

REVISIÓN

Neurobiología de las metilxantinas

R. MORATALLA

Instituto Cajal. CSIC. Madrid. España.

RESUMEN. Objetivo. En este artículo vamos a revisar las acciones farmacológicas de las metilxantinas y la de sus componentes principales, la cafeína y la teofilina. Vamos a ver su mecanismo de acción, los receptores implicados, la distribución de estos receptores en el sistema nervioso central (SNC), su localización celular y la interacción de estos receptores con los de la dopamina.

Material y métodos. Mediante estudios de hibridación *in situ* sencilla y doble se ha puesto de manifiesto la distribución y la localización neuronal de los receptores de adenosina A1 y A2a, principales receptores de las metilxantinas. Mediante ensayos de comportamiento, fijación de ligandos y técnicas de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) se ha estudiado la interacción de estos receptores con los receptores de dopamina D1 y D2.

Resultados. Las metilxantinas son estimulantes del SNC, incrementan la actividad motora, el rendimiento intelectual y disminuyen la fatiga y el sueño. Las metilxantinas son antagonistas no selectivos de los receptores de adenosina, fundamentalmente A1 y A2a, y su consumo crónico produce dependencia. Los receptores A1 inhiben la adenilil ciclasa y se encuentran en el hipocampo, corteza, núcleos talámicos, estriado y globo pálido. Los receptores A2a estimulan la adenilil ciclasa y se encuentran casi exclusivamente en el estriado y tubérculo olfatorio. En el estriado los A1 se encuentran localizados con los

D1, mientras que los A2a colocalizan con los D2 en las neuronas estriatopálidas. La adenosina, mediante la activación de sus receptores A1 y A2, se opone a las acciones mediadas por la dopamina a través de sus receptores D1 y D2. Esta interacción se lleva a cabo mediante la formación de heterodímeros proteína-proteína con los receptores A2a-D2 y A1-D1. Estos resultados además han sido corroborados en animales *knock-out* (KO) para cada uno de los receptores implicados.

Conclusiones. Las metilxantinas son psicoestimulantes motores que bloquean los receptores de adenosina A1 y A2a. La adenosina se opone a las acciones mediadas por dopamina. En el estriado, los receptores A1 colocalizan con los D1 en las neuronas de la vía directa, mientras que los A2a colocalizan con los D2 en las neuronas de la vía indirecta. La interacción entre estos dos sistemas de receptores se lleva a cabo mediante la formación de heterodímeros entre los receptores A1-D1 y A2a-D2.

PALABRAS CLAVE: cafeína, teofilina, dopamina, heterodímeros, abuso, abstinencia.

The neurobiology of methylxanthines

ABSTRACT. Objective. In this review we are going to see the pharmacological profile of the methylxanthines and that of their main components caffeine and theophiline. We will review their mechanisms of action, the implicated receptors, the distribution of these receptors within the Central Nervous System, their neuronal localization and their interaction with the dopamine receptors.

Material and methods. The distribution and the cellular localization of adenosine receptors A1 and A2a have been studied by single and double *in situ* hybridization. Behavioural and ligand binding studies together with FRET techniques have been used

Correspondencia:

R. MORATALLA
Instituto Cajal.
CSIC.
Avda. Dr. Arce n.º 37.
28002 Madrid. España.
Correo electrónico: moratalla@cajal.csic.es

Recibido: 20-05-2008

Aceptado para su publicación: 28-06-2008

to study the interaction between the adenosinergic and dopaminergic systems as well as that of their receptors.

Results. Methylxanthines are psychostimulants that increase motor activity and arousal and decrease fatigue and sleep. Methylxanthines are non selective antagonists of adenosine receptors, mainly A1 and A2a receptors. Chronic use of methylxanthines produces dependency. A1 receptors inhibit adenylyl cyclase (AC) and are widely expressed in the brain (hippocampus, cortex, thalamus, striatum and globus pallidus). A2a receptors stimulates AC and are almost exclusively located in the striatum and olfactory tubercle. In the striatum, A1 receptors are colocalized with D1 receptors, while A2a colocalized with D2 receptors. Adenosine, by the activation of A1 and A2a receptors counteracts dopamine responses mediated by D1 and D2 receptors. This interaction occurs through intramembrane receptor-receptor interaction between A2a-D2 and A1-D1 receptors. These results have also been confirmed with the use of KO mice for each of the implicated receptors.

