



TESIS DOCTORAL

**ASPECTOS ESTRUCTURALES Y
CINÉTICOS DE LA INTERACCIÓN
LIGANDO-RECEPTOR
RELEVANTES EN LA
FARMACOLOGÍA DE LA
ESQUIZOFRENIA**

Javier Rodríguez Carracedo

Departamento de Farmacología

Facultad de Farmacia

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015





UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**ASPECTOS ESTRUCTURALES Y
CINÉTICOS DE LA INTERACCIÓN
LIGANDO-RECEPTOR
RELEVANTES EN LA
FARMACOLOGÍA DE LA
ESQUIZOFRENIA**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

Javier Rodríguez Carracedo

2015





FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
Campus Universitario Vida s/n. 15782
Santiago de Compostela

Dña. **María Isabel Loza García**, doctora en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela, y Dña. **María de los Ángeles Castro Pérez**, Doctora en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Aspectos estructurales y cinéticos de la interacción ligando-receptor relevantes en la farmacología de la esquizofrenia”, que para optar al grado de Doctor presenta D. Javier Rodríguez Carracedo, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia y cumple los requisitos para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 9 de noviembre de 2015.

Fdo.: María Isabel Loza García

Fdo.: María de los Ángeles Castro Pérez



RESUMEN DE LA TESIS

En este trabajo, se investigó en primer lugar la relevancia de ciertos determinantes estructurales en el bolsillo de unión de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) pertenecientes al receptoroma de antipsicóticos, para la afinidad y selectividad de dos antipsicóticos atípicos de gran relevancia farmacológica y clínica, clozapina y olanzapina. Partiendo de un análisis biocomputacional multirreceptorial de los perfiles de afinidad de ambos fármacos por distintos GPCRs así como de datos de modelización y acoplamiento ligando-receptor disponibles, se generaron receptores (serotoninérgico 5-HT_{2A}, dopaminérgico D₂) mutados en posiciones de interés y se determinó la afinidad de ambos antipsicóticos mediante ensayos de unión de radioligandos de competición en el equilibrio, identificándose posiciones aminoacídicas cuya identidad es relevante para el perfil de afinidad y selectividad de estos fármacos.

Por otra parte, se abordó un estudio de las cinéticas de interacción del antipsicótico atípico lurasidona con uno de los GPCRs diana más relevante en su perfil farmacológico, el receptor de serotonina 5-HT₇. Así, se cuantificó el parámetro tiempo de residencia del fármaco en dicho receptor en ensayos de unión de radioligandos cinéticos mediante el método de competición cinética de Motulsky y Mahan. Esto supuso la puesta a punto y la ejecución de un primer paso de cara a la caracterización del perfil de selectividad cinético de lurasidona. La determinación de este parámetro permitió obtener información farmacológica relevante relativa al fármaco.

Por último, se estudió la relevancia para las cinéticas de interacción ligando-receptor de la identidad de un residuo en el bucle extracelular 3 del receptor de adenosina A_{2A}, receptor postulado como de interés terapéutico en esquizofrenia. Mediante ensayos de unión de radioligandos cinéticos, se pudo comprobar que dicho residuo, identificado como de potencial interés en base a datos de simulación de dinámica molecular, resulta determinante para la cinética de disociación del radioligando antagonista A_{2A}-selectivo [³H]-ZM241385.

Palabras clave: Receptores acoplados a proteínas G, antipsicóticos, perfil de selectividad, cinéticas de la interacción ligando-receptor y tiempo de residencia.



THESIS ABSTRACT

In this work, we first investigated the relevance of certain structural determinants in the binding site of G protein-coupled receptors (GPCRs) belonging to the receptorome of antipsychotics, for the affinity and selectivity of two pharmacologically and clinically relevant atypical antipsychotics, clozapine and olanzapine. Based on biocomputational multireceptorial analysis of the affinity profiles of both drugs at different GPCRs, as well as on data available from modeling and docking studies, specific receptors (serotonin 5-HT_{2A}, dopamine D₂) were mutated at the positions of interest and the affinity of both antipsychotics for the mutant receptors was determined in radioligand competition binding assays. This led us to identify amino acids in specific positions of the receptors relevant for the affinity and selectivity of both drugs.

As a second step in our study of structural determinants relevant for the ligand-receptor interactions in schizophrenia, we addressed the determination of the ligand binding kinetics of the atypical antipsychotic lurasidone at one of the most relevant target GPCRs in its receptorome, the serotonin 5-HT₇ receptor. Hence, the parameter *residence time* of the drug in the receptor was quantified in kinetic radioligand competition binding assays, applying the Motulsky and Mahan method. The successful implementation of this methodology represents the first step towards a characterization of the kinetic selectivity profile of lurasidone. The determination of the residence time of lurasidone at 5-HT₇ receptors allowed us to extract relevant pharmacological information related to the drug.

Finally, we studied the relevance of the identity of a residue in extracellular loop 3 of the adenosine A_{2A} receptor, another GPCR of interest in schizophrenia, for the ligand-receptor interaction kinetics. By kinetic radioligand binding assays, we found that this residue, identified upon the analysis of data available from molecular dynamics simulations, is indeed determinant for the dissociation kinetics of the A_{2A}- selective antagonist radioligand [³H]-ZM241385.

Keywords: G protein-coupled receptors, antipsychotics, selectivity profile, ligand-receptor interaction kinetics and residence time.



RESUMO DA TESE DE DOUTORAMENTO

Neste traballo, investigouse en primeiro lugar a relevancia de certos determinantes estruturais no peto de unión de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) pertencentes ao receptoroma de antipsicóticos, para a afinidade e selectividade de dous antipsicóticos atípicos de gran relevancia farmacolóxica e clínica, clozapina e olanzapina. Partindo dunha análise biocomputacional multirreceptorial dos perfís de afinidade de ambos fármacos por distintos GPCRs, así como de datos de modelización e axuste ligando-receptor dispoñibles, xeráronse receptores (serotonérgico 5-HT_{2A}, dopaminérgico D₂) mutados en posicións de interese e determinouse a afinidade dos antipsicóticos mediante ensaios de unión de radioligandos de competición no equilibrio. Identificáronse posicións aminoacídicas das cales a súa identidade é relevante para o perfil de afinidade e selectividade destes fármacos.

Por outra banda, abordouse un estudo das cinéticas de interacción do antipsicótico atípico lurasidona con un dos GPCRs diana máis relevante no seu perfil farmacolóxico, o receptor de serotonina 5-HT₇. Así, cuantificouse o parámetro tempo de residencia do fármaco no devandito receptor en ensaios de unión de radioligandos cinéticos mediante o método de competición cinética de Motulsky e Mahan. Isto supuxo a posta a punto e a execución dun primeiro paso para a caracterización do perfil de selectividade cinético de lurasidona. A determinación deste parámetro permitiu obter información farmacolóxica relevante relativa ao fármaco.

Por último, estudouse a relevancia para as cinéticas de interacción ligando-receptor da identidade dun residuo no bucle extracelular 3 do receptor de adenosina A_{2A}, receptor postulado como de interese terapéutico en esquizofrenia. Mediante ensaios de unión de radioligandos cinéticos, púidose comprobar que devandito residuo, identificado como de potencial interese en base a datos de simulación de dinámica molecular, resulta determinante para a cinética de disociación do radioligando antagonista A_{2A}-selectivo [³H]-ZM241385.

Palabras chave: Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), antipsicóticos, perfil de selectividade, cinéticas da interacción ligando-receptor e tempo de residencia.



AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la USC; que con sus conocimientos y enseñanzas hicieron posible esta tesis doctoral. Especialmente quiero agradecer a las directoras de este trabajo, las doctoras María Isabel Loza García y María de los Ángeles Castro Pérez, su dedicación, labor de dirección y la ayuda prestada para la realización de la misma. También y de forma especial quiero darle las gracias a la doctora Maribel Cadavid, inicialmente directora de este trabajo, por su contribución a esta tesis terminada.

Quisiera dar las gracias a dos grupos colaboradores del grupo Biofarma: el grupo del doctor Manuel Pastor de la Universidad Pompeu Fabra y los colaboradores doctores Gutiérrez-de-Terán y David Rodríguez, por sus trabajos iniciales que contribuyeron a plantear las hipótesis que aquí se exponen.

Quisiera dar las gracias a todos los miembros del grupo Biofarma, especialmente a los compañeros del laboratorio, por la colaboración prestada en la ejecución de la presente tesis. En general, a todos los compañeros de tesis del grupo Biofarma por su ayuda. Gracias a los doctores Andrés Crespo y Patricio Atanes y a Icíá Varela y Rocío Ailim de la Fuente por sus trabajos en el laboratorio relacionados con el desarrollo experimental de la presente tesis y que facilitaron su ejecución material. A otras compañeras de tesis doctoral como Sonia Lage, Andrea Silva y otros compañeros de laboratorio como el doctor David Moreira y Enrique Gil.

A mis padres, por su apoyo incondicional.

A todos, mi gratitud.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
<i>1.1. PATOLOGÍA Y TERAPÉUTICA DE LA ESQUIZOFRENIA</i>	<i>1</i>
1.1.1. Introducción: etiopatología de la esquizofrenia.....	1
1.1.1.1. Epidemiología, cuadro clínico y diagnóstico de la esquizofrenia	1
1.1.1.2. Etiopatogenia de la esquizofrenia.....	3
1.1.1.2.1. <i>Genética</i>	3
1.1.1.2.2. <i>Hallazgos neuropatológicos y de neuroimagen*</i>	4
1.1.1.2.3. <i>La explicación etiológica clásica: la implicación de la dopamina</i>	4
1.1.1.2.4. <i>El papel de la serotonina.....</i>	6
1.1.1.2.5. <i>La implicación de los neurotransmisores glutamato y GABA</i>	8
1.1.1.2.6. <i>Hipótesis del neurodesarrollo, de la neurodegeneración, patología sináptica e hipótesis inmunológica.</i>	10
1.1.1.2.7. <i>El sistema de modulación de adenosina.....</i>	12
1.1.2. Fármacos antipsicóticos	13
1.1.2.1. Recomendaciones terapéuticas en esquizofrenia.....	13
1.1.2.2. Fármacos antipsicóticos: perfil farmacológico y clínico.....	15
1.1.2.2.1. <i>Antipsicóticos de primera generación o clásicos.....</i>	15
1.1.2.2.2. <i>Antipsicóticos de segunda generación o atípicos: perfil farmacológico multirreceptorial, acciones farmacológicas y eficacia clínica.....</i>	17
1.1.2.2.3. <i>Antipsicóticos de segunda generación o atípicos: clozapina y otros fármacos</i>	22

1.1.2.2.4. Otras patologías en las que están indicados los fármacos antipsicóticos o éstos tienen potencial utilidad	29
Necesidad terapéutica en esquizofrenia: énfasis en la sintomatología negativa y cognitiva	30
1.2. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs) OBJETO DE ESTUDIO, RELEVANTES EN LA PATOLOGÍA Y LA TERAPÉUTICA DE LA ESQUIZOFRENIA	32
1.2.1. Introducción a los receptores acoplados a proteínas G	32
1.2.1.1. El ciclo de vida de un GPCR.....	35
1.2.1.2. Dimerización y oligomerización de GPCRs.....	38
1.2.1.3. Cambios conformacionales en GPCRs y selectividad funcional	40
1.2.1.4. Modulación alostérica en GPCRs.....	45
1.2.2. GPCRs implicados en la fisiopatología de la esquizofrenia.....	47
1.2.2.1. El receptor 5-HT _{2A} de serotonina	47
1.2.2.2. El receptor de dopamina D ₂	51
1.2.2.3. El receptor de serotonina 5-HT ₇	53
1.2.2.4. El receptor de adenosina A _{2A}	58
1.2.3. Aspectos estructurales y cinéticos de la interacción ligando-receptor en GPCRs.....	63
1.2.3.1. Recientes avances en el conocimiento de la estructura y las conformaciones de los GPCRs	63
1.2.3.2. Aspectos cinéticos de la interacción ligando-receptor: el tiempo de residencia (t_R)	72
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	85

2.1. ESTUDIO DE DETERMINANTES ESTRUCTURALES EN EL SITIO DE UNIÓN DEL RECEPTOR RELEVANTES PARA EL PERFIL DE AFINIDAD Y SELECTIVIDAD DE ANTIPSICÓTICOS SOBRE GPCRS DE SU RECEPTOROMA.....	87
2.1.1. Relevancia del residuo en posición 3.36 para la unión de antipsicóticos a GPCRS de su receptoroma	92
2.1.2. Relevancia de los residuos en las posiciones 5.43 y 5.46 para la unión de antipsicóticos a GPCRS de su receptoroma	95
2.1.3. Relevancia del residuo en posición 3.33 para la unión de antipsicóticos a GPCRS diana y antidiana de su receptoroma	100
2.2. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS: TIEMPO DE RESIDENCIA DEL ANTIPSICÓTICO ATÍPICO LURASIDONA EN EL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT₇.....	105
2.3. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS: RELEVANCIA DEL RESIDUO HIS264 EN EL3 PARA LAS CINÉTICAS DE ASOCIACIÓN Y DISOCIACIÓN DE [³H]-ZM241385 AL RECEPTOR DE ADENOSINA A_{2A}.....	110
2.4. HIPÓTESIS.....	117
2.5. OBJETIVOS	118
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	121
3.1. MATERIALES Y COMPUESTOS	123
3.2. MÉTODOS.....	125
3.2.1. Mutagénesis dirigida	125
3.2.2. Cultivo celular y generación de líneas celulares expresando establemente los receptores a estudio.....	128
3.2.3. Preparación de membranas para ensayos de unión de radioligandos	130
3.2.3.1. Preparación de membranas de líneas celulares CHO-5-HT _{2A} y receptores CHO-D _{2S}	130
3.2.3.2. Preparación de membranas de líneas CHO-5-HT _{1A}	130

3.2.3.3. Preparación de membranas de la línea celular que expresa el receptor 5-HT ₇	131
3.2.3.4. Preparación de membranas de líneas celulares expresando receptores A _{2A}	131
3.2.3.5. Determinación de la concentración de proteína en las preparaciones de membranas.....	132
3.2.4. Ensayos de unión de radioligandos.....	132
3.2.4.1. Ensayos sobre receptores 5-HT _{2A} , D ₂ y 5-HT _{1A} para el estudio de determinantes estructurales en el sitio de unión del receptor relevantes para el perfil de afinidad y selectividad de antipsicóticos.....	132
3.2.4.1.1. <i>Determinaciones de unión específica para la selección de clones celulares expresando receptores mutados</i>	132
Selección de clones expresando el receptor 5-HT _{2A} -Ser3.36Cys.....	132
Selección de clones expresando receptores D _{2S} -Cys3.36Ser, D _{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y D _{2S} -Val3.33Tyr.....	133
Selección de clones expresando el receptor 5-HT _{1A} -Thr5.43Ser/Ala5.46Ser.....	134
3.2.4.1.2. <i>Ensayos de saturación</i>	134
Ensayos de saturación en receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2A} -Ser3.36Cys.....	134
Ensayos de saturación en receptores D _{2S} , D _{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y D _{2S} -Val3.33Tyr.....	135
3.2.4.1.3. <i>Ensayos de competición</i>	135
Ensayos de competición en receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2A} -Ser3.36Cys.....	135
Ensayos de competición en receptores D _{2S} , D _{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y D _{2S} -Val3.33Tyr.....	135
3.2.4.2. Ensayos sobre el receptor 5-HT ₇	136
3.2.4.2.1. <i>Ensayos de saturación</i>	136
3.2.4.2.2. <i>Ensayos de competición en el equilibrio</i>	137
3.2.4.2.3. <i>Ensayos cinéticos de disociación de [³H]-SB269970 para la determinación de la constante de velocidad de disociación del radioligando</i>	137

3.2.4.2.4. Ensayos cinéticos de asociación de [³ H]-SB269970 para la determinación de la constante de velocidad de asociación del radioligando	138
3.2.4.2.5. Ensayos de competición cinética para la determinación de las constantes de velocidad de asociación (k_{on} , k_3) y disociación (k_{off} , k_4) de lurasidona.....	139
3.2.4.3. Ensayos sobre receptores A _{2A}	140
3.2.4.3.1. Determinaciones de unión específica para la selección de clones celulares expresando el receptor A _{2A} -His7.29Asn.....	140
3.2.4.3.2. Ensayos de saturación.....	141
3.2.4.3.3. Ensayos cinéticos de disociación de [³ H]-ZM241385 para la determinación de la constante de velocidad de disociación del radioligando.....	141
3.2.4.3.4. Ensayos cinéticos de asociación de [³ H]-ZM241385 para la determinación de la constante de velocidad de asociación del radioligando.....	141
3.2.4.4. Análisis de los resultados de ensayos de unión de radioligandos	142
3.2.4.4.1. Ensayos de saturación.....	142
3.2.4.4.2. Ensayos de competición en el equilibrio.....	142
3.2.4.4.3. Ensayos cinéticos de disociación para la determinación de la constante de velocidad de disociación del radioligando.....	144
3.2.4.4.4. Ensayos cinéticos de asociación para la determinación de la constante de velocidad de asociación observada del radioligando.....	145
3.2.4.4.5. Cálculo de la constante de velocidad de asociación (k_{on}) del radioligando a partir de datos de k_{off} y k_{obs}	146
3.2.4.4.6. Cálculo de la “constante de disociación cinética” ($K_{d, cin}$) del radioligando y lurasidona a partir de datos de k_{off} y k_{on}	146
3.2.4.4.7. Determinación de las constantes de velocidad k_{off} y k_{on} de radioligandos a partir de los valores de constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}) mediante regresión.	147

3.2.4.4.8. Ensayos de competición cinética para la determinación de las constantes de velocidad de asociación (k_{on} , k_3) y disociación (k_{off} , k_4) de un ligando competidor no marcado.....	148
---	-----

4. RESULTADOS 151

4.1. ESTUDIO DE DETERMINANTES ESTRUCTURALES EN EL SITIO DE UNIÓN DEL RECEPTOR RELEVANTES PARA EL PERFIL DE AFINIDAD Y SELECTIVIDAD DE ANTIPSICÓTICOS SOBRE GPCRS DE SU RECEPTOROMA.....	153
---	-----

4.1.1. Relevancia del residuo en posición 3.36 para la unión de antipsicóticos a GPCRs de su receptoroma 153

4.1.1.1. Unión del radioligando [3 H]-ketanserina a los receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2A} -Ser3.36Cys.....	153
---	-----

4.1.1.2. Unión del radioligando [3 H]-espiperona a los receptores D ₂ y D ₂ -Cys3.36Ser.....	155
--	-----

4.1.1.3. Afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2A} -Ser3.36Cys.....	155
---	-----

4.1.2. Relevancia de los residuos en las posiciones 5.43 y 5.46 para la unión de antipsicóticos a GPCRs de su receptoroma 159

4.1.2.1. Unión del radioligando [3 H]-espiperona a los receptores D ₂ y D ₂ -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala.....	159
---	-----

4.1.2.2. Unión del radioligando [3 H]- 8-OH-DPAT a los receptores 5-HT _{1A} y 5-HT _{1A} -Thr5.43Ser/Ala5.46Ser.....	161
---	-----

4.1.2.3. Afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores D ₂ y D ₂ -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala.....	162
--	-----

4.1.3. Relevancia del residuo en posición 3.33 para la unión de antipsicóticos a GPCRs diana y antidiana de su receptoroma 164

4.1.3.1. Unión del radioligando [³ H]-espiperona al receptor D _{2S} -Val3.33Tyr	164
4.1.3.2. Afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores D ₂ y D ₂ - Val3.33Tyr.....	165
4.2. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS:	
TIEMPO DE RESIDENCIA DEL ANTIPSICÓTICO ATÍPICO LURASIDONA EN EL	
RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT₇.....	169
4.2.1. Afinidad de lurasidona por el receptor 5-HT₇.....	169
4.2.2. Determinación de parámetros cinéticos de unión del radioligando [³H]- SB269970 y lurasidona al receptor 5-HT₇	170
4.2.2.1. Determinación de la constante de velocidad de disociación del radioligando [³ H]-SB269970 del receptor 5-HT ₇	170
4.2.2.2. Determinación de la constante de velocidad de asociación del radioligando [³ H]-SB269970 al receptor 5-HT ₇	172
4.2.2.3. Determinación de las constantes de velocidad k_{off} y k_{on} del radioligando [³ H]-SB269970 a partir de valores de constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}) mediante regresión	173
4.2.2.4. Cálculo del valor de la “constante de disociación cinética” ($K_{\text{d, cin}}$) del radioligando [³ H]-SB269970 en el receptor 5-HT ₇	174
4.2.2.5. Determinación de las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) de lurasidona en el receptor 5-HT ₇	175
4.2.2.6. Cálculo del tiempo de residencia (t_{R}) de lurasidona en el receptor 5-HT ₇	177
4.2.2.7. Cálculo del valor de la “constante de disociación cinética” ($K_{\text{d, cin}}$) de lurasidona en el receptor 5-HT ₇	177
4.3. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS:	
RELEVANCIA DEL RESIDUO HIS264 EN EL3 PARA LAS CINÉTICAS DE	
ASOCIACIÓN Y DISOCIACIÓN DE [³H]-ZM241385 AL RECEPTOR DE ADENOSINA	
A_{2A}.....	178

4.3.1. Afinidad de [³H]-ZM241385 por los receptores A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn.....	178
4.3.2. Determinación de parámetros cinéticos de unión del radioligando [³H]-ZM241385 a los receptores A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn.....	179
4.3.2.1. Determinación de la constante de velocidad de disociación de [³ H]-ZM241385 de ambos receptores.....	179
4.3.2.2. Cálculo del tiempo de residencia (<i>t_R</i>) del radioligando [³ H]-ZM241385 en los receptores A _{2A} y A _{2A} -His7.29Asn.....	181
4.3.2.3. Determinación de la constante de velocidad de asociación del radioligando [³ H]-ZM241385 al receptor A _{2A}	181
4.3.2.4. Determinación de las constantes de velocidad <i>k_{off}</i> y <i>k_{on}</i> del radioligando [³ H]-ZM241385 en el receptor A _{2A} -His7.29Asn a partir de valores de constante de velocidad de asociación observada (<i>k_{obs}</i>) mediante regresión	182
4.3.2.5. Cálculo del valor de la “constante de disociación cinética” (<i>K_{d, cin}</i>) del radioligando [³ H]-ZM241385 en los receptores A _{2A} y estimación de la constante de velocidad de asociación (<i>k_{on}</i>) de [³ H]-ZM241385 al receptor A _{2A} -His7.29Asn a partir de datos experimentales de <i>K_d</i> en el equilibrio y <i>k_{off}</i>	184
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	187
5.1. ESTUDIO DE DETERMINANTES ESTRUCTURALES EN EL SITIO DE UNIÓN DEL RECEPTOR RELEVANTES PARA EL PERFIL DE AFINIDAD Y SELECTIVIDAD DE ANTIPSICÓTICOS SOBRE GPCRS DE SU RECEPTOROMA.....	189
5.1.1. Relevancia del residuo en posición 3.36 para la unión de antipsicóticos a GPCRS de su receptoroma	189
5.1.2. Relevancia de los residuos en las posiciones 5.43 y 5.46 para la unión de antipsicóticos a GPCRS de su receptoroma	194
5.1.3. Relevancia del residuo en posición 3.33 para la unión de antipsicóticos a GPCRS diana y antidiana de su receptoroma	201

5.2. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS: TIEMPO DE RESIDENCIA DEL ANTIPSICÓTICO ATÍPICO LURASIDONA EN EL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT₇.....	206
5.3. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS: RELEVANCIA DEL RESIDUO HIS264 EN EL3 PARA LAS CINÉTICAS DE ASOCIACIÓN Y DISOCIACIÓN DE [³H]-ZM241385 AL RECEPTOR DE ADENOSINA A_{2A}.....	211
5.4. CONCLUSIONES.....	217
6. BIBLIOGRAFÍA	223





ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.	Estructura química de haloperidol, una butirofenona.....	15
Fig. 2.	Estructura química de lurasidona.	24
Fig. 3.	Resumen de los ensayos clínicos con lurasidona para el tratamiento de la esquizofrenia.....	28
Fig. 4.	Estructura de la rodopsina bovina, con los 3 bucles extracelulares (E-I, E-II y E-III), el extremo N-terminal (extracelular), los 3 bucles citoplasmáticos (C-I, C-II, C-III) y el extremo C-terminal (citoplasmático).	32
Fig. 5.	Representación de la relación filogenética entre los GPCRs del genoma humano (Fredriksson y col., 2003).....	34
Fig. 6.	Representación de la relación filogenética entre los GPCRs de los grupos α y β de la familia rodopsina del genoma humano.....	35
Fig. 7.	Ciclo de vida de un GPCR.....	37
Fig. 8.	Ejemplos de receptores heteroméricos y heterómeros receptoriales..	39
Fig. 9.	Cambios conformacionales en TM6 tras la activación del receptor β_2 -adrenérgico.	43
Fig. 10.	Selectividad funcional de ligandos de GPCRs.	45
Fig. 11.	Representación esquemática del fenómeno de modulación alostérica.	46
Fig. 12.	Modelo del receptor 5-HT _{2A} humano unido a su antagonista selectivo ketanserina (Dezi y col., 2007).....	49
Fig. 13.	Gráfica que representa las principales vías de señalización del receptor 5-HT ₇	55
Fig. 14.	Estructura química de ZM241385.	60
Fig. 15.	Modelo de la estructura del receptor de adenosina A _{2A} -T4L- Δ C cristalizado por Jaakola y col., (2008).	61
Fig. 16.	Sitio de unión de del receptor de adenosina A _{2A} -T4L- Δ C uniendo el ligando ZM241385.	62
Fig. 17.	Áreas, variabilidad y cambios conformacionales de los GPCRs.....	67

- Fig. 18.** Representación de los sitios de unión de los receptores de adenosina A_{2A} (A, izquierda, código PDB 3EML) y de histamina H₁ (B, derecha, código PDB 2RH1)..... **69**
- Fig. 19.** Distintas configuraciones debidas a cambios conformacionales en el proceso de activación de GPCRs caracterizadas cristalográficamente..... **70**
- Fig. 20.** Mecanismos cinéticos de unión ligando-receptor y definiciones matemáticas de constantes para los modelos A (mecanismo de un solo paso), B (mecanismo de tipo ajuste-inducido) y C (equilibrio conformacional)..... **76**
- Fig. 21.** Valores observados experimentalmente de la constante de asociación observada (k_{obs} ; constante de pseudoprimer orden) en función de la concentración del ligando (*inhibitor*) y del mecanismo de unión al receptor (A, B o C). **77**
- Fig. 22.** Modelo de representación de los resultados de un ensayo de competición cinético de dos puntos..... **83**
- Fig. 23.** Estructura química de la clozapina (dibenzodiazepina) y de la olanzapina (tienobenzodiazepina). **87**
- Fig. 24.** Superposición de los modelos por homología de los 14 GPCRs modelizados en el trabajo de Selent y col., (2008). **90**
- Fig. 25.** Representación de zonas y posiciones homólogas identificadas en el estudio de Selent y col. (2008) en el sitio de unión entre los receptores modelizados..... **91**
- Fig. 26.** La gráfica resume los valores de afinidad (pK_i) de olanzapina y clozapina por los distintos receptores con Cys o Ser en posición 3.36 (grupos C3.36 y S3.36, respectivamente)..... **93**
- Fig. 27.** Se representa un complejo clozapina-receptor 5-HT_{2A} (a) y un complejo clozapina-receptor D₂ (b)..... **94**
- Fig. 28.** Diferencias de pK_i (olanzapina – clozapina) (\pm DE) y secuencias de los receptores considerados en los trabajos de Selent y col. (2008, 2014), tras su asignación a grupos en base a dichas diferencias..... **97**

- Fig. 29.** Ejemplo de modelización de las interacciones entre un receptor del grupo 1 y clozapina y olanzapina realizado por Selent y col., (2008). **99**
- Fig. 30.** Representación del sitio de unión del receptor de histamina H₁ en complejo con doxepina realizada a partir de los datos de cristalización aportados por Shimamura y col. (2011). **103**
- Fig. 31.** Representación de modelos del sitio de unión de los receptores H₁ y M₁ en complejo con el antipsicótico atípico lurasidona, indicándose los aminoácidos que establecen interacciones con el fármaco, según se describen por Ichikawa y col. (2012). **104**
- Fig. 32.** Posición e interacciones del ligando ZM241385 con el receptor de adenosina A_{2A} humano en la estructura cristalográfica 3EML (código PDB) del complejo. **111**
- Fig. 33.** Representación bidimensional del complejo receptor A_{2A}:ZM241385 donde se detallan las interacciones del ligando con residuos del receptor según se determinaron en el estudio de cristalización de Jaakola y col. (2008).. **113**
- Fig. 34.** Representación de la interacción entre Glu5.30 en EL2 de los receptores A_{2A} y A_{2B} con el aminoácido en posición 7.29 en EL3 (His264 en A_{2A}, Asn266 en A_{2B}), de acuerdo con los modelos de Rodríguez y col. para los dos receptores (tomado de Rodríguez y col., 2011)..... **115**
- Fig. 35.** Validación de una preparación de membranas HEK-5-HT₇ mediante ensayos de saturación con el radioligando [³H]-SB269970. **137**
- Fig. 36.** Determinación de la afinidad de [³H]-ketanserina por los receptores 5-HT_{2A} no mutado y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys mediante ensayos de unión de [³H]-ketanserina de saturación. **154**
- Fig. 37.** Determinación de la afinidad de los antipsicóticos clozapina y olanzapina por los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys mediante ensayos de unión de radioligandos de competición utilizando [³H]-ketanserina. **157**
- Fig. 38.** Determinación de la afinidad de N-desmetil-clozapina y serotonina por los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys mediante ensayos de unión de radioligandos de competición utilizando [³H]-ketanserina..... **158**

- Fig. 39.** Determinación de la afinidad de [³H]-espiperona por los receptores D_{2S} no mutado y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala mediante ensayos de unión de [³H]-espiperona de saturación. 161
- Fig. 40.** Determinación de la afinidad de los antipsicóticos clozapina y olanzapina por los receptores D_{2S} y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala mediante ensayos de unión de radioligandos de competición utilizando [³H]-espiperona..... 163
- Fig. 41.** Determinación de la afinidad de [³H]-espiperona por el receptor D_{2S}-Val3.33Tyr mediante ensayos de unión de [³H]-espiperona de saturación..... 165
- Fig. 42.** Determinación de la afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores D_{2S} y D_{2S}-Val3.33Tyr mediante ensayos de unión de radioligandos de competición utilizando [³H]-espiperona. 167
- Fig. 43.** Determinación de la afinidad de lurasidona por el receptor 5-HT₇ mediante ensayos de unión de radioligandos de competición en el equilibrio utilizando [³H]-SB269970.. 170
- Fig. 44.** Determinación de la constante de velocidad de disociación (*k_{off}*) del radioligando [3H]-SB269970 del receptor 5-HT₇ mediante ensayos cinéticos de disociación..... 171
- Fig. 45.** Determinación de la constante de velocidad de asociación (*k_{on}*) del radioligando [³H]-SB269970 al receptor 5-HT₇ mediante ensayos cinéticos de asociación.. 173
- Fig. 46.** Representación del valor de *k_{obs}* obtenido en distintos experimentos de asociación (n = 9) realizados en el receptor 5-HT₇ con varias concentraciones del radioligando [³H]-SB269970 y determinación de los valores de *k_{on}* y *k_{off}*..... 174
- Fig. 47.** Determinación de las constantes de velocidad de asociación y disociación de lurasidona en el receptor 5-HT₇ mediante ensayos de competición cinética con [³H]-SB269970. 176
- Fig. 48.** Determinación de la constante de disociación en el equilibrio del radioligando [³H]-ZM241385 en los receptores A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn mediante ensayos de unión de radioligando de saturación. 179

- Fig. 49.** Determinación de la constante de velocidad de disociación (k_{off}) del radioligando [^3H]-ZM241385 de los receptores A_{2A} no mutado y A_{2A} -His7.29Asn mediante ensayos cinéticos de disociación. **180**
- Fig. 50.** Determinación de la constante de velocidad de asociación (k_{on}) del radioligando [^3H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} mediante ensayos cinéticos de asociación. **182**
- Fig. 51.** Determinación de los valores de k_{on} y k_{off} mediante regresión, a partir de los valores de k_{obs} obtenidos en experimentos de asociación con el receptor A_{2A} -His7.29Asn realizados con cuatro concentraciones del radioligando [^3H]-ZM241385. **183**
- Fig. 52.** Estructura química de los ligandos usados en este apartado del trabajo: clozapina (dibenzodiazepina), olanzapina (tienobenzodiazepina), serotonina y N-desmetilclozapina. **191**
- Fig. 53.** Acoplamiento de clozapina y olanzapina en el sitio de unión ortostérico del receptor D_2 **197**
- Fig. 54.** Representación de las interacciones de clozapina (A, C) y olanzapina (B, D) con residuos del sitio de unión de los receptores D_{2S} no mutado (A, B) y D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala (C, D). **199**
- Fig. 55.** Modelización de los complejos de clozapina (A) y olanzapina (B) con el receptor 5-HT $_{1A}$ **200**
- Fig. 56.** A) Modelo del receptor D_2 en complejo con clozapina basado en la reciente estructura cristalográfica del receptor D_3 , mostrando la mutación Val3.33Tyr. B) Representación del reordenamiento de Tyr3.33 en el receptor D_2 -Val3.33Tyr predicho por el modelo. **204**
- Fig. 57.** A) Representación de la estructura cristalográfica del receptor H_1 en complejo con doxepina, donde se aprecia la interacción del residuo Tyr3.33 con el sistema tricíclico del ligando (Shimamura y col., 2011). B) Acoplamiento del ligando doxepina en el modelo del receptor H_1 basado en la estructura cristalográfica del complejo descrita por Shimamura y col. (2011). **205**



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Perfiles de afinidad por distintos receptores de lurasidona y otros antipsicóticos atípicos.....	25
Tabla 2.	Estructuras de GPCRs determinadas mediante cristalización.....	65
Tabla 3.	Distintos estados de activación caracterizados en las distintas estructuras cristalográficas de GPCRs.....	71
Tabla 4.	Características de los GPCRs modelizados en el trabajo de Selent y col., 2008.....	89
Tabla 5.	Secuencia de aminoácidos de distintos GPCRs del receptoroma de los antipsicóticos.....	101
Tabla 6.	Valores de afinidad (K_i) de clozapina y olanzapina por los receptores 5-HT _{2A} , D ₂ y H ₁ humanos, así como de otras especies.....	102
Tabla 7.	Construcciones, secuencias de cebadores y enzimas de restricción utilizadas para la generación de receptores mutados mediante mutagénesis dirigida.....	126
Tabla 8.	Continuación de la tabla 7 de construcciones, secuencias de cebadores y enzimas de restricción utilizadas para la generación de receptores mutados mediante mutagénesis dirigida.....	127
Tabla 9.	Valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_i) (nM) y de pK_i de distintos ligandos obtenidos en ensayos de unión de radioligandos de competición frente a [³ H]-ketanserina.....	159
Tabla 10.	Valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_i) (nM) y de pK_i de clozapina y olanzapina obtenidos en ensayos de unión de radioligandos de competición frente a [³ H]-espiperona.....	164
Tabla 11.	Valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_i) (nM) y de pK_i de clozapina y olanzapina obtenidos en ensayos de unión de radioligandos de competición frente a [³ H]-espiperona.....	168
Tabla 12.	Valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_d) y de la “constante de disociación cinética” ($K_{d,cin}$) del radioligando [³ H]-	

SB269970 en el receptor 5-HT₇ obtenidos en este estudio y recogidos en la literatura.....175

Tabla 13. Resumen de los valores de las constantes calculadas en los ensayos realizados con los receptores de adenosina A_{2A} no mutado y A_{2A}-His7.29Asn.185



LISTA DE ABREVIATURAS

[nM]	concentración (nM)
°C	grados Celsius
ΔG	energía libre de Gibbs (incremento)
°K	grados Kelvin
α_x	receptor adrenérgico α subtipos: 1A, 2A, 2B o 2C
β_x	receptor β -adrenérgico subtipos: 1, 2 o 3
μg	microgramo
μM	micromolar
^3H	tritio
5-CT	5-carboxamidotriptamina
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptófano
5-HT _x	receptor de serotonina 5-HT subtipo x: 1A,1B, 1D, 2A, 2B, 2C, 3, 4, 5A, 6 y 7
8-OH-DPAT	7-(dipropilamino)-5,6,7,8-tetrahidro-1-naftalenol
Å	Angstrom
AA	ácido araquidónico
AC	adenilato ciclasa
ADA	adenosina deaminasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AEMPS	Agencia española de medicamentos y productos sanitarios
Akt	proteína cinasa B
Ala	alanina
AMP	adenosín-5'-monofosfato
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxiazolpropiónico
AMPc	adenosín monofosfato 3',5' cíclico

ANOVA	análisis de la varianza
Arg	arginina
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
AS-19	(2S)-(+)-5-(1,3,5-trimetilpirazol-4-il)-2-(dimetilamino)tetralina
Asn	asparagina
Asp	aspártico
AT ₁	receptor AT ₁ de angiotensina II
ATCC	colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	adenosín-5'-trifosfato
ATV	área tegmental ventral
A _x	receptor de adenosina A _{2A} subtipos x: 1, 2A, 2B y 3
BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro (<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>)
BES	ácido N,N-bis(2-hidroxiethyl)2-aminoetanosulfónico
B _{max}	densidad máxima de sitios de unión
BSA	albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CB _x	receptor canabinoide subtipo X: 1-2
CDC42	homólogo de la proteína de control de división celular 42 (<i>Cell Division Control protein 42 homolog</i>)
CHO-K1	línea celular de ovario de hámster chino (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
C _i	curio
cpm	cuentas por minuto
CREB	elemento de respuesta a AMPc (<i>cAMP Response Element-Binding protein</i>)
Cys	cisteína
DAG	diacilglicerol
DE	desviación estándar
DMEM	medio de cultivo celular <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

