha estructura en ratones. Se expuso a los animales a *Escherichia coli* y luego se activó el área ventral tegmental. Al activar dicha estructura, hubo un aumento en la actividad antibacteriana de monocitos y macrófagos, que se interpreta como un aumento de la respuesta inmune adaptativa e innata. Con esto se determinó que la activación del área ventral tegmental afecta la fisiología del sistema inmune y probablemente los placebos funcionan gracias a la capacidad del sistema de recompensa de estimular la respuesta inmune (Ben-Shaanan y cols., 2016).

En otro estudio se usaron los DREADDs para estimular directamente el circuito corteza prefrontal-amígdala y se demostró que, al hacerlo, se restauraba la conducta normal en animales deprimidos (Hultman y cols., 2016).

Los DREADDs han contribuido también a determinar el papel del núcleo incertus como modulador de la cognición y la atención, y los comportamientos emocionales y motivados. Esto mediante la activación, *in vitro*, con CNO del hM3Dq-DREADD expresado en este núcleo, que llevó a una depolarización duradera con descarga de potenciales de acción (Ma y cols., 2016).

En estados tempranos de la enfermedad de Alzheimer hay hiperactividad neuronal que puede aumentar la secreción y formación de placas del péptido β -amiloide (péptido neurotóxico que se considera la causa de la muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer). Mediante el uso de los DREADDs en dos modelos de enfermedad de Alzheimer se demostró que la atenuación a largo plazo de la actividad neuronal disminuye la agregación del péptido. Así, se determinó que la modulación de la actividad neuronal podría constituir una estrategia terapéutica para mejorar la patología inducida por amiloides en la enfermedad de Alzheimer (Yuan y Grutzendler, 2016).

REFERENCIAS

También, los DREADDs permitieron determinar que la ketamina induce una respuesta antidepresiva por activación de la vía hipocampo ventral-corteza prefrontal medial, pues al activar dicha vía usando DREADDs se remedó la respuesta tipo antidepresivo de la ketamina (Carreno y cols., 2015).

En un modelo de síndrome de Down se usaron hM3Dq-DREADDs para estimular neuronas que estaban degenerando y que, por lo tanto, inducían a una pérdida de memoria. Al estimularlas aumentó la realización de una tarea de reconocimiento de objetos novedosos que se asocia con un aumento de la memoria. Así, los DREADDs consiguieron aumentar la memoria en un modelo animal del síndrome de Down (Fortress y cols., 2015).

Así como estos estudios, hay más reportados sobre la identificación de neuronas que codifican para la ingesta de alimentos, silenciación de neuronas serotoninérgicas, identificación de neuronas responsables de la sensación de placer, estudios de dolor neuropático, deconstrucción de las acciones de los receptores opioides *in vitro* e *in vivo*, estudios de adicción al alcohol y otras drogas de abuso, por mencionar algunos.

Según el profesor Roth, los DREADDs tienen un gran potencial terapéutico. En su artículo *DREADDs for neuroscientists* del 2016, expresó que:

Se han sugerido muchas aplicaciones terapéuticas basadas en DREADDs incluyendo diabetes, desórdenes metabólicos, enfermedad de Parkinson, abuso de alcohol y psicoestimulantes, depresión, trastorno de estrés postraumático, convulsiones intratables, desórdenes inflamatorios, autismo y muchas otras enfermedades.

Sea como sea, aún quedan áreas para mejorar la tecnología de los DREADDs, pero lo que se ha avanzado hasta ahora es de mucho valor en neurociencias e incluso otras disciplinas y está generando un considerable número de publicaciones que parece aumentar a gran velocidad

- Alexander GM, Rogan SC, Abbas AI, Armbruster BN, Pei Y, Allen JA, Nonneman RJ, Hartmann J, Moy SS, Nicoletis MA, McNamara JO, Roth BL (2009). Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* 63:27-39.
- Armbruster BN, Li X, Pausch MH, Herlitze S, Roth BL (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potentially activated by an inert ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5163-8.
- Ben-Shaanan TL, Azulay-Debbi H, Dubovik T, Starosvetsky E, Korin B, Schiller M, Green NL, Admon Y, Hakim F, Shen-Orr SS, Rolls A (2016). Activation of the reward system boosts innate and adaptive immunity. *Nat Med* 22:940-4.
- Bender D, Holschbach M, Stöcklin G (1994). Synthesis of n.c.a. carbon-11 labelled clozapine and its major metabolite clozapine-N-oxide and comparison of their biodistribution in mice. *Nucl Med Biol* 21:921-5.
- Carreno FR, Donegan JJ, Boley AM, Shah A, DeGuzman M, Frazer A, Lodge DJ (2015). Activation of a ventral hippocampus-medial prefrontal cortex pathway is both necessary and sufficient for an antidepressant response to ketamine. *Mol Psychiatry* 21:1298-308.
- Coward P, Wada HG, Falk MS, Chan SD, Meng F, Akil H, Conklin BR (1998). Controlling signaling with a specifically designed Gi-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:352-7.
- Crick F (1999). The impact of molecular biology on neuroscience. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:2021-5.
- Dobrzanski G, Kossut M (2016). Application of the DREADD technique in biomedical brain research. *Pharmacol Rep* 69:213-21.
- Dong S, Rogan SC, Roth BL (2010). Directed molecular evolution of DREADDs: a generic approach to creating next-generation RASSLs. *Nat Protoc* 5:561-73.
- Fortress AM, Hamlett ED, Vazey EM, Aston-Jones G, Cass WA, Boger HA, Granholm AC (2015). Designer receptors enhance memory in a mouse model of Down syndrome. *J Neurosci* 35:1343-53.
- Hultman R, Mague SD, Li Q, Katz BM, Michel N, Lin L, Wang J, David LK, Blount C, Chandy R, Carlson D, Ulrich K, Carin L, Dunson D, Kumar S, Deisseroth K, Moore SD, Dzirasa K (2016). Dysregulation of Prefrontal Cortex-Mediated Slow-Evolving Limbic Dynamics Drives Stress-Induced Emotional Pathology. *Neuron* 91:439-52.
- Ma S, Allocca G, Ong-Pålsson EK, Singleton CE, Hawkes D, McDougall SJ, Williams SJ, Bathgate RA, Gundlach AL (2016). Nucleus incertus promotes cortical desynchronization and behavioral arousal. *Brain Struct Funct* 222:515-37.
- Roth BL (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89:683-94.
- Sternson SM, Roth BL (2014). Chemogenetic tools to interrogate brain functions. *Annu Rev Neurosci* 37:387-407.
- Strader CD, Gaffney T, Sugg EE, Candelore MR, Keys R, Patchett AA, Dixon RA (1991). Allele-specific activation of genetically engineered receptors. *J Biol Chem* 266:5-8.
- Yuan P, Grutzendler J (2016). Attenuation of β -Amyloid Deposition and Neurotoxicity by Chemogenetic Modulation of Neural Activity. *J Neurosci* 36:632-41.
- Duncan AA, MacLaren, Richard W. Browne, Jessica K. Shaw, Sandhya Krishnan Radhakrishnan, Prachi Khare, Rodrigo A. España and Stewart D. Clark (2016). Clozapine N-Oxide Administration Produces Behavioral Effects in Long-Evans Rats: Implications for Designing DREADD Experiments. *eNeuro* 3 (5) DOI: <https://doi.org/10.1523/NEURO.0219-16>

Catalina Valdés Baizabal
Instituto de Neurociencias de Castilla y León-INCyL
Universidad de Salamanca
cvb@usal.es