Conclusions. Methylxanthines are psychomotor stimulants that block adenosine receptors A1 and A2a. Adenosine opposes dopamine-mediated responses. In the striatum, A1 receptors colocalized with D1 receptors in direct pathway neurons while A2a receptors colocalized with D2 receptors in indirect pathway neurons. The interaction between dopaminergic and adenosinergic systems is taken place by the intramembrane receptors interaction between A1-D1 and between A2a-D2 receptors.

KEY WORDS: caffeine, theophiline, dopamine, heterodimers, abuse, abstinence.

Introducción

La cafeína y la teofilina son derivados de la metilxantina que, en cantidades moderadas, se encuentran en bebidas como el café, té, mate o chocolate. Aunque sus efectos no sean tan fuertes como los de la cocaína o anfetamina, son estimulantes del sistema nervioso central (SNC). En dosis moderadas producen una mejora del rendimiento mental y físico y reducen el cansancio y el sueño. Dosis altas pueden producir ansiedad y disforia, así como trastornos del sueño. Incluso con dosis bajas la cafeína puede actuar como estímulo discriminativo. Fisiológicamente, la cafeína aumenta la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la diuresis.

Produce dependencia física leve y también síndrome de abstinencia. En el SNC la cafeína es un bloqueador no específico de los receptores de adenosina A1 y A2a.

Estructura química

Las xantinas cafeína, teofilina y teobromina son indiscutiblemente los psicoestimulantes más utilizados en todo el mundo. En España, por ejemplo, se estima que aproximadamente un 80% de la población adulta toma a diario café o té. Otros compuestos como el chocolate y bebidas refrescantes como coca-cola y nestea (con menor contenido en xantinas) son también ampliamente consumidos por la población más joven. Las xantinas, en una u otra forma, se han utilizado desde la antigüedad, de ahí sus nombres: teofilina (hoja divina) y teobromina (alimento de los dioses). La mayor fuente de cafeína se obtiene de las semillas de la planta *Coffea arabica*, mientras que las hojas de té, de la planta *Thea sinensis*, contienen cafeína y teofilina. Las semillas de cacao *Theobroma cacao*, además de contener teobromina también contienen cafeína, aunque en menores cantidades que las semillas de la planta del café (tabla 1).

Varias estadísticas apuntan que el consumo diario de café por la población adulta es de aproximadamente 300 mg de término medio y por persona. Sin embargo, su ingesta puede aumentar considerablemente en consumidores compulsivos. Incluso los niños pueden ingerir cantidades considerables de cafeína, principalmente a través del consumo de refrescos con cafeína y el consumo de chocolate¹.

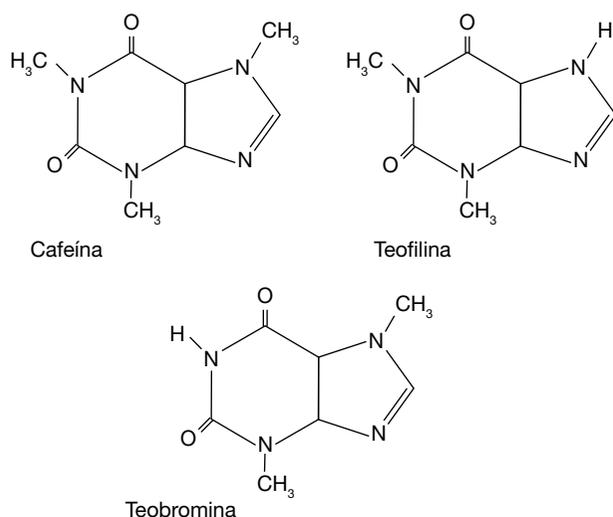
Estructuralmente, las xantinas son derivados purinérgicos formados por los heterociclos pirimidina e imidazol condensados, dando lugar a las metilxantinas, cafeína (1,3,7 trimetilxantina), teofilina (1,3 dimetilxantina) y teobromina (3,7 dimetilxantina) (fig. 1). Las sales que forman estos compuestos son fácilmente solubles.