DMEM/F-12	medio <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i>	
DMSO	dimetilsulfóxido	
DMSZ	colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>)	
DOI	(±) 2,5-dimetoxi-4-yodoanfetamina,	1-(2,5-dimetoxi-4-yodofenil)-2-aminopropano
DOM	(±) 2,5-dimetoxi-4-metilanfetamina	1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)-2-aminopropano
dpm	desintegraciones por minuto	
D _x	receptor de dopamina D subtipo X: 1, 2, 3, 4 y 5	
EC ₅₀	concentración eficaz 50	
EDTA	ácido etilendiaminetetraacético (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	
EE	error estándar	
EEM	error estándar de la media	
egr-2	factor de transcripción <i>early growth response 2</i>	
EGTA	ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (<i>ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>)	
EL	bucle extracelular (<i>Extracellular Loop</i>)	
EMA	Agencia Europea del Medicamento	
E _{max}	efecto máximo	
ERK	quinasas reguladas por señales extracelulares (<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>)	
FBS	suero bovino fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	
FRET	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>) o transferencia de energía de resonancia de Förster (<i>Förster resonance energy transfer</i>)	
FSH	hormona estimulante del folículo	
FST	test de natación forzada	

g	gramo
GABA	ácido γ amino-butírico
GDP	guanosina-5'-difosfato
GIRK	canales de potasio de rectificación de entrada regulados por proteínas G (<i>G protein-coupled Inwardly-Rectifying Potassium channels</i>)
Gln	glutamina
Glu	glutámico
Glu169	Se ejemplifica un código de posición de aminoácidos. Se indica la posición del aminoácido Glu en la secuencia de aminoácidos de una proteína
Glu169 ^{5.30}	Se ejemplifica un código de posición de aminoácidos. Se indica la posición del aminoácido Glu en la secuencia de aminoácidos de una proteína y la posición de acuerdo con el número de Ballesteros y Weinstein (1995)
Glu5.30	Para indicar la posición de un aminoácido se hace uso preferente de la nomenclatura propuesta por Ballesteros y Weinstein (1995). El primer dígito indica el segmento transmembrana y el segundo número (separado por un punto) la posición en el segmento con respecto al aminoácido más conservado.
Gly	glicina
GM1	gangliósido GM1. Monosialotetrahexosilgangliósido.
GPCRDB	base de datos de receptores acoplados a proteínas G (ver Isberg y col., 2014)
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G (<i>G Protein-Coupled Receptors</i>)
GRK	quinasas de receptores acoplados a proteína G (<i>G protein-coupled Receptor Kinases</i>)
GSK3	glucógeno sintasa cinasa 3
GTP	guanosina-5'-trifosfato
GTPasa	guanosina-5'-trifosfatasa
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo (<i>Genome-Wide Association Study</i>)
G _x	Proteína G (heterotrímico) tipos X: S, i/o, q y 12

h	hora
H ₀	Hipótesis nula
HEK293	células embrionarias de riñón humano 293 (<i>Human Embryonic Kidney 293</i>)
HEK-5-HT ₇	línea HEK293 que expresa de forma estable el receptor 5-HT ₇ humano
HeLa229	línea de células epiteliales de adenocarcinoma de cérvix humanas.
HeLa-A _{2A}	línea HeLa que expresa de forma estable el receptor A _{2A}
HEPES	ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfónico
His	histidina
HTS	métodos de cribado de alto rendimiento (<i>High-Throughput Screening</i>)
H _X	receptor histaminérgico subtipo X: 1, 2, 3 y 4
IC ₅₀	concentración inhibitoria del 50% de la unión o de la respuesta
IL	bucle intracelular
Ile	isoleucina
IL-1 β	interleucina 1 β
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
IPs	inositoles fosfato
JAK/STAT	cinasa Janus/transductor de señal y activador de la transcripción (<i>Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
k ₁	constante de velocidad de asociación del radioligando en el modelo de competición cinética de Motulsky y Mahan (1983). En los modelos de mecanismos cinéticos de unión ligando-receptor (Tummino y Copeland, 2008) su significado depende del mecanismo concreto.
k ₂	constante de velocidad de disociación del radioligando en el modelo de competición cinética de Motulsky y Mahan (1983). En los modelos de mecanismos cinéticos de unión ligando-receptor (Tummino y Copeland, 2008) su significado depende del mecanismo concreto.
k ₃	constante de velocidad de asociación del ligando competidor en el modelo de competición cinética de Motulsky y Mahan (1983). En los modelos de mecanismos cinéticos de unión ligando-receptor

(Tummino y Copeland, 2008) su significado depende del mecanismo concreto.

k_4	constante de velocidad de disociación del ligando competidor en el modelo de competición cinética de Motulsky y Mahan (1983). En los modelos de mecanismos cinéticos de unión ligando-receptor (Tummino y Copeland, 2008) su significado depende del mecanismo concreto.
K_d	constante de disociación en el equilibrio
$K_{d,cin}$	constante de disociación “cinética”. Calculada a partir de constantes de unión cinéticas
K_i	constante de disociación en el equilibrio
k_{obs}	constante de velocidad de asociación observada
k_{off}	constante de velocidad de disociación
k_{on}	constante de velocidad de asociación
L	litro
LB	medio de cultivo bacteriano lisogénico (<i>Lysogeny Broth</i>)
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
Leu	leucina
LH	hormona luteinizante
LP-211	<i>N</i> -(4-cianofenilmetil)-4-(2-difenil)-1-piperazinohexanamida
LSD	dietilamida de ácido lisérgico (<i>Lysergic Acid Diethylamide</i>)
Lys	lisina
M	molar
MAPK	cinasa activada por mitógeno (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MEM	medio <i>Minimum Essential Medium</i>
Met	metionina
mg	miligramo
mGlu ₂	receptor metabotrópico de glutamato mGlu ₂
mGlu ₅	receptor metabotrópico de glutamato mGlu ₅
MIC	concentración mínima inhibitoria

min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
M _x	receptor de acetilcolina muscarínico M subtipo _x : 1, 2, 3, 4 o 5.
NCS-1	sensor de calcio neuronal 1
NECA	5'-N-etilcarboxamidoadenosina
NECAB2	proteína de unión de calcio neuronal 2. (<i>N-terminal EF-hand calcium binding protein 2</i>)
NGF	factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve Growth Factor</i>)
n _H	coeficiente de Hill
nm	nanómetro
nM	nanomolar
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato, agonista específico de los receptores heteroméricos ionotrópicos de NMDA de glutamato (subunidades GluNX: 1, 2A, 2B, 2C, 2D, 3A y 3B)
NOR	test de reconocimiento de objetos nuevos
NRG1	neurregulina 1
PBS	tampón de fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCP	fenciclidina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pdH	enlace mediante puente de hidrógeno
PDB	Base de datos de proteínas. <i>Protein Data Bank</i> . Berman y col. (2000).
PDB ID	código identificador de proteína en <i>Protein Data Bank</i>
PDE	fosfodiesterasa
PDZ	Dominio PDZ, implicado en señalización celular y presente en proteínas como la proteína de densidad postsináptica PSD95 (<i>Post Synaptic Density Protein 95</i>), la proteína supresora de tumores en <i>Drosophila</i> DlgA (<i>Drosophila disc large tumor suppressor</i>), y la

	proteína zonula occludens-1, zo-1 (<i>zonula occludens-1 protein</i>). El acrónimo combina las iniciales de estas tres proteínas.
PEI	polietileneimina
Phe	fenilalanina
pIC ₅₀	-log de la concentración inhibitoria del 50% de la unión o de la respuesta
PIP ₂	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
pK _i	-log de la constante de disociación en el equilibrio
PKPD	Integración farmacocinética-farmacodinámica (farmacología cuantitativa)
PLA ₂	fosfolipasa A ₂
PLC-β	fosfolipasa C-β
PLD	fosfolipasa D
pM	picomolar
PPI	test de inhibición prepulso
Pro	prolina
PSD95	proteína de densidad postsináptica PSD95 (<i>Post Synaptic Density protein 95</i>)
RGS	proteínas reguladoras de la señalización de proteína G (<i>Regulators of G protein Signaling</i>)
rpm	revoluciones por minuto
RSK2	cinasa de la proteína ribosómica S6 de la subfamilia p90 subtipo 2
s	segundo
SAR	relación estructura-actividad (<i>Structure-Activity Relationship</i>)
SB269970	2R-1-[(3-hidroxifenil)sulfonil]-2-[2-(4-metil-1-piperidinil)etil]pirrolidina
Ser	serina
SERT	transportador de serotonina (<i>Serotonin Transporter</i>)

SKR	estudios de relación cinético-estructurales
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
t	tiempo
TDM	trastorno depresivo mayor
TGF- β	factor de crecimiento transformante- β (<i>Transforming Growth Factor-β</i>)
Thr	treonina
TM	dominio transmembrana (<i>Transmembrane Domain</i>)
TMDD	Modelo farmacocinético de disposición de fármaco mediada por diana (<i>Target-Mediated Drug Disposition</i>)
t_R	tiempo de residencia
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trp	triptófano
TST	test de suspensión de cola
Tyr	tirosina
U	unidad
UK 432097	(2-(3-[1-(piridin-2-il)piperidin-4-il]ureido)etil-6-N-(2,2-difeniletil)-5'-N-etilcarboxamidoadenosina-2-carboxamida)
Val	valina
VIH	virus de inmunodeficiencia humano
WT	no mutado, nativo (<i>wild-type</i>)
x g	unidad relativa de medida de aceleración
ZM241385	4-(2-((7-amino-2-(furan-2-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazin-5-il)amino)etil)fenol



1. INTRODUCCIÓN





1.1. PATOLOGÍA Y TERAPÉUTICA DE LA ESQUIZOFRENIA

1.1.1. Introducción: etiopatología de la esquizofrenia

Se entiende por psicosis “cada uno de los trastornos de la vida psíquica caracterizados por una ruptura de la continuidad de sentido biográfico, una alteración grave de la capacidad de enjuiciar la realidad o la aparición de síntomas clínicos como alucinaciones, delirios o trastornos de conciencia” (Diccionario RANM, 2012). La psicosis es un síndrome, un conjunto de signos y síntomas que pueden asociarse a muchos trastornos psiquiátricos diferentes y no constituyen un trastorno específico en clasificaciones de enfermedades. Entre un número de trastornos que requieren la presencia de psicosis como aspecto determinante de su diagnóstico se encuentran la esquizofrenia. La psicosis puede estar presente en otras enfermedades, aun sin ser determinante para su diagnóstico, como la manía, la depresión, diversos trastornos cognitivos y en Alzheimer (Stahl, 2002).

Se define la esquizofrenia [*skhizo-* gr. ‘dividir’ + *phren(o)-* gr. ‘mente’ + *-ía* gr.]; (acuñado por E. Bleuler en 1910) como “enfermedad mental grave que aparece generalmente en la adolescencia o al principio de la edad adulta. Interfiere con la capacidad para reconocer lo que es real, controlar las emociones, pensar con claridad, emitir juicios y comunicarse. En general se conservan tanto la claridad de la conciencia como la capacidad intelectual, aunque con el paso del tiempo puede presentarse un déficit cognoscitivo. El trastorno afecta a las funciones esenciales que dan a la persona normal la vivencia de su individualidad, singularidad y dominio de sí misma. El enfermo cree que sus pensamientos, sentimientos y actos más íntimos son conocidos o compartidos por otros y pueden presentarse ideas delirantes en torno a la existencia de fuerzas naturales o sobrenaturales capaces de influir en los actos y pensamientos del individuo afectado. frecuentes las alucinaciones, especialmente las auditivas. (...)” (Diccionario de la RANM, 2012).

1.1.1.1. Epidemiología, cuadro clínico y diagnóstico de la esquizofrenia

Se estima que la prevalencia es de alrededor de un 0.4 a un 1%. La tasa de incidencia anual se sitúa en un 0.1 a 0.2 por 1000 habitantes (aproximadamente el 0.015 %). La prevalencia es similar en ambos sexos o algo mayor en varones. El inicio del trastorno suele

situarse entre los quince y treinta años de edad y suele ser anterior en varones. Las manifestaciones clínicas no incluyen ninguna que sea característica de esta enfermedad. En el cuadro esquizofrénico se presentan *alteraciones senso-perceptivas* como alucinaciones; *trastornos del pensamiento* como delirios e ideas delirantes (trastornos del contenido) y los trastornos *formales* del pensamiento como las asociaciones laxas y trastornos formales de tipo *negativo* como la pobreza en fluidez verbal y alogia; *alteraciones de la afectividad* como el aplanamiento afectivo, respuesta emocional inapropiada y sobre todo en etapas iniciales manifestaciones de ansiedad, maníacas y depresivas; *alteraciones de la conducta* como comportamiento extravagante y *alteraciones psicomotoras* como agitación o estupor catatónico y estereotipias y manierismos, o agresividad sin previo aviso. Más de la mitad de los pacientes presentan *signos neurológicos menores* como alteraciones de la coordinación motora y el equilibrio (Rubio Valladolid, 2015).

Se denominan síntomas positivos a las alucinaciones, las ideas delirantes, las conductas extrañas y los trastornos formales del pensamiento. Como síntomas negativos se clasifican el aplanamiento afectivo, la alogia, la abulia y apatía, la anhedonia, la asocialidad y las alteraciones de la atención (Crespo y col., 2007). Los síntomas cognitivos engloban disfunciones en atención, el aprendizaje, la memoria, la concentración o el pensamiento abstracto.

Se distinguen determinados subtipos clínicos de la enfermedad como la esquizofrenia paranoide con delirios estructurados y mejor pronóstico; la hebefrenia, en la que predominan ideas delirantes, alteraciones formales del pensamiento y afectividad inapropiada; la catatónica, con presencia de trastornos psicomotores graves. Otros subtipos son la esquizofrenia indiferenciada, la residual y la simple. Es importante el diagnóstico diferencial de la esquizofrenia con respecto a trastornos psicóticos secundarios a una enfermedad médica, trastornos del estado de ánimo (depresión y manía), el trastorno esquizoafectivo, el trastorno psicótico agudo y el esquizofreniforme, trastornos de la personalidad (esquizotípico, paranoide, límite) o crónicos por ideas delirantes (paranoia).

En el curso de la enfermedad típicamente se aprecia una fase prodrómica en la que aparecen aislamiento social, cambios en el comportamiento, alteraciones del pensamiento leves o afectividad inadecuada, una fase psicótica o activa en la que se desarrollan los delirios y alucinaciones, las alteraciones del pensamiento graves y una conducta

desorganizada y una fase residual o estable en la que destaca la sintomatología negativa. Más de la mitad de los pacientes tienen mal pronóstico. Son factores de comorbilidad el consumo de sustancias de abuso y la depresión (Lieberman y col., 2001; Perkins y col., 2008; Tandon y col., 2009).

También se distingue (modelo dicotómico de Crow) un tipo I, caracterizado por un inicio agudo, con predominio de síntomas positivos, con buen pronóstico y buena respuesta a neurolépticos debido a que predominan las alteraciones de la neurotransmisión de dopamina. El tipo II se presenta con un inicio crónico, y en el predomina la sintomatología negativa. La respuesta a neurolépticos mala. Es un tipo que se asocia con alteraciones estructurales cerebrales y pérdidas neuronales (Cuesta y col., 2007).

1.1.1.2. Etiopatogenia de la esquizofrenia

1.1.1.2.1. *Genética*

Los estudios convencionales para determinar genes de susceptibilidad a la esquizofrenia son estudios de asociación (estudios con una estructura básica de estudio de casos y controles genético), además de los estudios clásicos de ligamiento de la transmisión de marcador y padecimiento de la enfermedad (Fañanás y col., 2007). Respecto a la metodología de estos estudios destacar que se han desarrollado en los últimos años los llamados estudios GWAS (*Genome-Wide Association Study*), proyectos de asociación a escala genómica realizando genotipados mediante *microarrays* (Dopazo, 2012). Algunos ejemplos de estudios GWAS publicados son Aberg y col. (2013) y Lencz y col. (2013); este último encuentra a *NDST3*, un gen que codifica una proteína implicada en el metabolismo de heparán sulfato, como gen de riesgo en esquizofrenia. Otros ejemplos de genes de susceptibilidad a la esquizofrenia son el gen *COMT* (catecol-O-metiltransferasa), el gen *NRG1* (de neuregulina 1), el gen *DTNBP* (disbindina), el gen *BDNF* (factor neurotrófico derivado del cerebro), el gen *DISC1* (implicado en el desarrollo neuronal) o el gen *AKT1* (codifica la serina/treonina cinasa proteína cinasa B, proteína implicada en transmisión sináptica y plasticidad neuronal) (Bernardo y Vioque, 2015).

1.1.1.2.2. *Hallazgos neuropatológicos y de neuroimagen**

Los estudios mediante de técnicas de neuroimagen estructural y funcional indican que en pacientes con esquizofrenia hay una dilatación de los ventrículos laterales y del tercer ventrículo, una reducción global del volumen de sustancia gris cerebral, especialmente en los lóbulos temporales y en el lóbulo frontal izquierdo (atrofia cortical global con predominio prefrontal) y también una reducción del volumen del tálamo, amígdala e hipocampo (Padín, 2007; Bernardo y Vioque, 2015). Las anomalías estructurales descritas no son específicas ni diagnósticas (Bernardo y Vioque, 2015).

1.1.1.2.3. *La explicación etiológica clásica: la implicación de la dopamina*

Respecto al sistema dopaminérgico se pueden considerar cuatro vías como relevantes para comprender la fisiopatología de la esquizofrenia:

- Vía mesocortical. Se proyecta principalmente hacia la corteza orbitofrontal, prefrontal medial y cingulada, pero también hacia la corteza dorsolateral prefrontal y la corteza temporal y parietal, desde los cuerpos celulares dopaminérgicos del área tegmental ventral. Tiene origen en el grupo neuronal A10 de neuronas mesencefálicas. Continúa discutiéndose su participación en los síntomas negativos y en ciertos síntomas cognitivos de la esquizofrenia. La hipofunción dopaminérgica que se observa en esquizofrenia en esta vía podría ser primaria o secundaria a otras alteraciones.
- Vía mesolímbica. Se proyecta también desde los cuerpos celulares dopaminérgicos del área tegmental ventral hacia ciertos núcleos como el núcleo *accumbens*, núcleos de la estría terminal, la amígdala, el tubérculo olfatorio, núcleos septales laterales y áreas límbicas del estriado y otros de la región límbica. También tiene origen en el grupo neuronal A10 de neuronas mesencefálicas. Se propone que la hiperactividad de esta vía es causa de los síntomas positivos de la esquizofrenia tales como alucinaciones, delirios y conductas emocionales.
- Vía nigroestriada. Envía proyecciones desde la sustancia negra hacia el cuerpo estriado (caudado y putamen). Conlleva activación de las neuronas con receptores D₁ acoplados a G_s (circuito directo) e inhibición de las neuronas con receptores D₂

acoplados a G_i (circuito indirecto) del núcleo caudado. El antagonismo D_2 en esta vía se asocia a bradicinesia iatrogénica.

- Vía tuberoinfundibular. Los cuerpos celulares se encuentran en el núcleo arqueado y en el área periventricular del hipotálamo y envían proyecciones hacia el infundíbulo y la hipófisis anterior controlando la liberación de hormonas tales como la prolactina (control pulsátil). Su bloqueo en el tratamiento con antipsicóticos origina las reacciones adversas ginecomastia y galactorrea.

Existen varios subtipos de receptores dopaminérgicos: los receptores D_1 y D_5 (familia D_1) y los receptores D_2 , D_3 y D_4 (familia D_2). Los receptores D_1 predominan en la corteza, los D_2 en el estriado, y los D_3 y D_4 en la región límbica (Kapur y Remington, 1996). Se ha descrito que en la esquizofrenia hay alteraciones en los niveles de expresión de los receptores D_1 (disminución en córtex), D_2 (incremento estriatal) y D_3 (aumento en corteza cerebral) (Harrison, 1999). Con respecto a los niveles y actividad de la dopamina, las evidencias de su alteración en esquizofrenia son de las más evidentes (Harrison, 1999). Se sugiere que el conjunto de evidencias obtenidas mediante estudios de neuroimagen indican una alteración del sistema dopaminérgico a nivel presináptico (Ginovart y Kapur, 2012).

Según la hipótesis dopaminérgica de etiopatología de la esquizofrenia, en esta subyace una hiperfunción dopaminérgica en la vía mesolímbica (aparición de síntomas positivos) y en una hipofunción de las proyecciones dopaminérgicas mesocorticales a la corteza prefrontal causante de los síntomas negativos y cognitivos. Se habla de la existencia de una desconexión cortico-subcortical primaria (Bertolino y col., 2000). Los fármacos antipsicóticos normalizarían la neurotransmisión mesolímbica mediante el bloqueo de la señalización dopaminérgica D_2 .

La primera hipótesis (Meltzer y Stahl, 1976) sólo se refería a la relación de la hiperactividad dopaminérgica con los síntomas positivos. La llamada hipótesis dopaminérgica “revisada” incorpora además la hipofunción dopaminérgica de las proyecciones mesocorticales a la corteza prefrontal como causa de los síntomas negativos y cognitivos. Una posible explicación de la hiperfunción dopaminérgica mesolímbica sería que un posible estado hipoglutamatérgico modularía la actividad del área mesolímbica favoreciendo la liberación de dopamina, aunque esta hipofunción tendría un alcance limitado (Carlsson y col., 1999; Carlsson y col., 2004). También se ha sugerido que

anomalías de la neurotransmisión dopaminérgica en la que interviene el receptor D₁ a nivel de la corteza prefrontal serían la causa de los síntomas cognitivos y negativos (Goldman-Rakic y col., 2000).

1.1.1.2.4. *El papel de la serotonina*

La hipótesis de que la serotonina juega algún papel en la etiopatogenia de la esquizofrenia es anterior incluso a la hipótesis dopaminérgica. Comenzó basándose en las actividades psicotomiméticas de la mescalina y de la dietilamida del ácido lisérgico (LSD) (Stoll, 1947), continuó al proponerse la hipótesis de la transmetilación (Osmond y Smythies, 1952) y perdió interés al plantearse la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia.

En el caso de la serotonina no está descrita una alteración primaria en una vía neuroanatómica, similar a la hiperfunción dopaminérgica en el sistema límbico, y que se relacione con la etiología de la esquizofrenia. Desde la aparición de la clozapina y su actividad antagonista de los receptores 5-HT_{2A}, presente en todos los antipsicóticos atípicos, se ha renovado especialmente el interés en conocer las posibilidades terapéuticas de este sistema. Como vía neuroanatómica del sistema de modulación difuso de serotonina del SNC destacar la vía serotoninérgica ascendente ventral, con origen en el grupo B7 (núcleo dorsal del rafe) y en el complejo B6-B8 (en el mesencéfalo y la frontera pontomesencefálica) (García-Porrero y Hurlé, 2015), y que inerva el tálamo, hipotálamo (núcleos mamilares y área hipotalámica lateral), estriado, neocorteza y núcleos del sistema límbico como el fascículo del cíngulo, amígdala, corteza entorrinal, hipocampo, giro dentado y núcleo *accumbens*. Las neuronas dopaminérgicas de los grupos neuronales origen de las vías mesocortical, mesolímbica y nigroestriada son invadidas por neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe (Adell y col., 2010).

Hay una serie de localizaciones neuroanatómicas en las cuales la modulación de la actividad de receptores de serotonina localizados en las mismas conlleva la modulación de la actividad de neuronas de las vías dopaminérgicas implicadas en la fisiopatología de la esquizofrenia. Destaca la vía serotoninérgica ascendente ventral y la innervación que realiza del núcleo A10. Como ejemplo decir que todos los fármacos antipsicóticos considerados como de segunda generación presentan un perfil multirreceptorial que incluye afinidades por distintos subtipos de receptores serotoninérgicos, de forma muy relevante por el receptor

5-HT_{2A}. Tras la aparición de los antipsicóticos atípicos, se sugirió que la superioridad que manifiestan en el tratamiento de los síntomas negativos se debería a la desinhibición de la transmisión dopaminérgica en la corteza prefrontal (Kapur y Remington, 1996), atribuida al antagonismo 5-HT_{2A} de clozapina (con actividad agonista parcial según algunos autores; Weiner y col., 2001). Ya se ha dicho que este receptor se relaciona con la vía serotoninérgica ascendente ventral que inerva neuronas dopaminérgicas del ATV. Su agonismo a nivel de esta vía serotoninérgica conlleva la activación de las mismas neuronas, no sólo de forma directa, sino que están implicadas también acciones a nivel presináptico y mecanismos de inhibición de neuronas gabaérgicas o la excitación de neuronas glutamatérgicas (Meltzer y col., 2003). Este receptor también se encuentra en distintas zonas potencialmente moduladoras de la actividad de vías dopaminérgicas implicadas en esquizofrenia, tales como neuronas piramidales corticales o proyecciones corticotegmentales glutamatérgicas (De Almeida y Mengod, 2007).

Otras evidencias que apoyan un papel, por lo menos en la terapéutica, de la serotonina en la esquizofrenia la aportan algunos estudios que sugieren que la liberación de serotonina y el agonismo de los receptores 5-HT_{2A} puede ser determinante para la hiperactividad motora en modelos animales de síntomas positivos de esquizofrenia conseguidos mediante la administración aguda de antagonistas NMDA (Millan y col., 1999). El agonismo parcial 5-HT_{1A} produce el mismo efecto en modelos animales (Meltzer y Huang, 2008). Los fármacos antipsicóticos atípicos presentan además como dianas en su perfil multirreceptorial el agonismo parcial 5-HT_{1A} y el antagonismo 5-HT₇. En relación con el receptor 5-HT_{1A}, su activación se relaciona con inhibición de neuronas del rafe (Meltzer y col., 2003). Se ha relacionado su presencia y su agonismo en corteza con la liberación de dopamina en córtex cerebral (ensayos *in vivo*) y el agonismo 5-HT_{1A} con la mejoría de síntomas negativos y cognitivos en esquizofrenia (Sumiyoshi y col., 2001; Sumiyoshi y col., 2007; Meltzer y col., 2012). En relación con el antagonismo 5-HT₇ se postula una acción de mejora cognitiva (ensayos en modelo de disfunción cognitiva y reconocimiento de objetos nuevos) demostrada con amisulprida en ensayos *in vivo* (Meltzer y Massey, 2011). De forma importante, la amisulprida (un antagonista D₂/D₃ y antagonista 5-HT₇) obtuvo mejores resultados que olanzapina en ensayos clínicos con pacientes con esquizofrenia en el área de aprendizaje, memoria verbal y declarativa (*Rey Auditory Verbal Learning Test*, RAVLT; Mortimer y col., 2007). El agonismo 5-HT_{2C} es capaz de disminuir

la señalización dopaminérgica en corteza cerebral y núcleo *accumbens* y, de hecho, el agonismo inverso 5-HT_{2C} se considera un componente de interés en el perfil de fármacos antipsicóticos, aunque no existen evidencias de que los antipsicóticos atípicos sean agonistas inversos efectivos en humano (Meltzer y Huang, 2008; Meltzer y Massey, 2011).

Recientemente se ha descrito la existencia del dímero 5-HT_{2A}/mGlu2 en neuronas piramidales de la corteza cerebral de los que se postula su implicación en los procesos fisiopatológicos de la corteza que ocurren en esquizofrenia (González-Maeso y col., 2008). En relación con esta localización, se han encontrado disminuciones en los niveles de este receptor en el córtex (Harrison, 1999). De todo lo expuesto anteriormente puede deducirse una interacción entre las vías de señalización serotoninérgicas, dopaminérgicas y glutamatérgicas muy estrecha, con relevancia potencial o probada en la etiología y terapéutica de la esquizofrenia.

1.1.1.2.5. *La implicación de los neurotransmisores glutamato y GABA*

Se trata de una hipótesis que podría explicar el origen de las anomalías en la neurotransmisión dopaminérgica en el área mesolímbica y las vías mesocorticales. Una de las primeras evidencias que apuntaron a esta hipótesis se obtuvo con la administración de los anestésicos disociativos fenciclidina (PCP) o ketamina, ambos bloqueantes de los receptores NMDA que inducen síntomas psicóticos en sujetos sanos (Javitt, 1987; Javitt y Coyle, 2004). Estos agentes farmacológicos son capaces de provocar alucinaciones, así como alteraciones formales del pensamiento o síntomas cognitivos (Jentsch y col., 1999). Se llegó así a pensar que en el cerebro de los pacientes esquizofrénicos podría existir cierto grado de hipofunción glutamatérgica NMDA.

Los hallazgos a favor de esta hipótesis incluyen alteraciones en el número y disposición de sinapsis axodendríticas de la capa III de la corteza, en las que se localizan receptores NMDA (y que podrían guardar relación con el denominado *circuito excitador intrínseco*) o la presencia de anomalías en la densidad de receptores NMDA en pacientes esquizofrénicos en la corteza y ganglios basales. La disminución de esas sinapsis podría ser responsable de un estado de hipofunción glutamatérgica en esquizofrenia. Se sugiere que el circuito excitador intrínseco podría ser el sustrato neuroanatómico de la memoria de trabajo (Riaza y Chinchilla, 2007).

La actividad de vías glutamatérgicas influye en la actividad de las vías dopaminérgicas mesocorticales, mesolímbicas y nigroestriatales, de forma que existe una interconexión entre estos sistemas. En esta interconexión es importante el sistema de modulación glutamatérgico, que parte de la corteza prefrontal y actúa sobre la actividad de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (Javitt y Laruelle, 2008). Este sistema consta de una vía activadora, formada principalmente por proyecciones glutamatérgicas hacia neuronas dopaminérgicas mesocorticales, y de una vía inhibitoria, con eferentes glutamatérgicos hacia interneuronas gabaérgicas del cerebro medio y mesencefálicas y que modula la actividad de neuronas dopaminérgicas subcorticales (Javitt y Laruelle, 2008). Una hipofunción de la transmisión glutamatérgica en estas vías podría desembocar en una disminución de la actividad dopaminérgica mesocortical y en la hiperactividad dopaminérgica en regiones subcorticales (Javitt y Laruelle, 2008). Además, varios estudios señalan la influencia de los antipsicóticos sobre la transmisión glutamatérgica al interaccionar con receptores de glutamato. En el caso de la clozapina, esta parece actuar como agonista parcial en el sitio de glicina del receptor NMDA (Riaza y Chinchilla, 2007). Los antipsicóticos también pueden modificar los niveles de expresión de receptores glutamatérgicos en lugares como el estriado (Riva y col. 1997). Como ya se ha dicho, la administración aguda de antagonistas NMDA constituye la base de los modelos animales de sintomatología positiva de esquizofrenia (Meltzer y col., 2011; Meltzer y Massey, 2011). En estos modelos se produce un aumento de liberación de dopamina en áreas como el núcleo *accumbens* (Del Arco y col., 2007). Los modelos de disfunción cognitiva en animales se basan en la administración subcrónica de los mismos antagonistas (Meltzer y Massey, 2011).

Entre otros hechos que dan soporte a la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia, y que la relacionan con otras hipótesis como la neurodegenerativa, se encuentra el bloqueo de la señalización glutamatérgica de neuronas excitadoras corticales producido por antagonistas NMDA y la reducción asociada de la actividad de interneuronas gabaérgicas responsables de la inhibición de otras neuronas glutamatérgicas. Esto conlleva un aumento del nivel de activación de estas últimas y un exceso en la liberación de glutamato en otras zonas distintas de la corteza, con potenciales efectos neurotóxico y neurodegenerativos mediante la interacción con receptores tipo AMPA y kainato (Pietraszek, 2003; Olney y Farber, 1995). La hipofunción glutamatérgica NMDA tiene consecuencias en los procesos

de neurodesarrollo y de plasticidad sináptica interfiriendo con la migración de neuroblastos y alterando fenómenos de sinaptogénesis (Riaza y Chinchilla, 2007). Existe además un interés en la investigación de rutas celulares proapoptóticas activadas mediante receptores AMPA/kainato (Riaza y Chinchilla, 2007). Como se puede ver, hay conexiones entre esta hipótesis y las explicaciones neurodegenerativa, de alteraciones en el neurodesarrollo y de neuroplasticidad de la esquizofrenia.

Por último, comentar en este apartado que el GABA cumple una función moduladora inhibitoria de la actividad dopaminérgica. Una desregulación en la actividad de las neuronas gabaérgicas podría dar lugar alteraciones en las vías dopaminérgicas responsables de los síntomas psicóticos (Puente y col., 2007).

1.1.1.2.6. *Hipótesis del neurodesarrollo, de la neurodegeneración, patología sináptica e hipótesis inmunológica.*

Hay una serie de evidencias que apuntan a que la esquizofrenia podría ser una enfermedad del neurodesarrollo, causada por un desarrollo temprano aberrante del cerebro. Entre ellas se encuentra el retraso de los pacientes en el alcance de hitos de desarrollo en la infancia y la documentación de anomalías cognitivas, motoras o del comportamiento indicativas de un funcionamiento cerebral anormal antes del diagnóstico (Arnold y col., 2005). Otras evidencias vienen dadas por el hecho de que las complicaciones obstétricas incrementan el riesgo de esquizofrenia y de que los hallazgos neuropatológicos *post mortem* indican posibles alteraciones en la organización histológica durante el neurodesarrollo en ausencia de indicadores de neurodegeneración (Riaza y col., 2007a; Arnold y col., 2005). Particularmente, se encuentran patrones alterados de organización laminar en regiones ventromediales de los lóbulos temporales y en la orientación espacial de ciertas poblaciones neuronales de hipocampo, corteza entorrinal y cíngulo anterior. Otras líneas de investigación se centran en posibles defectos en la mielinización postnatal (Riaza y col., 2007a).

Otra hipótesis que se considera en esquizofrenia es la neurodegenerativa, que se basa en el conocimiento de la evolución temporal del deterioro cognitivo y de su naturaleza y de las variaciones de parámetros neuroanatómicos indicativos de deterioro en los pacientes. En este último caso se tienen en cuenta la dilatación ventricular (Molina y col., 2004) o los

cambios de tamaño de los lóbulos temporales. Como ya se ha comentado, la hipótesis de la neurodegeneración puede guardar relación con la hipofunción NMDA, ya que esta puede provocar fenómenos de estimulación de la liberación de glutamato secundarios (por inhibición de neuronas gabaérgicas responsables de inhibición tónica) que causen degeneración o apoptosis a través de los receptores AMPA o de kainato (Konradi y Heckers, 2003; Heckers y Konradi., 2014).

En cuanto a indicios de patología sináptica en esquizofrenia, la disminución de la actividad excitatoria intrínseca, en la que es determinante la señalización glutamatérgica, podría afectar a la formación y remodelado de sinapsis en la adolescencia (Riaza y col., 2007c). El complejo de proteínas SNARE está implicado en funciones como neurotransmisión o plasticidad neuronal. El complejo SNARE lo forman syntaxina-1, SNAP25 y Vamp2. Otras proteínas relacionadas con este complejo son Munc18 y sinapsina. En general los estudios de asociación con esquizofrenia de polimorfismos de genes que codifican proteínas del complejo SNARE como syntaxina-1 o SNAP25 obtienen resultados positivos (Fanous y col., 2010; en Guerrero y col., 2012 Libro) aunque no todos (Kawashima y col., 2008). En relación con esquizofrenia un estudio GWAS encuentra un sitio de riesgo para esta enfermedad relacionado con el gen *TSNARE1* (Ripke y col., 2013).

Otras líneas de investigación en la etiopatología de la esquizofrenia en esta dirección (Riaza y col., 2007c) se centran en una serie de proteínas de las que en general puede decirse que participan en el proceso de neurodesarrollo y plasticidad sináptica tales como:

- Se estudia la participación de ácido retinoico durante el desarrollo fetal en la configuración de regiones anatómicas importantes en la fisiopatología de la esquizofrenia.
- Se estudia la participación de reelina (Varela y col., 2015), una proteína de matriz extracelular producida por las células de Cajal-Retzius que desempeña un papel importante en el neurodesarrollo facilitando la migración de los neuroblastos y la sinaptogénesis.
- Se estudia la implicación de la familia de proteínas *Wnt* las cuales tienen efectos en el neurodesarrollo y la plasticidad sináptica y suprimen la expresión constitutiva de GSK3 β (glucógeno sintasa cinasa 3).

- Se estudia la glucoproteína NCAM (molécula de adhesión celular neuronal) expresada en terminaciones sinápticas e implicada en el neurodesarrollo.
- Se estudia la proteína neuregulina 1 (NRG1), que participa en varios procesos de neurodesarrollo como la migración y la supervivencia neuronal.
- Asimismo, se estudian las neurotrofinas NGF (factor de crecimiento nervioso) y BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro) (Guillin y col., 2007).

Por último, hay diversas evidencias que apoyan la hipótesis inmunológica de la etiología de la esquizofrenia. Entre otras, existe un grupo de pacientes que presentan anomalías en varios marcadores de actividad inmunológica y en ellos predomina la actividad de los linfocitos T CD4⁺ Th2 sobre la de Th1 (Riaza y col., 2007b; Schwarz y col., 2001). En general se trata de pacientes con mal pronóstico y resistencia al tratamiento.

1.1.1.2.7. *El sistema de modulación de adenosina*

La adenosina ejerce funciones moduladoras sobre los sistemas de señalización glutamatérgica y dopaminérgica. Las primeras hipótesis acerca de la implicación de la adenosina en esquizofrenia se basaron en la modulación alostérica negativa de los agonistas A_{2A} en la señalización dopaminérgica a través de heterómeros A_{2A}-D₂ del estriado (Ferré y col., 1994). En el estriado y la corteza, los receptores A₁ presinápticos inhiben la liberación de dopamina y de glutamato (Solinas y col., 2002). La activación del receptor A_{2A} presináptico y del localizado en astrocitos originan una liberación de glutamato y una disminución de su recaptación por astrocitos (transportador GLT-1), respectivamente. Existe un ensayo clínico con dipiridamol (inhibidor de la recaptación de adenosina) como monoterapia a 200 mg/día esquizofrenia que muestra mejoría de los síntomas positivos y negativos (Wonodi y col., 2011). Basándose en las dos últimas menciones y la influencia de la adenosina en la señalización glutamatérgica, se propuso la hipótesis etiológica de la hipofunción de adenosina (Lara y col., 2006). Actualmente (Rial y col., 2014) se propone una simultánea disminución en la función del receptor A₁ y una desregulación A_{2A} (incremento de los receptores A_{2A} neuronales y disminución de los de astrocitos) como cambios fisiopatológicos en la esquizofrenia. Según Rial y col., las estrategias terapéuticas en esquizofrenia que actúen sobre este sistema deben dirigirse para actuar en ambas dianas simultáneamente.

1.1.2. Fármacos antipsicóticos

1.1.2.1. Recomendaciones terapéuticas en esquizofrenia

La eficacia del tratamiento farmacológico de la esquizofrenia con los fármacos antipsicóticos ha sido ampliamente demostrada: según un estudio el uso a largo plazo de antipsicóticos se asocia a una menor tasa de mortalidad en los pacientes con esquizofrenia frente a los pacientes sin tratamiento. En el caso de antipsicóticos de segunda generación, la clozapina se asocia a una mortalidad significativamente menor que el resto (Tiihonen y col., 2009). La eficacia de los distintos antipsicóticos en el control de los síntomas positivos está claramente demostrada, pero existen distintas opiniones acerca de la eficacia y superioridad de los antipsicóticos de segunda generación en el tratamiento de síntomas negativos y cognitivos.

En la farmacoterapia de esquizofrenia (Guía de práctica clínica sobre la esquizofrenia MSC, 2009) se recomienda determinar una serie de parámetros (como peso, parámetros hematológicos, valoración neurocognitiva o electrocardiograma) antes de comenzar el tratamiento del paciente esquizofrénico. Se recomienda extremar la precaución en los pacientes que no se han sometido a ningún tratamiento previo. También se recomienda la elección de medicación antipsicótica de segunda generación (mejor tolerabilidad y menores síntomas extrapiramidales). Además, se distingue el tratamiento de un episodio psicótico y su fase de recuperación del tratamiento de la esquizofrenia en sus fases de estabilización y estable.

Se aboga por el uso de la medicación de segunda generación administrada por vía oral como la risperidona, olanzapina, quetiapina, amisulprida y aripiprazol, como primera y segunda línea de tratamiento en el primer episodio de psicosis, debido al menor riesgo a corto y largo plazo de efectos adversos extrapiramidales. Se recomienda el mantenimiento de la medicación antipsicótica para el tratamiento de un primer episodio de psicosis durante un mínimo de dos años, después de la primera recuperación de los síntomas (fase de recuperación). Se debe mantener la farmacoterapia para la prevención de recaídas en las fases de estabilización y estable. En el caso de recaídas pese a adherencia o en caso de no mejoría de los síntomas en pacientes bajo tratamiento con fármacos de primera generación se propone el cambio a antipsicóticos atípicos. No se recomienda la administración

fármacos de primera generación en situaciones de urgencia (Guía de práctica clínica sobre la esquizofrenia MSC, 2009).

Se recomienda que la medicación antipsicótica sea prescrita si es posible de una manera no coercitiva y en combinación con intervenciones psicosociales que incluyan estrategias de promoción de la adherencia y la no administración de múltiples medicamentos antipsicóticos y las combinaciones de fármacos de primera generación y de segunda excepto en períodos de transición.

Clozapina, un antipsicótico de segunda generación de uso restringido debido al riesgo de agranulocitosis, se indica en casos de agresividad persistente, de riesgo de suicidio elevado y ante la falta de respuesta al tratamiento con una administración adecuada de antipsicóticos de dos tipos diferentes (Guía de práctica clínica sobre la esquizofrenia MSC, 2009).

Algún estudio confirma que una terapia integrada farmacológica y psicológica es más beneficiosa para el paciente que la farmacoterapia sola (Marder, 2000). El consenso español de expertos para el tratamiento de la esquizofrenia recomienda la utilización de las terapias de apoyo, cognitiva y de grupo, las intervenciones familiares, la rehabilitación cognitiva y el entrenamiento en habilidades sociales (Giner y col., 2000). La terapia cognitivo-conductual se considera eficaz como tratamiento complementario a la atención estándar en esquizofrenia con síntomas persistentes (Gould y col., 2001) y se recomienda para el tratamiento de los síntomas en esquizofrenia resistente (Guía de esquizofrenia del SNS, 2009). Otras intervenciones psicosociales son la terapia psicodinámica y el entrenamiento en el automanejo de la esquizofrenia.

1.1.2.2. Fármacos antipsicóticos: perfil farmacológico y clínico

1.1.2.2.1. Antipsicóticos de primera generación o clásicos

Comenzando por el grupo de antipsicóticos de primera generación, conocido también como de los neurolépticos o antipsicóticos típicos, destacar la fenotiazina alifática clorpromazina y la butirofenona haloperidol. Otros fármacos de primera generación son tioridazina y perfenazina (fenotiazina piperidina), clorprotixeno (tioxanteno) y loxapina (dibenzoxapina). Todos basan su efecto antipsicótico en el antagonismo D₂ principalmente sobre el tracto mesolímbico. Por su bloqueo dopaminérgico a nivel de los tractos dopaminérgicos mesocortical, tuberoinfundibular y nigroestriatal estos antipsicóticos van a causar una serie de reacciones adversas. Se distinguen dentro de este grupo, entre otros tipos, los fármacos de alta potencia, como el haloperidol (**Fig. 1**) y de baja potencia, como la clorpromazina.

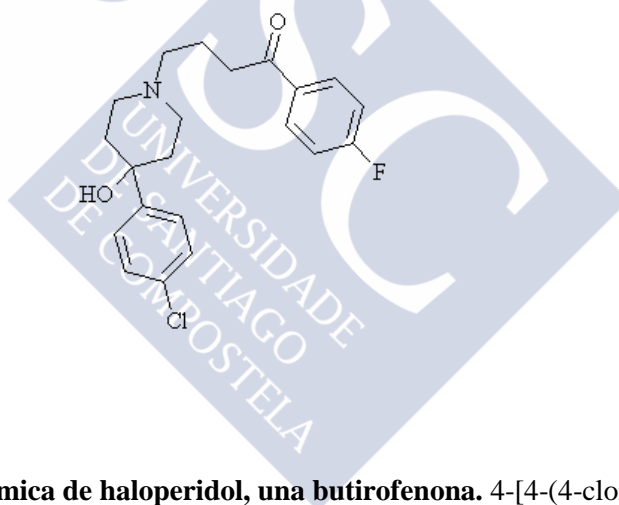


Fig. 1. Estructura química de haloperidol, una butirofenona. 4-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxipiperidino]-4'-fluorobutirofenona.

Destacar que un porcentaje relativamente alto de pacientes (un 20%) son refractarios al tratamiento con antipsicóticos clásicos, y que los síntomas positivos de la esquizofrenia responden al tratamiento antipsicótico de mejor manera que los síntomas negativos o cognitivos, que pueden resultar incluso agravados. Así, un bloqueo dopaminérgico excesivo en la vía mesocortical va a agravar el déficit dopaminérgico cortical existente produciendo un empeoramiento de los síntomas negativos. Son característicos del uso de estos fármacos la ataraxia (indiferencia al entorno con inhibición emocional) y el embotamiento cognitivo

(síndrome de déficit inducido por neurolépticos) que inicialmente dio origen al término neuroléptico (Gil y Huete, 2009; Wilkaitis y col., 2006).

El bloqueo de la inhibición tónica de la liberación de prolactina producida por dopamina a nivel de la vía tuberoinfundibular va a provocar (frecuencia inferior al 1% para haloperidol; BOT PLUS 2.0 [Base de datos], 2015) una elevación de los niveles de prolactina y una disminución de FSH y LH, lo que puede causar amenorrea, galactorrea, ginecomastia y disminución de la densidad ósea y de la libido.

El bloqueo de receptores D₂ a nivel del sistema nigroestriado conlleva algunos de los efectos adversos más perjudiciales de los antipsicóticos. El temblor en reposo, la rigidez y la hipocinesia (éstos síndromes se engloban en el término *parkinsonismo*) y la acatisia y la distonía aguda son efectos agudos que se presentan hasta en un 10% o más de los pacientes tratados con antipsicóticos clásicos. Así, a mayor nivel de ocupación D₂ puede observarse distonía generalizada, catalepsia y estado catatónico. Varios meses tras el inicio del tratamiento puede aparecer discinesia tardía que no mejora o se agrava tras suspender el fármaco y que no responde a tratamiento con fármacos anticolinérgicos.

La concentración plasmática máxima se alcanza al cabo de 1-4 h tras la administración oral de formas sólidas, reduciéndose este tiempo en el caso de preparaciones líquidas. La administración intramuscular da lugar a una absorción más rápida y predecible con pico a los 30-60 min y eficacia clínica desde los 15 min (Wilkaitis y col., 2006). Existen formas de liberación prolongada de zuclopentixol y risperidona que consiguen un grado óptimo de cumplimiento farmacológico pero que presentan el inconveniente de la imposibilidad de suspensión inmediata. La mayoría de los antipsicóticos típicos se metaboliza a través de las enzimas del complejo citocromo P450 CYP2D6 y CYP3A4, habiéndose descrito metabolizadores lentos y ultrarrápidos a través del CYP2D6, una isoenzima de la cual son inhibidores.

Los antipsicóticos clásicos presentan una notable afinidad por los receptores de histamina H₁, determinados α -adrenérgicos y muscarínicos no implicados en su efecto terapéutico pero que conllevan determinados efectos secundarios. Así, son frecuentes en estos tratamientos la aparición de sedación, hipotensión ortostática, arritmias o alteraciones de la glucemia. Especialmente los antipsicóticos de baja potencia se asocian a prolongación del intervalo QT (riesgo de arritmias ventriculares graves). El síndrome neuroléptico

maligno tiene una incidencia entre el 0,02% y el 2% y puede llegar a una mortalidad del 20-30%. Otros efectos adversos son los hematológicos (leucopenia y la más grave agranulocitosis) y los oculares, gastrointestinales y genitourinarios.

Estos fármacos tienen limitaciones ya que alrededor del 30% de los pacientes con psicosis aguda no presenta respuesta o es muy pobre y en más del 60% de los pacientes la respuesta es sólo parcial (Fleischhacker, 1995). Son ineficaces en el tratamiento de los síntomas negativos e incluso agravan los síntomas cognitivos (Meltzer y col., 1996), sobre todo cuando se asocian fármacos anticolinérgicos para tratar los síntomas extrapiramidales. El tratamiento con estos fármacos obtiene resultados inferiores a los obtenidos con fármacos atípicos (Leucht y col., 2009) y existen ensayos que señalan una mortalidad aumentada en pacientes tratados con antipsicóticos típicos con respecto a los atípicos (Schneeweiss y col., 2007).

1.1.2.2.2. *Antipsicóticos de segunda generación o atípicos: perfil farmacológico multirreceptorial, acciones farmacológicas y eficacia clínica*

Una característica que desde la aparición de los antipsicóticos atípicos se asocia a su eficacia es su característico perfil farmacológico multirreceptorial. El concepto de fármaco multirreceptorial se utiliza para designar fármacos con un rango óptimo de afinidades por múltiples dianas necesarias para obtener eficacia terapéutica. Como se explicará más adelante (ver sección 1.2.3.2.), el factor tiempo es clave para la caracterización de dicho perfil. Se reúnen en una sola molécula la polifarmacología y la afinidad preferente en la unión a receptores (Mestres y Gregori-Puigjané, 2009).

Con estos fármacos aparecen una serie de actividades farmacológicas que se asocian a algún tipo de efecto terapéutico o efectos adversos. Además del antagonismo D₂ y la mejoría de la sintomatología positiva y todo el repertorio conocido de reacciones adversas asociadas ya presentes en los antipsicóticos clásicos, se encuentra en los antipsicóticos atípicos el agonismo parcial D₂, relacionado con la mejoría de los síntomas positivos, negativos y cognitivos. Otra actividad farmacológica relevante es la elevada afinidad por el receptor D₁, incluso superior a la mostrada por el receptor D₂, no presente en los neurolepticos clásicos y que se observa en el perfil de clozapina. El antagonismo de los receptores D₃, presentes en áreas límbicas, se relaciona con el control cognitivo y emocional

y con la mejoría de la sintomatología negativa; su posible localización presináptica posibilitaría la modulación de la liberación de neurotransmisores. Otros receptores dopaminérgicos sobre los que los antipsicóticos atípicos pueden presentar actividad relevante para su acción terapéutica son los D₄, actividad presente en clozapina, aunque ha perdido el interés atribuido inicialmente como determinante de atipicidad.

La más destacable de las nuevas actividades farmacológicas presentes respecto a las de antipsicóticos clásicos corresponden a la actividad sobre receptores de serotonina. Algunos autores proponen que los antipsicóticos atípicos deberían recibir el nombre de moduladores de dopamina del espectro de serotonina (“*serotonin spectre dopamine modulators*”: SSDM). Esto es debido a que como se ha visto presentan actividades sobre estos receptores que en último término afectan a la actividad de las vías dopaminérgicas (Meltzer y Massey, 2011). Los receptores de serotonina cuya modulación presenta potencial interés son el 5-HT_{2A}, 1A, 2C, 3, 4, 5, 6 y 7 (Alex y Pehek, 2007). El antagonismo 5-HT_{2A} se relaciona con la mejoría de la sintomatología negativa y cognitiva. Existen evidencias de que la activación 5-HT_{1A} modula neuronas (presumiblemente glutamatérgicas) que regulan la actividad de neuronas dopaminérgicas de la vía mesocortical. Esto hay que relacionarlo con la mejoría de síntomas cognitivos y negativos atribuida a este agonismo (parcial) 5-HT_{1A}, probablemente debido a un aumento de la liberación de dopamina prefrontal. El receptor 5-HT_{2C} también es una potencial diana para la regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas de las tres vías comentadas, aunque presenta diferencias en las distintas vías en cuanto a capacidad de inhibición tónica en condiciones fisiológicas (no estimulada farmacológicamente) (Alex y Pehek, 2007). El antagonismo 5-HT_{2C} también se relaciona con la disminución de extrapiramidalismos y, al igual que el antagonismo 5-HT_{2A}, con el aumento de peso. El antagonismo de los serotoninérgicos 5-HT₃ (mesocorticolímbicos) presente en clozapina se relaciona con la disminución de los síntomas extrapiramidales. El antagonismo de receptores 5-HT₆ se relaciona con la neurotransmisión colinérgica y la mejora de la memoria y del aprendizaje (Álamo y col., 2007a).

Una característica del perfil de afinidades de clozapina al igual que de otros antipsicóticos es el antagonismo 5-HT₇. Esta característica es común a otros fármacos antipsicóticos determinados tales como clozapina, lurasidona, quetiapina, risperidona y

ziprasidona y también clásicos, como clorpromazina o flufenazina. Es el único receptor de serotonina por el que presenta afinidad apreciable amisulprida, fármaco cuya eficacia y perfil clínico son similares al de los antipsicóticos atípicos. En amisulprida la actividad antagonista 5-HT₇ se relaciona con su actividad antidepresiva. Las características antipsicóticas atípicas de la amisulprida se explican por su afinidad selectiva por receptores D₂ de localización mesocortical (Álamo y col., 2007a).

Con respecto a la actividad sobre receptores muscarínicos, histamínicos y adrenérgicos los nuevos antipsicóticos atípicos presentan una actividad sobre estos receptores que no es homogénea, encontrándose desde fármacos con nula afinidad por un receptor concreto, fármacos que no presentan afinidad por ninguno de ellos o fármacos con un perfil de afinidad específico por estos receptores. En concreto, el antagonismo de receptores adrenérgicos puede tener alguna acción positiva (ansiólisis, α_1 y sobre todo α_2 , para este último también mejoría del humor y mejoría cognitiva) aunque en general la actividad farmacológica sobre estos receptores y los muscarínicos e histaminérgicos conllevan un gran número de conocidas reacciones adversas que complementan a las causadas por el antagonismo D₂.

El primer fármaco de este grupo fue la clozapina (posee una estructura tipo dibenzodiazepina). Posteriormente se introdujeron risperidona (benzisoxazol) y la olanzapina (tienobenzodiazepina). Otros fármacos antipsicóticos de segunda generación son sertindol (indol), quetiapina (dibenzotiazepina), aripiprazol (dihidroquinolinona), ziprasidona (benzoisotiazol) y lurasidona (benzoisotiazol).

La superioridad clínica de la clozapina fue atribuida inicialmente a una afinidad por los receptores 5-HT_{2A} superior a la afinidad por los receptores D₂, llegándose a establecer el índice de Meltzer (ratio de afinidades por los receptores 5-HT_{2A} y D₂) con un valor indicativo de atipicidad superior a 1,12 (Meltzer y col., 1989). Desde la década de los ochenta conforme avanzaba la investigación sobre estos fármacos se enunciaban distintas características farmacológicas “determinantes de atipicidad” para los antipsicóticos: una afinidad mayor por los receptores 5-HT_{2A} que por los receptores D₂, capacidad para mejorar los síntomas negativos y cognitivos en esquizofrenia, perfil multirreceptorial, alta selectividad *in vivo* por los receptores D₂ corticales y límbicos en comparación con la

afinidad por los receptores D₂ estriatales y una mayor afinidad por el receptor D₄ (Meltzer y col., 2003; Meltzer, 2004; Seeman, 2005).

Así, algunos trabajos se centran en explicar las características que determinarían la atipicidad de los fármacos en base a un aumento de la liberación de dopamina y acetilcolina en el área mesocortical, un área cuya hipofunción dopaminérgica se relaciona con aparición de sintomatología negativa y cognitiva (Huerta, 2007). La hipofunción dopaminérgica mesocortical se vería corregida con los antipsicóticos atípicos mediante el antagonismo 5-HT_{2A} y el agonismo 5-HT_{1A} (Meltzer y col., 2003; Álamo y col., 2007).

Según otros autores la atipicidad estaría basada en diferencias en la localización preferente de los fármacos en las distintas vías dopaminérgicas. Se sugiere que los antipsicóticos atípicos tienen afinidad preferente por las vías dopaminérgicas límbicas y corticales. Algunos fármacos atípicos presentan una localización preferente en neuronas del área tegmental ventral con respecto a neuronas del núcleo A9 (en sustancia negra), relacionada con extrapiramidalismos (Xiberas y col., 2001; Álamo y col., 2004).

Otros autores proponen las diferencias en el tiempo de residencia (t_R) del fármaco en el receptor dopaminérgico (concretamente velocidad de disociación elevada) como la explicación del carácter atípico. Diversos antipsicóticos presentan un reducido tiempo de residencia sobre el receptor D₂, de 1 min para el caso de clozapina, amisulprida o quetiapina y siendo superior (≈ 30 min) para haloperidol, clorpromazina o racloprida. Un t_R reducido debería permitir una mejor trasmisión dopaminérgica fisiológica que conllevaría menos extrapiramidalismos, menor hiperprolactinemia y una menor contribución a los síntomas cognitivos y negativos. Esta propuesta inicial se refería a la clozapina y sus bajos niveles de efectos adversos extrapiramidales (Seeman, 2014).

Estos fármacos presentan en general y al igual que los fármacos clásicos una notable afinidad por los receptores H₁-histaminérgicos, α -adrenérgicos y muscarínicos no implicados en su efecto terapéutico y que conllevan acciones farmacológicas que pueden derivar en efectos secundarios o reacciones adversas. Pero en este grupo son generalmente más leves y, debido a que no existe homogeneidad en el perfil multirreceptorial, existen fármacos en los que predominan determinadas reacciones adversas y están ausentes otras. Así, con estos fármacos también son frecuentes la aparición de sedación, hipotensión, arritmias, ganancia de peso, dislipidemias o trastornos hematológicos pero cada fármaco

tiene su particular tasa de incidencia. Pueden causar convulsiones, tromboembolismo, aumento de los niveles de enzimas hepáticas o prolongar el intervalo QT. Son fármacos que no están exentos de provocar síntomas extrapiramidales agudos, pero la incidencia es baja, lo que también es un factor predictivo de disminución del riesgo de discinesia tardía. Hoy existe una controversia acerca del aumento de mortalidad y del riesgo de sufrir eventos cardiovasculares en tratamientos a largo plazo con antipsicóticos, respecto a lo que algunos autores consideran que el antagonismo 5-HT_{2A} debería tener algún papel en la reducción del riesgo cardiovascular (Blasco-Fontecilla H y col., 2010).

En cuanto a la eficacia clínica, los antipsicóticos atípicos son superiores a los antipsicóticos de primera generación tal como el haloperidol en eficacia, prevención de recaídas, incidencia de depresión o aparición de efectos adversos extrapiramidales, aunque esta superioridad en todos los parámetros de eficacia no es extensible a todo el grupo de antipsicóticos de segunda generación de manera generalizada, sino que hay determinados fármacos que destacan en alguna propiedad como amisulprida, clozapina, olanzapina y risperidona en eficacia o aripiprazol y quetiapina en depresión (Leucht y col., 2009; Martin y col., 2006). También destaca la superioridad de clozapina en baja incidencia de reacciones adversas extrapiramidales (Leucht y col., 2013) o aripiprazol en baja sedación (Leucht y col., 2009). Sin embargo, no ofrecen generalmente una ventaja, sino que son inferiores en aspectos como sedación, especialmente clozapina (Leucht y col., 2013) o ganancia de peso, especialmente olanzapina (Swartz y col., 2008) frente a fármacos de primera generación (haloperidol y clorpromazina en el primer caso y perfenazina en el segundo).

En general puede afirmarse que los antipsicóticos atípicos son más eficaces que los antipsicóticos clásicos en el tratamiento de los síntomas negativos (Álamo y col., 2007) sean primarios o secundarios a la psicosis. Clozapina es especialmente eficaz en el tratamiento de la elevada sintomatología negativa en pacientes (Meltzer y McGurk, 1999). En general puede decirse que son moderadamente eficaces en la mejora de los síntomas cognitivos; puede concluirse que producen una mejora de la función cognitiva global específicamente en los dominios de aprendizaje y de procesamiento del lenguaje (Woodward y col., 2005; metaanálisis).

El metaanálisis realizado por Leucht y col., (2009) concluye que los antipsicóticos atípicos (quetiapina, sertindol, olanzapina, risperidona) tienen una moderada ventaja en

tolerabilidad y eficacia, tanto global como en síntomas positivos y negativos sobre los clásicos. Aunque respecto a estos resultados, algunos autores (Geddes y col., 2003) los atribuyen a las dosis del antipsicótico típico analizadas, de manera que una vez considerada una dosis equivalente desaparece la ventaja terapéutica. Del metaanálisis de Davis (2003) puede concluirse que los agentes atípicos son moderadamente más eficaces que los clásicos en sintomatología negativa, cognitiva y afectiva y ligeramente en el tratamiento de sintomatología positiva. Existe una controversia relacionada con lo anterior, relacionada con la explicación de la eficacia en sintomatología negativa de los antipsicóticos de segunda generación. Para algunos autores, los antipsicóticos atípicos son capaces de causar una mejoría primaria, para otros sólo mejoran síntomas secundarios a la psicosis, depresión, extrapiramidalismos y otros efectos secundarios (Álamo y col., 2007a).

1.1.2.2.3. *Antipsicóticos de segunda generación o atípicos: clozapina y otros fármacos*

Comenzando por **clozapina** (8-cloro-11-(4-metil-1-piperazinil)-5H-dibenzo[*b,e*] [1,4]diazepina; estructura tipo dibenzodiazepina) sólo se utiliza para el tratamiento de esquizofrenia resistente y de psicosis en el curso de la enfermedad de Parkinson (Ficha técnica de Leponex, 2014). En España está tipificada como fármaco de especial control médico o con medidas especiales de seguridad debido al riesgo de agranulocitosis, de forma que previamente al inicio del tratamiento el recuento leucocitario ha de ser mayor a 3500/mm³ y el recuento absoluto de neutrófilos ha de ser mayor de 2000/mm³. Debe realizarse posteriormente un control frecuente del mismo parámetro de forma que si los valores caen por debajo de 3000/mm³ (leucocitos) o de 1500/mm³ (neutrófilos) debe suspenderse la medicación (Ficha técnica de Leponex, 2014). La posibilidad de neutropenia o leucopenia obliga a tener que tomar precauciones en caso de infección. Es significativo además el aumento del riesgo de miocarditis, que en algunos casos ha sido mortal. Clozapina es metabolizada principalmente en el citocromo P450 isoenzima CYP1A2 y sus metabolitos son N-desmetil-clozapina y N-óxido-clozapina (Ficha técnica de Leponex, 2014). Unas concentraciones plasmáticas de fármaco superiores a 350 ng/mL se asocian a una mejor respuesta. Son significativos el aumento de peso y la alteración de los parámetros lipídicos sanguíneos (Wirshing y col., 2002). También produce convulsiones, sedación y

estreñimiento (Marder y Wirshing, 2006; Leucht y col., 2013; Ficha técnica de Leponex, 2014).

Olanzapina (2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-b][1,5]benzodiazepina es otro antipsicótico atípico indicado en el tratamiento de la esquizofrenia en la terapia de continuación en pacientes que muestran una respuesta inicial al tratamiento para el mantenimiento de la mejoría clínica. Olanzapina también está indicada en el tratamiento del episodio maníaco de moderado a grave y en la prevención de las recaídas en pacientes que presentan trastorno bipolar con respuesta previa en la fase maníaca. No está autorizado el uso de olanzapina en pacientes con psicosis y/o trastornos del comportamiento asociados a demencia debido a un aumento de la mortalidad y del riesgo de accidente cerebrovascular (Nota informativa de AEMPS, 2004/03; Gill y col., 2007).

Risperidona (3-[2-(4-[6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-il]-1-piperidinil)-etil]-6,7,8,9-tetrahidro-2-metil-4H-pirido-[1,2-a]-pirimidin-4-ona, es otro antipsicótico atípico indicado en el tratamiento de la esquizofrenia aguda y crónica. También está indicado en el tratamiento de los episodios maníacos de moderados a graves asociados a los trastornos bipolares, en el tratamiento a corto plazo (hasta 6 semanas) de la agresión persistente que puede aparecer en pacientes con demencia de tipo Alzheimer y en el tratamiento sintomático de la agresión persistente en los trastornos de la conducta en niños de 5 años de edad en adelante y adolescentes (Ficha técnica de Risperdal, 2013). Está disponible una formulación de liberación prolongada de risperidona que se administra cada dos semanas. Tampoco se recomienda su uso en pacientes con demencia distinta de Alzheimer debido al aumento del riesgo cardiovascular (Nota informativa de AEMPS, 2008/19).

Lurasidona (Fig. 2) es un antipsicóticos atípico de reciente aprobación, derivado de benzoisotiazol, que contiene una estructura de norbornano fusionado a un grupo imida. Éste se une mediante un anillo ciclohexilo y un anillo piperazínico al primer grupo mencionado.

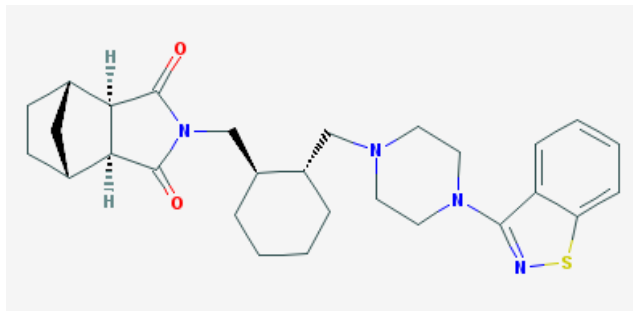


Fig. 2. Estructura química de lurasidona. (3aR,4S,7R,7aS)-2-((1R,2R)-2-(4-(1,2-benzisotiazol-3-il)-1-piperazinilmetil)-1-ciclohexilmetil)hexahidro-4,7-metano-2H-isoindol-1,3-diona; SM-13496].

Este fármaco es un antagonista de los receptores de dopamina D_2 y de serotonina $5-HT_{2A}$ y $5-HT_7$ con una afinidad de 0.994, 0.47 y 0.495 nM, respectivamente (Ficha técnica de Latuda, 2015). También es un agonista parcial de los receptores $5-HT_{1A}$ con una afinidad de 6.38 nM. No tiene afinidad apreciable por los receptores de histamina H_1 ni por los receptores muscarínicos, aunque sí por los adrenérgicos α_{2C} y α_{2A} con una afinidad de 10.8 nM y 40.7 nM respectivamente. (Ishibashi y col., 2010; Ichikawa y col., 2012; Ficha técnica, 2014). La **Tabla 1** recoge los valores de afinidad por distintos receptores de los antipsicóticos presentados hasta este punto.

Receptor	Binding Affinity, K_i ^a			
	Lurasidone	Olanzapine	Clozapine	Haloperidol
	<i>nM</i>			
Dopamine D ₂	1.68 ± 0.09	14.4 ± 3.2	108 ± 27	3.28 ± 0.42
5-HT _{1A}	6.75 ± 0.97 (4.0)	>1000 ^b (>69)	123 ± 5 (1.1)	>1000 ^b (>300)
5-HT _{2A}	2.03 ± 0.46 (1.2)	5.78 ± 0.89 (0.40)	9.17 ± 1.46 (0.085)	84.7 ± 13.1 (26)
5-HT ₇	0.495 ± 0.090 (0.29)	n.t.	42.2 ± 12.0 (0.39)	>1000 ^b (>300)
Noradrenaline α_1	47.9 ± 7.8 (29)	22.1 ± 7.7 (1.5)	17.5 ± 5.0 (0.16)	17.9 ± 1.5 (5.5)
Noradrenaline α_{2A}	40.7 ± 7.7 (24)	n.t.	147 ± 14 (1.4)	>1000 ^b (>300)
Noradrenaline α_{2C}	10.8 ± 0.64 (6.4)	n.t.	15.6 ± 2.0 (0.14)	>1000 ^b (>300)

Tabla 1. Perfiles de afinidad por distintos receptores de lurasidona y otros antipsicóticos atípicos. Los valores se expresan en unidades nM. n.t., no probado. ^ael número entre paréntesis indica la *ratio* de potencia relativa entre el valor de K_i para los distintos receptores y el valor correspondiente al receptor D₂. ^bvalor de IC50. (Tomado de Ishibashi y col, 2010).

Se han realizado estudios de modelización de receptores y de análisis de acoplamiento de ligando que han determinado los sitios relevantes de interacción entre lurasidona y receptores relevantes para su acción antipsicótica como D₂, 5-HT_{2A} y 5-HT₇ (Ichikawa y col., 2012). Lurasidona se dispone en estos receptores en el sitio de unión en una localización próxima a la cara extracelular del receptor. En los tres receptores se conserva la interacción de Asp3.32 con el grupo amino protonado de la piperazina intermedia y las interacciones hidrofílicas del grupo benzoisotiazol con aminoácidos situados en el segmento TM5 y proximidades como Ser5.43 y Ser5.46 en el caso del receptor D₂, Ser239 y Ser242 del receptor 5-HT_{2A} o Ser243 y Thr244 del receptor 5-HT₇. Existen entre otras interacciones las de aminoácidos hidrofóbicos con el norbornano y el anillo aromático bencénico de lurasidona (Ichikawa y col., 2012). Lurasidona no muestra afinidad apreciable por receptores muscarínicos M₁ e histaminérgicos H₁, por lo que se espera minimizar los efectos adversos derivados de ese antagonismo en este antipsicótico. Para ello resulta determinante estructuralmente el poseer un grupo intermedio voluminoso (ciclohexilo) y una mitad también voluminosa (norbornano-2,3-carboximida) que interaccionan y generan impedimento estérico con los residuos Ile454 y Trp103 de H₁ y Tyr82 de M₁ (Ichikawa y col., 2012).

Experimentos utilizando lurasidona en modelos animales de déficit cognitivo mediante la administración subcrónica de antagonistas NMDA (MK-801) describen mejorías en los déficits de memoria y aprendizaje y se atribuyen al antagonismo 5-HT₇

(Ishibashi y col., 2010; Horisawa y col., 2013). Otros estudios preclínicos realizados con los ligandos MDL100907 y ACP-103 (antagonistas 5-HT_{2A}), encuentran que éstos son capaces de mejorar los resultados en el test de reconocimiento de objetos *in vivo* administrados conjuntamente con una dosis subefectiva de lurasidona (Meltzer y Massey, 2011; Snigdha y col., 2010), lo que indica que en esta actividad puede tener efecto otro receptor serotoninérgico como el 5-HT_{2A}, presente el perfil de lurasidona. Se investiga la mejora en índices de depresión en modelos de depresión en ratones (test de natación forzada, FST, y test de suspensión de cola, TST) tratados con lurasidona, que se relacionan con su actividad antagonista 5-HT₇ (Cates y col., 2013).

En la clínica, lurasidona se ha mostrado eficaz en el tratamiento de la esquizofrenia (Meltzer y col., 2011; Potkin y col., 2011) y en la actualidad está autorizado en Estados Unidos con las indicaciones para el tratamiento de la esquizofrenia y de la fase de depresión asociada al trastorno bipolar de tipo I. Además, está autorizado en la Unión Europea para el tratamiento de la esquizofrenia (Plan de seguridad de Latuda de EMA, 2014; Ficha técnica de Latuda, 2015).

El inicio del tratamiento con lurasidona se recomienda con una dosis de 37 mg/día para ir aumentándola paulatinamente hasta un máximo de 148 mg/día. En caso de insuficiencia renal e insuficiencia hepática moderada e recomienda el inicio con 18.5 mg y no más de 74 mg/día. En caso de insuficiencia hepática severa el límite se sitúa en 37.5 mg /día (Plan de seguridad de Latuda, 2014; Ficha técnica de Latuda, 2015).

En cuanto al perfil de seguridad de lurasidona, está contraindicada su administración concomitante con inhibidores e inductores potentes del citocromo P450 isoenzima CYP3A4 y en supuestos de hipersensibilidad. Con respecto a embarazo está clasificada como de categoría B (Micromedex [base de datos], 2014). Con respecto a los efectos adversos lurasidona puede provocar ansiedad, agitación y somnolencia y otras reacciones adversas derivadas del bloqueo dopaminérgico D₂ tales como acatisia, discinesia, distonía, discinesia tardía, hiperprolactinemia o síndrome neuroléptico maligno. También puede producir hipotensión ortostática, insomnio y efectos adversos gastrointestinales (Micromedex [base de datos], 2014).

Asimismo, se recomienda la toma de precauciones en pacientes con manía o con posibilidad de convulsiones en los que existe un riesgo aumentado. Con respecto a otras

reacciones adversas graves se recomienda la toma de precauciones por tratarse de efectos adversos observados en tratamientos con otros fármacos antipsicóticos atípicos y especialmente para las posibilidades de: cambios metabólicos tales como hiperglucemia, dislipidemia o ganancia de peso; de eventos cerebrovasculares isquémicos, de los cuales existe un riesgo demostrado en ancianos con demencia en tratamiento con antipsicóticos atípicos, condiciones estas en las que se ha demostrado además un aumento de la tasa de mortalidad (debe recordarse que lurasidona no está aprobada para el tratamiento de psicosis asociada a demencia); desregulación de la temperatura corporal; y agranulocitosis, leucopenia y neutropenia (Plan de seguridad de Latuda de EMA, 2014; Micromedex [base de datos], 2014).

En cuanto a eficacia clínica de lurasidona se han realizado varios ensayos clínicos de eficacia en el tratamiento de la esquizofrenia (**Fig. 3**) tenidos en cuenta para su aprobación inicial (Micromedex [base de datos], 2014). Con respecto a la eficacia en el tratamiento agudo lurasidona se comparó frente a ziprasidona mediante un ensayo doble ciego, prospectivo y de tres semanas, siendo los resultados similares para ambos fármacos en cuanto a eficacia en el tratamiento de la esquizofrenia aguda (puntuación en escala de síndromes positivos y negativos, PANSS; puntuación en la Escala de Calgary para depresión en esquizofrenia, CDSS; en la puntuación de severidad e impresiones globales clínicas, CGI-S), cambios en parámetros metabólicos o cardíacos, tasa de efectos adversos severos o tasas de discontinuación (Potkin y col., 2011). También obtuvo resultados comparables a olanzapina en cuanto a eficacia y perfil de reacciones adversas en el tratamiento de esquizofrenia aguda en otro ensayo prospectivo multicéntrico, doble ciego y controlado con placebo (Meltzer y col., 2011a). Lurasidona se demostró no inferior a quetiapina en cuanto a recaída tras un tratamiento de doce meses en estudios controlados con placebo en pacientes con esquizofrenia crónica que mostraron respuesta al tratamiento inicial de seis semanas con uno u otro fármaco. El tratamiento con lurasidona tuvo una tasa de hospitalización menor con respecto al tratamiento con quetiapina. La tasa de reacciones adversas extrapiramidales fue superior para lurasidona y ambos tratamientos presentaron una ganancia de peso similar (Loebel y col., 2013). El estudio comparativo de lurasidona y ziprasidona demostró un perfil similar de efectos adversos y de eficacia para ambos en el tratamiento de esquizofrenia crónica y estable y de trastornos esquizoafectivos (Potkin y col., 2011). La indicación de lurasidona para el tratamiento de la fase depresiva del trastorno

bipolar I en adultos en monoterapia o como terapia complementaria a litio o valproico viene avalada, entre otros, por dos estudios con pacientes con episodio depresivo mayor asociado a trastorno bipolar I sin psicosis y seis semanas de tratamiento con lurasidona en monoterapia o como terapia complementaria a litio o valproico frente a placebo. Se demostró mejoría en las puntuaciones en la escala de depresión Montgomery-Asberg (MADRS) y en la escala de impresión global clínica y de severidad de la enfermedad bipolar (CGI-BP-S) (Micromedex [base de datos], 2014). En la **Fig. 3** se enumeran parte de los ensayos clínicos con lurasidona en el tratamiento agudo y crónico de la esquizofrenia realizados (Harvey, 2015).

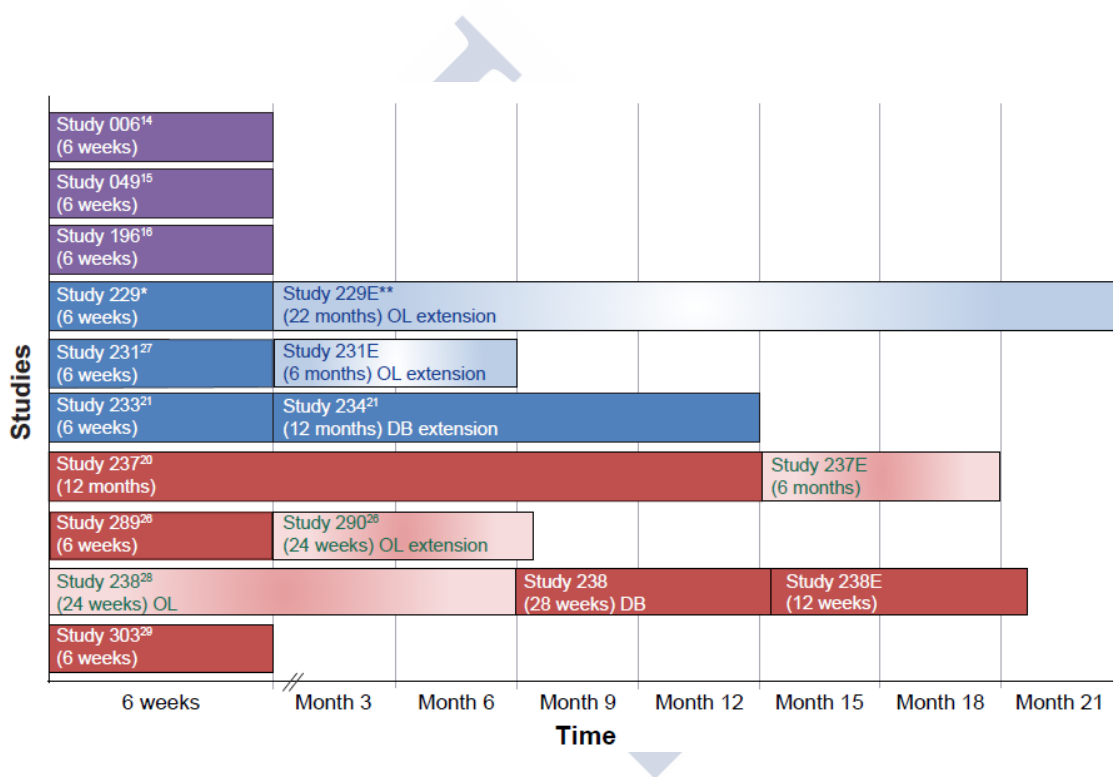


Fig. 3. Resumen de los ensayos clínicos con lurasidona para el tratamiento de la esquizofrenia. Los estudios 006, 049 y 196 son estudios de eficacia en el tratamiento agudo (respectivamente, Ogasa y col., 2013; Nakamura y col., 2009; Nasrallah y col., 2013). Los estudios 233, 237, 289 y 238 son estudios de seguridad y eficacia en el tratamiento de la esquizofrenia a largo plazo (respectivamente, Loebel y col., 2013; Citrome y col., 2012; Citrome y col., 2014 y Tandon y col., 2014). OL: Estudio abierto; DB: Doble ciego. (Tomado de Harvey, 2015).

1.1.2.2.4. *Otras patologías en las que están indicados los fármacos antipsicóticos o éstos tienen potencial utilidad*

Con respecto a otras indicaciones de los antipsicóticos de primera generación distintas de esquizofrenia, destacar que las benzamidas tienen interés en el tratamiento de neurosis, vértigo, depresión (sulpirida), el síndrome de abstinencia alcohólica y trastornos del movimiento (tiaprida). Otros antipsicóticos (clásicos) pueden tener aplicación en patologías concretas y éstos se adecúan por poseer un perfil farmacológico y de comportamiento clínico específico, aunque pueden en la práctica estar relegados por otros fármacos. Así, haloperidol está indicado en el tratamiento de agitación psicomotora y determinados movimientos anormales (tics y corea). Levomepromazina (fenotiazina con cadena alifática) se utiliza en estados de agitación psicomotriz, y además en ansiedad y depresión. Perfenazina (piperazina) está indicada en depresión mayor con componente psicótico y periciazina (piperidina) en episodios agudos de neurosis. Droperidol se utiliza para prevenir náuseas y vómitos provocados por la anestesia. Pimozida (difenilbutilpiperidina) está indicada en ansiedad (Antipsicóticos, Catálogo CGCOF, 2015).