Acción farmacológica de las xantinas

Las acciones farmacológicas de las xantinas son muy similares entre sí, debido a la analogía química, existiendo sólo diferencias cuantitativas. La cafeína es la más potente en cuanto a su acción sobre el SNC, le sigue la teofilina y después la teobromina, siendo esta última el compuesto menos activo de los tres. La cafeína estimula el SNC produciendo un incremento en el rendimiento intelectual objetivo y subjetivo, aumen-

Tabla 1. Contenido en xantinas de algunos productos alimenticios y recreativos

Fuentes	Contenido en cafeína	Contenido en teobromina	Contenido en teofilina
Bebidas:			
Café	80-100 mg/taza		
Café descafeinado	3 mg/taza		
Té	28 mg/taza		< 10 mg/taza
Chocolate	30 mg/taza		
Bebidas de cola	30-50 mg/lata		
Chocolates:			
Chocolate puro	35 mg/onza	300-400 mg/onza	
Chocolate con leche	6 mg/onza		

**Figura 1.** Fórmula química de las metilxantinas.

tando la capacidad de concentración y de atención. Incrementa la interacción social y produce sensación de bienestar, sin tener consecuencias depresivas una vez pasado el efecto. También puede desencadenar ansiedad, sobre todo en la interacción social. Todos los efectos que produce son dependientes de la dosis. Como otros estimulantes, reducen la sensación de fatiga, aumentan el estado de vigilia retrasando la iniciación del sueño y, con dosis elevadas, pueden alterar la calidad y duración de éste. Esta respuesta sobre el sueño es más prominente en individuos de edad avanzada, independientemente de que en el pasado hubiera una buena tolerancia a los efectos de la cafeína. También ejerce su efecto estimulante en la totalidad del sistema nervioso, aumentando por tanto la motilidad voluntaria y la refleja. Incrementa la presión arterial y la frecuencia respiratoria y taquicardia, produciendo diuresis y estimulando la liberación de catecolaminas, en concreto la adrenalina. Asimismo, antagoniza la acción de los de-

presores del SNC como los barbitúricos y las benzodiazepinas.

La cafeína se absorbe casi completamente en el tracto intestinal de forma rápida, aproximadamente a los 45 minutos de su ingesta. La vida media de la cafeína está entre 2,5 y 4,5 horas, de manera que la ingesta repetida en el curso del día aumenta gradualmente los niveles plasmáticos de cafeína, incrementando con ello los efectos que produce².

Efectos del uso crónico de cafeína

El tratamiento repetido con cafeína puede producir tolerancia o sensibilización, dependiendo de la pauta de administración. Así, el tratamiento continuado con cafeína en el agua de bebida de la rata produce tolerancia a los efectos locomotores de la cafeína³ y sensibilización motora con dosis intermitentes, bien por vía oral o intraperitoneal⁴. En seres humanos se observa tolerancia en los efectos cardiovasculares, aunque esta tolerancia no sea completa en la mayoría de los casos⁵. Sin embargo, no está claro que esta tolerancia se ejerza también en los efectos psicológicos y conductuales. Lo que sí parece claro es que la cafeína produce menos insomnio en consumidores crónicos que en consumidores ocasionales.

Abuso de cafeína

Aunque el abuso de cafeína no está asociado a los patrones de uso compulsivo característicos de la utilización de otros psicoestimulantes, se observan con alguna frecuencia pacientes que persisten en el consumo de cafeína a pesar de las contraindicaciones médicas específicas individuales. El consumo crónico de cafeína puede llevar a la ingestión de cantidades elevadas

produciendo nerviosismo, insomnio, inquietud y también trastornos fisiológicos como taquicardia. Estas manifestaciones clínicas son similares a las que se observan en trastornos de ansiedad. Con dosis elevadas, más de 1 g de cafeína al día, se observan efectos psicóticos mayores. En cuanto a los efectos adversos del abuso de cafeína, algunos investigadores han observado un cierto riesgo a padecer enfermedades coronarias y, en mujeres embarazadas, a tener bebés con bajo peso natal.

Dependencia de la cafeína

La existencia del síndrome de abstinencia a la cafeína es hoy en día irrefutable. Existen síntomas psicológicos y físicos, no ya sólo después de la interrupción del consumo sino también después de una disminución en el consumo de cafeína. Los síntomas de abstinencia más claros son dolores de cabeza, somnolencia, cansancio, atenuación de la atención y concentración, dificultad en la coordinación y, en algunos casos, ansiedad o depresión leve. También se ha descrito deseo compulsivo por cafeína. Es importante observar que el síndrome de abstinencia a la cafeína puede ser lo suficientemente severo como para producir trastornos ocupacionales y sociales en grandes consumidores o personas dependientes de la cafeína. Aunque el síndrome de abstinencia se describió en consumidores de elevadas dosis de cafeína (> 600 mg/día), también ocurre en individuos que consumen tan poco como 100 mg al día, que es el equivalente a una taza de café o bien a dos o tres latas de refrescos con cafeína. Las manifestaciones sintomáticas aparecen el primer día de abstinencia de cafeína y pueden durar varios días más. Parece ser que la liberación de la abstinencia es uno de los factores principales en el consumo crónico de café; en particular en el primer café de la mañana.

Mecanismos de acción de la cafeína y teofilina

Sistema adenosinérgico

La cafeína y la teofilina deben su acción farmacológica al bloqueo de los receptores de adenosina⁶ y su potencia de acción es proporcional a la afinidad que presenta cada una de ellas por los receptores de adenosina. La adenosina es un nucleósido de purina ubicuo que se forma a partir del adenosín trifosfato (ATP) en el fluido extracelular mediante la acción de diversas ectoenzimas plasmáticas que defosforilan el ATP a adeno-

sín monofosfato (AMP) y éste a adenosina. La adenosina también se puede sintetizar intracelularmente mediante la enzima 5' nucleotidasa plasmática. Su formación y liberación se activa mediante estrés metabólico y falta de oxígeno. La adenosina es un inhibidor general del sistema nervioso que produce sedación, relajación y ansiólisis en el SNC y vasodilatación coronaria, relajación de la musculatura lisa gastrointestinal e inhibición de la agregación plaquetaria en el sistema nervioso periférico (SNP). Recientemente, también se ha observado que actúa como neuroprotector en la isquemia cerebral y en el infarto que se produce^{7,8}. La adenosina no se considera un neurotransmisor clásico, ya que no se almacena en vesículas sinápticas y su liberación no es dependiente de calcio⁹.

Receptores de adenosina

Hasta la fecha se han clonado 4 receptores para la adenosina, A1, A2a, A2b y A3, con un alto grado de homología entre ellos y una localización cerebral específica para cada uno¹⁰. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a las proteínas G que tienen siete dominios transmembrana. Debido a que la adenosina se une con mayor afinidad a los receptores A1 y A2a, la mayoría de las acciones farmacológicas se deben a estos receptores, siendo la participación de A2b y A3 cuantitativamente despreciable.

Los receptores A1 y A2a ejercen acciones bioquímicas opuestas. La estimulación de los receptores A1 disminuye la acumulación de AMP cíclico (AMPC) al acoplarse a las proteínas Gi/Go, mientras que los A2a aumentan al estar acoplados a Gs y G_{olf}, cuya estimulación activa la adenilato ciclasa aumentando la acumulación de AMPC en el citoplasma celular (fig. 2).

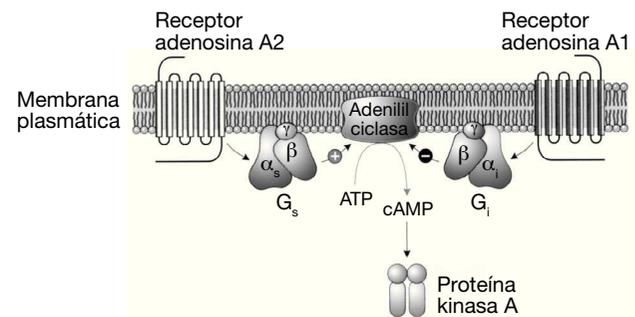


Figura 2. Regulación de la enzima adenilato ciclasa por los receptores adenosinérgicos. Los receptores A2a están acoplados a Gs y estimulan la adenilato ciclasa, la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y la proteína Kinasa A. Los receptores A1 están acoplados a Gi e inhiben la vía de señalización dependiente de AMPC.

Distribución de los receptores A1

El patrón de distribución cerebral de estos dos receptores, A1 y A2a, es bien diferente, según evidencian experimentos realizados con hibridación *in situ* con ribosondas específicas para cada uno de los receptores y también con autorradiografía de fijación específica de ligandos radiactivos. Los receptores A1 se encuentran fundamentalmente en el hipocampo, corteza cerebral, núcleos talámicos y en el estriado y globo pálido. La mayoría de los receptores A1 están en el terminal presináptico, donde median en la inhibición ejercida por la adenosina sobre la liberación de neurotransmisores clásicos (glutamato, dopamina y acetilcolina, etc.). Se piensa que este control inhibitorio de la neurotransmisión ejercida por la adenosina es el mecanismo por el cual la cafeína y las otras xantinas potencian la atención, concentración y el estado de alerta en el ejercicio mental y físico. La cafeína, al bloquear el receptor A1, libera el efecto inhibitorio de la adenosina sobre la neurotransmisión¹¹. De hecho, estudios de microdiálisis demuestran que la administración de cafeína aumenta la liberación de acetilcolina en la corteza prefrontal de la rata¹², incrementando también la actividad cortical¹³.