De otras indicaciones de los antipsicóticos de segunda generación distintas de esquizofrenia, destacar su eficacia en la reducción de episodios de manía y depresivos y en la disminución de recaídas, en monoterapia (aripiprazol y olanzapina) o como tratamientos complementarios (risperidona y quetiapina) en el trastorno bipolar (Vieta y col., 2014; Goodwin y col., 2009). Los anteriormente citados se han propuesto como de primera línea (Yatham, 2009). Quetiapina y clotiapina se utilizan en depresión. La primera tanto en fases depresivas del trastorno bipolar (Yatham y col., 2009; estudios BOLDER I y II y EMBOLDEN I y II: para los dos últimos Young y col., 2010; McElroy y col., 2010) (al igual que lurasidona) como en trastorno depresivo mayor (indicación). En general en el tratamiento de la depresión unipolar utilizados como terapia complementaria con antidepresivos el aumento de la tasa de remisión es modesto (Nelson y Papakostas, 2009), como en el tratamiento adicional del trastorno depresivo mayor sin respuesta. Olanzapina, risperidona y ziprasidona son eficaces y de primera línea en el control de los síntomas de agitación en esquizofrenia y manía (Rocca y col., 2006).

Necesidad terapéutica en esquizofrenia: énfasis en la sintomatología negativa y cognitiva

Además de ser necesario mejorar la tolerabilidad de los fármacos antipsicóticos y su perfil de seguridad, se reconoce una importante necesidad terapéutica en relación a la sintomatología negativa y cognitiva de la esquizofrenia. En este sentido, son potenciales dianas para el tratamiento de los síntomas cognitivos los inhibidores de acetilcolinesterasa, los receptores nicotínicos α_7 y muscarínicos M_1 . También el sitio de unión de glicina del receptor NMDA y el transportador de glicina, los receptores dopaminérgicos D_1 y D_4 y los adrenérgicos α_2 . Pero el mayor interés en el tratamiento de síntomas cognitivos asociados a esquizofrenia lo presentan los receptores de serotonina modulados por los antipsicóticos atípicos, tales como 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ (Gray y Roth, 2007). Especialmente el receptor 5-HT_{1A} que se localiza en hipocampo, áreas cortico límbicas y neuronas del rafe. Son de interés los agonistas parciales y su modulación de la actividad de neuronas piramidales (mejoría cognitiva en animales) y los antagonistas, para los que también se ha descrito mejoría cognitiva probablemente bloqueando autorreceptores del rafe (Gray y Roth, 2007).

Se han generado modelos animales de sintomatología cognitiva de esquizofrenia mediante la administración subcrónica de antagonistas glutamatérgicos NMDA tales como fenciclidina (PCP) y MK-801. Este modelo genera ratones deficientes en el reconocimiento de objetos nuevos (NOR). Se cree que puede ser un modelo bastante representativo de los déficits de memoria declarativa de pacientes esquizofrénicos (Meltzer y col., 2011; Young y col., 2009). Se ha visto que en general los antipsicóticos atípicos son capaces de revertir este déficit. Existe evidencia de que la serotonina puede estar implicada tanto en la generación del déficit cognitivo mediante antagonistas NMDA como en la acción de los antipsicóticos atípicos para revertirlo (Meltzer y col., 2011; Horiguchi y col., 2012; Horiguchi y col., 2013).

Existe la teoría de que los déficits en la liberación de dopamina en la corteza e hipocampo están relacionados con los déficits cognitivos. Está bastante aceptado que los antipsicóticos atípicos aumentan la liberación de dopamina en el córtex. Se considera que los antipsicóticos atípicos incrementan la liberación de dopamina en el córtex e hipocampo debido a su agonismo (parcial) 5-HT_{1A} y el antagonismo 5-HT_{2A} (Ichikawa y col, 2001;

Meltzer y col., 2003; Huang y col., 2012). De hecho, los agonistas 5-HT_{1A} son eficaces en la reversión de los déficits en el test NOR y también en otros modelos de administración aguda de antagonistas NMDA (Meltzer y col., 2011). En cuanto al receptor 5-HT_{2A} su antagonismo o agonismo inverso en general es insuficiente para producir mejorías en el test de reconocimiento de objetos nuevos por si solos (Vanover y col., 2006). Su acción procognitiva en determinadas condiciones podría estar relacionada con la capacidad de modular la actividad de vías glutamatérgicas (Meltzer y col., 2011). El receptor 5-HT_{2C} es una potencial diana para el tratamiento de los déficits cognitivos, aunque existe un cierto desconocimiento de la actividad real de los antipsicóticos atípicos en este receptor y de su papel en los déficits cognitivos inducidos por antagonistas NMDA ejercido por sus agonistas y antagonistas y por su actividad constitutiva (Meltzer y col., 2011a).

El cuanto al receptor 5-HT₇, decir que ha sido recientemente objeto de estudio en animales su implicación en procesos de aprendizaje y memoria (Roberts y Hedlund, 2012; revisión). Los hallazgos encontrados en experimentación con ratones carentes del gen 5-HT₇ (5-HT₇^{-/-}; 5-HT₇ “*knock-out*”) son la presencia de un peor rendimiento en ensayos de nueva localización (mayor indiferencia a los cambios espaciales) con respecto al ratón normal, indicios de comportamiento egocéntrico en la prueba del laberinto de Maze (este comportamiento aloecéntrico se considera dependiente del estriado, un área con baja expresión de este receptor), un condicionamiento al miedo contextual deteriorado e indicios de empeoramiento en aprendizaje instrumental con componente contextual (Roberts y Hedlund, 2009). Sin embargo, la memoria de referencia mejora mediante la administración del antagonista SB269970.

Otros estudios han encontrado que el antagonismo del receptor 5-HT₇ produce mejorías en el test NOR, concretamente se ha demostrado para los antagonistas 5-HT₇ SB269970, lurasidona y amisulprida (Abbas y col., 2009; Ishibashi y col., 2010). AS-19, un agonista del receptor 5-HT₇, bloquea la mejoría producida por estos dos últimos. Sin embargo, para este último ensayo existen resultados que indican que no existe diferencia (Roberts y Hedlund, 2012).

En cuanto a ensayos clínicos en pacientes con esquizofrenia destacar el metaanálisis de Woodward y col. (2005), que ha determinado que los antipsicóticos atípicos producen una mejoría de la función cognitiva, concretamente de la memoria declarativa.

1.2. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRS) OBJETO DE ESTUDIO, RELEVANTES EN LA PATOLOGÍA Y LA TERAPÉUTICA DE LA ESQUIZOFRENIA

1.2.1. Introducción a los receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) están formados por una sola cadena polipeptídica constituida por hasta 1100 aminoácidos. Todos los miembros de esta superfamilia de proteínas de membrana comparten una estructura de 7 dominios α -hélice transmembrana hidrofóbicos (segmentos TM), un dominio extracelular amino-terminal y un dominio intracelular carboxi-terminal. Esta estructura general se confirmó con la determinación de la estructura cristalina de un GPCR en el año 2000, la rodopsina bovina (**Fig. 4**) (Palczewski y col., 2000).

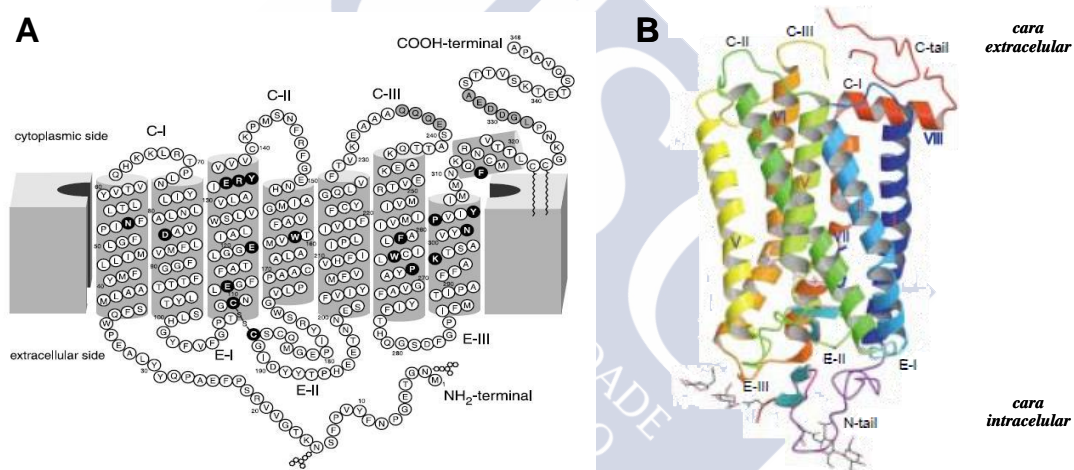


Fig. 4. Estructura de la rodopsina bovina, con los 3 bucles extracelulares (E-I, E-II y E-III), el extremo N-terminal (extracelular), los 3 bucles citoplasmáticos (C-I, C-II, C-III) y el extremo C-terminal (citoplasmático). A) Modelo bidimensional (Palczewski y col., 2000); B) modelo tridimensional. (Tomado de Okada y Palczewski, 2001).

Los dominios que presentan mayor variabilidad estructural dentro de la familia de los GPCRs son el extremo carboxi-terminal, los bucles de unión entre los segmentos transmembrana intra- y extracelulares y en particular el espacio entre los segmentos TM5–TM6 (tercer bucle intracelular, IL3) y el extremo amino-terminal. La longitud del extremo amino-terminal es relativamente pequeña (10-50 aminoácidos) para receptores de

monoaminas y receptores peptídicos, y más larga (300-600 aminoácidos) para receptores de hormonas glicoproteicas. Una clasificación de los GPCRs en base a la homología de las secuencias (Bockaert y Pin, 1999) agrupa dentro de la clase A o de tipo rodopsina, a GPCRs de aminas biógenas como la serotonina, los cuales se caracterizan por tener un dominio amino-terminal relativamente corto. Dentro de esta clase A pertenecen a la subclase **1a** los receptores β -adrenérgicos, los receptores de serotonina (a excepción del receptor 5-HT₃) y de dopamina, y entre ellos los receptores estudiados en este trabajo como 5-HT_{2A}, 5-HT₇ y D₂. Se caracterizan por poseer el sitio de unión de ligandos localizado en un bolsillo formado por las α -hélices en la zona transmembrana.

La clasificación GRAFS de GPCRs (Fredriksson y col., 2003) clasifica los GPCRs humanos en 5 familias en base a criterios filogenéticos: Glutamato, Rodopsina, Adhesión, *Frizzled/taste2* y Secretina (**Fig. 5**), siendo la familia rodopsina la mayor. A ella pertenecerían los receptores para aminas biógenas antes citados, cuyos ligandos de pequeño tamaño se unen preferentemente a zonas entre las regiones transmembrana, así como receptores para glicoproteínas (como la hormona luteinizante (LH) o la hormona estimulante del folículo (FSH)) cuyo sitio de unión se encuentra en el extremo N-terminal del receptor (Morris y col., 2008). Se han descrito 4 grupos dentro de esta familia: α , β , γ y δ . Los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT₇, D₂ y A_{2A} pertenecen al grupo α (**Fig. 6**).

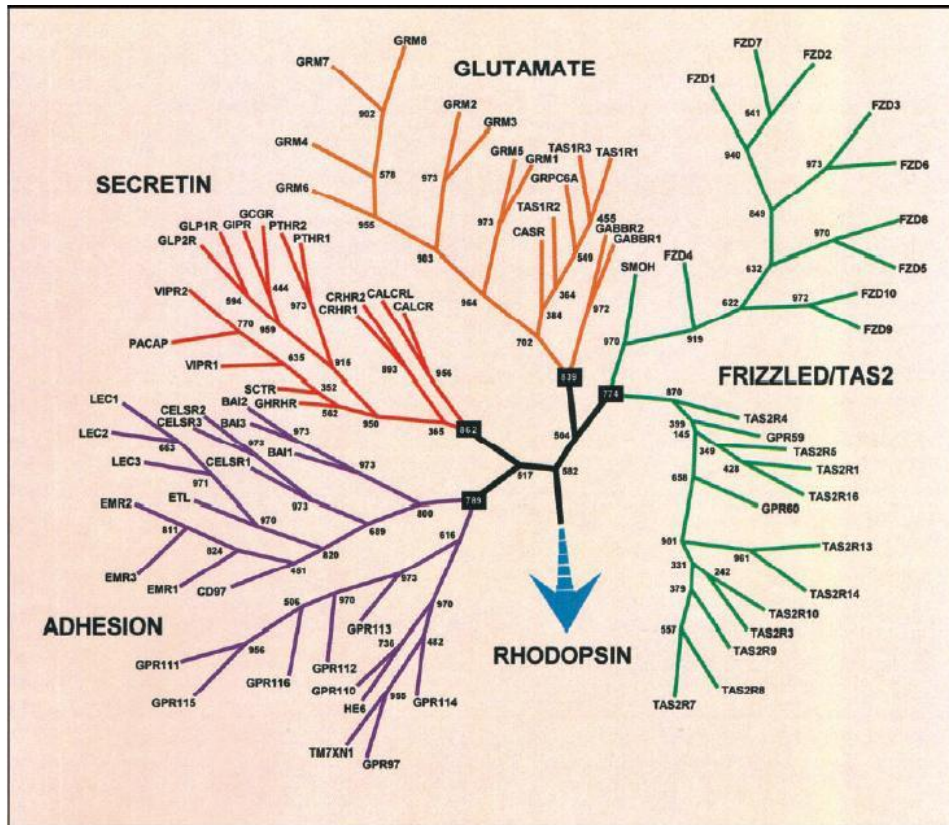


Fig. 5. Representación de la relación filogenética entre los GPCRs del genoma humano (Fredriksson y col., 2003).

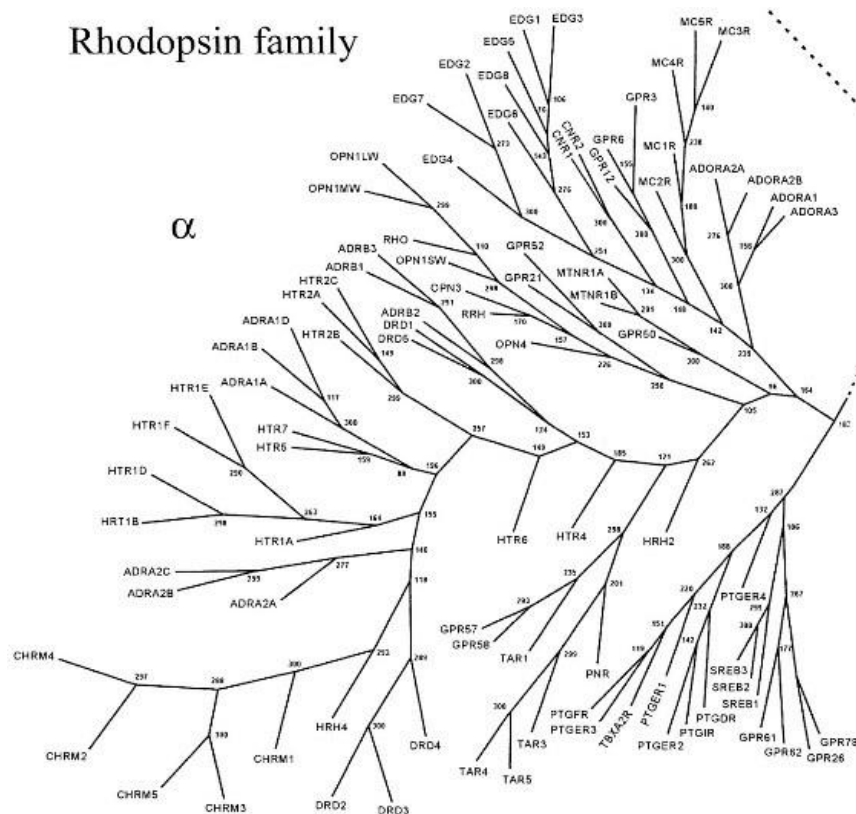


Fig. 6. Representación de la relación filogenética entre los GPCRs de los grupos α y β de la familia rodopsina del genoma humano. Todos los receptores estudiados en este trabajo pertenecen al grupo α (Fredriksson y col., 2003).

1.2.1.1. El ciclo de vida de un GPCR

En términos generales se puede describir un ciclo de vida para GPCRs (**Fig. 7**) que constaría de las siguientes fases (Terrillon y Bouvier, 2004):

1.-*Síntesis* en el retículo endoplásmico y *transporte* a la membrana plasmática. La inhibición de la síntesis de GPCR mediante la inhibición de la transcripción génica constituye un mecanismo de regulación de la actividad de estos receptores (Sallés y Flórez, 2014).

2.- *Activación*. Existe un acoplamiento entre receptor-proteína G-sistema efector que es el que define la respuesta bioquímica a nivel de tipo celular y tisular específica. Cada receptor puede señalizar a través de varias proteínas G y cada una de estas puede activar o inhibir distintos sistemas effectores. Con respecto a las proteínas G heterotriméricas, se recuerda que están formadas por tres subunidades: α , β y γ ; formando las dos últimas un

dímero. La subunidad α contiene el sitio de unión de GDP y GTP y posee actividad GTPasa. Se han descrito 23 formas de subunidades α distintas, 7 de subunidades β y 12 de subunidades γ . Los subtipos de subunidad α se agrupan en cuatro subfamilias α_s , $\alpha_{i/o}$, α_q y α_{12} que dan nombre a las proteínas G heterotriméricas (Sallés y Flórez, 2014).

La proteína heterotrimérica permanece unida en estado inactivo con el GDP unido a la subunidad α . El proceso de activación provoca que el GDP se intercambie por GTP de forma dependiente de Mg^{+2} . Esto provoca la disociación de la subunidad α del dímero $\beta\gamma$, y ambos actúan sobre los sistemas efectores hasta que la actividad GTPasa de la subunidad α provoca la hidrólisis del GTP a GDP, tras lo que la subunidad α se reasocia al dímero $\beta\gamma$ (Sallés y Flórez, 2014).

Son sistemas efectores (y su mediador) de las proteínas G la adenilil ciclasa (síntesis de AMPc), la fosfolipasa C- β (hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato PIP_2 y liberación de inositol-1,4,5-trifosfato IP_3 y diacilglicerol DAG), la fosfolipasa A_2 (liberación de ácido araquidónico), fosfolipasa D (producción de ácido fosfatídico), las fosfodiesterasas (PDE), las proteínas cinasas RhoA/Rho o las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAP cinasa). El dímero $\beta\gamma$ puede señalar a través de sistemas efectores como ciertas formas de fosfolipasa C- β , inhibir ciertas formas de adenilil ciclasa y contribuir a la activación de cinasas como las de receptores acoplados a proteínas G (GRK) o MAP cinasas, entre otros efectores, o regular canales iónicos modulados por dímeros $\beta\gamma$ (GIRK).

3.-Desensibilización. En términos generales, los GPCRs se pueden desensibilizar tras su exposición a agonistas, aunque la velocidad y extensión del proceso varía para cada receptor y tipo celular. El proceso conduce a un desacoplamiento funcional y posiblemente físico entre el receptor y las proteínas G. Las quinasas dependientes de segundos mensajeros (PKA, PKC) son responsables de los procesos denominados desensibilización heteróloga, mientras que las GRKs son responsables de la desensibilización homóloga de estos receptores. La fosforilación mediada por GRKs es en general insuficiente para una desensibilización total del receptor, requiriéndose para ello el reclutamiento de β -arrestinas, que interaccionan con el receptor fosforilado interfiriendo con su acoplamiento a las proteínas G.

4.-Internalización. Numerosos GPCRs internalizan en un proceso que implica la fosforilación del receptor por GRKs, su posterior unión de β -arrestinas 1 y/o 2 y la

formación de vesículas de clatrina, en un proceso particularmente bien establecido para el caso del receptor β_2 -adrenérgico (Luttrell y col., 2001) aunque no necesariamente común a todos los GPCRs.

5.-Degradación y/o reciclaje. La facilitación de los mecanismos de degradación constituye una forma de regulación de la actividad de GPCRs, mediante la disminución del número de receptores complementaria a la inhibición de la síntesis. Ambas producen una *regulación a la baja* del número de receptores, un proceso que se desarrolla en el intervalo de horas (Sallés y Flórez, 2014).

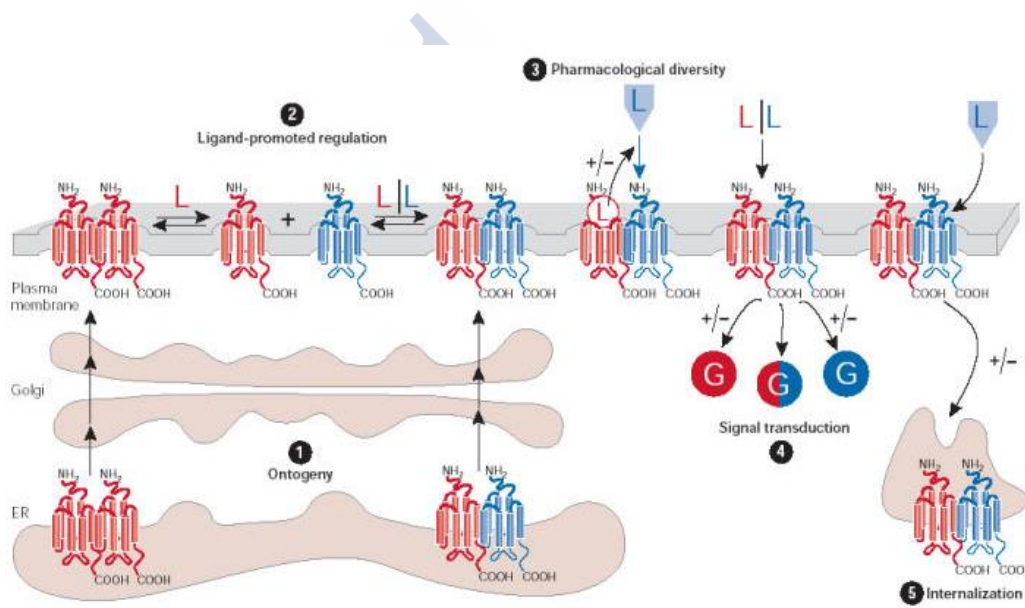


Fig. 7. Ciclo de vida de un GPCR. (1) Los receptores sintetizados por la célula alcanzan la membrana plasmática. (2, 3) En la membrana interaccionan con diversos ligandos agonistas y antagonistas. (4) Eso desencadena la transducción de una serie de señales específicas al interior de la célula. (5) Simultáneamente, la expresión y la función de los GPCRs en la membrana plasmática están sometidas a una continua regulación por mecanismos de desensibilización, fosforilación, interacción con otras proteínas u otros GPCRs, internalización, reciclaje o degradación. Estos mecanismos operan tanto a nivel basal como a consecuencia de la interacción del receptor con sus ligandos. (Tomado de Terrillon y Bouvier, 2004).

1.2.1.2. Dimerización y oligomerización de GPCRs

En la última década se han realizado numerosos estudios que corroboran que los GPCR son capaces de formar dímeros u oligómeros, de naturaleza tanto homo- como heteromérica. Estas crecientes evidencias han llevado a proponer una terminología recomendada actualmente para receptores cuyas unidades funcionales están formadas por más de una subunidad y entre los que habría ejemplos de GPCRs (Ferré y col., 2009). Los términos receptores heteroméricos y receptores homoméricos hacen referencia a complejos (diméricos u oligoméricos) cuya unidad mínima funcional está formada por 2 o más subunidades (diferentes o iguales, respectivamente) que no serían funcionales individualmente (**Fig. 8**). Un ejemplo de este tipo entre los GPCRs sería el receptor metabotrópico del ácido γ -amino-butírico GABA_B, cuya mínima unidad funcional está necesariamente formada por dos subunidades de proteínas con 7 dominios transmembrana (GABA_{B1} y GABA_{B2}), que no resultan funcionales como GPCR por sí mismas. Los términos heterómero u homómero receptorial se refieren a complejos macromoleculares compuestos por dos (dímero) o más (oligómero) unidades receptoriales que son funcionales por sí mismas. Dan lugar a un complejo con propiedades farmacológicas de algún modo distinguibles de las propiedades que presentan individualmente las unidades que lo componen, en aspectos como unión de ligandos, regulación del heterómero o vías de señalización.

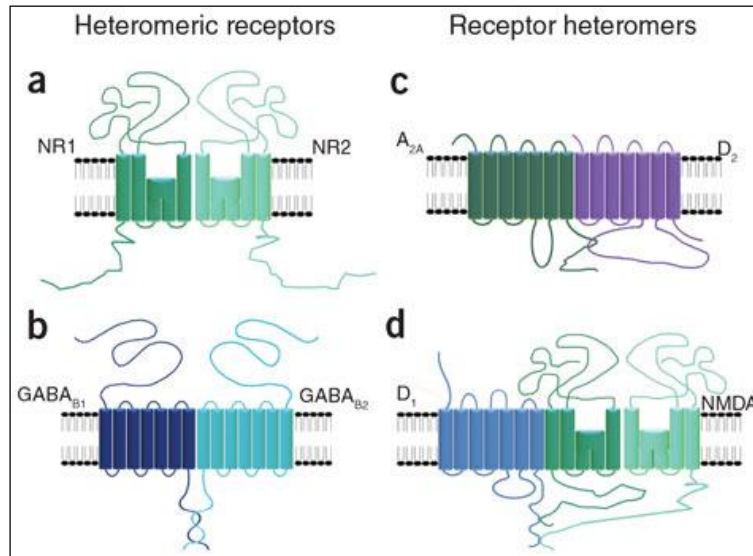


Fig. 8. Ejemplos de receptores heteroméricos y heterómeros receptoriales: (a) receptor heteromérico ionotrópico NMDA de glutamato; (b) receptor heteromérico GABA_B (de tipo GPCR); (c) heterómero A_{2A}-D₂ (unidades funcionales de tipo GPCR); (d) heterómero D₁-NMDA (combina una unidad de tipo GPCR y una unidad de tipo receptor ionotrópico). (Tomado de Ferré y col., 2009).

La **dimerización** es un proceso descrito para numerosos GPCRs en las dos últimas décadas; a la vez se ha podido demostrar la funcionalidad de monómeros de GPCRs individuales (Whorton y col., 2007; Whorton y col., 2008; Kuszak y col., 2009; Bayburt y col., 2011; Damian y col., 2012). Por ello, la relevancia fisiológica y consecuencias funcionales de la dimerización y oligomerización de GPCRs son objeto de estudio de forma muy activa actualmente. Que un determinado GPCR forme homo- o heterooligómeros posibilita la aparición de una farmacología distinta que puede presentar el complejo respecto a las unidades mínimas funcionales (Schwartz y Holst, 2007).

Se ha descrito la homodimerización de los receptores 5-HT_{2A} (Brea y col., 2009), 5-HT₇ (Teitler y col., 2010; Smith y col., 2011), D₂ (Lane y col., 2014) y A_{2A} (Canals y col., 2004; Fanelli y col., 2011). Con respecto a la heterodimerización, esta se ha descrito para las siguientes parejas de receptores: A₁-A_{2A} (Ferré y col., 2008); A_{2A}-D₂ (Canals y col., 2003); 5-HT_{2A}-mGlu2 (González-Maeso y col., 2008); 5-HT_{2A}-D₂ (Lukasiewicz y col., 2010) y D₁-D₂ (George y col., 2014) entre otros.

Se propone que la dimerización es relevante en los distintos aspectos del ciclo de vida de un GPCR. La dimerización juega un papel esencial en la maduración del receptor y permite un correcto transporte de los receptores desde el retículo endoplasmático a la superficie celular. La dimerización en el retículo es determinante en el caso del receptor GABA_B (subunidades GABA_{B1} y GABA_{B2}) para su transporte a la membrana plasmática. (Terrillon y Bouvier, 2004). En algunos casos, la derivación del receptor internalizado hacia una ruta de degradación y/o reciclaje puede verse regulada por dimerización. Así, recientemente se ha demostrado que el heterodímero formado por el protómero receptor canabinoide CB₁ y el protómero receptor de orexina 1 presenta una localización predominante en endosomas. El tratamiento con un antagonista de cualquiera de los protómeros provoca que cambie su localización a la membrana (Ellis y col., 2006).

1.2.1.3. Cambios conformacionales en GPCRs y selectividad funcional

Los GPCRs son moléculas dinámicas en las que ocurren fluctuaciones estructurales rápidas y pequeñas. La activación de un GPCR por unión de agonistas conlleva el paso de un estado basal a otro activo, teniendo lugar una serie de cambios conformacionales. El estado basal de un GPCR, esto es, el estado del receptor en ausencia del ligando, se estabiliza por la contribución de los bucles intra- y extracelulares, que contribuyen a mantener la estructura del receptor y de interacciones no covalentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos de los dominios transmembrana (TM) (Kobilka, 2007). La unión de ligandos induce cambios conformacionales y en las interacciones que estabilizan el estado inactivo, de manera que se estabiliza una nueva conformación del receptor (Nygaard y col., 2013).

A modo de ejemplo, en la estructura cristalina de la rodopsina determinada por primera vez en el año 2000 (Palczewski y col., 2000), que corresponde al estado inactivo del receptor, se constata la estabilización de este estado mediante la interacción del 11-cis-retinal, unido covalentemente en el sitio de unión del receptor, con residuos específicos en los dominios TM3, 6 y 7 del receptor. El motivo Asp/Glu-Arg-Tyr/Trp (motivo “DRY”) en el segmento citoplasmático final de TM3 también contribuye a la estabilidad de la conformación inactiva. Este motivo es común entre GPCRs de la clase A y su aminoácido Arg3.50 interacciona en rodopsina con Glu6.30 en el extremo citoplasmático de TM6, formando una interacción conocida como “*ionic lock*”, que estabiliza al receptor en el estado inactivo (basal) (Meng y Bourne, 2001; Katritch y col., 2013). Así, se ha comprobado que

mutaciones que rompen las interacciones moleculares estabilizadoras incrementan la flexibilidad del receptor y el movimiento de los TM, lo que incrementa a su vez la probabilidad de que el receptor pueda adoptar una conformación activa en ausencia de un agonista, mostrando actividad constitutiva. Mutaciones en los residuos implicados en el “*ionic lock*” incrementan la actividad basal en varios GPCRs, incluyendo el β_2 -adrenérgico, el H₂ de histamina, el α_{1B} -adrenérgico o el AT₁ de angiotensina (Kobilka y Deupi, 2007).

Otras evidencias experimentales indican que Glu134 (3.49) del motivo “DRY” se protona durante la activación de la rodopsina, sugiriendo que la rotura de esta red de interacciones es parte del proceso normal de activación del receptor, de manera que se acepta que, durante la activación de los GPCRs, como mecanismo general variaría la posición relativa de TM3 y TM6, rompiéndose el “*ionic lock*”, entre otros cambios conformacionales (Meng y Bourne, 2001).

A partir del año 2007, con la publicación de varias estructuras cristalográficas ha podido saberse que en otros GPCRs el papel estabilizador del “*ionic lock*” podría ser más limitado ya que está ausente en algunas estructuras de GPCRs como el receptor β_1 -adrenérgico (en alguna estructura unido antagonista) y el aminoácido con un grupo carboxilo en 6.30 sólo se conserva en un 30% de los GPCRs (Katritch y col., 2013). Otra interacción relacionada con el motivo DRY, un enlace iónico entre Arg3.50-Asp3.49, aparece en todas las estructuras inactivas cristalizadas (Katritch y col., 2013) y con respecto a las activas el enlace solamente no aparece en rodopsina y el receptor β_2 -adrenérgico. En estos dos receptores en estado activo Arg3.50 experimenta un cambio en la conformación rotamérica e interactúa con la hélice C-terminal de la subunidad G α .

Adicionalmente, se ha propuesto la existencia de otro cambio conformacional asociado a la activación de GPCRs, conocido como “*rotamer toggle switch*”, para los receptores pertenecientes a la familia de la rodopsina (Kobilka y Deupi, 2007). Este mecanismo implica un cambio en la curvatura del TM6 a nivel del residuo prolina más altamente conservado entre los GPCRs en esta hélice y una rotación de la hélice sobre su eje. Estos movimientos transmembrana permitirían la exposición de dominios en el lado citosólico (en IL3) que conducirían la señalización a través de proteínas G heterotriméricas (Meng y Bourne, 2001). El reordenamiento de las hélices 3 y 6 durante la activación del receptor ha sido cuantificado mediante técnicas biofísicas tales como FRET en diferentes

GPCRs de las clases 1 y 2 (Vilardaga y col., 2003; Hoffmann y col., 2005; Lohse y col., 2014). La comparación de las estructuras de cristalización publicadas del receptor β_2 -adrenérgico también permite comprobar el movimiento de TM6 (**Fig. 9**). Experimentos biofísicos realizados con el receptor β_2 -adrenérgico sugieren que estos dos mecanismos mencionados, la ruptura del “*ionic lock*” y el “*rotamer toggle switch*”, se activan independientemente, siendo los propios agonistas los que difieren en la capacidad de promover uno u otro. Además, las evidencias indican que se requiere más de un cambio conformacional y la rotura de diversas interacciones para lograr el estado completamente activo del receptor (Kobilka y Deupi, 2007). Relacionado con el aminoácido Pro comentado y pertenecientes ambos al motivo Cys-Trp-x-Pro (“CWxP”) de TM6, el aminoácido Trp6.48 experimenta un cambio rotamérico en algunas estructuras, y aunque fue inicialmente relacionado con activación en el receptor β_2 -adrenérgico, se ha visto en estructuras cristalográficas que no se correlaciona con el estado de activación del receptor (Katritch y col., 2013; Manglik y Kobilka, 2014).



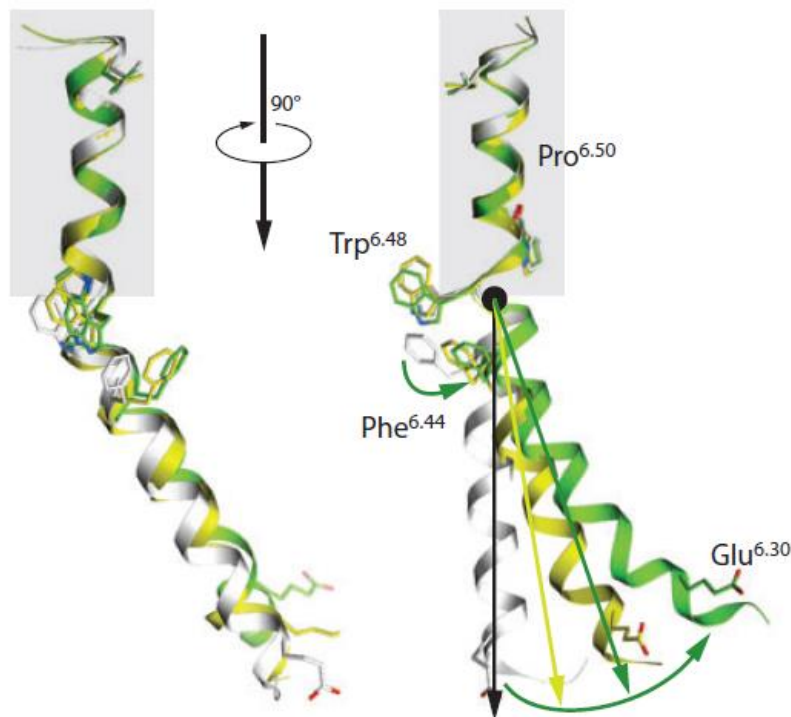


Fig. 9. Cambios conformacionales en TM6 tras la activación del receptor β_2 -adrenérgico. El segmento TM6 experimenta un movimiento hacia afuera y rotación asociados a la activación del receptor (“*rotamer toggle switch*”). Se representan la conformación de TM6 en las estructuras cristalográficas del receptor β_2 -adrenérgico inactivo (gris, código PDB: 2RH1), activo unido a anticuerpo y de forma débil a proteína G (amarillo; código PDB: 3POG) y activo unido de forma completa a proteína G (verde; código PDB: 3SN6). (Tomado de Katritch y col, 2013).

Durante el proceso de activación hay un desplazamiento del segmento TM7 hacia el interior del GPCR en dirección a su eje, especialmente acusado en rodopsina y A_{2A} . El motivo “NPxxY” (Asn-Pro-x-x-Tyr) se localiza en TM7 cerca del extremo C-terminal y contiene el residuo Tyr^{7.53}. Éste experimenta un cambio en su conformación rotamérica de manera que pasa de estar dirigido hacia TM1, 2 o 8 (visto en todas las estructuras de cristalización inactivas) a apuntar hacia el eje del receptor en todas las estructuras cristalizadas de GPCRs en estado activo (Katritch y col., 2013).

Como consecuencia de la unión de distintos ligandos a GPCRs, pueden tener lugar cambios conformacionales intermedios o distintos de la estructura del receptor y éstos a su vez relacionarse con distintas vías de activación. En el caso del receptor β_2 -adrenérgico la

unión de un ligando al receptor puede estabilizar una conformación que no se corresponde con la conformación completamente activa del receptor unido a proteínas G_s . De hecho, la unión de agonistas al receptor β_2 -adrenérgico que activan la vía de señalización mediante arrestinas provocan un cambio conformacional limitado (Liu y col., 2012). En relación con estructuras cristalográficas algún autor considera que las estructuras disponibles que faciliten información acerca de la interacción con proteínas G son escasas. Se espera que futuras estructuras expliquen la selectividad por determinadas proteínas G, selectividad que podría estar dirigida por ligando (Katritch y col., 2013).

La unión de agonistas a un GPCR se relaciona con heterogeneidad conformacional que es importante para permitir el acoplamiento a distintas proteínas de señalización (Nygaard y col., 2013). Así, un ligando A promovería o estabilizaría una conformación del receptor ligeramente diferente a la estabilizada por un ligando B, lo que constituiría una base molecular para la aparición de una farmacología específica para cada uno de los ligandos A y B (**Fig. 10**). En el caso del receptor 5-HT_{2A}, se ha descrito que algunos ligandos como LSD señalización preferencial a través $G_{q/11}$ (Cussac y col., 2008) y del efector PLA₂-AA (Berg y col., 1998) en comparación con otros, que señalizan preferentemente mediante el efector PLC-IP (Berg y col., 1998) y la liberación de Ca^{+2} (Cussac y col., 2008). Para este receptor existen diferencias en la señalización entre ligandos alucinógenos (como DOI) y no alucinógenos, siendo los primeros los únicos que señalizan a través de proteínas G_i , aunque en este caso la potencia de la señalización es dependiente de otros factores como la coexpresión de mGlu2 (aumenta) o la unión de agonistas glutamatérgicos al dímero 5-HT_{2A}-mGlu2 (la inhiben) (González-Maeso y col., 2007; González-Maeso y col., 2008). A esto se le denomina **selectividad funcional** o eficacia colateral (*agonist-directed trafficking of signaling, ligand-directed biased signaling*) (Kenakin, 2007; Kenakin, 2007b; Kenakin, 2013).