Distribución de los receptores A2a

En contraste con la extensa distribución del receptor A1, el receptor A2a se localiza casi exclusivamente en el estriado dorsal y ventral y en el tubérculo olfatorio (fig. 3), áreas profusamente inervadas por terminales dopaminérgicos. La densidad de receptores en el estriado es bastante elevada y comparable, por otra parte,

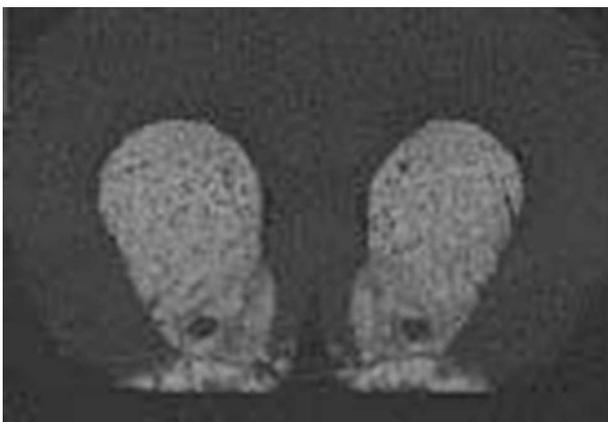


Figura 3. Fotografía de un autorradiograma de hibridación *in situ* que ilustra la distribución anatómica del ARNm para el receptor A2a en el estriado de rata.

con la densidad de los receptores dopaminérgicos. Estudios de hibridación *in situ* en comparación con tinciones inmunohistoquímicas con un anticuerpo monoclonal específico para el receptor A2a demuestran que este receptor es fundamentalmente postsináptico y se sintetiza en las neuronas de proyección del estriado. Estas neuronas son espinosas y de mediano tamaño. El marcaje con el anticuerpo se localiza en el neuropilo, en las dendritas y en las espinas dendríticas, y también colocaliza con el neuropéptido encefalina en el citoplasma de estas neuronas¹⁴.

Fenotipo molecular de las neuronas que expresan los receptores A1 y A2a

Estudios de hibridación *in situ* doble, con ribosondas específicas para el receptor A2a o A1 en combinación con ribosondas para los distintos marcadores de las neuronas estriatales, han demostrado que el receptor A1 se localiza en las neuronas del estriado que dan origen a la vía directa (estriónigra) por proyectar directamente del estriado a la sustancia negra. Estas neuronas, además, expresan el receptor dopaminérgico D1 de forma que el receptor A1 colocaliza con el receptor D1 en estas neuronas del estriado. De manera similar, se ha demostrado que los receptores A2a se expresan en las neuronas que forman la vía indirecta, proyectando del estriado al globo pálido y de ahí a la sustancia negra. Estas neuronas, además, expresan el receptor dopaminérgico D2. Estas dos vías de proyección del estriado, directa e indirecta, ejercen a su vez acciones opuestas en cuanto al control de la actividad motora. Mientras que la estimulación de la vía directa potencia el movimiento, la de la vía indirecta lo inhibe. La cafeína produce sus efectos estimulantes activando las neuronas de proyección estriatales. Tanto los efectos bioquímicos como los conductuales de la cafeína se han relacionado con su habilidad para reducir la inhibición ejercida por la adenosina endógena sobre la transmisión dopaminérgica estriatal. También se ha visto que interacciona con el sistema opioide, ya que la administración conjunta de cafeína y naloxona precipita un pseudosíndrome de abstinencia que está mediado por los receptores A2a¹⁵.