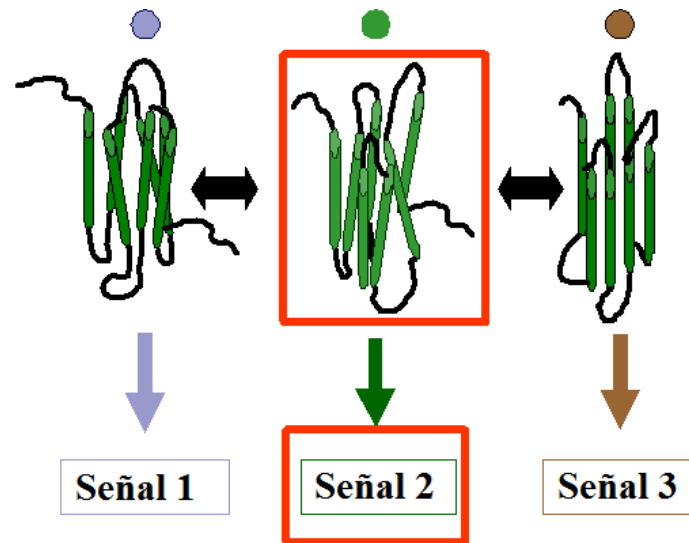


Fig. 10. Selectividad funcional de ligandos de GPCRs. Distintos ligandos de un GPCR pueden promover o estabilizar estados conformacionales diferentes del receptor, con consecuencias funcionales de selectividad funcional (también denominada eficacia colateral o *agonist trafficking*), resultando en comportamientos funcionales selectivos de determinadas rutas de señales.

1.2.1.4. Modulación alostérica en GPCRs

Las características farmacológicas tales como afinidad, potencia o vía de señalización regulada, de un ligando que se une a un GPCR en su sitio ortostérico de unión de ligandos, pueden verse modificadas por la unión de **moduladores alostéricos** a sitios alostéricos del receptor. Este fenómeno de modulación puede darse tanto en sitios localizados en un GPCR monomérico como entre sitios en distintos protómeros de un GPCR dimérico, y afectar tanto a la unión de ligandos como a la señalización del receptor (**Fig. 11**). Así, la dimerización de GPCRs amplía las posibilidades de regulación alostérica, pudiendo darse fenómenos de cooperatividad tanto positiva como negativa entre protómeros (Schwartz y Holst, 2007; Kenakin, 2007a).

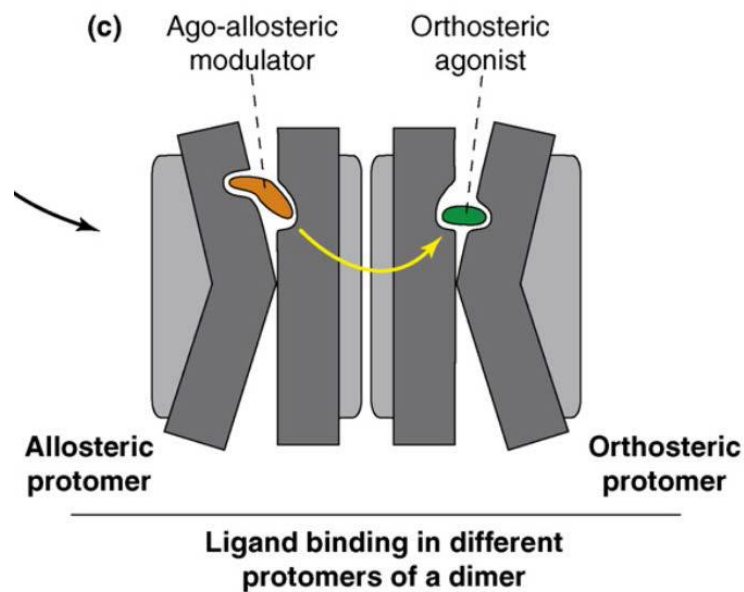


Fig. 11. Representación esquemática del fenómeno de modulación alostérica. Un modulador alostérico unido a un protómero alostérico modifica la afinidad, potencia o vía de señalización del ligando ortostérico unido al segundo protómero ortostérico de un dímero receptorial. (Tomado de Schwartz y Holst, 2007).

Un ejemplo es la existencia de modulación alostérica en el **heterómero** formado por el protómero 5-HT_{2A} y el protómero receptor metabotrópico de glutamato mGlu2 en la corteza somatosensorial humana a nivel de la señalización G_i, actuando los agonistas de mGlu2 como moduladores alostéricos negativos de la señalización de determinados ligandos alucinógenos (González-Maeso y col, 2008).

El uso terapéutico de moduladores alostéricos presenta, en cuanto a beneficios terapéuticos, potenciales ventajas sobre los ortostéricos tales como riesgo de sobredosificación reducido, mantenimiento del patrón fisiológico de actividad receptorial ya que su actividad es dependiente del ligando endógeno, o potencial de desarrollo de ligandos con alta selectividad por subtipos de receptores debido a la especificidad de subtipos de los sitios alostéricos (Sallés y Flórez, 2013).

1.2.2. GPCRs implicados en la fisiopatología de la esquizofrenia

1.2.2.1. El receptor 5-HT_{2A} de serotonina

El subtipo de receptores de serotonina 5-HT_{2A} pertenece a la Clase A de la clasificación de homología y al grupo α de la familia rodopsina, y su tamaño es de 471 aminoácidos. Su gen (*HTR2A*) se encuentra en el *locus* 13q14-q21. Se expresa de forma amplia en el sistema nervioso central (SNC). Es el receptor de serotonina más abundante en las neuronas de la corteza somatosensorial. También se expresa en neuronas del sistema nervioso periférico y en fibroblastos, así como en plaquetas y en otros tipos celulares del sistema cardiovascular (Hannon y Hoyer, 2008).

Se ha encontrado una elevada densidad de sitios de unión de este receptor en áreas de la corteza, caudado, núcleo *accumbens*, tubérculo olfatorio e hipocampo (López-Giménez y col., 2001). Se localiza en neuronas piramidales glutamatérgicas en la corteza cerebral, especialmente en dendritas apicales de neuronas piramidales de las capas IV y V, en el soma de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y sustancia negra y en interneuronas gabaérgicas en la corteza y el hipocampo (Meltzer y col., 2003). En el campo de la investigación en esquizofrenia, en general se han encontrado disminuciones en la expresión de este receptor en estudios *post mortem* en la corteza prefrontal humana (área de Brodmann 9) (Matsumoto y col., 2005; Scarr y col., 2004). Se han encontrado tras la administración crónica de antipsicóticos atípicos tanto reducciones (Padín y col., 2006, en rata) como aumentos (Hernández y Sokolov, 2000; humano) en la densidad de los receptores 5-HT_{2A} en corteza prefrontal.

En cuanto a la señalización de este receptor, decir que activa preferentemente la vía de transducción de proteínas G del tipo G_{q/11} (González-Maeso y col., 2008), regulando la actividad del sistema efector fosfolipasa C (PLC- β) (Brea y col., 2009). Esta última provoca la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) que libera inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Éstos provocan un aumento de la concentración de Ca⁺² intracelular y la activación de proteína cinasa C (PKC), cinasa sobre la que el Ca⁺² y el DAG ejercen una acción activadora sinérgica (Brea y col., 2009). La activación de receptores 5-HT_{2A} conduciría adicionalmente a la activación de proteínas dependientes de Ca⁺² como la calmodulina, y a la fosforilación de otras proteínas celulares (Bockaert y col., 2010).

Adicionalmente, existen evidencias de que el receptor 5-HT_{2A} también puede activar la vía efectora de la fosfolipasa-A2 (PLA₂) (Felder y col., 1990), que libera ácido araquidónico al medio intracelular. Respecto a las vías de señalización del receptor 5-HT_{2A} implicadas en la liberación de IP₃ y AA, se ha descrito que distintos agonistas del receptor pueden presentar selectividad funcional por una u otra vía, activando preferencialmente una determinada (Berg y col., 1998). El receptor 5-HT_{2A} activa diversas rutas de MAP cinasas (Oufkir y col., 2010), y tirosina quinasa c-Src (Lu y col., 2008), entre otras, y presenta actividad constitutiva en sistemas biológicos (Aloyo y col., 2009). Este receptor interacciona con β -arrestinas (Bhattacharya y col., 2010) y otras proteínas (PSD95, caveolina, RSK2) que regulan su localización y funcionalidad (revisado en Allen y col., 2008), interacciones que pueden ser diferencialmente promovidas por distintos ligandos del receptor (Schmid y col., 2008). Interacciona con calmodulina en un dominio C-terminal que regula su desensibilización (Turner y Raymond, 2005) y posee un motivo PDZ de unión a PSD95, esencial para su localización en zonas dendríticas de las neuronas corticales piramidales (Xia y col., 2003).

Asimismo, en neuronas del córtex somatosensorial, tanto los agonistas no alucinógenos (lisurida, ergotamina) como alucinógenos (LSD, DOI, DOM) del receptor 5-HT_{2A} activan la vía de señalización G_q-PLC (González-Maeso y col., 2008) e inducen por esta vía la expresión del factor de transcripción de la familia de genes de respuesta inmediata *c-fos*. Sólo los agonistas alucinógenos del receptor activan en estas mismas neuronas la vía de señalización de G_i e inducen la expresión del factor de transcripción *egr-2*. Esta vía de señalización puede ser modulada alostérica y negativamente mediante agonistas del receptor mGlu2. La activación de la vía G_i dependiente de ligando (alucinógeno) es un ejemplo de selectividad funcional.

En cuanto a la regulación del receptor 5-HT_{2A} en respuesta a ligandos, el receptor internaliza por mecanismos dependientes de GRKs y de β -arrestina-2 en determinados tipos celulares (HEK293) (Bhattacharya y col., 2010). La interacción del receptor con β -arrestinas puede determinar otros tipos de señalización celular y respuestas *in vivo*, que pueden ser dependientes o independientes de esa interacción según se trate de ligandos del receptor alucinógenos o no alucinógenos, como se ha observado para 5-hidroxitriptófano (5-HTP) y DOI en ratones *in vivo* (Schmid y col., 2008).

El receptor 5-HT_{2A} es uno de los GPCRs para el que se dispone de más herramientas farmacológicas, que cubren todo el espectro de eficacias (agonista total, agonista parcial, antagonista neutro, agonista inverso) y engloban diferentes familias químicas (indolaminas, fenilalquilaminas, ligandos ergóticos, piperidínicos, de tipo dibenzodiazepina, etc.). Un agonista selectivo de todos los subtipos 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 2B Y 2C) es DOI (pKi en el rango 7.4–9.2) (Alexander y col., 2013; Branchek y col., 1990) y dos antagonistas selectivos son ketanserina (pKi en el rango 8.1–9.7) (**Fig. 12**) y MDL100907 (pIC₅₀ en el rango 6.5–9.3) (Alexander y col., 2013; Knight y col., 2004).

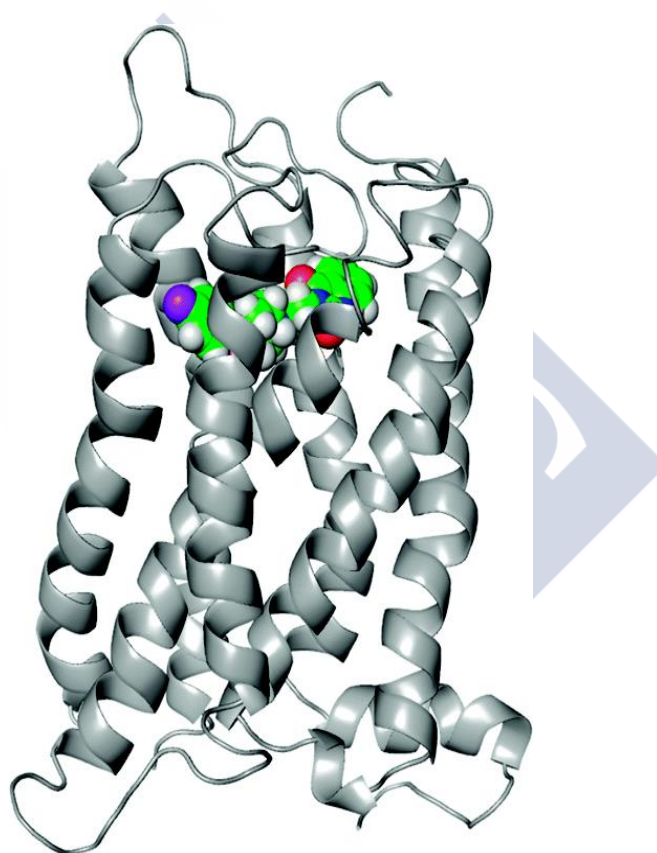


Fig. 12. Modelo del receptor 5-HT_{2A} humano unido a su antagonista selectivo ketanserina
(Dezi y col., 2007).

Por otra parte, nuestro grupo ha descrito la formación constitutiva de homodímeros del receptor 5-HT_{2A} en líneas celulares expresando el receptor heterológamente, mediante técnicas de coimmunoprecipitación y FRET (Brea y col., 2009). Estos datos bioquímicos y

biofísicos de interacción entre protómeros del receptor fueron coherentes con datos de ensayos de unión de radioligandos y funcionales compatibles con la existencia de fenómenos de cooperación entre protómeros de dímeros de 5-HT_{2A}, obtenidos también en líneas celulares expresando heterológicamente el receptor.

Para este receptor, recientemente se ha descrito la formación de heterodímeros (heterómero receptorial) con el receptor metabotrópico de glutamato mGlu₂ en líneas celulares. Más notablemente, se detectó su presencia en corteza somatosensorial humana por técnicas de coimmunoprecipitación (González-Maeso y col., 2008), encontrándose indicios de que la formación de este heterodímero es determinante para la señalización del receptor 5-HT_{2A} por la vía de G_i estimulada en respuesta a agonistas alucinógenos (Moreno y col., 2011). Así, se ha demostrado la existencia de alosterismo entre ambos protómeros para la respuesta por esta vía, actuando los agonistas de mGlu₂ (protómero alostérico) como moduladores alostéricos negativos de la activación de G_i inducida por agonistas 5-HT_{2A} alucinógenos (González-Maeso y col., 2008).

Como se ha visto, las vías de neurotransmisión serotoninérgica tienen interés en el tratamiento de la esquizofrenia. El agonismo inverso 5-HT_{2A} se ha relacionado con liberación de dopamina en córtex cerebral (ensayos *in vivo*) y con la reducción de síntomas en psicosis causada por L-DOPA. (Meltzer y col., 2010). Los antagonistas 5-HT_{2A} (MDL100907 y ACP-103) son capaces de revertir la hiperactividad locomotora en el modelo de síntomas positivos generado mediante la administración aguda en ratones de un antagonista NMDA (PCP, MK801 o ketamina) (Carlsson y col., 1999). También suprimen las alteraciones en el modelo de disfunción cognitiva generado mediante la administración subcrónica en ratones de antagonistas NMDA (Meltzer y Massey, 2003).

La activación de los receptores 5-HT_{2A} aumenta la actividad dopaminérgica en las vías mesocortical, mesolímbica y nigroestriatal (Alex y Pehek, 2007; Meltzer y col., 2003). La mejoría de los síntomas negativos en el tratamiento de la esquizofrenia con antipsicóticos atípicos se atribuye al antagonismo de receptores 5-HT_{2A} (Kapur y Remington, 1996). Se ha sugerido que el dímero 5-HT_{2A}/mGlu₂ en neuronas piramidales de la corteza cerebral estaría implicado en procesos fisiopatológicos que ocurren en esquizofrenia (González-Maeso y col., 2008). En relación con este receptor y área existen trabajos preclínicos centrados en determinar los mecanismos de modulación de la liberación de dopamina y

glutamato en la corteza prefrontal medial que indican que los antagonistas 5-HT_{2A} inhiben la liberación de dopamina en la corteza prefrontal (Pehek y col., 2006) y que el pretratamiento con uno de estos antagonistas selectivos es capaz de bloquear el incremento en la liberación de glutamato en corteza causado por DOI (Scruggs y col., 2003). Otros estudios *in vivo* consideran que en el papel del receptor 5-HT_{2A} en relación con la liberación de dopamina en la vía mesocortical está relacionado con la activación de receptores de glutamato a nivel del ATV (Pehek y Hernan, 2015).

1.2.2.2. El receptor de dopamina D₂

Existen varios subtipos de receptores dopaminérgicos: los receptores D₁ y D₅ (familia tipo D₁) y acoplados a proteínas G_s y los receptores D₂, D₃ y D₄ (familia tipo D₂), acoplados a proteínas G_{i/o}. Todos pertenecen al grupo α de la familia rodopsina.

El gen de este receptor (*DRD2*) se encuentra en el *locus* 11q23. El receptor D₂ presenta dos isoformas D_{2short} (corta) y D_{2long} (larga) originadas mediante modificación post-transcripcional (“*splicing*”) que difieren en la presencia de un fragmento de 29 aminoácidos en el tercer bucle intracelular a nivel del sexto exón (Beaulieu y col., 2015). Estas dos isoformas D_{2S} y D_{2L} difieren en su localización; presináptica en el caso de la forma corta y preferentemente postsináptica en el caso de la larga (Rouge-Pont y col., 2002). Existen evidencias de que realmente se acoplan a proteínas G diferentes (G_i y G_o para D_{2L} y D_{2S} respectivamente) (Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

Se expresa ampliamente en el caudado y el putamen (en neuronas gabaérgicas) y en la sustancia negra (autorreceptor). También existe una elevada densidad en el núcleo *accumbens* y en el área tegmental ventral. En los lóbulos anteriores de la hipófisis regula la liberación de hormonas (prolactina). Sus niveles de expresión son moderados en globo pálido, núcleo subtalámico, tálamo e hipocampo (Jackson y col., 1994) y bajos en corteza (Guillin y col., 2007). Está relacionado con el tratamiento y fisiopatología de otras enfermedades del sistema nervioso como enfermedad de Parkinson y adicciones (Vallone y col., 2000)

La vía de señalización principal del receptor D₂ consiste en la inhibición de AC mediante interacción con proteínas G_{i/o}, lo que resulta en una reducción de la actividad de PKA. El dímero de subunidades G _{$\beta\gamma$} de la proteína G_o puede activar fosfolipasa C (PLC) con

el consiguiente aumento de Ca^{+2} intracelular y activación de la calcineurina (Hernández y López., 2000; Lee y col., 2004; Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Asimismo, este dímero también modifica la actividad de los canales de calcio de tipo N- y L- y de canales de potasio de rectificación de entrada regulados por proteínas G (GIRK). El receptor D_2 también activa vías de señalización de proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) tales como ERK1 y 2 y promueve la fosforilación de CREB (Banisashemi y Albert., 2002). Este receptor también puede señalizar mediante mecanismos AMPc independientes a través de la proteína β -arrestina2 (Beaulieu y col, 2004; Masri y col., 2008).

El haloperidol (pKi en rango de 7.4–8.8; Alexander y col., 2013) es un antagonista de la familia D_2 , al igual que espiperona, otra butirofenona que está disponible como radioligando tritiado. Racloprida es un antagonista selectivo del receptor D_2 también disponible como radioligando.

Se ha descrito el heterómero de receptores de dopamina D_1 - D_2 con potencial interés para el tratamiento de la esquizofrenia (George, 2014), aunque se relaciona también con enfermedad de Parkinson (Fuxe y col., 2015). El dímero $\text{A}_{2\text{A}}$ - D_2 (Borroto-Escuela y col., 2011) se localiza en terminaciones glutamatérgicas cortico-estriatales y en neuronas gabaérgicas estriatopalidales (Fuxe y col., 2007a). Se considera que la activación del protómero $\text{A}_{2\text{A}}$ de este dímero conlleva una reducción de la señalización del receptor D_2 , y una consiguiente activación de neuronas gabaérgicas y disminución de la actividad de la vía indirecta de los ganglios basales, de forma que el antagonismo $\text{A}_{2\text{A}}$ presenta potencial interés en el tratamiento del Parkinson (Fuxe y col., 2007). Se ha demostrado la existencia del dímero $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ - D_2 (*in vitro*) y en el caso del dímero $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ -His452Tyr/ D_2 que incorpora un protómero $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ mutado, se ha descrito una dimerización reducida corregida por clozapina (Lukasiewicz y col., 2011).

En relación con esquizofrenia, el bloqueo de este receptor tanto a nivel postsináptico como presináptico va a mediar las acciones terapéuticas de los antipsicóticos en las vías mesolímbica y mesocortical. Se considera que el bloqueo presináptico conlleva un silenciamiento por *bloqueo por despolarización*, especialmente en la vía mesolímbica y de forma ausente en la vía mesocortical, que se añade al postsináptico (Martínez-Cué y Flórez, 2014).

1.2.2.3. El receptor de serotonina 5-HT₇

Al igual que todos los anteriores, se trata de un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) perteneciente al grupo α de la familia rodopsina. El trabajo de clonación del receptor 5-HT₇ inicial fue publicado en 1993 (Lovenberg y col. 1993; Bard y col. 1993; Ruat y col. 1993; Shen y col. 1993). Es el subtipo de receptor de serotonina que presenta la mayor afinidad por la serotonina (Ruat y col., 1993), que está en el orden nanomolar. Su gen (*HTR7*) está localizado en el cromosoma 10q21-q24. La modificación post-transcripcional del transcrito genera tres variantes del receptor en humano (5-HT_{7(a)}, 5-HT_{7(b)} y 5-HT_{7(d)}) que difieren sólo en el extremo carboxi-terminal (Heidman y col., 1997), que presentan similares propiedades farmacológicas (Pytliak y col., 2011).

Se expresa a altos niveles en núcleos del sistema límbico en el tálamo (núcleos anterior y mediodorsal) y formación hipocámpica (giro dentado). Otras regiones con expresión intermedia son el hipotálamo, las regiones hipocámpicas CA1 y CA2, el septum, el núcleo basolateral de la amígdala, el giro anterior cingulado (Varnäs y col., 2004). Son áreas de baja expresión ciertas áreas de la corteza (células piramidales y neuronas gabaérgicas) y células de Purkinje del cerebelo (Varnäs y col., 2004; Hagan y col., 2000; Mengod y col., 2010) del cerebro humano y, al contrario que en otras especies, también se encuentran ciertos niveles de expresión en el núcleo caudado, putamen y en la sustancia negra (ganglios basales) (Martín-Cora y Pazos, 2004). La mayoría se localiza en el soma y axones terminales de neuronas gabaérgicas (Díaz y col., 2011).

Este receptor se ha implicado en la regulación de los ritmos circadianos (Glass y col. 2003). También en la regulación fisiológica del humor, termorregulación (Hedlund, 2009) y en procesos de aprendizaje contextual dependiente de hipocampo (Gasbarri y col, 2008; Sarkisyan y Hedlund, 2009). Presenta sobre todo interés en el tratamiento de la depresión, una patología para la que las evidencias de su potencial utilidad son las más numerosas (Bonaventure y col., 2007; Sarkisyan y col., 2010; Naumenko y col., 2014). En relación con esta patología se estudia su papel en la modulación de la actividad de las neuronas del rafe. De hecho, existen evidencias de que el antagonismo de este receptor es capaz de prevenir la inhibición de neuronas del rafe (Mnie-Filali y col., 2011). Se sugiere que el receptor 5-HT₇ está localizado en los axones terminales de neuronas glutamatérgicas que llegan al mismo núcleo, y que esta relación es relevante funcionalmente (experimentos en rata; Harsing y

col., 2004). Con mayor relevancia para la esquizofrenia, se estudia la capacidad de este receptor de modular la actividad de neuronas del ATV y su relación con la actividad de la vías dopaminérgicas mesocortical y mesolímbica (Mnie-Filali y col., 2007).

Además, se estudia su potencial utilidad en el tratamiento de patologías como ansiedad, dolor, epilepsia y migraña (Hedlund, 2009; Leopoldo y col., 2011). Fuera del SNC se implica en la contracción de células del músculo liso (Hedlund y col., 2004) y modula la inflamación en el tracto gastrointestinal (Guseva y col., 2014a).

El receptor 5-HT₇ se acopla a proteínas G_s y estimula la AC, incluyendo algunas isoformas de AC específicas de neuronas, estimuladas por Ca⁺²/calmodulina. Esto conlleva el aumento de los niveles intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) y la activación de proteína cinasa A (PKA) (**Fig. 13**), que finalmente provoca la activación de múltiples cascadas de señalización como la de las cinasas reguladas por señal extracelular (ERK) y proteína cinasa B (Akt) de forma Ras-dependiente y Rap-1 independiente (Guseva y col., 2014). La interacción del receptor 5-HT₇ con proteínas G₁₂ activa pequeñas GTPasas (Rho y Cdc42) que controlan la expresión de genes o las modificaciones en los filamentos de actina (Kvachnina y col., 2005). La depleción de colesterol y de los constituyentes esfingomielina, gangliósido 1 (GM1) o caveolina-1 de las balsas lipídicas modifican la unión de serotonina a este receptor (Sjögren y col., 2006; Sjögren y Svenningsson, 2007).

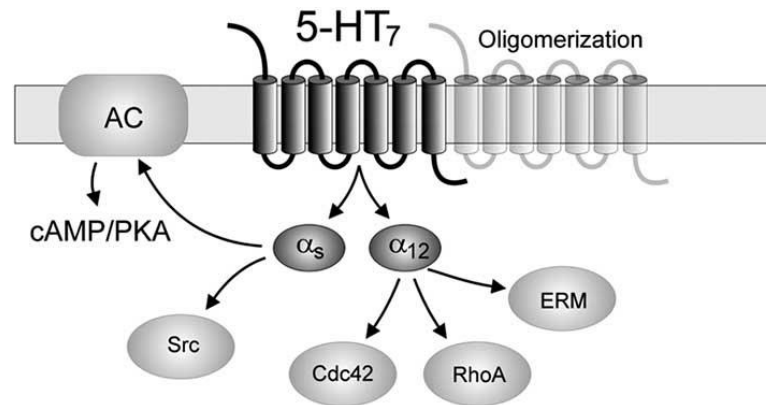


Fig. 13. Gráfica que representa las principales vías de señalización del receptor 5-HT₇. Se muestra la señalización mediante acoplamiento a proteínas G_s como a proteínas G₁₂. Ésta activa pequeñas GTPasas (Rho y Cdc42). (Tomado de Woehler y Ponimaskin, 2009).

Se ha descrito que el receptor 5-HT₇ puede formar homooligómeros en cultivos recombinantes (Teitler y col., 2010). Sus homodímeros se han observado en cultivos primarios de astrocitos de rata (Smith y col., 2011).

Varios antipsicóticos son antagonistas de receptores 5-HT₇ (Roth y col., 1994), entre otros aripiprazol (Hedlund, 2009), clozapina y risperidona (Díaz y col., 2011). Son agonistas de alta afinidad la 5-carboxamidotriptamina (5-CT) y 7-(dipropilamino)-5,6,7,8-tetrahidro-1-naftalenol (8-OH-DPAT), aunque no son agonistas selectivos pues ambos presentan también afinidad por el receptor 5-HT_{1A}. Se han descrito antagonistas pseudoirreversibles del receptor 5-HT₇, inactivantes de la producción de AMPc (risperidona, 9-hidroxisperidona, metiotepina, bromocriptina, lisurida y metergolina) (Klein y Teitler, 2011). La unión de risperidona y hidroxisperidona puede ser revertida por antagonistas competitivos (clozapina y mesulergina). Estas y otras peculiaridades de su comportamiento podrían explicarse teniendo en cuenta la homodimerización (Teitler y col., 2010; Smith y col., 2011; y Teitler y Klein, 2012).

Un agonista de alta afinidad y selectivo de 5-HT₇ es el LP-211 (Leopoldo y col., 2008). Éste se distribuye ampliamente en el SNC (Hedlund y col., 2010) y es útil para la realización de estudios *in vivo*. Las arilpiperazinas LP-211 (N-(4-cianofenilmetil)-4-(2-difenil)-1-piperazinoxianamida) y MEL-9 (N-bencil-4-(2-difenil)-1-piperazinoxianamida) presentan un comportamiento farmacológico similar en algunos

aspectos al descrito para algunos antipsicóticos antagonistas irreversibles del receptor 5-HT₇. Ambos ligandos antagonizan de forma no remontable la producción de AMPc inducida por 5-CT en células HEK293 y también inhiben la actividad de AC inducida por forskolina en las mismas células. La unión es resistente a lavados en ensayos en célula entera (HEK293) de unión de radioligandos y también en ensayos de producción de AMPc bloquean la respuesta a 5-CT y forskolina de forma irreversible (resistente a lavados) (Leopoldo y col., 2004; Leopoldo y col., 2007; Atanes y col., 2013). Queda por determinar cuál es la traslación de estas observaciones *in vitro* en relación con el comportamiento *in vivo* del ligando LP-211 como agonista 5-HT₇.

El SB269970 (2R-1-[(3-hidroxifenil)sulfonil]-2-[2-(4-metil-1-piperidinil)etil]pirrolidina) es un antagonista del receptor 5-HT₇ del que se ha descrito su buena distribución cerebral (Hagan y col., 2000: en rata) y que se encuentra disponible como radioligando tritiado ($K_d = 1.2 \cdot 10^9$; Alexander y col., 2013) Estudios con este compuesto utilizando ensayos de inhibición prepulso (PPI) en ratones parecen indicar que el antagonismo 5-HT₇ ejerce una modulación de la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica con potencial utilidad en el tratamiento de la sintomatología positiva en esquizofrenia (Galici y col., 2008).

Con respecto al receptor 5-HT₇ hay que destacar su relación con la plasticidad estructural de circuitos cerebrales (Volpicelli y col., 2014). Está implicado en la conformación de la citoarquitectura neuronal y formación de redes neuronales durante el desarrollo embrionario y en la vida postnatal temprana. Su activación en neuronas hipocampales postnatales de ratón produce un incremento del número de sinapsis y de la actividad sináptica (Kobe y col., 2012). Además, en estas mismas neuronas su activación modula la señalización del receptor de glutamato NMDA (Vasefi y col., 2013). En el caso del cerebro adulto o adolescente el receptor 5-HT₇ también parece jugar un papel en la modulación de la plasticidad estructural de las redes neuronales (Volpicelli y col., 2014). Ensayos *in vivo* en ratones con LP-211 mostraron un incremento significativo en el número total y densidad de espinas dendríticas en neuronas del estriado (Speranza y col., 2015).

Otra actividad con la que está relacionada este receptor es la intelectual-cognitiva. En relación con el aprendizaje y estudios preclínicos, el ratón carente del gen 5-HT₇ (“*knock-out*”) presenta una actividad normal en los test de reconocimiento de objetos

nuevos, un test que evalúa un tipo de memoria episódica que depende de la corteza cerebral y que se relaciona con la memoria declarativa episódica humana. En estudios de aprendizaje contextual en modelos animales, en general, se realizan pruebas tales como el test de nueva localización o el de condicionamiento al miedo contextual; en éstos el ratón *knock-out* 5-HT₇ muestra déficits en aprendizaje contextual (Roberts y col., 2004) y el antagonismo selectivo de este receptor empeora también los resultados (Roberts y Hedlund, 2012). Otros hallazgos en estudios con animales indican que el bloqueo del receptor 5-HT₇ mediante ligandos como el antagonista selectivo SB269970 y amisulprida, es capaz de mejorar los déficits cognitivos y psicomotores en modelos animales de síntomas de esquizofrenia desarrollados mediante la administración de antagonistas NMDA, particularmente en el test de reconocimiento de objetos nuevos (NOR) (administración subcrónica de antagonista) y en modelo animal de síntomas positivos de hiperactividad locomotora (administración aguda de antagonista NMDA) (Horiguchi y col., 2011; Meltzer y Massey, 2011). Sin embargo, los resultados no son concluyentes en el ensayo de inhibición prepulso (PPI) en modelo animal obtenido mediante la administración de antagonista NMDA (PCP o ketamina), ya que se obtienen resultados contradictorios (Galici y col., 2008; Semenova y col., 2008).

Con respecto a este receptor existen evidencias de la actividad antidepresiva de su delección genética y del tratamiento con antagonistas 5-HT₇ en los ensayos de natación forzada (FST) y de suspensión de cola (TST) (Hedlund y col., 2005; Guscott y col., 2005). De forma muy importante se ha atribuido al antagonismo 5-HT₇ la acción antidepresiva de amisulprida, una benzamida desarrollada inicialmente como antagonista D₂/D₃ selectivo para el tratamiento de la esquizofrenia (Abbas y col., 2009). Amisulprida está autorizada en Italia para el tratamiento de la distimia, una forma de depresión moderada, que se presenta con síntomas de tristeza, anhedonia, pérdida de vitalidad, baja autoestima y que tiende a la cronicidad. Algunos autores sugieren que el antagonismo 5-HT₇ podría explicar la eficacia antidepresiva (Abbas y col., 2009). De manera destacada, antidepresivos de nueva generación tales como vortioxetina (medicamento Brintellix) presentan entre sus actividades farmacológicas el antagonismo 5-HT₇, aunque vortioxetina presenta otras actividades como antagonismo de los receptores 5-HT₃, 5-HT₇ y 5-HT_{1D}, agonismo parcial del receptor 5-HT_{1B}, agonismo del receptor 5-HT_{1A} e inhibición del transportador de serotonina (SERT). Los antipsicóticos clozapina, risperidona, olanzapina y amisulprida

(fármacos atípicos) y clorpromazina, flufenazina y pimozida (antipsicóticos clásicos) también tienen alta afinidad por este receptor. Su papel en el tratamiento de la disfunción cognitiva u otras acciones terapéuticas en el paciente con esquizofrenia necesita una mayor investigación (Gray y Roth, 2007).

1.2.2.4. El receptor de adenosina A_{2A}

La familia de receptores de adenosina comprende los subtipos de receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃. El receptor A_{2A} es un GPCR de la clase A y grupo α de la familia rodopsina, con relativamente alta afinidad por adenosina. Se han publicado valores de EC₅₀ de adenosina de 0.7 μ M (Fredholm y col., 2001) para el receptor A_{2A} y de 34 μ M en el caso del receptor A_{2B}. El gen de este receptor (*ADORA2A*) se encuentra en el cromosoma 22q11.23.

El receptor A_{2A} está implicado en la fisiología de la plasticidad neuronal, el control del sueño y el control de las actividades motoras en el estriado (Cheng y col., 2014). Es una potencial diana moduladora del aprendizaje y de la memoria y se relaciona con ansiedad y depresión (Cheng y col., 2014a).

Se encuentran elevados niveles de expresión de este receptor en el estriado dorsal y ventral (fundamentalmente de localización postsináptica) y en el tubérculo olfatorio. Se expresa a menores niveles en regiones como el hipocampo y la corteza cerebral (Svenningsson y col., 1997). Se encuentra de forma presináptica en terminaciones corticoestriatales y en hipocampo de rata (Rebola y col., 2005). Se expresa también en células inmunes y de la glía, sobre todo en respuesta a interleucina β (IL- β), donde controla la neuroinflamación (Cheng y col., 2014).

La principal vía de señalización del receptor A_{2A} se deriva de su acoplamiento a proteínas G_s, con aumento de AMPc y activación de PKA. Esta última fosforila entre otras el factor CREB y activa la vía Src/Ras/Raf-1/MEK/ERK (Schulte y Fredholm, 2003). Interacciona con α -actinina, un regulador de la internalización y tráfico β -arrestina dependiente (Burgueño y col., 2003). Además, se ha descrito que este receptor interacciona con proteínas que unen Ca⁺² como NECAB2, NCS-1 y calmodulina (Canela y col., 2007; Navarro y col., 2009; y Navarro y col., 2012).

El antagonismo A_{2A} es una posible estrategia neuroprotectora (Cunha y col., 2008). La activación del receptor A_{2A} también es necesaria para un correcto neurodesarrollo de los

circuitos hipocampales (Silva y col., 2013). La activación del receptor A_{2A} en el hipocampo modula la plasticidad sináptica a través de múltiples mecanismos (Cheng y col., 2014a). Asimismo, existen claras evidencias de que su antagonismo o supresión mejora el aprendizaje y la memoria en animales (Cunha y Agostinho, 2010; Cheng y col., 2014a).

En los últimos años ha habido una intensa investigación en el campo de dimerización de este receptor. Se ha descrito la existencia de homodimerización de este receptor (Canals y col., 2004), sobre el que se han predicho los dominios de interacción mediante estudios de simulación (Fanelli y Felling, 2011). Del heterodímero A_1 - A_{2A} se ha propuesto su implicación en la regulación de la liberación de glutamato (Ciruela y col., 2006; Ciruela y col., 2011). Se ha caracterizado el dímero A_{2A} - D_2 del que se ha propuesto (Fuxe y col., 2005; Fuxe y col., 2010; Trincavelli y col., 2012) que podría actuar como diana de agonistas A_{2A} en neuronas gabaérgicas de la vía estriatopalidal ventral para, en el tratamiento de la esquizofrenia, reducir la hipofunción glutamatérgica de las proyecciones desde el núcleo talámico mediodorsal a la corteza prefrontal. También existe el dímero A_{2A} -mGlu5 en neuronas del estriado (Ferré y col., 2002; Ciruela y col., 2011).

Con respecto a los ligandos de este receptor, decir que la amilorida es un modulador alostérico del receptor A_{2A} (Gao y Ijzerman, 2000). Se sugiere que este fármaco puede unirse al sitio alostérico de unión de Na^+ , sitio que presenta interés como potencial diana de moduladores alostéricos (Gutiérrez-de-Terán y col., 2013). El ligando 5'-N-etilcarboxamidoadenosina (NECA) y CGS-15943 (9-cloro-2-(2-furanil)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5-amina) son un agonista y un antagonista selectivos respectivamente de la familia de receptores adenosínicos. Los ligandos CGS-21680 (2-(4-(2-carboxietil)-fenetilamino)-5'-N-etilcarboxamidoadenosina) y ZM241385 (Poucher y col., 1995; Palmer y col., 1995) (**Fig. 14**) son un agonista y un antagonista respectivamente del receptor A_{2A} disponibles como radioligandos (K_d en los rangos $1.6 \cdot 10^{-8} - 2.2 \cdot 10^{-8}$ M y $8 \cdot 10^{-10} - 1.8 \cdot 10^{-9}$ M para cada radioligando respectivamente; Alexander y Millns, 2001; Alexander y col., 2013).

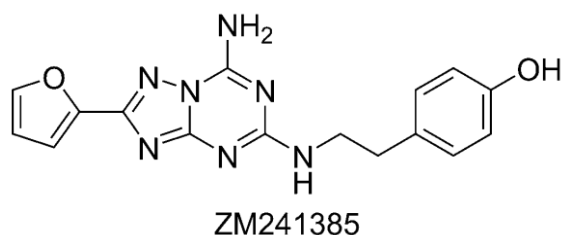


Fig. 14. Estructura química de ZM241385. (4-(2-((7-amino-2-(furan-2-il)-[1,2,4]triazolo[1,5-a]-[1,3,5]triazin-5-il)amino)etil)fenol), un derivado de triazolotriazina.

Con respecto a este receptor, hay que destacar especialmente las recientes investigaciones en el campo de la determinación estructural mediante técnicas cristalográficas y los estudios de simulación de dinámica molecular. Desde el año 2008 se han publicado una serie de trabajos que tienen por objeto la determinación de la estructura y conformación del receptor A_{2A} mediante técnicas cristalográficas y de difracción de rayos X. Dos de estos (la primera publicada de Jaakola en 2008) y (Doré y col., 2011) describen la estructura del receptor A_{2A} formando un complejo con el antagonista específico ZM241385.

Con respecto al primero de estos trabajos (Jaakola y col, 2008), la incorporación del antagonista selectivo ZM241385 cumple una función de termoestabilización del complejo. El receptor presenta una sustitución del tercer bucle intracelular (IL3) por la lisozima del bacteriófago T4 y la supresión de parte del extremo C-terminal para conseguir una estabilidad conformacional adecuada para su cristalización (Jaakola y col., 2008) (**Fig. 15**). En este complejo A_{2A} -ZM241385, el ligando mostró una considerable superficie de contacto con Trp6.48, lo que sugeriría que el antagonista estabiliza al receptor en un estado inactivo (Jaakola y col., 2008) (**Fig. 16**). En esta estructura no se observa la interacción entre el motivo D/ERY y Glu6.30 constitutiva del cierre iónico (“*ionic lock*”) que, como ya se ha dicho (ver más arriba), se relaciona con la inactivación del receptor (Vogel y col., 2008).