Modulación de las acciones de la dopamina por la adenosina

Investigaciones recientes demuestran de manera consistente que la adenosina modula las acciones de la dopamina a través de sus receptores A1 y A2a. Esta modulación es de tipo antagonístico con los dos tipos de

receptores. Así, el receptor A1 se opone a las acciones mediadas por el receptor dopaminérgico D1 y el receptor A2a se opone a las acciones mediadas por el receptor D2^{14,16-19}. Mediante experimentación animal en roedores se ha demostrado, en concreto, que la activación del receptor A2a antagoniza los efectos comportamentales y los efectos bioquímicos mediados por los receptores D2 en los ganglios basales²⁰, mientras que su bloqueo potencia estas acciones. El mecanismo por el cual existe un efecto antagonístico entre el receptor A2a y el D2 y entre A1 y D1 puede involucrar una interacción directa entre estos dos receptores, ya que todos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembrana y están colocalizados A1 y D1 en las neuronas estriatoglicícolas, y A2a y D2 en las neuronas estriatopallidales^{18,19}. Esta interacción se forma a través de heterodímeros proteína-proteína con los receptores A1 y D1²¹ y con los A2a y D2²². En estudios con ratones *knock-out* (KO) para el recep-

tor A2a se ha demostrado que la presencia de ambos receptores es necesaria para las acciones mediadas por uno u otro receptor^{14,16,21}. Es decir, la inactivación del receptor D2 inhibe considerablemente las respuestas mediadas por el receptor A2a y viceversa^{14,16}.

Agradecimientos

A Oskar Ortiz, Noelia Granado y Marco de Mesa por su valiosa ayuda con el procesador de textos y con las figuras, así como por la lectura crítica del manuscrito. El trabajo de investigación está financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo (PI071073), Plan Nacional Sobre Drogas, y por el Instituto de Salud Carlos III, FIS, mediante la Red de Trastornos adictivos, RD06/0001/1011 y CIBERNED.

La autora declara que no existe conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Benowitz NL. Clinical pharmacology of caffeine. *Annu Rev Med.* 1990;41:277-88.
2. Arnaud NJ. Metabolismo of caffeine and other components of coffee. En: Garattini S, editor. *Caffeine, coffee and heart.* New York: Raven Press; 1993. p. 45-95.
3. Finn IB, Holtzman SG. Tolerance to caffeine-induced stimulation of locomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1986;238:542-6.
4. Meliska CJ, Landrum RE, Landrum TA. Tolerance and sensitization to chronic and subchronic oral caffeine: effects on wheel running in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990;35:477-9.
5. Rogers PJ, Richardson NJ, Derroncourt C. Caffeine use: is there a net benefit for mood and psychomotor performance. *Neuropsychobiology.* 1995;31:195-9.
6. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999;51:83-133.
7. Deckert J, Gleiter CH. Adenosine—an endogenous neuroprotective metabolite and neuromodulator. *J Neural Transm Suppl.* 1994;43:23-31.
8. Chen JF, Huang Z, Ma J, Zhu J, Moratalla R, Standaert DG, et al. A2a adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci.* 1999;19:9192-200.
9. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:31-55.
10. Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:581-606.
11. Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:857-72.
12. Acquas E, Tanda G, Di Chiara G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharmacol.* 2002;27:182-93.
13. Rainnie DG, Grunze HC, McCarley RW, Greene RW. Adenosine inhibition of mesopontine cholinergic neurons: implications for EEG arousal. *Science.* 1994;263:689-92.
14. Chen J-C, Moratalla R, Yu L, Martín AB, Hackett E, Alberti I, et al. Inactivation of adenosine A2A receptors selectively attenuates amphetamine-induced behavioural sensitization. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28:1086-95.
15. Bilbao A, Cippitelli A, Martín AB, Granado N, Ortiz O, Bezaud E, et al. Absence of quasi-morphine withdrawal syndrome in adenosine A2A receptor knockout mice. *Psychopharmacology.* 2006;185:160-8.
16. Chen J-F, Moratalla R, Impagnatiello F, Grandy DK, Cuellar B, Rubinstein M, et al. Dispensable role of D2 dopamine receptors in A2A adenosine receptor-induced behavioral and cellular responses as revealed by A2A and D2 receptor knockout mice. *PNAS USA.* 2001;98:1970-5.
17. Carriba P, Ortiz O, Patkar K, Justinova Z, Stroik J, Themann A, et al. Triatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32:2249-59.
18. Ferré S, Ciruela F, Woods AS, Lluís C, Franco R. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 2007;30:440-6.
19. Ferré S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem.* 2008;105:1067-79.

20. Fredduzzi S, Moratalla R, Monopoli A, Cuellar B, Xu K, Ongini E, et al. Persistent behavioral sensitization to chronic L-DOPA requires A2A adenosine receptors. *J Neurosci*. 2002;22:1054-62.
21. Gines S, Hillion J, Torvinen M, Le Crom S, Casado V, Canela EI, et al. Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes. *PNAS, USA*. 2000;97:8606-11.
22. Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR, et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem*. 2003;278:46741-9.