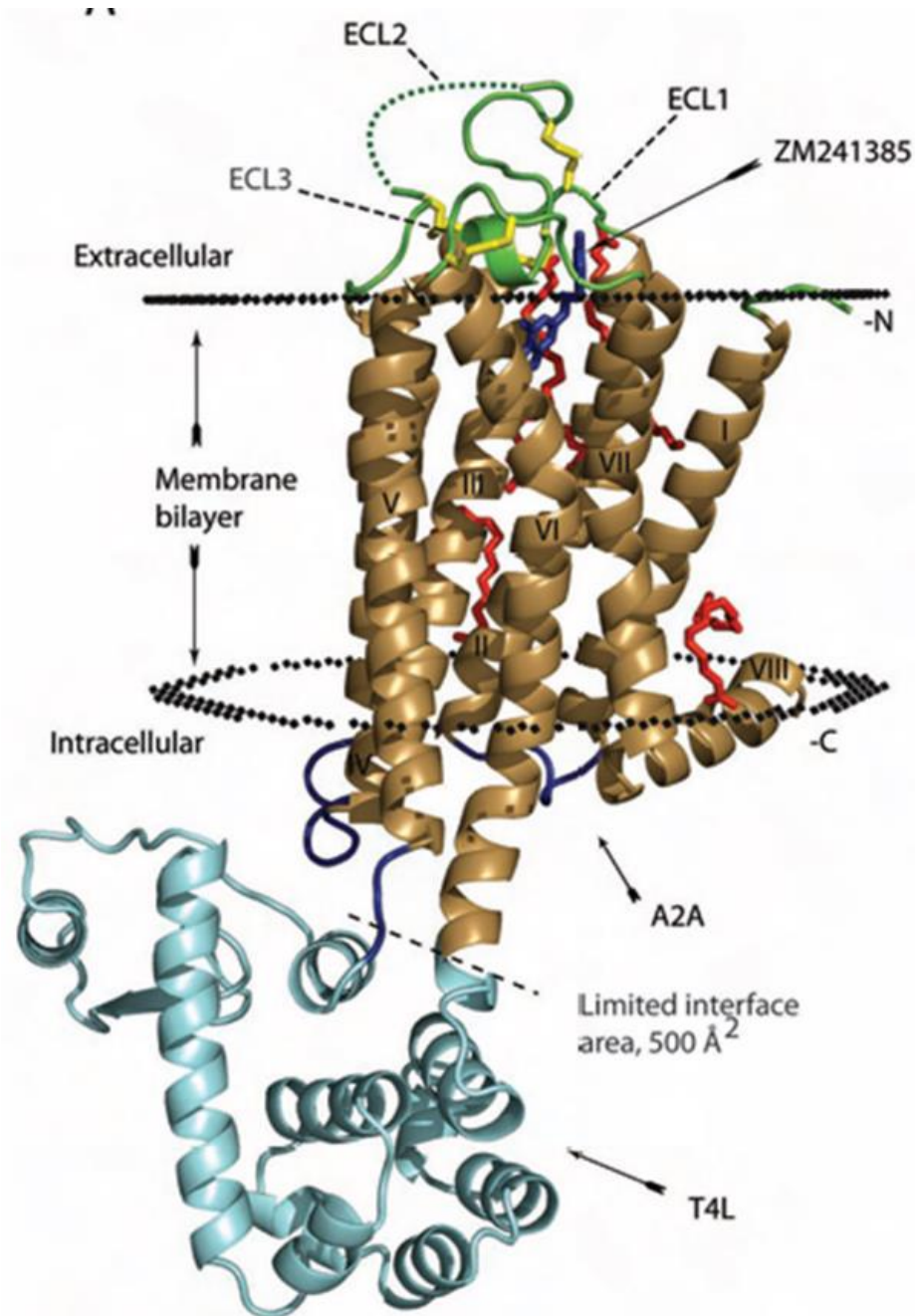


Fig. 15. Modelo de la estructura del receptor de adenosina A_{2A} -T4L- Δ C cristalizado por Jaakola y col., (2008). Se muestran los dominios transmembrana (marrón), la proteína T4L fusionada (azul claro) y los bucles extracelulares (verde). También se muestran el ligando ZM241385 (azul oscuro) y moléculas lipídicas (rojo). (Tomado de Jaakola y col., 2008).

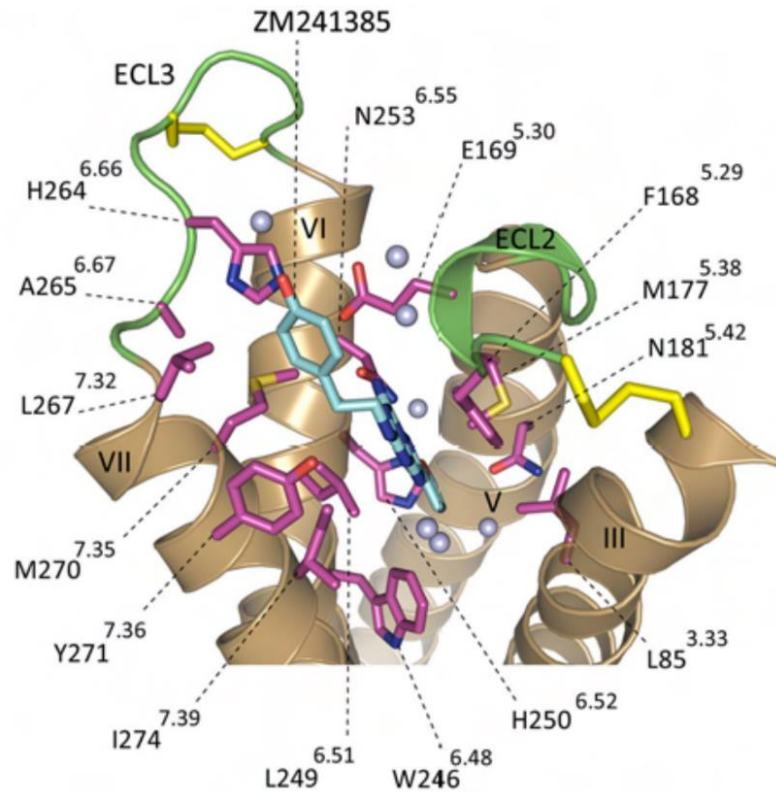


Fig. 16. Sitio de unión de del receptor de adenosina A_{2A}-T4L-ΔC uniendo el ligando ZM241385. Nótese que el ligando ZM241385 se dispone de forma casi perpendicular al plano de la membrana y el fenol hacia la cara extracelular. El grupo amino de la triazina interacciona con Glu169 (5.30). Se representan los bucles que determinan el acceso al sitio de unión y que interaccionan con ZM241385 (EL2 y 3). (Tomado de Jaakola y col., 2008).

Con posterioridad a este trabajo de Jaakola se publicaron otros trabajos de estudio de la conformación del receptor A_{2A}, que también emplearon la cristalografía y la difracción de rayos X. El primero que se comenta (Doré y col., 2011) describe la estructura del receptor de adenosina A_{2A} termoestabilizado mediante mutaciones puntuales en complejo con el ligando ZM241385 y cafeína. Describe un sitio de unión similar al descrito por el trabajo de Jaakola (2008). La ausencia del fragmento T4L hace posible la presencia del cierre iónico y un sitio de unión más accesible. La mayor accesibilidad al sitio de unión en comparación con la estructura del trabajo de Jaakola y col., se debe a un desplazamiento hacia fuera del sitio de entrada al sitio de unión del motivo de residuos entre las Cys que conforman el enlace mediante puente disulfuro en EL3 (motivo Cys-Pro-Asp-Cys) (Doré y col., 2011). En esta estructura His264 tiene una distinta conformación rotamérica (Doré y col., 2011).

Otros estudios (Lebon y col., 2011) describen el receptor A_{2A} también termoestabilizado mediante mutaciones puntuales pero unido a los ligandos adenosina y NECA, que interaccionan con Glu169^{5.30} de EL2 mediante puente de hidrógeno. Finalmente, otro estudio también hace uso de la termoestabilización mediante fusión del fragmento T4L y describe un receptor A_{2A} unido al agonista UK 432097 (2-(3-[1-(piridin-2-il)piperidin-4-il]ureido)etil-6-N-(2,2-difeniletil)-5'-N-etilcarboxamidoadenosina-2-carboxamida) (Xu y col., 2011). El análisis de estas estructuras que incorporan un agonista han determinado una serie de cambios conformacionales en el sitio de unión de A_{2A} asociados a la activación; particularmente un acercamiento de los aminoácidos hidrofílicos en TM3, TM5 y TM7 al anillo de ribosa de agonistas (UK 432097 o NECA) (Jacobson y col., 2013).

Se han publicado para este receptor y agonistas con estructura de ribosa y no-ribosa, un estudio que determina el tiempo de residencia de estos ligandos, encontrando para los de estructura no-ribosa un menor tiempo de residencia en el receptor. El mismo estudio describe una correlación entre eficacia funcional de estos ligandos y tiempo de residencia en el receptor (Guo y col., 2012). Otro estudio con derivados del ligando ZM241385 con distintos sustituyentes, entre otros el grupo piperazina e introducidos en el grupo amino en posición 5 del biciclo sustituyendo al fenol, realiza un análisis de las relaciones cinético-estructurales (*Structure-Kinetic Relationship*, SKR), que a diferencia de los estudios clásicos de relación estructura-actividad (*Structure-Activity Relationship*, SAR) incorpora la dimensión tiempo en el análisis de las distintas estructuras. En este caso y para estos ligandos no se encuentra una clara correlación (lineal) entre los valores de distintos descriptores (peso molecular, lipofilia, superficie molecular o carga) y los de las constantes cinéticas (k_{on} y k_{off}) (Guo y col., 2014).

1.2.3. Aspectos estructurales y cinéticos de la interacción ligando-receptor en GPCRs

1.2.3.1. Recientes avances en el conocimiento de la estructura y las conformaciones de los GPCRs

Desde comienzos de la pasada década, se han publicado los datos de las estructuras de varios GPCRs obtenidas mediante cristalografía de rayos X, comenzando por la rodopsina (Palczewski y col., 2000) y siguiendo con el receptor β_2 -adrenérgico (Rasmussen

y col., 2007; Rosenbaum y col., 2007). Posteriormente, hasta el año 2015 ha habido un gran aumento del número de estructuras disponibles alcanzándose las más de 125 estructuras de 33 GPCR distintos (*G protein-Coupled Receptors Data Base*, GPCRDB; Isberg y col., 2000). Del total del número de estructuras, más de un tercio corresponden a GPCR de bioaminas (Rosenbaum y col., 2009; Piscitelli y col., 2015). En la actualidad están disponibles las estructuras de varios receptores de monoaminas y acetilcolina de la clase A de GPCRs y grupo α de la familia rodopsina. Son ejemplos los receptores adrenérgicos β_1 en complejo con cianopindolol (Warne y col., 2008; código PDB 2VT4) y β_2 unido a carazolol (Cherezov y col., 2007; código PDB 2RH1), de histamina H_1 en complejo con doxepina (Shimamura y col., 2011; código PDB 3RZE), de dopamina D_3 unido a eticloprida (Chien y col., 2010; código PDB 3PBL), muscarínicos de acetilcolina M_2 (Haga y col., 2012; código PDB 3UON) y M_3 (Kruse y col., 2013; código PDB 4DAJ) en complejo con 3-quinuclidinilo bencilato y tiotropio respectivamente, y los serotoninérgicos 5-HT_{1B} (Wang y col., 2013; código PDB 4IAR) y 5-HT_{2B} (Wacker y col., 2013; código PDB 4IB4) en complejo ambos con ergotamina. Otros receptores cristalizados son varios subtipos de receptores opioides (κ , μ y δ), entre otros (Katritch y col., 2013). Las distintas estructuras se han obtenido formando el receptor un complejo con agonistas inversos, antagonistas o agonistas y en algunos casos formando un complejo con proteínas G (ver **Tabla 2**). En el procedimiento de cristalización es determinante lograr una estabilidad conformacional aceptable algo difícil debido a la flexibilidad estructural y múltiples conformaciones termodinámicas de los GPCRs. Esto se logra recurriendo a modificaciones de los GPCRs mediante técnicas como la fusión con proteínas fácilmente cristalizables en dominios como IL3, la introducción de mutaciones puntuales (termoestabilización) o el uso de anticuerpos como adyuvantes de la cristalización (Katritch y col., 2012). La estructura de la proteína cristalizada se analiza mediante cristalografía de rayos X. Otras técnicas como la resonancia magnética nuclear o el intercambio hidrógeno-deuterio asociado a espectrometría de masas pueden aportar información sobre el equilibrio dinámico ligando-dependiente de los distintos estados funcionales del receptor. La interpretación de la información obtenida ha de tener en cuenta las características del ligando (agonista o antagonista), y las modificaciones del receptor sometido a cristalización, entre otros aspectos.

Receptor	Engineered ^a	Ligandtype ^b	Ligand	Year	Ref.	PDB ID (resolution, Å)	
A _{2A} Adenosine A _{2A} AR (human)	ICL3 fusion	IAG	ZM241385	2008	[15]	3EML (2.6)	
		AGO ⁺	UK-432097	2011	[48]	3QAK (2.71)	
	Point mutations	AGO ⁺	Adenosine	2011	[29]	2YDO (3.0)	
		AGO ⁺	NECA			2YDV (2.6)	
		IAG	ZM241385	2011	[78]	3PWH (3.30)	
		ANT	XAC			3REY (3.31)	
	ANT	Caffeine			3RFM (3.60)		
β ₁ Adrenergic β ₁ AR (turkey)	Point mutations, partial ICL3 deletion	ANT	Cyanopindolol	2008	[14]	2VT4 (2.7)	
		PAG	Dobutamine	2011	[79]	2Y00 (2.5), 2Y01 (2.6)	
		AGO	Carmoterol			2Y02 (2.6)	
		AGO	Isoprenaline			2Y03 (2.85)	
		PAG	Salbutamol			2Y04 (3.05)	
		IAG	Carazolol	2011	[62]	2YCW (3.0)	
		ANT	Cyanopindolol			2YCX (3.25), 2YCY (3.15), 2Y CZ (3.65)	
β ₂ Adrenergic β ₂ AR (human)	ICL3 fusion	IAG	Not resolved + Fab ^d	2007	[13]	2R4R (3.4), 2R4S (3.4)	
		IAG	Carazolol	2007	[11,12]	2RH1 (2.4)	
		IAG	Timolol	2008	[23]	3D4S (2.8)	
		IAG	ICI118551	2010	[24]	3NY8 (2.84)	
		IAG	Compound #1 [44]			3NY9 (2.84)	
		ANT	Alprenolol			3NYA (3.16)	
		IAG	Not resolved + Fab ^d	2010	[31]	3KJ6 (3.4)	
		AGO ⁺	BI-167107+ nanobody ^e	2011	[26]	3P0G (3.5)	
		AGO	FAUC50 ^c	2011	[80]	3PDS (3.5)	
		N-terminal fusion	AGO ⁺	BI-167107 + Gαβγ + nanobody ^d	2011	[25]	3SN6 (3.2)
Chemokine CXCR4 (human)	ICL3 fusion	ANT	IT1t	2010	[16]	3ODU (2.5), 3OE6 (3.2), 3OE8 (3.1), 3OE9 (3.1)	
		ANT	CVX15 peptide			3OE0 (2.9)	
Dopamine D3R (human)	ICL3 fusion	ANT	Eticlopride	2010	[17]	3PBL (2.89)	
Histamine H ₁ R (human)	ICL3 fusion	IAG	Doxepin	2011	[18]	3RZE (3.1)	
Rhodopsin (bovine)	N2C/N15D/D282C	IAG	11- <i>Cis</i> retinal ^c	2000	[9] ^f	1F88 (2.8)	
				2004	[81]	1U19 (2.2)	
						1GZM (2.65), L9H (2.6), 1HZX (2.8), 2I37 (4.0), 3OAX (2.6), 3C9L (2.65)	
						3C9M (3.4), 2J4Y(3.4)	
				9- <i>Cis</i> retinal ^c	2007	[82]	2PED (2.95)
			AGO	All- <i>trans</i> retinal ^c	2006	[83]	2G87 (2.6), 2HPY (2.8)
			AGO ⁺	II- <i>trans</i> retinal ^c + Gα peptide ^e	2011	[49]	2X72 (3.0)
Opsin (bovine)		APO ⁺		2008	[51]	3CAP (2.9)	
		APO ⁺	Gα peptide ^e	2008	[52]	3DOB (3.2)	
Rhodopsin (squid)		IAG	11- <i>Cis</i> retinal ^c	2008	[84]	2Z1Y (3.7)	
				2008	[85]	2Z73 (2.5)	

Tabla 2. Estructuras de GPCRs determinadas mediante cristalización. Receptores de adenosina A_{2A}, adrenérgicos β₁ y β₂, de quimiocina CXCR4, dopaminérgico D₃ y de histamina H₁, entre otros. El tipo de ligando se indica mediante las iniciales IAG (agonista inverso), ANT (antagonista), AGO (agonista), PAG (agonista parcial) y APO (sin ligando). Se indica también el año, el código de identificación de la base de datos de proteínas PDB (*Protein Data Bank*; PDB ID) y la resolución de la estructura en angstroms (Å). (Tomado de Katritch y col., 2012).

Los datos de biología estructural obtenidos en estos estudios acerca de la estructura de receptores es un importante complemento para la información previa obtenida a partir de estudios de mutagénesis, estudios de relación estructura-actividad con series de compuestos y de las aproximaciones bioinformáticas de modelización de los GPCRs o de los sitios de unión. Esta información puede utilizarse para interpretar y explicar otros resultados

experimentales biofísicos, bioquímicos o farmacológicos y permite abordar el descubrimiento de fármacos cada vez desde una perspectiva más racional, sobre todo apoyándose en los métodos informáticos de modelización y simulación.

El análisis de estas estructuras mediante cristalografía ha permitido determinar una serie de características estructurales, en cierto grado comunes, de los GPCRs. La mitad de los receptores definida por el plano de la membrana que se orienta hacia la cara extracelular, y que está implicada en el reconocimiento y unión de ligandos, presenta pocos cambios conformacionales en el proceso de activación del receptor y la mayor variabilidad de secuencia entre los distintos GPCRs. La mitad inferior, implicada en la unión de proteínas de señalización, presenta los mayores cambios conformacionales durante el proceso de activación y una menor variabilidad de la secuencia entre los distintos GPCRs (Katritch y col., 2012) (**Fig. 17**).



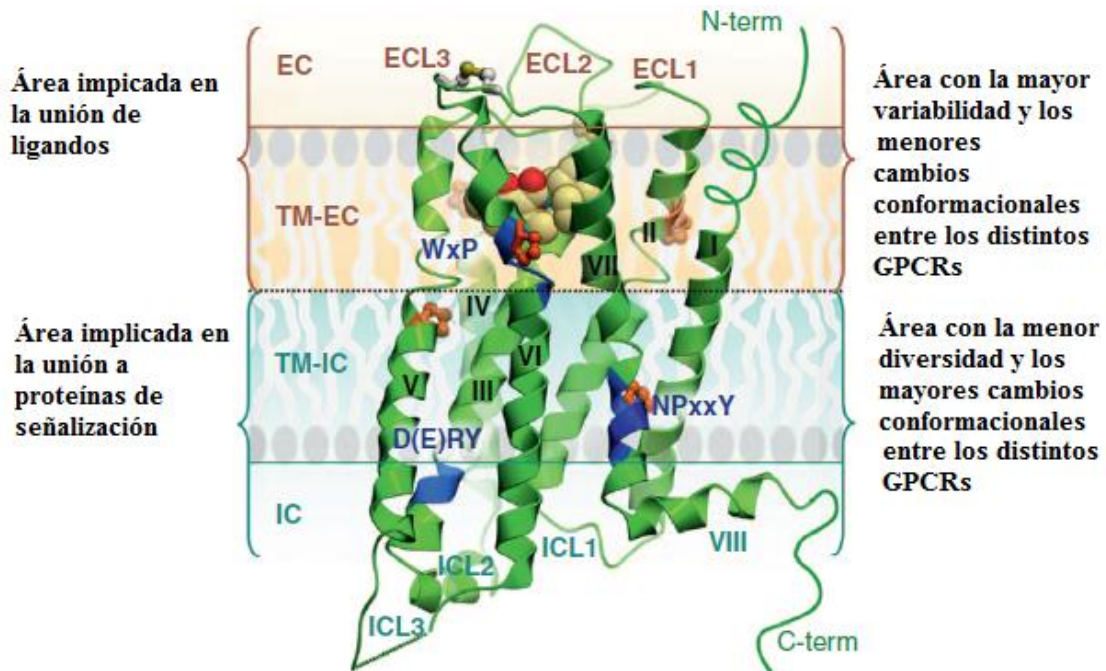


Fig. 17. Áreas, variabilidad y cambios conformacionales de los GPCRs. Se representa un modelo del receptor de dopamina D₃ realizado a partir de datos de cristalización (PDB ID: 3PBL).

La mitad extracelular aproximadamente desde el plano de la membrana es el área menos conservada. La otra mitad presenta los mayores cambios conformacionales asociados a la activación del receptor. (Tomada y modificada de Katritch y col., 2012).

La información acerca de la conformación y estructura de los bucles extracelulares hasta ahora era limitada por una serie de factores: son difíciles de alinear y de modelizar para elaborar modelos bioinformáticos por la falta de información sobre sus elementos estructurales y porque su estructura es difícil de determinar mediante estudios cristalográficos debido a su flexibilidad. Así, el área más alejada de EL2 del receptor A_{2A} se asocia a inestabilidad (Jaakola y col., 2008). Estos bucles presentan una serie de elementos que determinan la estructura del área extracelular tales como elementos de estructura secundaria, enlaces mediante puente disulfuro e interacciones con TM7 determinadas (Katritch y col. 2012). El enlace mediante puente disulfuro entre el bucle EL2 y la parte superior de TM3 y que implica al residuo 3.25 está muy conservado dentro de la superfamilia de GPCR (Rodríguez y col., 2011) y divide EL2 en dos partes: EL2a (la próxima a TM4) y EL2b (la próxima a TM5) (Katritch y col., 2012). Los elementos presentes en EL2a varían mucho entre receptores, pueden encontrarse desde la falta de

estructura secundaria en H₁ y D₃, hasta una lámina β en A_{2A} que interacciona con otra lámina β de EL1. EL2b posee también variabilidad: posee sólo 4 aminoácidos en D₃ y siete en A_{2A}, en este caso con una hélice α. Otros bucles (EL1 y EL3) presentan una menor variabilidad. En el caso de A_{2A}, y al contrario que en otros receptores, EL1 está desplazado hacia el interior y define la entrada al sitio de unión (Katritch y col., 2012). En este receptor la estructura secundaria de TM5 del receptor A_{2A} también difiere de otros receptores: se trata de una π-hélice (i+5) con más aminoácidos por vuelta que la α-hélice estándar. El área de la mitad extracelular de los receptores dispone de otras zonas de variabilidad, aunque de la forma del haz de hélices podría decirse que se conserva, sobre todo comparándola con la que presenta la mitad intracelular del receptor (Katritch y col., 2012).

Con respecto al sitio de unión ortostérico decir que son dominios bastante rígidos en los que ocurren cambios conformacionales limitados (Katritch y col., 2012). Esto podría conllevar ventajas a la hora de plantear un descubrimiento racional de fármacos a partir de la información de las estructuras publicadas. Los sitios de unión presentan variabilidad en la localización en la estructura global del receptor, haces de hélices que lo conforman y, por supuesto, aminoácidos que lo forman. En el caso del receptor A_{2A}, el sitio de unión se dispone de manera muy próxima a los bucles extracelulares y la interacción de ligandos con aminoácidos como Phe168 o Glu5.30 de EL2 y His264(7.29) de EL3 están presentes en las uniones de antagonistas de alta afinidad como ZM241385 (Jaakola y col., 2008), pero ausentes en los complejos con agonistas como NECA y adenosina que carecen de un sustituyente adecuado (Lebon y col., 2011). En el caso del receptor H₁ el sitio de unión se dispone en una zona profunda del haz de hélices y el ión fosfato (PO₄⁻³) modula el acceso al mismo (Katritch y col., 2012) (**Fig. 18**).

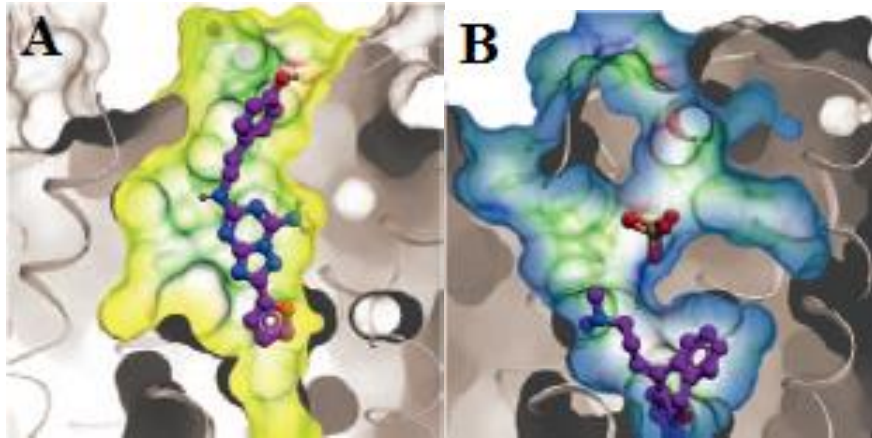


Fig. 18. Representación de los sitios de unión de los receptores de adenosina A_{2A} (A, izquierda, código PDB 3EML) y de histamina H_1 (B, derecha, código PDB 2RH1). El sitio de unión de adenosina del receptor A_{2A} se encuentra próximo a los bucles extracelulares y es similar a un canal accesible. El sitio de unión de H_1 se encuentra en una zona profunda del haz de hélices. (Tomado de Katritch y col., 2012).

Con respecto a la mitad intracelular de los GPCRs, hay una serie de secuencias que se conservan en todos los receptores de la clase A como el motivo D[E]RY en TM3, Glu6.30 o el motivo NPxxY en TM7 (Katritch y col., 2012). Con respecto al grado de variabilidad entre GPCRs en esta área, del que ya se ha dicho que es menor que el existente entre la mitad extracelular entre los mismos, IL1 y TM8 son regiones muy conservadas. Por el contrario la longitud de IL3 es muy variable (Katritch y col., 2012). Asimismo, la comparación de las formas activas e inactivas de los receptores aporta información acerca de los cambios estructurales que ocurren durante el proceso de activación (**Fig. 19** y **Tabla 3**).

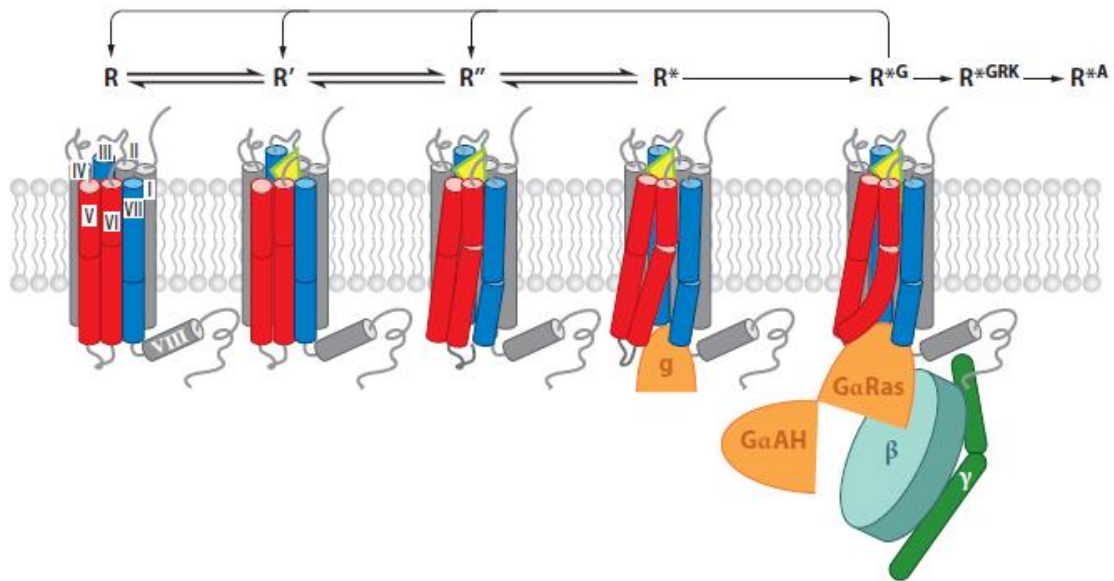


Fig. 19. Distintas configuraciones debidas a cambios conformacionales en el proceso de activación de GPCRs caracterizadas cristalográficamente. Se representa: el estado inactivo estabilizado por agonistas inversos o antagonistas (R); el estado inactivo con unión de baja afinidad de agonistas (R'); el estado activo (R''); dos estados activos en los que hay unión de la proteína G heterotrimérica, siendo el último un estado de unión y señalización a través de proteínas G completo tras la liberación de GTP (R* y R*G). R*GRK y R*A son estados conformacionales favorables a la unión a cinasas de GPCR y β-arrestinas. (Tomado de Katritch y col., 2013).

Receptor	R (inactive state)	R' (inactive agonist-bound state)	R'' (active state)	R* (active state, with G α mimic)	R* ^G (G protein signaling state)
A _{2A} AR	3EML (47); 3REY, 3RFM, 3PWH (46); 3VGA, 3VG9 (116); 3UZA, 3UZC (117); 4EII (79)	n/a	3QAK ^a (20); 2YDO ^b , 2YDV ^b (21)	n/a	n/a
β_1 AR	2VT4 (13); 2YCW, 2YCX, 2YCY, 2YCZ (43); 4AMI, 4AMJ (45)	2Y00, 2Y01, 2Y02, 2Y03, 2Y04 (44)	n/a	n/a	n/a
β_2 AR	2RH1 (12, 28); 2R4R, 2R4S (118); 3D4S (41); 3KJ6 (109); 3NY8, 3NY9, 3NYA (42)	3PDS (114)	n/a	3P0G ^c (23)	3SN6 ^d (22)
Rhodopsin	1F88 (9), 1U19 (40) ^e	2G87, 2HPY (39)	3CAP ^f (15)	3DQB ^g (14), 2X72 ^g (17); 3PQR ^g , 3PXO ^g (18); 4A4M ^h (19)	n/a

Tabla 3. Distintos estados de activación caracterizados en las distintas estructuras cristalográficas de GPCRs. El receptor A_{2A} se ha caracterizado en la forma inactiva y activa. Los estados conformacionales de los receptores tabulados son el estado inactivo (R), el estado inactivo con unión de baja afinidad de agonistas (R'), el estado activo (R''), y dos estados activados en los que hay unión de la proteína G heterotrimérica, siendo el último un estado de unión y señalización a través de proteínas G completo tras la liberación de GTP (R* y R*^G). (Tomado de Katritch y col., 2013).

En el área implicada en la unión a proteínas de señalización de GPCRs, la variación de la posición de TM6 en los distintos estados de activación se ha cuantificado desde 3.5 Å (receptor A_{2A}) hasta 14 Å (receptor β_2 -adrenérgico acoplado a proteínas G) (Katritch y col., 2013). Otros motivos estructurales de este área como el enlace iónico entre Arg3.50-Asp(Glu)3.49 se han encontrado en todas las estructuras cristalizadas inactivas y también en la activa de A_{2A} (Katritch y col., 2013).

Mediante los estudios de cristalización pueden caracterizarse sitios alostéricos del receptor, tales como el bolsillo alostérico presente en el receptor A_{2A} en un canal que une el área extracelular e intracelular del receptor y que aloja un átomo de sodio. Este bolsillo se colapsa en el proceso de activación. Con respecto a la unión de Na se ha observado un efecto modulador alostérico negativo de la unión de agonistas en este y otros GPCRs (Katritch y col., 2013). También presenta interés el estudio de la di- y oligomerización; un ejemplo es la determinación de dos grupos consenso de interfaces de simetría a partir del estudio de las estructuras cristalográficas, las interfaces de simetría A (para rodopsina y el receptor opioide

κ entre otros, implica a TM1, TM2 y TM8) y B (para el receptor de quimiocina CXCR4 entre otros, implica a las zonas extracelulares de TM5 y TM6, intracelulares de TM3 y TM4 y a TM5 y TM6). La disposición en el dímero de estas interfaces es antiparalela (Katritch y col., 2013).

En la actualidad cobran importancia los estudios de simulación de dinámica molecular y otras aproximaciones bioinformáticas de modelización de GPCRs, realizados a partir de datos obtenidos de las estructuras cristalográficas con métodos informáticos (Rodríguez y col., 2011). En general, a la hora de construir un modelo sobre el que realizar las simulaciones se tiene en cuenta todo tipo de información presente en los estudios cristalográficos del receptor, como pueden ser enlaces iónicos entre aminoácidos o interacciones entre dominios bien definidas. Se realizan análisis de las conformaciones más probables de determinados segmentos (TM) y se atribuyen valores de fluctuación a cada área que se incorporan a la dinámica del receptor simulado, pudiendo incluirse simulaciones de la interacción con agua y la membrana plasmática (Rodríguez y col., 2011).

1.2.3.2. Aspectos cinéticos de la interacción ligando-receptor: el tiempo de residencia (t_R)

Los parámetros que caracterizan la unión de un fármaco o ligando a un receptor en el equilibrio, como las constantes de disociación en el equilibrio (K_d y K_i), no aportan información acerca de la dimensión temporal del proceso de unión ligando-receptor. Los ensayos de determinación de estos parámetros se realizan en sistemas cerrados en el equilibrio, en los cuales las concentraciones de ligando libre prácticamente se mantienen invariables. Sin embargo, los sistemas *in vivo* son sistemas abiertos en los cuales la concentración de fármaco libre puede variar o ser objeto de una serie de fenómenos que modifican su unión al receptor con respecto a condiciones de equilibrio en ensayos *in vitro*, tales como el *rebinding* (ver más adelante). El parámetro t_R permite obtener una medida de la duración del complejo ligando-receptor, un parámetro menos variable en las distintas condiciones *in vitro* o *in vivo*. El parámetro tiempo de residencia (t_R) se define como el tiempo de unión medio al receptor de cada molécula de una determinada población de las mismas. Se define matemáticamente como la inversa de la constante de velocidad de disociación ($1/k_{off}$). También se define el parámetro vida media de disociación ($t_{1/2}^{diss}$) como la vida media del complejo ligando-receptor y se calcula como $t_{1/2}^{diss} = \ln 2/k_{off}$ (Tummino

y Copeland, 2008). El parámetro tiempo de residencia (t_R) presenta interés en el proceso de búsqueda de fármacos, en el estudio de la farmacodinamia de fármacos y de su farmacocinética y por su relación con la eficacia, seguridad y selectividad de fármacos en terapéutica (Copeland, 2010).

Con respecto a los fenómenos que condicionan la unión del ligando al receptor en *in vivo* es preciso destacar el fenómeno de *rebinding*. De acuerdo con algunos autores, el fenómeno de unión de determinados fármacos estaría condicionado por la formación de una capa de medio extracelular alrededor de la célula que actuaría como una barrera de difusión de moléculas de fármaco promoviendo su unión de nuevo al receptor. Este límite a la difusión es favorecido por la complejidad anatómica y fisiológica, la complejidad de la matriz extracelular, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y factores patológicos (Vauquelin y Charlton, 2010). Basándose en este concepto, se propuso un modelo para explicar el comportamiento farmacocinético de [^3H]-diprenorfina (Perry y col., 1980) caracterizado mediante un microcompartimento del receptor en el que se contiene la barrera de difusión y en el cual ocurren fenómenos de asociación y disociación de acuerdo con las constantes de velocidad de asociación y disociación k_{on} y k_{off} . El fármaco difunde y se reequilibra con el fármaco presente en otras áreas del cerebro de acuerdo con las constantes de primer orden k_{in} y k_{out} . Así, y de acuerdo con este modelo, la probabilidad de *rebinding* depende de la k_{on} y no de la afinidad (Vauquelin, 2010). Otro modelo de explicación del *rebinding* que guarda similitudes es el de Goldstein y col. (1995). El fenómeno de *rebinding* se considera un parámetro fundamental a tener en cuenta en condiciones tanto *in vitro* como *in vivo* y del que se espera que prolongue la duración de la acción al hacer que aumente o se estabilice la ocupación del receptor en los distintos tiempos de la curva farmacocinética de una administración, pese a la barrera para la unión del ligando al receptor que supone la capa de difusión en los estadios iniciales de la administración (Vauquelin, 2010). Con respecto a la interpretación de ensayos funcionales en los que se observa un antagonismo no remontable existen dos explicaciones: la actividad moduladora alostérica o la existencia de fenómenos de cooperatividad negativa y el recurso a t_R elevado del competidor en el receptor, sobre todo en ausencia de reserva de receptores o tratándose de un proceso de unión del ligando al receptor de un solo paso (Vauquelin y Szczuka, 2007).

La dimensión tiempo del fenómeno de unión del fármaco al receptor puede ser caracterizado mediante las constantes de velocidad de asociación y disociación del fármaco del receptor (k_{on} y k_{off} , respectivamente). Ambas definen el valor de la constante de disociación *cinética* (K_d) de acuerdo con la ecuación k_{off}/k_{on} , ecuación válida para referirse al primer paso de unión del complejo binario ligando-receptor (Tummino y Copeland, 2008) (**Fig. 20**). La constante de disociación (K_d) se relaciona, además, con parámetros termodinámicos como la energía libre de Gibbs (ΔG) ya que las diferencias de energía libre entre los estados unido y libre del fármaco al receptor (ΔG_d) determina el valor de afinidad. Éstas se relacionan mediante la ecuación que define la variación de energía libre como $\Delta G_d = R \cdot T \cdot \ln(K_d)$, siendo $R = 8.314 \text{ (J} \cdot \text{°K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$ y T la temperatura en grados kelvin (Pan y col., 2013).

La constante de velocidad de disociación (k_{off}) informa acerca de la dimensión temporal del fenómeno de unión del ligando al receptor, concretamente de la tasa de disociación de los elementos del complejo. La constante de velocidad de asociación (k_{on}) hace referencia a la velocidad de formación del complejo fármaco-receptor. El cálculo de esta a partir de la constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}) depende de la concentración del ligando que se asocia y del mecanismo cinético de unión ligando-receptor (**Fig. 20**). Se han definido tres mecanismos cinéticos de interacción ligando-receptor (Tummino y Copeland, 2008):

- El primero (mecanismo A) consiste en un mecanismo de asociación y disociación de un solo paso de manera que el receptor (R) y el ligando (L) se unen para formar el complejo (RL), y esta formación es el único paso determinante cinéticamente. La constante de velocidad de disociación (k_{off}) equivale a la constante de velocidad de disociación k_2 y la constante de velocidad de asociación (k_{on}) equivale a la constante de asociación k_1 . En este modelo el valor de la constante de asociación observada equivale a $k_1 \cdot [L] + k_2$, siendo [L] la concentración de radioligando. El modelo de asociación de un paso de unión y otro de disociación, se esquematiza en la siguiente figura:



Este mecanismo cinético de unión se considera predominante en la mayoría de los procesos de unión ligando a GPCRs (Guo y col., 2014a).

- Un segundo modelo de interacción ligando-receptor (mecanismo B) (Tummino y Copeland, 2008) es análogo al modelo de interacción enzima-sustrato con ajuste inducido (Koshland y col., 1958). En este modelo hay una formación inicial de un complejo (RL), a partir del cual se forma mediante isomerización otro complejo (R*L). Ambas fases determinan la velocidad de unión del ligando. El valor de la constante de velocidad de disociación en este caso viene definido en función de una ecuación que incorpora las dos microconstantes de disociación (k_2 , correspondiente a la disociación del complejo RL y k_4 , correspondiente a la reversión de isomerización del complejo R*L). Puede esperarse que en la mayoría de los casos sea la reversión de isomerización k_4 el factor limitante de la disociación del complejo. Unos valores similares para k_2 y k_4 provocaría que ambas fueran limitantes de la disociación del complejo ligando-receptor. Puede determinarse una constante de disociación en el equilibrio correspondiente a la formación del complejo RL (K_d) y otra correspondiente a la afinidad del complejo final R*L (K_d^*) (**Fig. 20**). Este mecanismo cinético de asociación de un paso de unión y otro de disociación, se esquematiza en la siguiente figura:



Este mecanismo cinético de unión se considera predominante en la mayoría de los procesos de unión ligando-receptor (Guo y col., 2014a).

- El tercer mecanismo propuesto (mecanismo C) (Tummino y Copeland, 2008) se trata de una selección conformacional. En este modelo existe un equilibrio entre dos estados conformacionales en ausencia de ligando. A uno de ellos es capaz de unirse el ligando (R*). A medida que se une ligando y se forma el complejo (R*L) en función de la concentración de L y de la microconstante k_3 decrece la población de receptores R*, que se forman a partir de receptores R según la microconstante k_1 . Una característica que lo diferencia de los mecanismos A y B es que el valor de la constante de asociación observada (k_{obs}) disminuye al aumentar la concentración de L (aumenta en los modelos de mecanismos A y B).

Kinetic Parameter	Mechanism A ^a	Mechanism B ^a	Mechanism C ^a
K_d^b	$\frac{k_2}{k_1}$	$\frac{k_2}{k_1}$	not applicable
K_d^{*c}	not applicable	$\frac{k_2}{\left(k_1 + \frac{k_1 k_3}{k_4}\right)} = \frac{K_d}{\left(1 + \frac{k_3}{k_4}\right)}$	$\frac{k_4}{k_3}$
k_{obs}^d	$k_1[L] + k_2$	$k_4 + \frac{k_3 k_1 [L]}{k_2} = k_4 + \frac{k_3}{1 + \frac{K_d}{[L]}}$	$k_1 + \frac{k_2}{\left(1 + \frac{k_3 [L]}{k_4}\right)} = k_1 + \frac{k_2}{\left(1 + \frac{[L]}{K_d^*}\right)}$
k_{off}^e	k_2	$\frac{k_2 k_4}{(k_2 + k_3 + k_4)}$	k_4
τ^f	$\frac{1}{k_2}$	$\frac{(k_2 + k_3 + k_4)}{k_2 k_4}$	$\frac{1}{k_4}$
$t_{1/2}^{diss. g}$	$\frac{0.693}{k_2}$	$\frac{0.693(k_2 + k_3 + k_4)}{k_2 k_4}$	$\frac{0.693}{k_4}$

Fig. 20. Mecanismos cinéticos de unión ligando-receptor y definiciones matemáticas de constantes para los modelos A (mecanismo de un solo paso), B (mecanismo de tipo ajuste-inducido) y C (equilibrio conformacional). ^b K_d es la constante de disociación en el equilibrio referida al complejo inicial RL. ^c K_d^* es la constante de disociación en el equilibrio para el complejo final binario R*L en un mecanismo cinético de unión de dos pasos. ^d k_{obs} es la constante de velocidad de asociación observada y ^e k_{off} la constante de velocidad de disociación. k_1 y k_2 equivalen a k_{on} y k_{off} en el mecanismo A. En el mecanismo B hay dos constantes de velocidad de asociación (k_1 y k_3) y dos constantes de velocidad de disociación (k_2 y k_4); k_3 y k_4 corresponden al ajuste conformacional. En el mecanismo C hay dos constantes de velocidad de interconversión entre estados de un receptor (k_1 y k_2); una constante de velocidad de asociación (k_3) y una constante de velocidad de disociación (k_4) al receptor competente para unir ligando (R*). ^f τ es el tiempo de residencia (t_R) y ^g $t_{1/2}^{diss}$ la vida media de disociación del complejo receptor-ligando. (Tomado de Tummino y Copeland, 2008).

A partir de la constante de asociación observada (k_{obs}) puede determinarse la k_{on} en los distintos modelos de unión de acuerdo con las ecuaciones apropiadas. La correspondiente al mecanismo A define k_{on} como el cociente $(k_{obs} - k_{off})/[L]$, siendo [L] la concentración experimental del radioligando que se asocia. En relación a los mecanismos que se acaban de mencionar la k_{obs} presenta un perfil de variación característico en función de la concentración de ligando y los distintos mecanismos cinéticos de unión (Fig. 21).

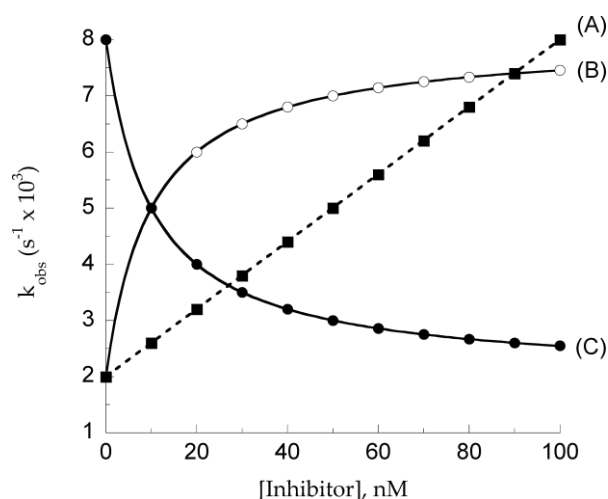


Fig. 21. Valores observados experimentalmente de la constante de asociación observada (k_{obs} ; constante de pseudoprimer orden) en función de la concentración del ligando (*inhibitor*) y del mecanismo de unión al receptor (A, B o C). La curva A (ajuste lineal) corresponde al modelo cinético de asociación simple o de un solo paso. La curva B corresponde al modelo cinético de dos pasos (con isomerización tras la unión) y es análogo al modelo de ajuste inducido de interacciones enzima-sustrato. Los datos correspondientes al mecanismo B se ajustan a un modelo de hipérbola. La curva C corresponde al modelo cinético de selección conformacional. (Tomado de Tummino y Copeland, 2008).

Son determinantes a nivel molecular de la cinética de unión de un ligando a un receptor aspectos como: la accesibilidad del sitio de unión y las interacciones que establece el fármaco hasta llegar al sitio de unión; los cambios conformacionales de los distintos dominios en el acceso del ligando al sitio de unión; las interacciones del ligando con el receptor de tipo iónico, mediante puentes de hidrógeno o de tipo van der Waals, no siendo la complementariedad iónica un factor determinante para una rápida unión de ligandos (Collins, 2012); y la presencia de moléculas de agua (Pan y col., 2013). En estudios de simulación computacionales en el receptor A_{2A} se ha relacionado la presencia de moléculas de agua con disminuciones del t_R de antagonistas del receptor de adenosina A_{2A} (Bortolato y col., 2013). Las numerosas estructuras cristalográficas de GPCR, publicadas en los últimos años contribuirán a determinar aminoácidos o dominios que podrían ser condicionantes de la cinética de unión de ligandos.

En relación con determinantes estructurales del t_R y como ejemplo, destacar que se ha relacionado la mayor flexibilidad del segundo bucle extracelular del receptor

muscarínico M_2 con respecto al de M_3 , con las diferencias en tiempo de residencia de tiotropio en estos dos receptores, siendo unas 10 veces mayor en el último (Kruse y col., 2012). Como ejemplo, pueden tomarse los valores de t_R en el receptor M_3 de 90 min para tiotropio, 50 min para aclidinio y de algo más de medio minuto para ipratropio calculados a partir de los valores de k_{off} publicados por Gavaldà y col., (2009) que se obtuvieron mediante ensayos de asociación y disociación en membranas. No debe olvidarse que la temperatura y fuerza iónica del medio experimental o fisiológico constituyen factores de primer orden que influyen sobre la determinación del tiempo de residencia. Como ejemplo y con respecto al receptor M_3 , la determinación del tiempo de ocupación de fármacos como tiotropio en ensayos cinéticos *in vitro* a 37°C y con concentraciones de Na^+ similares a las fisiológicas determina una vida media ($t_{1/2}$) unas 10 veces inferior al obtenido en otras condiciones no fisiológicas (Sykes y col., 2012).

Los estudios de relación estructura-actividad clásicos relacionan parámetros físico-químicos o estructurales de ligandos con parámetros de afinidad o eficacia funcional. Similares en ciertos aspectos a aquellos, los estudios de relaciones cinético-estructurales (*Structure-Kinetic Relationship*, SKR) incorporan la dimensión tiempo a la hora de describir esas relaciones, entre ellas la variable tiempo de residencia y presentan indudable interés en el área de descubrimiento de fármacos su implementación en un formato de alto rendimiento. Como ejemplo de este tipo de estudios y de manera destacada se ha descrito una buena correlación entre t_R y eficacia funcional para determinados agonistas del receptor A_{2A} de adenosina (Guo y col., 2012). Otros trabajos de farmacología molecular describen relaciones entre la estructura y la cinética de unión (SKR) utilizando el tiempo de residencia, de derivados del ligando ZM241385 en el receptor A_{2A} de adenosina (Guo y col., 2014) o de ligandos del receptor muscarínico M_3 (Tautermann y col., 2013).

El tiempo de residencia presenta interés en terapéutica: puede ser determinante para la duración, la eficacia o la idoneidad de una concreta indicación terapéutica. Es importante su integración e interpretación conjunta junto a otros parámetros farmacocinéticos. Para un modelo sencillo de distribución monocompartimental que tiene en cuenta la asociación y disociación del ligando al receptor, se concluye que para la disminución de complejos ligando-receptor o la disociación del receptor o la tasa de eliminación del compartimento serían el paso limitante del proceso (Dahl y Akerud, 2013). Además, hay que tener en cuenta

que la existencia del fenómeno de *rebinding* puede prolongar la duración de acción (Vauquelin y Charlton, 2010). De esta forma existe una dependencia de la eficacia de otros parámetros farmacocinéticos: para los broncodilatadores β -adrenérgicos (salbutamol, indacaterol y salmeterol) se investiga, pero no se encuentra una relación entre tiempo de residencia y duración de acción terapéutica (Sykes y Charlton, 2012). Existen modelos farmacocinéticos que integran parámetros cinéticos de unión a receptores con conceptos de farmacocinética clásicos. El modelo disposición del fármaco mediado por diana (*target-mediated drug disposition*; TMDD) considera que la capacidad de unión del fármaco a la diana es limitada y saturable, y que esta unión tiene implicaciones por si misma para los fenómenos de disposición (Levy, 1994; Peletier y Gabrielsson, 2009). Integran parámetros tales como concentración de ligando (L), de receptor (R) o de complejo ligando-receptor (RL), parámetros de asociación y disociación del receptor (k_{on} y k_{off}) y parámetros de velocidad de administración y eliminación. Simplificaciones de este modelo permiten asumir que las variaciones de concentraciones de L, R o RL son despreciables (modelo cuasi estado estacionario, quasi-steady-state; QSS) o que lo es el proceso de disposición en la diana (cuasi-equilibrio; quasi-equilibrium; QE).

Un ejemplo de esto lo constituye el caso de memantina, un antagonista NMDA no competitivo cuyo perfil de tiempo de residencia permite prevenir el daño neuronal en casos de activación patológica del receptor, mostrando un perfil de seguridad y tolerabilidad aceptable y superior al de un antagonista de lenta disociación, pues permitiría la neurotransmisión fisiológica (Lipton, 2006).

Se asocia la *duración* de acción terapéutica del antihipertensivo inhibidor de renina aliskirén con sus elevados tiempos de residencia como inhibidor enzimático. También se asocian la superior duración de acción y eficacia terapéutica del antihistamínico H_1 desloratadina (Anthes y col., 2002) y del candesartán (antagonista de receptores AT_1 de angiotensina) (Vauquelin y col., 2006) con un mayor tiempo de residencia en la diana. Se han relacionado la aparición de resistencias a fármacos anti-VIH como darunavir (inhibidor de la proteasa) con disminuciones del tiempo de residencia de estos fármacos (Dierynck y col., 2007). En la indicación de ácido acetilsalicílico para la prevención de eventos aterotrombóticos a bajas dosis, la idoneidad de esta concreta indicación terapéutica se debe a una acción farmacodinámica sostenida (irreversible) en plaquetas, que no sintetizan

ciclooxigenasa. La baja dosificación conlleva ventajas en cuanto a efectos adversos (Swinney, 2008).

De forma destacada para el tratamiento de la esquizofrenia, algunos autores atribuyen a la diferencia entre t_R de distintos antipsicóticos las diferencias en el perfil de efectos adversos extrapiramidales de los antipsicóticos (Kapur y Seeman, 2001). El t_R para fármacos como clozapina y quetiapina en el receptor D_2 es inferior a un minuto; para otros antipsicóticos clásicos como haloperidol y clorpromazina está en torno a 30 min (Seeman, 2014). Se considera que el tiempo de residencia de los primeros controla los síntomas positivos y no interrumpe la señalización dopaminérgica fisiológica, lo que disminuye la incidencia de efectos adversos extrapiramidales (Álamo y col., 2007a) Además en relación con este receptor y fármacos, en estudios de farmacología se han encontrado relaciones de correlación entre una rápida disociación del receptor D_2 y menor lipofilia y menor peso molecular estudiando compuestos como benzamidas, butirofenonas, compuestos tricíclicos análogos a fenotiazina (tipo clozapina), y otros como aminopiridinas, piridazinas y aminotiazoles (Tresadern y col., 2011).

La relevancia en terapéutica del tiempo de residencia viene determinada no sólo por los posibles efectos derivados de la actividad en un tipo de diana, sino que en el caso de fármacos con *perfil multirreceptorial* los distintos tiempos de residencia en las distintas dianas pueden generar para cada fármaco un concreto perfil de *selectividad cinética*. Tras la disposición del fármaco el tiempo de residencia en cada diana podría ser determinante para el perfil de efectos adversos o eficacia. Los fármacos para el tratamiento de enfermedades del SNC (esquizofrenia, depresión o manía) suelen presentar un perfil de selectividad complejo, responsable en general de superioridad terapéutica sobre todo en el caso de los antipsicóticos atípicos, pero también del perfil de efectos secundarios. En el caso de los broncodilatadores antagonistas muscarínicos tales como el tiotropio, el tiempo de residencia de tiotropio en el receptor M_3 es considerablemente mayor al de ipratropio. Esta característica inicialmente se utilizó para explicar su eficacia tras la administración de una sola dosis al día ya que su perfil farmacocinético sistémico no ayudaba a explicarla (Disse y col., 1999) aunque hoy se proponen que la larga duración de acción de broncodilatadores antagonistas muscarínicos debe estar provocada por otros fenómenos como el *rebinding* (Sykes y col., 2012). Sin embargo, para esta clase de fármacos (ipratropio, tiotropio y

aclidinio), las diferencias de tiempo de residencia entre los receptores M_2 y M_3 , con un mayor tiempo de residencia de todos los fármacos en el receptor M_3 con respecto al receptor M_2 y un ratio de $k_{off} M_2/M_3$ superior también en todos los casos a 4 (Gavaldá y col., 2009), confieren un perfil de selectividad cinética favorable a la producción de menos reacciones adversas cardiovasculares relacionadas con el antagonismo M_2 (Gavaldá y col., 2009). Aunque respecto a esto último algunos autores consideran que aclidinio presenta un perfil tendente a la producción de menos efectos adversos cardiovasculares, no sólo por su menor tiempo de residencia en el receptor M_2 (al igual que ipratropio) con respecto a tiotropio, sino por un fenómeno de metabolización sistémica rápida que minimiza su distribución en corazón (Gavaldá y col., 2009).

El t_R se considera de elevada importancia en descubrimiento temprano de fármacos, concretamente en los procesos iniciales de cribado de moléculas y de optimización de cabezas de serie (Copeland y col., 2006; Lu y Tonge, 2010). Se considera un predictor de la eficacia (Lu y Tonge, 2010). Se considera que en actividades de investigación de relaciones entre la estructura y la actividad de moléculas (SAR) el parámetro k_{on} no presenta tanto interés porque aun tratando de modificarlo la unión del fármaco al receptor puede estar determinada por la difusión, la dosis u otros parámetros farmacocinéticos (Copeland y col., 2006). La optimización de K_d y de la constante de velocidad de disociación (k_{off}) en derivados de un farmacóforo no tiene por qué ser convergente (Copeland y col., 2006). A esto se añade que el parámetro t_R es de especial importancia y puede resultar determinante para la eficacia terapéutica en un sistema *in vivo*, ya que puede determinar entre otros la duración de acción o el perfil de selectividad (cinética). Por estas razones se recomienda disponer de información acerca de la dimensión temporal del fenómeno de unión ligando-diana desde un primer momento, determinando el parámetro t_R a partir del valor de la constante k_{off} . Algunos autores proponen en actividades de descubrimiento de fármacos como validación de dianas, generación de cabezas de serie y su optimización, una integración sistemática de consideraciones de tipo farmacocinético y farmacodinámico (farmacología integrativa, farmacología cuantitativa) más amplia, en aspectos tales como dosis-respuesta, márgenes de seguridad y parámetros de distribución (Gabrielsson y col., 2009). Como ejemplo en actividad de descubrimiento de fármacos de inhibidores de la enzima FabI de *Francisella tularensis* se ha visto correlación entre t_R y eficacia *in vivo* en

modelo animal de tularemia, pero no para parámetros de afinidad (K_i) o concentración mínima inhibitoria (MIC) (Lu y Tonge, 2010).

En cuanto a la realización de ensayos cobran importancia diseños experimentales adecuados para llevar a cabo determinaciones en formatos de medio y alto rendimiento (*High-Throughput Screening*, HTS). Los procedimientos más comunes para la determinación de las constantes de velocidad de asociación y disociación a receptores son los “directos” mediante la iniciación de la asociación o disociación a distintos tiempos, midiendo el radioligando unido a cada uno de ellos y el procedimiento de competición cinética (Motulsky y Mahan, 1984; Sykes y col., 2010), que consiste en llevar a cabo una competición de unión/asociación entre un radioligando y un ligando competidor del que queremos determinar sus k_{on} y k_{off} , determinando a distintos tiempos el radioligando unido. Este último diseño experimental presenta la ventaja de que puede utilizarse para determinar constantes cinéticas de ligandos no marcados. El desarrollo matemático del modelo parte de que entre ambos ligandos y el receptor se produce una asociación mediante un mecanismo cinético de un solo paso.

Partiendo del método de competición cinética se ha desarrollado un modelo de ensayo que difiere en la ejecución y en el análisis de los resultados del método clásico: el ensayo de asociación competitiva de dos puntos (*dual-point competition association assay*; Guo y col., 2012a). Se basa en el distinto perfil de las curvas de competición cinética según el que la velocidad de disociación del competidor sea mayor o menor que la del radioligando (**Fig. 22**). El cálculo de cocientes de unión específica a distintos tiempos permite determinar si el ligando competidor posee una mayor o menor constante velocidad de disociación de la diana que el radioligando cuya constante es conocida. Permite simplificar las determinaciones de unión de radioligando y utilizarlo en ensayos de alto rendimiento.

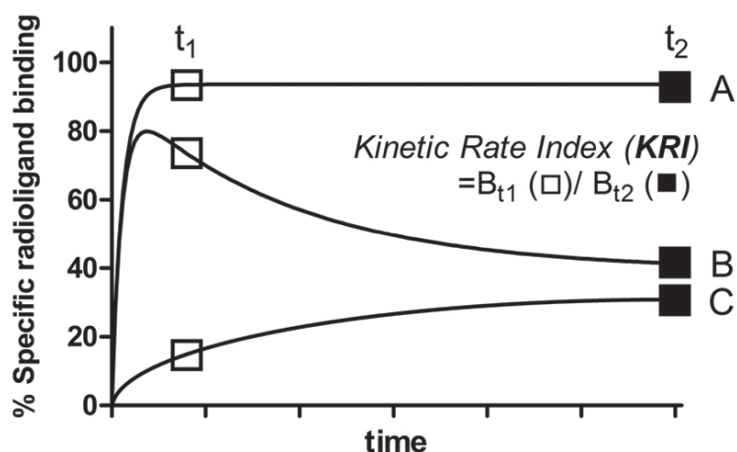
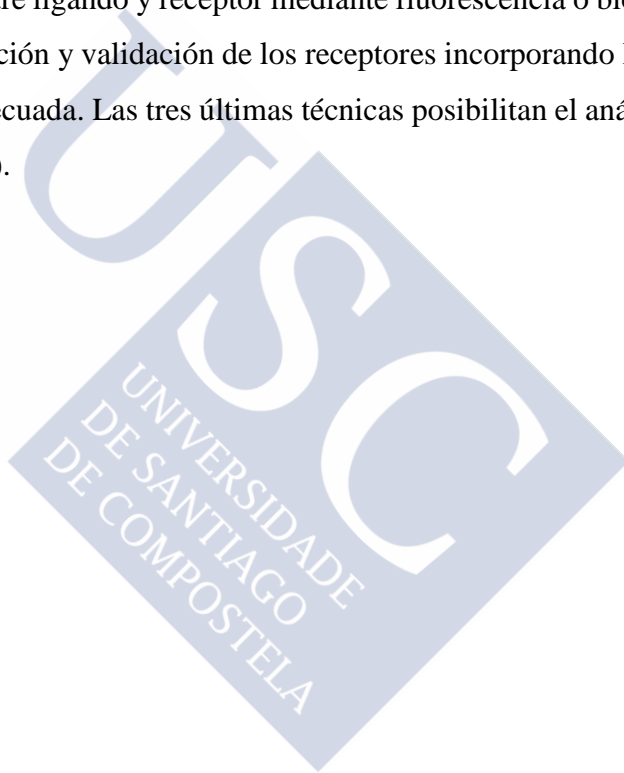


Fig. 22. Modelo de representación de los resultados de un ensayo de competición cinético de dos puntos. La curva A representa una asociación de radioligando simple. La curva B representa un experimento de competición en el que la constante de velocidad de disociación del competidor es menor que la del radioligando ($k_2 > k_4$), esto es, el tiempo de residencia del competidor es mayor. La curva C corresponde a una competición en la que la constante de velocidad de disociación del radioligando es la menor ($k_2 < k_4$). (Tomado de Guo y col., 2012a).

Otro procedimiento *in vitro* que permite determinar la k_{off} de ligandos sin marcar es el de competición en dos pasos (*two-step competition*, TSC) (Pacieu y col., 2010). Consiste en una incubación con un rango de concentraciones de competidor, un lavado y finalmente una incubación con una concentración de radioligando durante un tiempo determinado. Se produce un desplazamiento de la curva de competición en función del t_R del ligando competidor y puede determinarse el valor de k_{off} del ligando competidor mediante el ajuste a un modelo derivado del propuesto por Motulsky (1984) y utilizado por Malany y col., (2009).

En cuanto a otros métodos experimentales para la determinación del tiempo de residencia, distintos a los ya abundantemente documentados basados en la unión de radioligandos, está desarrollado y establecido el método de resonancia de plasma de superficie (*surface plasmon resonance*, SPR) que tiene en cuenta el índice refractivo y el ángulo crítico de la luz polarizada (Hoffmann y col., 2015). Requiere la inmovilización de la muestra, y en general la purificación, en un entorno no biológico pero que posibilita sistemas de flujo y la detección en tiempo real. Otras técnicas en desarrollo pueden clasificarse en dos grupos: el microbalance de cristal de cuarzo (“quartz crystal

microbalance”) y las técnicas basadas en la fluorescencia y unión de ligandos (Hoffmann y col., 2015). El primero es una técnica biofísica comparable a la SPR en muchas ventajas e inconvenientes. Las técnicas de fluorescencia comprenden las basadas en la intensidad de fluorescencia, la anisotropía de fluorescencia, la espectroscopía de correlación de fluorescencia y podrían clasificarse como tales las basadas en la transferencia de energía de resonancia. Presentan como inconveniente general el que el uso de ligandos modificados incorporando fluoróforos requiere realizar una caracterización farmacológica de los mismos. Las técnicas de anisotropía y de espectroscopía de correlación no necesitan la separación del radioligando no unido del unido. Para hacer uso de las técnicas basadas en transferencia de energía entre ligando y receptor mediante fluorescencia o bioluminiscencia se necesita el diseño, clonación y validación de los receptores incorporando la secuencia de la proteína fluorescente adecuada. Las tres últimas técnicas posibilitan el análisis en tiempo real (Hoffman y col., 2015).



2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





2.1. ESTUDIO DE DETERMINANTES ESTRUCTURALES EN EL SITIO DE UNIÓN DEL RECEPTOR RELEVANTES PARA EL PERFIL DE AFINIDAD Y SELECTIVIDAD DE ANTIPSICÓTICOS SOBRE GPCRS DE SU RECEPTOROMA

La primera parte del trabajo presentado se centra en conocer la contribución de determinados componentes estructurales en el bolsillo de unión de GPCRs pertenecientes al receptoroma de antipsicóticos a la interacción ligando-receptor para estos fármacos.

Clozapina es uno de los antipsicóticos más eficaces, considerado el “*gold standard*” entre los antipsicóticos actuales, pero presenta el inconveniente del grave efecto adverso de agranulocitosis y se reserva para el tratamiento de psicosis refractarias. Olanzapina, con mejor perfil de seguridad, constituye una opción ampliamente utilizada con una buena eficacia clínica (Juliano y col., 2013). Con respecto al perfil multirreceptorial característico de estos fármacos existe un interés en conocer el perfil “ideal” asociado a eficacia y disminución de efectos adversos. El estudio de este perfil siempre conlleva un aumento del conocimiento acerca de la fisiopatología y clínica de la enfermedad y permite comprender aspectos como selectividad farmacológica y su relación con las reacciones adversas o con la eficacia clínica, vías de señalización molecular celulares y vías de señalización cerebrales, relaciones estructura-actividad de fármacos y estructura de receptores. El primer objetivo de nuestro trabajo fue conocer si determinados residuos localizados en el sitio de unión de GPCRs relevantes en la farmacología de los antipsicóticos son determinantes para el perfil de afinidad y selectividad de estos fármacos, centrándonos en los antipsicóticos de gran relevancia terapéutica clozapina y olanzapina (**Fig. 23**) como modelo de estudio.

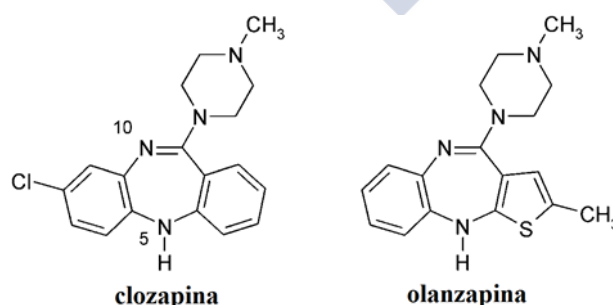


Fig. 23. Estructura química de la clozapina (dibenzodiazepina) y de la olanzapina (tienobenzodiazepina). Aparecen señalados los átomos de N en posiciones 5 y 10.

Este trabajo se llevó a cabo en el contexto de un proyecto de colaboración con el grupo de Informática Biomédica del Dr. Manuel Pastor (IMIM/Universitat Pompeu Fabra). Nuestro estudio partió de resultados previos obtenidos por dicho grupo, a partir de modelos computacionales de 14 receptores GPCR diana de antipsicóticos (entre ellos los serotoninérgicos 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A} y el dopaminérgico D₂) realizados por homología en base a la estructura cristalográfica del receptor β_2 -adrenérgico unido a carazolol (código PDB, *Protein Data Bank*: 2RH1; Cherezov y col., 2007), disponible en el momento en el que se llevaron a cabo estos estudios (Selent y col., 2008). El trabajo se completó con el estudio de los perfiles de afinidad de clozapina y olanzapina por los distintos GPCRs modelizados, estudios de acoplamiento de ligandos a estos receptores (“*docking*”) y análisis de la relación entre estos aspectos y la secuencia aminoacídica y estructura de los GPCRs a estudio.

El trabajo de Selent y col. (2008), base para nuestros estudios, abordó en primer lugar un análisis del perfil de afinidad de clozapina y olanzapina por 14 GPCRs del receptoroma de antipsicóticos, en concreto, los serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆ y 5-HT₇; dopaminérgicos D₂, D₃ y D₄; muscarínicos M₁ y M₄; adrenérgicos α_1 y α_2 e histaminérgico H₁. Los valores de afinidad tenidos en cuenta para la realización de este estudio corresponden a datos experimentales que se recopilaron de la literatura, así como de bases de datos públicas, y son los que se recogen en la **Tabla 4**.

Receptor	Rhodopsin homology ^[a]	β_2 Adrenergic homology ^[a]	Res. 3.36	pK_i olanzapine ^[13]	pK_i clozapine ^[13]
5-HT _{2A}	10.7	60.7	S	8.8	8.3
5-HT _{2B}	10.7	57.1	S	8.2	8.5
5-HT _{2C}	10.7	60.7	S	8.3	8.1
M ₁	17.8	25	S	8.0	8.2
M ₄	17.8	25	S	7.9	7.9
H ₁	14.2	46.4	S	8.2	8.1
5-HT _{1A}	17.8	53.5	C	5.0 ^[b]	7.0
5-HT ₆	14.2	60.7	C	8.1	8.1
5-HT ₇	10.7	53.5	C	7.1	7.7
D ₂ ^[c]	14.2	57.1	C	7.7	6.9
D ₃	14.2	53.5	C	7.7	7.0
D ₄ ^[d]	14.2	53.5	C	7.7	7.4
α_1	14.2	57.1	C	7.6	8.0
α_2	14.2	50	C	6.5 (6.55) ^[e]	7.1 (7.82) ^[e]

Tabla 4. Características de los GPCRs modelizados en el trabajo de Selent y col., 2008. ^[13]Los valores de afinidad (pK_i) de clozapina y olanzapina se tomaron de Lange y col., (2007). ^[a]Las columnas de homología se refieren al porcentaje de identidad de secuencia entre residuos del sitio de unión de los receptores. ^[b]Olanzapina no presenta afinidad por el receptor 5-HT_{1A}, asignándosele un valor de 5 (pK_i) de cara a llevar a cabo posteriores análisis. ^[c]Los valores de afinidad por el receptor D₂ se refieren a la variante D_{2S}. ^[d]Los valores de afinidad por el receptor D₄ se refieren a la isoforma D_{4.4}. ^[e]Los valores de afinidad por el receptor α_2 se refieren al receptor de rata; entre paréntesis se muestran los valores correspondientes al receptor humano tomados de la base de datos PDSP (*National Institutes of Mental Health Psychoactive Drug Screening Program*, PDSP K_i Database: <http://pdsp.med.unc.edu/>). (Tomado de Selent y col., 2008).

Posteriormente, en el citado trabajo de Selent y col. se realizó un análisis de la estructura del sitio de unión de estos 14 GPCRs en complejo con clozapina y olanzapina. Se realizaron superposiciones de los modelos por homología de los distintos receptores generados que permitieron realizar una comparación de la estructura del sitio de unión de los distintos GPCRs. También se incluyó un análisis de la superposición de las posiciones de acoplamiento de los antipsicóticos clozapina y olanzapina en los distintos receptores (**Fig. 24**), lo que permitió hacer una comparación de las interacciones que tienen lugar en los distintos complejos ligando-receptor.

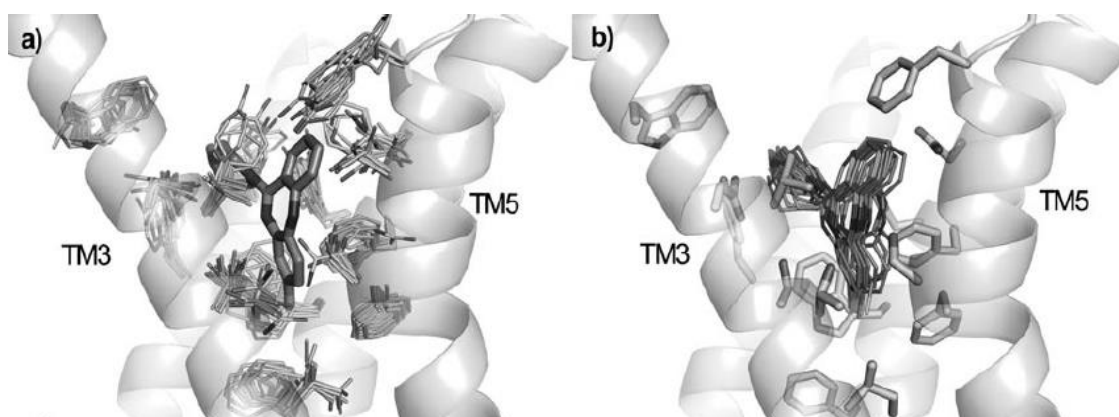


Fig. 24. Superposición de los modelos por homología de los 14 GPCRs modelizados en el trabajo de Selent y col., (2008). (a) Se muestran la disposición de las cadenas laterales en el sitio de unión de los GPCRs y (b) la superposición de las posiciones de acoplamiento de clozapina en los mismos receptores. (Tomado de Selent y col., 2008).

A partir de los modelos receptoriales generados en el citado trabajo, los autores identificaron una serie de características estructurales comunes a los 14 GPCRs (Selent y col., 2008): el aspártico en posición 3.32 determinante para la unión de ligandos; regiones hidrofílicas en TM3 y TM5; regiones hidrofóbicas como el agrupamiento aromático entre TM5 y TM6 y residuos alifáticos en TM1 y TM2. Las regiones hidrofílicas identificadas comprenden la posición Cys/Ser 3.36 y las posiciones en TM5 5.42, 5.43 y 5.46, para las que ya se había descrito algún papel, tanto en la modulación de la afinidad y el posicionamiento de ligandos serotoninérgicos con determinadas características estructurales en el caso de la posición 3.36 en el bolsillo de unión del receptor 5-HT_{2A} (Almaula y col., 1996) como en la selectividad por grupos aromáticos (fenol, catecol, imidazol, indol) de ligandos endógenos por el receptor beta-adrenérgico (posiciones 5.42, 5.43 y 5.46) (Kobilka, 2004) (**Fig. 25**).

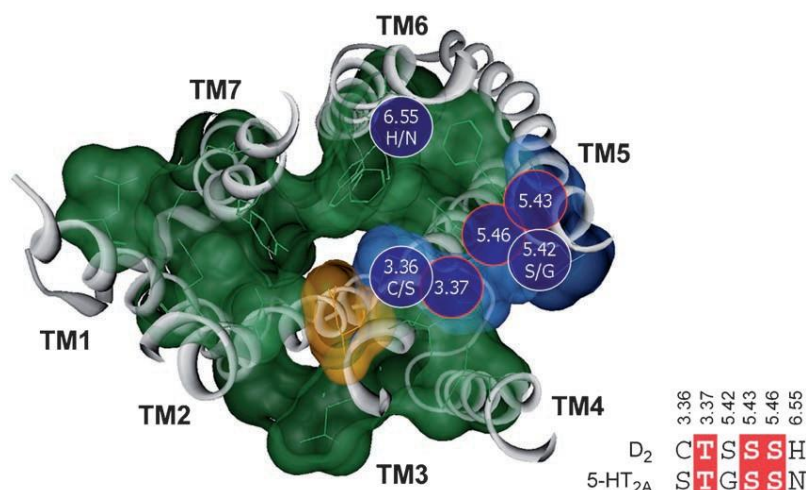


Fig. 25. Representación de zonas y posiciones homólogas identificadas en el estudio de Selent y col. (2008) en el sitio de unión entre los receptores modelizados. Se señalan el residuo Asp3.32 conservado en TM3 (naranja); regiones hidrofóbicas (verde): agrupamiento aromático en TM5 y TM6 y residuos alifáticos en TM1 y TM2; regiones hidrofílicas (azul): posiciones 3.36 y 3.37 (TM3) y 5.42, 5.46 y 5.47 (TM5). En la esquina inferior derecha se representa para comparación un alineamiento de la secuencia en el sitio de unión de los receptores 5-HT_{2A} y D₂ humanos, resaltando en rojo los residuos conservados. (Tomado de Selent y col., 2008).

De los mencionados estudios de modelización de GPCRs del receptoroma de los antipsicóticos y de acoplamiento de ligandos (clozapina, olanzapina) en esos modelos derivan tres hipótesis acerca de la interacción ligando-receptor que fueron confrontadas experimentalmente en este bloque de trabajo. Estas hipótesis plantean comprobar la relevancia de aminoácidos en determinadas posiciones de GPCRs del receptoroma de antipsicóticos para el perfil de afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina, entre otros ligandos, por esos GPCRs. Con el planteamiento y comprobación de estas hipótesis se espera que los resultados verifiquen y complementen la información disponible y obtenida en los estudios de modelización y acoplamiento de ligandos (Selent y col., 2008). Se considera que los resultados aportarán información acerca de la relevancia de los aminoácidos en determinadas posiciones de los receptores o de determinados componentes estructurales de los ligandos para los perfiles de afinidad y selectividad por GPCRs. El conocimiento acerca de la biología estructural de receptores podría verse aumentado al igual que podrían definirse mejor los determinantes del perfil multirreceptorial de fármacos

antipsicóticos. Indirectamente, se podría ampliar la información disponible en el área de descubrimiento de fármacos (optimización de cabezas de serie, modelización).

2.1.1. Relevancia del residuo en posición 3.36 para la unión de antipsicóticos a GPCRs de su receptoroma

El estudio planteado en este subapartado de nuestro trabajo parte de observación de que los perfiles de afinidad de clozapina y olanzapina por distintos GPCRs guardan relación con la identidad del residuo en la posición 3.36 del receptor. En concreto, la presencia de Ser o Cys en dicha posición definiría dos grupos de receptores por los que ambos antipsicóticos presentarían mayor y menor afinidad, respectivamente. De acuerdo con esta observación, la importancia del residuo 3.36 ya había sido evidenciada en estudios previos en los que se demostró que era determinante para la afinidad de serotonina por el receptor 5-HT_{2A} (Almaula y col., 1996). Concretamente, Selent y col. encontraron, en base a datos experimentales recogidos de la literatura de ensayos de unión de radioligandos, una afinidad de clozapina y olanzapina significativamente mayor (test t de Student, $p < 0.001$) por los receptores con un residuo Ser en la posición 3.36, entre los que se encuentran los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, M₁, M₄ y H₁, que por los receptores con un residuo Cys en esta posición (D₂, D₃, D₄, 5-HT_{1A}, 5-HT₆, 5-HT₇, α_1 y α_2), siendo el incremento medio del valor de afinidad de olanzapina asociado a Ser3.36 de aproximadamente una unidad logarítmica (algo menor en el caso de clozapina: 0.8) en unidades pK_i (**Fig. 26**) (Selent y col., 2008).

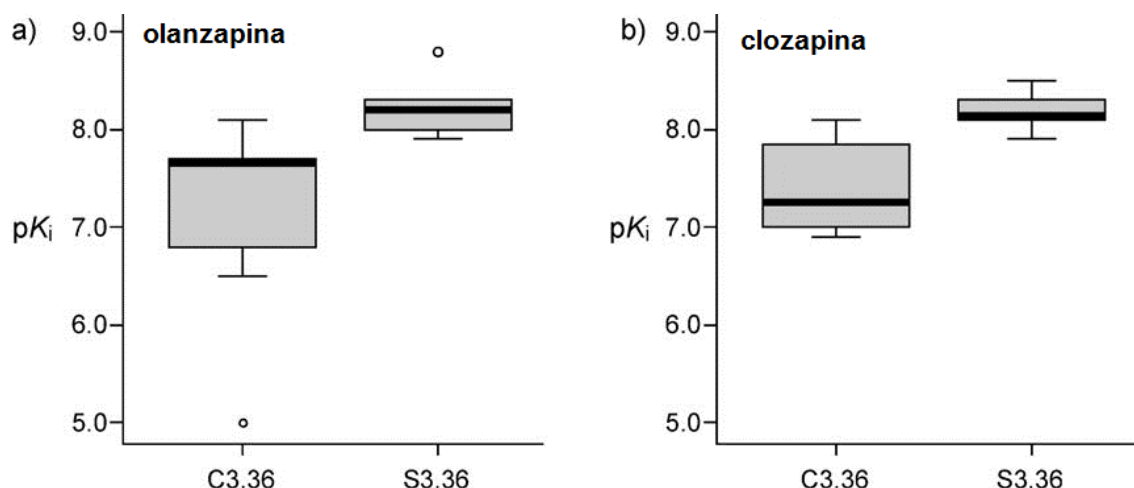


Fig. 26. La gráfica resume los valores de afinidad (pK_i) de olanzapina y clozapina por los distintos receptores con Cys o Ser en posición 3.36 (grupos C3.36 y S3.36, respectivamente). Los dos antipsicóticos presentan mayor afinidad por los receptores con Ser en posición 3.36 con respecto a los receptores con Cys en esa posición (test t de Student, $p < 0.001$). (Tomado y modificado de Selent y col., 2008). Receptores Cys3.36: D₂, D₃, D₄, 5-HT_{1A}, 5-HT₆, 5-HT₇, α_1 y α_2 ; receptores Ser3.36: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, M₁, M₄ y H₁.

Dentro de los dos grupos de receptores identificados, destacan por su relevancia en el perfil farmacológico de los antipsicóticos los receptores D₂ y 5-HT_{2A}, que notablemente constituyen ejemplos de los grupos de GPCRs Cys3.36 y Ser3.36, respectivamente. Los estudios de acoplamiento de antipsicóticos en los modelos de receptores generados llevados a cabo por Selent y col. (2008) encontraron similitudes entre una serie de interacciones que clozapina y olanzapina establecían tanto con el receptor 5-HT_{2A} como en el D₂: disposición del anillo tricíclico de forma perpendicular al plano de la membrana; formación de un enlace iónico entre el átomo de nitrógeno protonado en el anillo piperazina del ligando y Asp3.32; la existencia de una zona de unión hidrofóbica que empareda al ligando conformada por los residuos Phe6.52 y Val3.33; formación de un enlace mediante puente de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno 5 del ligando y Ser5.46; y existencia de una interacción aromática entre el anillo tricíclico y Trp6.48 (**Fig. 27**).

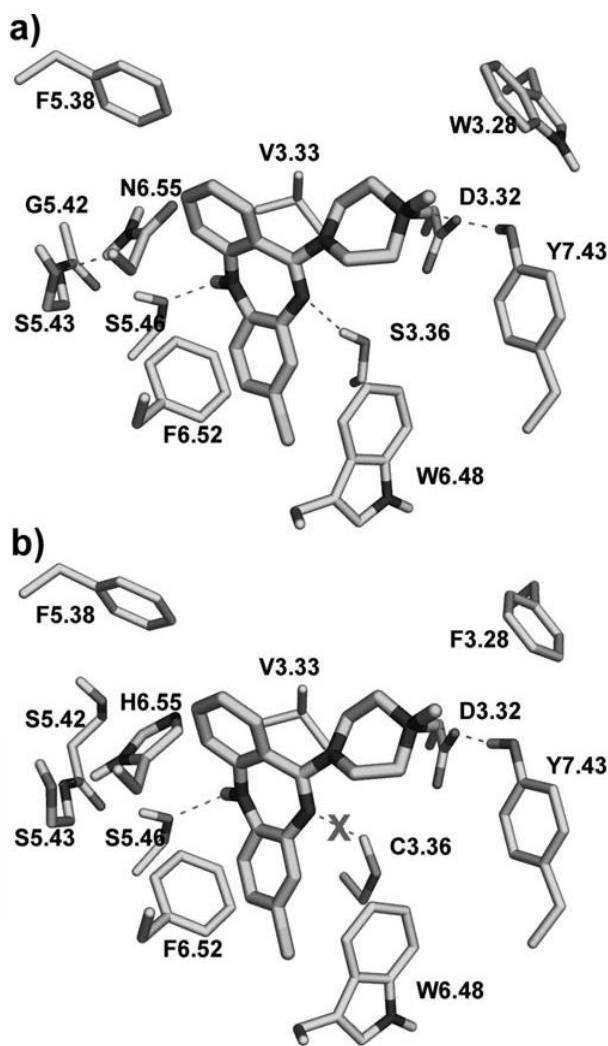


Fig. 27. Se representa un complejo clozapina-receptor 5-HT_{2A} (a) y un complejo clozapina-receptor D₂ (b). Se indican las principales interacciones entre estos receptores y el ligando: una unión iónica entre el átomo de N protonado en el anillo piperazina de clozapina con Asp3.32, el sándwich hidrofóbico entre Phe6.52 y Val3.33, el puente de hidrógeno entre el átomo N5 y Ser5.46 y una interacción aromática entre el sistema tricíclico y Trp6.48. “X” señala la interacción mediante puente de H de Cys3.36 con el átomo N10 de clozapina, más débil o ausente en el complejo con el receptor D₂. (Tomado de Selent y col., 2008).

Un análisis detallado de los resultados de los estudios de acoplamiento en estos dos receptores (**Fig. 27**) indica una diferencia potencialmente relevante entre las interacciones que ambos ligandos establecen con cada uno de ellos, en concreto en el tipo de enlace de puente de hidrógeno que se establece entre el átomo de nitrógeno N10 de los ligandos y el residuo 3.36 del receptor, que es más débil en el caso de Cys3.36 (receptor D₂) que en el

caso de Ser3.36 (receptor 5-HT_{2A}). Así, la diferencia de afinidades de los antipsicóticos por los dos grupos de receptores podría ser reflejo de la relevancia del aminoácido en posición 3.36 para la unión de estos ligandos.

En base a estos datos, y con el objetivo de aportar información acerca de la relevancia del aminoácido en posición 3.36 (Ser o Cys) en GPCRs del receptoroma de antipsicóticos para la interacción con los ligandos clozapina y olanzapina, del tipo de interacción establecida y/o de componentes estructurales de los ligandos relevantes para su perfil farmacológico, se planteó comprobar experimentalmente si la identidad (Ser o Cys) del residuo en posición 3.36 es determinante para los perfiles de afinidad de clozapina y olanzapina, seleccionando como receptores prototipo de cada grupo receptorial los receptores 5-HT_{2A} (Ser3.36) y D₂ (Cys3.36), sobre los que se llevó a cabo el estudio experimental. Para ello, se generaron mediante mutagénesis dirigida receptores 5-HT_{2A} y D_{2S} mutados en los que se intercambiaron los residuos Ser o Cys en la posición 3.36: el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys y el receptor D_{2S}-Cys3.36Ser, con el objetivo de verificar mediante ensayos de unión de radioligandos de competición la relevancia del aminoácido en posición 3.36 para los perfiles de afinidad de clozapina y olanzapina.

2.1.2. Relevancia de los residuos en las posiciones 5.43 y 5.46 para la unión de antipsicóticos a GPCRs de su receptoroma

Al igual que en el caso anterior, la hipótesis que se plantea en este subapartado parte de los resultados del estudio de modelización y acoplamiento multirreceptorial realizado por Selent y col., (2008). Clozapina y olanzapina son dos antipsicóticos atípicos con un perfil de afinidades por distintos GPCRs también bastante semejante y con estructura química muy similar, siendo la principal diferencia estructural entre ambos ligandos el reemplazamiento bioisostérico del anillo fenilo en el sistema tricíclico de clozapina por el anillo tiofeno de olanzapina. En el trabajo de Selent y col. (2008) se compararon las afinidades de clozapina y olanzapina por distintos GPCRs de su receptoroma, encontrándose una afinidad mayor de olanzapina en comparación con clozapina por una serie de receptores entre los que se encuentran los receptores D₂ (el caso más notable), D₃, D₄ y 5-HT_{2A} (grupo 1) (**Fig. 28**). Por el contrario, clozapina presentó una afinidad mayor que olanzapina por receptores tales como 5-HT_{1A} (el caso más notable), 5-HT_{2B}, 5-HT₇ y adrenérgicos α_1 y α_2

(grupo 2) (**Fig. 28**). Los estudios de acoplamiento de Selent y col. (2008) realizados en una serie de GPCRs diana de antipsicóticos permitieron hacer una preselección de posiciones que conforman el sitio de unión de antipsicóticos. Así, el alineamiento múltiple de la secuencia aminoacídica en posiciones relevantes para la interacción antipsicótico-receptor de acuerdo con los estudios de acoplamiento sobre los modelos receptoriales generados, para los receptores mencionados como pertenecientes a los dos grupos identificados, permitió apreciar notables similitudes entre los receptores pertenecientes a cada grupo, así como algunas diferencias destacables entre los dos grupos. Específicamente, se pudo observar que los receptores pertenecientes al grupo 1 (de mayor afinidad por olanzapina) presentan dos residuos Ser en las posiciones 5.43 y 5.46, mientras que de los receptores pertenecientes al grupo 2 (mayor afinidad por clozapina) podría decirse que comparten la característica estructural de presentar residuos más hidrofóbicos que Ser en estas posiciones (**Fig. 28**). Asimismo, un residuo con propiedades de donante/aceptor de puentes de hidrógeno (His/Asn) aparece conservado en la posición 6.55 entre los receptores del grupo 1 y no entre los receptores del grupo 2 (**Fig. 28**).



Los complejos ligando-receptor para olanzapina y clozapina sobre los modelos receptoriales basados en la estructura cristalina del receptor β_2 -adrenérgico y generados por Selent y col. (2008), muestran a ambos antipsicóticos aproximadamente en la misma posición, con olanzapina ligeramente más enterrada en el bolsillo de unión debido a la ausencia del átomo de cloro en esta estructura. Sin embargo, destaca en estos complejos que las tres posiciones que representan las principales diferencias en secuencia aminoacídica entre los grupos 1 y 2 (5.43, 5.46. y 6.55) se encuentran muy próximas al anillo tiofeno de olanzapina, que constituye la principal diferencia estructural de olanzapina en comparación con clozapina. Esto se puede observar en los complejos de cada ligando con el receptor 5-HT_{2A} (Ser5.43, Ser5.46, Asn6.55), un ejemplo de receptor perteneciente al grupo 1 (**Fig. 29**).



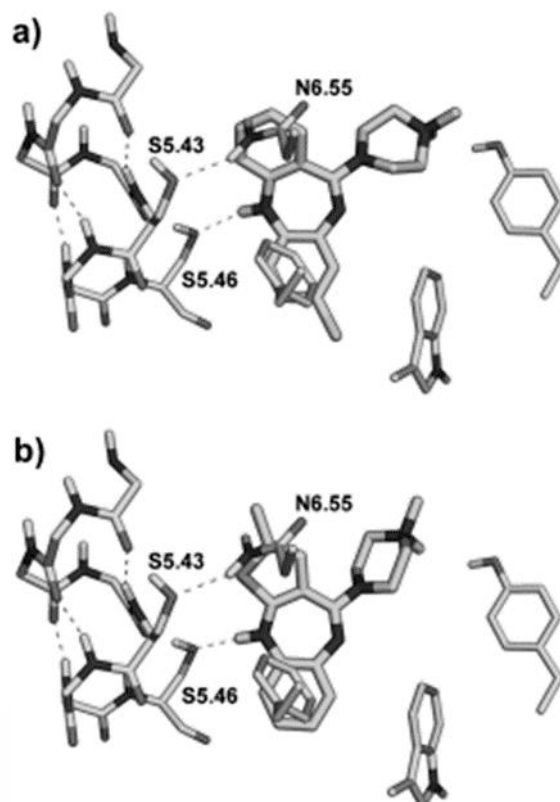


Fig. 29. Ejemplo de modelización de las interacciones entre un receptor del grupo 1 y clozapina y olanzapina realizado por Selent y col., (2008). Complejo de a) clozapina y b) olanzapina con el receptor 5-HT_{2A} de serotonina. Se muestran los residuos Ser5.43, Ser5.46 y Asn6.55, característicos del grupo 1, y claves para las interacciones polares con el anillo tiofeno de olanzapina. (Tomado de Selent y col., 2008).

Basándonos en la estructura de los complejos antipsicótico-receptor descritos por Selent y col. (2008), se puede interpretar que, para el caso de olanzapina, los receptores del grupo 1 posicionan el residuo Ser5.46 justo enfrente de los heteroátomos N5 y S en el sistema tricíclico, produciendo interacciones favorables. De esta forma, Ser5.43 interacciona con el residuo donante de puentes de H (His o Asn) estableciéndose interacciones polares adicionales con el anillo tiofeno de la olanzapina, lo que estabilizaría el complejo. Adicionalmente, el posicionamiento más enterrado de olanzapina en el bolsillo de unión podría favorecer sus interacciones con los residuos más polares presentes en TM5 en el grupo 1 (Ser5.43 y Ser5.46). Por el contrario, los receptores del grupo 2 presentan residuos menos polares en esas posiciones (como máximo un residuo Ser en 5.43/5.46), lo

que haría que interacciones mejor con el anillo fenilo de la clozapina que con el anillo tiofeno más polar presente en olanzapina.

Así, teniendo en cuenta los datos aportados por los estudios de acoplamiento en GPCRs diana de antipsicóticos de Selent y col. (2008) y los datos relativos a la diferencia de afinidades de clozapina y olanzapina por distintos receptores, nos planteamos investigar experimentalmente la relevancia de los aminoácidos en las posiciones 5.43 y 5.46 de GPCRs diana de antipsicóticos para el perfil farmacológico diferencial de clozapina y olanzapina así como las diferentes interacciones que estos dos ligandos distintos podrían establecer con estos aminoácidos. Así, en este subapartado de este trabajo se propuso comprobar si la diferencia en la identidad de los aminoácidos que ocupan las posiciones 5.43 y 5.46 de receptores adscritos a los dos distintos grupos, contribuye de forma determinante a la preferencia de afinidades que presentan, comparativamente, los antipsicóticos olanzapina y clozapina (mayor afinidad de olanzapina en comparación con clozapina por el grupo de receptores Ser5.43/Ser5.46 y mayor afinidad de clozapina en comparación con olanzapina por los receptores del grupo presentando aminoácidos más hidrofóbicos en estas mismas posiciones). Para comprobar experimentalmente esta hipótesis, nuestro trabajo se centró en los receptores D₂ (como prototipo de receptor del grupo Ser5.43/Ser5.46) y 5-HT_{1A} (receptor del grupo con residuos hidrofóbicos, en este caso Thr5.43/Ala5.46). De manera que se planteó un intercambio de estos aminoácidos en cada uno de los receptores mediante mutagénesis dirigida, con el fin de comprobar mediante ensayos de unión de radioligandos el impacto de las mutaciones en el perfil de afinidades de los antipsicóticos clozapina y olanzapina por ambos receptores.

2.1.3. Relevancia del residuo en posición 3.33 para la unión de antipsicóticos a GPCRs diana y antidiana de su receptoroma

Al igual que en los dos subapartados anteriores, la hipótesis de este trabajo parte de los resultados del estudio realizado por Selent y col., 2008. Mediante estudios de acoplamiento de los antipsicóticos clozapina y olanzapina en los distintos GPCRs modelizados se determinó que los ligandos, en su unión a los receptores 5-HT_{2A} y D₂, interaccionan con un sándwich hidrofóbico conformado por los residuos Phe6.52 y Val3.33 (Selent y col., 2008). Estos residuos se encuentran conservados en otros receptores del

receptoroma de los antipsicóticos como los dopaminérgicos D₃ y D₄, de serotonina 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₇ y adrenérgicos α₂ (Tabla 5).

	3.26	3.28	3.29	3.32	3.33	3.36	3.37	3.40	5.38	5.39	5.42	5.43	5.46	5.47	6.44	6.48	6.51	6.52	6.55	7.35	7.39
D ₂	D	F	V	D	V	C	T	I	F	V	S	S	S	F	F	W	F	F	H	Y	T
D ₃	D	F	V	D	V	C	T	I	F	V	S	S	S	F	F	W	F	F	H	Y	T
D ₄	D	L	M	D	V	C	T	I	Y	V	S	S	S	F	F	W	F	F	H	V	T
5-HT _{2A}	A	W	I	D	V	S	T	I	F	V	G	S	S	F	F	W	F	F	N	L	V
α ₂	E	Y	L	D	V	C	T	I	Y	V	S	C	S	F	F	W	F	F	Y	F	F
5-HT _{1A}	D	F	I	D	V	C	T	I	Y	T	S	T	A	F	F	W	F	F	A	G	N
5-HT ₇	N	F	I	D	V	C	T	I	Y	T	S	T	A	F	F	W	F	F	S	E	L
H ₁	L	W	L	D	Y	S	T	I	W	F	M	T	I	F	F	W	Y	F	F	M	W
M ₁	D	W	L	D	Y	S	N	V	I	I	G	T	A	F	F	W	Y	N	V	E	W

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos de distintos GPCRs del receptoroma de los antipsicóticos.

La presente hipótesis se centra en el residuo en posición 3.33, ocupado por Val en muchos de los GPCRs asociados a la acción terapéutica de los antipsicóticos. En receptores antidiaria como el histaminérgico H₁ o el muscarínico M₁ esta posición la ocupa Tyr. (Tomado de GPCRDB, 2015).

El receptor H₁ es uno de los receptores por el que los antipsicóticos clozapina y olanzapina presentan una mayor afinidad; responsable en gran medida del efecto adverso de sedación, causado especialmente por estos dos antipsicóticos, o de la ganancia de peso (Kroeze y col., 2003; Deng y col., 2010; Benedí e Iglesias, 2012; Leucht y col., 2013). Este receptor presenta en posición 3.33 un residuo tirosina, aminoácido también presente en esa posición en otras antidiarias de fármacos antipsicóticos como los receptores muscarínicos M₁, M₂ y M₃, relacionados con reacciones adversas de tipo cardíaco o ganancia de peso, entre otras. El análisis multirreceptorial de las afinidades que presentan clozapina y olanzapina por distintos GPCRs de su receptoroma junto con el alineamiento múltiple de las secuencias de esos receptores llevado a cabo por Selent y col (2008) viene a indicar que clozapina y olanzapina presentarían una mayor afinidad por receptores con Tyr en posición 3.33, una característica estructural presente en los receptores aceptados como antidiarias de los antipsicóticos atípicos, que por receptores con Val en esa posición, aspecto estructural

compartido por diversos GPCRs considerados dianas asociadas a la eficacia terapéutica de estos fármacos.

Para ilustrar esta observación, en la **Tabla 6** se recogen algunos valores de afinidad de clozapina y olanzapina por estos receptores recogidos de distintas fuentes que pueden servir como referencia, y que sitúan al receptor de histamina H₁ (Tyr3.33) como el GPCR por el que ambos fármacos presentan la mayor afinidad.

	5-HT _{2A}		D ₂		H ₁	
	K _i (nM) (PDSP)	K _i (nM) (Ishibashi y col., 2010)	K _i (nM) (PDSP)	K _i (nM) (Ishibashi y col., 2010)	K _i (nM) (PDSP)	K _i (nM) (Ishibashi y col., 2010)
Clozapina	5.92 (1 – 11) ¹	9.17 ± 1.46 ²	157 (44 – 260) ³	108 ± 27 ⁴	1.2 ⁵	2.02 ± 0.20 ⁶
Olanzapina	3.13 (1.31 – 5.8) ¹	5.78 ± 0.89 ²	34.23 (3.7 – 78) ³	14.4 ± 3.2 ⁴		3.83 ± 0.52 ⁶

Tabla 6. Valores de afinidad (K_i) de clozapina y olanzapina por los receptores 5-HT_{2A}, D₂ y H₁ humanos, así como de otras especies.

¹Media (rango) de valores de K_i (nM) tomados de PDSP (*National Institutes of Mental Health Psychoactive Drug Screening Program*, PDSP K_i Database: <http://pdsp.med.unc.edu/>) (receptor humano clonado, [³H]-ketanserina). ²Valor de K_i (nM, media ± EEM) tomado de Ishibashi y col., 2010 (córtex de rata, 1 nM [³H]-ketanserina).

³Media (rango) de valores de K_i (nM) tomados de PDSP (receptor humano clonado, [³H]-espiperona). ⁴Valor de K_i (nM, media ± EEM) tomado de Ishibashi y col., 2010 (estriado de rata, 0.05 nM [³H]-espiperona). ⁵Valor de K_i (nM) tomado de PDSP (membranas de córtex humano, [³H]-doxepina). ⁶Valor de K_i (nM, media ± EEM) tomado de Ishibashi y col., 2010 (cerebro de cobaya, 0.4 nM [³H]-pirilamina).

Los estudios acerca de la estructura del receptor histaminérgico humano H₁ mediante cristalización determinan la interacción hidrofóbica de Tyr3.33 con un anillo bencénico del ligando cristalizado doxepina (estructura dibenzoxepina) (Shimamura y col., 2011) y también con su cadena alifática lateral (**Fig. 30**). Es, por tanto, un aminoácido que participa en la unión de ligandos, al igual que se observa en estudios de modelización de este receptor y del receptor M₁ (ambos con Tyr3.33) con el antipsicótico de estructura benzoisotiazol lurasidona (**Fig. 31**, Ichikawa y col., 2012), realizados sobre modelos de receptores generados tomando como base la estructura cristalográfica 3PBL del receptor D₃ (Chien y col., 2010). Por lo que respecta al sistema aromático de lurasidona, decir que posee una estructura similar al de olanzapina (benzoisotiazol). En este último caso, el grupo benzoisotiazol de lurasidona en ambos receptores está próximo a Tyr3.33 (Ichikawa y col., 2012).

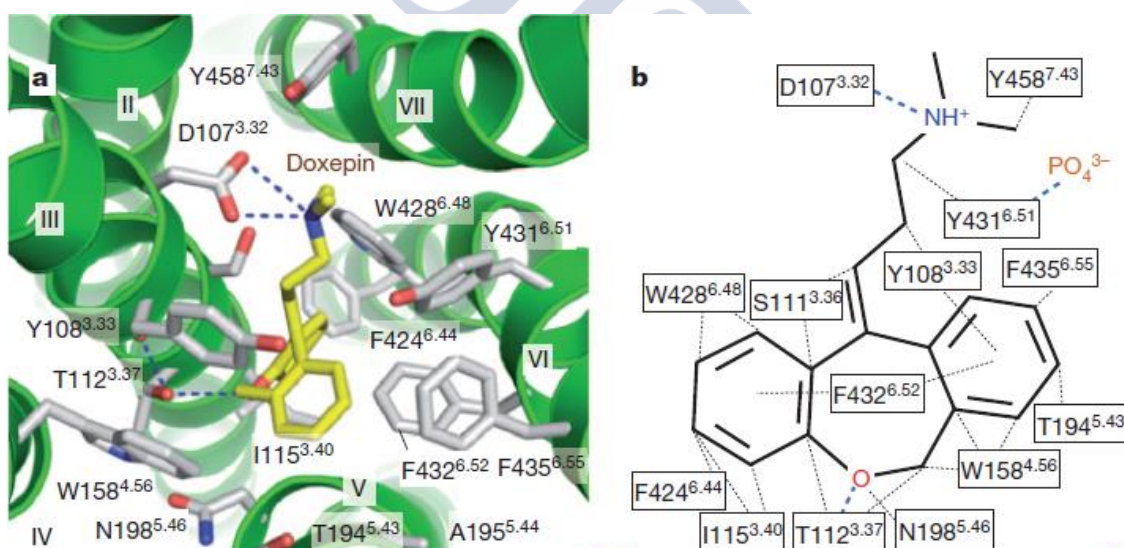


Fig. 30. Representación del sitio de unión del receptor de histamina H₁ en complejo con doxepina realizada a partir de los datos de cristalización aportados por Shimamura y col. (2011).

(a) Se muestra el ligando doxepina en amarillo. Los puentes de hidrógeno o uniones iónicas se muestran mediante líneas punteadas en azul. Los átomos de oxígeno están en rojo. (b) Se muestra Tyr3.33, que se dispone hacia el interior del sitio de unión e interacciona con un anillo bencénico y con la cadena lateral alifática de doxepina. (Tomado de Shimamura y col., 2011).

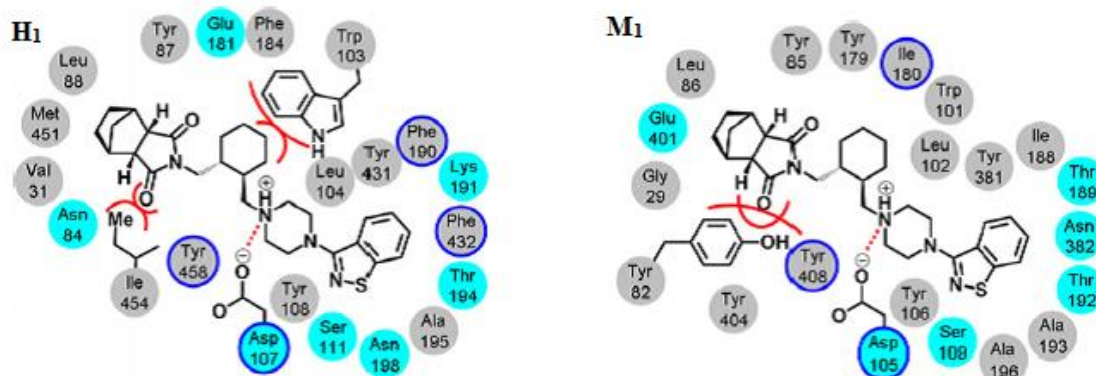


Fig. 31. Representación de modelos del sitio de unión de los receptores H₁ y M₁ en complejo con el antipsicótico atípico lurasidona, indicándose los aminoácidos que establecen interacciones con el fármaco, según se describen por Ichikawa y col. (2012). El trabajo de Ichikawa y col., (2012) realiza estudios de acoplamiento y simulación de dinámica molecular con modelos de estos dos receptores generados a partir de la estructura cristalográfica 3PBL del receptor D₃ (Chien y col., 2010). En ambos receptores el residuo de Asp3.32 interacciona con el átomo de N de la piperazina del ligando. Los residuos Tyr de la posición 3.33 son Tyr108 (H₁) y Tyr106 (M₁), y ambos están próximos al grupo benzotiazol. En gris se muestran los aminoácidos hidrofóbicos y en azul claro los hidrofílicos. (Tomado de Ichikawa y col., 2012).

Así, en este subapartado se planteó el estudio de la posible relevancia de la interacción que se establece entre los ligandos clozapina y olanzapina y el aminoácido en posición 3.33 en receptores diana (tales como el receptor D₂) y antidiana (en particular el receptor H₁) como determinante de la distinta afinidad de estos antipsicóticos por receptores presentando residuos Val o Tyr en esa posición. En concreto y como primera aproximación a esta cuestión nos centramos en el receptor D₂ y nos planteamos intercambiar mediante mutagénesis dirigida el aminoácido Val en posición 3.33 por Tyr con el fin de comprobar mediante ensayos de unión de radioligandos de competición el efecto de esta mutación sobre la afinidad de los antipsicóticos clozapina y olanzapina por este receptor.

2.2. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS: TIEMPO DE RESIDENCIA DEL ANTIPSICÓTICO ATÍPICO LURASIDONA EN EL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT₇

El parámetro tiempo de residencia (t_R) cuantifica el tiempo medio que una molécula de ligando o fármaco permanece unida a la diana. En el caso de fármacos con perfil multirreceptorial, una característica en general muy deseable en fármacos antipsicóticos y otros fármacos para enfermedades psiquiátricas complejas, el t_R podría ser un factor determinante para el perfil de eficacia y de reacciones adversas al poder conferir selectividad cinética sobre las distintas dianas (Seeman, 2005; Copeland y col., 2006). Esto puede ser particularmente relevante cuando el fármaco ha de actuar en presencia de ligandos endógenos que pueden alcanzar concentraciones muy elevadas puntualmente, como en las sinapsis, situación en la que los tiempos de residencia pueden determinar la capacidad del fármaco de competir de forma efectiva por la diana (Vauquelin y van Liefde, 2006; Vauquelin y Charlton., 2010). En el caso de fármacos con un aclaramiento lento del compartimento diana, un t_R elevado puede constituirse en el factor determinante de la duración de acción, en particular en el caso de antagonistas (Dahl y Akerud, 2013), aunque siempre valorado integrando otros aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos. De hecho, el parámetro tiempo de residencia presenta un enorme interés desde el punto de vista de la farmacología integrativa, que integra e interrelaciona la farmacodinamia y la farmacocinética de forma cuantitativa, ayudándose de los nuevos modelos PKPD (Derendorf y col., 2000; Ploeger y col., 2009; Gabrielsson y Green, 2009). La integración de este parámetro podría ayudar a definir y explicar un determinado perfil clínico en relación a eficacia o reacciones adversas.

En investigación y desarrollo de fármacos, el tiempo de residencia de fármacos sobre sus dianas o antidianas se considera un parámetro que podría aportar una caracterización más fiable y representativa del proceso de unión ligando-receptor en condiciones *in vivo* que otros parámetros clásicos de afinidad calculados en condiciones *in vitro* de equilibrio. En cribado de moléculas y en optimización de cabezas de serie, se valora actualmente adoptar criterios de selección de moléculas que incorporen parámetros cinéticos como t_R , una vez que se han desarrollado métodos experimentales relativamente sencillos para su determinación como los ensayos de unión de radioligandos de competición cinética de dos

puntos (Guo y col., 2012a). Asimismo, han podido establecerse correlaciones del t_R con otros parámetros obtenidos experimentalmente referidos a efectos celulares e *in vivo* (Guo y col., 2012), lo que sugiere que las bases moleculares de la eficacia de un agonista podrían estar ligadas al tiempo de residencia del ligando en el receptor. Por todo ello, hoy se aboga en general por la introducción sistemática de medidas de t_R en fases tempranas de cribado de moléculas y de generación y optimización de cabezas de serie (Copeland y col., 2006; Lu y Tonge, 2010).

La lurasidona como fármaco antipsicótico atípico presenta un perfil multirreceptorial, considerado como la base de la superioridad de estos fármacos respecto a la aproximación terapéutica de los antipsicóticos clásicos. Conocer las cinéticas de asociación y disociación, los tiempos de residencia en las distintas dianas y la selectividad cinética cobra especial interés para fármacos con un perfil de selectividad complejo como son los antipsicóticos atípicos, pues es una información que podría interesar para su incorporación en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos. Un primer ejemplo de la relevancia del t_R de los fármacos antipsicóticos para su eficacia y perfil de efectos adversos lo constituye la teoría de que un tiempo de residencia corto de los antipsicóticos atípicos en el receptor D_2 se relaciona con su baja incidencia de reacciones adversas extrapiramidales (Kapur y Seeman, 2001).

Como fármaco antipsicótico, lurasidona es el antipsicótico de segunda generación con mayor afinidad por el receptor $5-HT_7$ ($K_i = 0.495$ nM, frente a 5-CT) (Ishibashi y col., 2010), del que es antagonista (Samalin y col., 2014), siendo su afinidad por este receptor superior a la de otros antipsicóticos con un componente destacado de afinidad por $5-HT_7$ en su perfil farmacológico como amisulprida ($K_i = 135.5$ nM, frente a 5-CT) (Abbas y col., 2009), aripiprazol ($K_i = 9.6$ nM) (Kroeze y col., 2003) o quetiapina ($K_i = 307$ nM) (López-Muñoz y Álamo, 2013). Clozapina, risperidona y ziprasidona también presentan afinidades destacables por este receptor, con un valor de K_i en torno a 10 nM (Kroeze y col., 2003).

En estudios preclínicos, lurasidona se ha demostrado capaz de mejorar los resultados en ensayos de reconocimiento de objetos (NOR) en modelos de disfunción cognitiva inducidos mediante la administración subcrónica de antagonistas NMDA como MK-801 (Ishiyama y col., 2007; Horisawa y col., 2013) o fenciclidina (PCP) (Horiguchi y col., 2011), lo que constituye un modelo farmacológico de sintomatología cognitiva en esquizofrenia

(Meltzer y Massey, 2011). También se atribuyen al antagonismo 5-HT₇ de amisulprida efectos procognitivos en el mismo modelo (Abbas y col., 2009).

En ensayos clínicos, el estudio comparativo de lurasidona frente a quetiapina y placebo administrados en un periodo de 6 meses también encuentra mejoría en síntomas positivos frente a quetiapina para todas las dosis de lurasidona (40-160 mg) (Yasui-Furukori, 2012; Harvey y col., 2015a). A pesar de esto, hay que tener en cuenta que la mejoría de síntomas cognitivos también se ha relacionado con otras actividades farmacológicas presentes en el perfil farmacológico de lurasidona, como el antagonismo 5-HT_{2A} o el agonismo 5-HT_{1A}, tanto en estudios preclínicos *in vivo* como en ensayos clínicos (Meltzer y Massey, 2011). Asimismo, en el perfil multirreceptorial de lurasidona la falta de afinidad por receptores como H₁ y M₁ también sería favorable en este sentido (Yasui-Furukori, 2012). Por otra parte, existe la hipótesis de que la mejoría en sintomatología negativa y cognitiva podría deberse a una mejoría de los síntomas positivos (Álamo y col., 2007; Álamo y col., 2007a). Con todo, el antagonismo 5-HT₇ se considera un componente muy relevante en la eficacia terapéutica de lurasidona frente a la sintomatología de la esquizofrenia y en particular, en una dimensión mal cubierta por los fármacos antipsicóticos actualmente disponibles como es la negativa/cognitiva.

Algunos antipsicóticos atípicos con una afinidad destacada por el receptor 5-HT₇ se han mostrado moderadamente eficaces en el tratamiento de la depresión, especialmente quetiapina y aripiprazol en el tratamiento del trastorno depresivo mayor (TDM) y amisulprida en el de la distimia (Komossa y col., 2010). Los dos primeros de esos fármacos están aprobados para el tratamiento del trastorno depresivo mayor en Estados Unidos, pero sólo como terapia complementaria antidepresivos y quetiapina en la forma de liberación prolongada. De éstos, sólo quetiapina tiene la indicación para el tratamiento del trastorno depresivo mayor aprobada en España. Lurasidona, al igual que quetiapina, está aprobada para el tratamiento de la fase depresiva del trastorno bipolar en Estados Unidos (Micromedex [base de datos], 2014). Para esta indicación, lurasidona se ha demostrado eficaz tanto en monoterapia como de forma complementaria a litio o valproico (Micromedex [base de datos], 2014), mejorando la puntuación en la escala de calificación de la depresión de Montgomery-Asberg (Citrome y col., 2014a). Este fármaco también mejoró la

puntuación en la misma escala en el tratamiento de la esquizofrenia (Citrome y col., 2014b; Samalin y col., 2014).

La acción antidepresiva constituye quizás el efecto terapéutico asociado a antagonismo 5-HT₇ de mayor interés hoy en día. En ensayos *in vivo* en ratones, la acción antidepresiva del antagonismo 5-HT₇ se ha demostrado con el antagonista SB269970 y empleando ratones carentes del gen *HTR7*, mediante ensayos de suspensión de cola y de natación forzada (Hedlund y col., 2005). En otro estudio con lurasidona, empleando los mismos ensayos de evaluación de actividad antidepresiva en ratones, se observó cierto efecto antidepresivo que se relacionó igualmente con el antagonismo 5-HT₇ del fármaco (Cates y col., 2013).

Consistentemente con estas observaciones preclínicas, antidepresivos de nueva generación incorporan el antagonismo 5-HT₇ como una de sus actividades, como es el caso de vortioxetina, aunque no puede concluirse que su eficacia antidepresiva sea debida totalmente a la actividad antagonista 5-HT₇ (Sánchez y col., 2014) al presentar otras actividades como el agonismo parcial 5-HT_{1A} e inhibición de la recaptación de serotonina que podrían contribuir a este efecto (Sánchez y col., 2014). Lo mismo ocurriría con lurasidona, del que tampoco puede concluirse que el antagonismo 5-HT₇ sea totalmente responsable de su acción antidepresiva (Fountoulakis y col., 2015), sobre todo cuando están presentes otras actividades potencialmente relacionadas con tal acción como el agonismo 5-HT_{1A} y el antagonismo 5-HT_{2A} (Fountoulakis y col., 2015). En cualquier caso, otros antidepresivos como mianserina, fluoxetina, maprotilina o imipramina también incorporan un componente de antagonismo 5-HT₇ en su perfil farmacológico, aunque no se considere el principal responsable de su acción terapéutica.

En base a todo lo expuesto, en este apartado de nuestro trabajo partimos de la hipótesis de que el conocimiento de los tiempos de residencia del antipsicótico atípico de reciente aprobación lurasidona en sus distintos receptores diana puede aportar información acerca de su mecanismo de acción y de las bases farmacológicas de su perfil clínico de eficacia y seguridad. Esta información puede resultar de interés tanto desde el punto de vista terapéutico en relación al uso clínico de este fármaco como desde el punto de vista de la investigación y desarrollo de nuevos fármacos antipsicóticos. Así, como un primer paso en esta dirección, hemos abordado el objetivo de cuantificar el t_R de lurasidona en el receptor

5-HT₇ humano, que nos podría servir como modelo de partida para la puesta a punto metodológica necesaria y que podría aportar información de interés al tratarse de un receptor muy relevante en el perfil farmacológico característico y distintivo de este fármaco.



2.3. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS: RELEVANCIA DEL RESIDUO HIS264 EN EL3 PARA LAS CINÉTICAS DE ASOCIACIÓN Y DISOCIACIÓN DE [³H]-ZM241385 AL RECEPTOR DE ADENOSINA A_{2A}

Este apartado de nuestro trabajo se fundamenta en datos acerca de la estructura del receptor de adenosina A_{2A} en complejo con el antagonista ZM241385 aportados tras su cristalización y sometimiento a difracción de rayos X (código PDB 3EML) (Jaakola y col., 2008), así como en la información aportada por estudios de modelización y dinámica molecular llevados cabo por el grupo colaborador de los doctores D. Rodríguez y H. Gutiérrez sobre los receptores de adenosina A_{2A} y A_{2B} (Rodríguez y col., 2011).

En la zona extracelular de todos los GPCRS se localizan tres bucles extracelulares que conectan los distintos segmentos transmembrana. Es la zona que presenta la mayor variabilidad en la secuencia entre los distintos GPCRS. Su importancia viene dada porque pueden afectar a las interacciones receptor-ligando al poder establecerse interacciones de los ligandos con los aminoácidos localizados en dichos bucles, pueden condicionar el modo de acceso de los ligandos al sitio de unión o su salida del mismo y condicionan estéricamente y mediante interacciones la disposición global del haz de hélices (Wheatley y col., 2012). En general, los bucles extracelulares presentan una estructura secundaria definida e igualmente, la conformación espacial de los bucles puede verse definida por la presencia de elementos estructurales como puentes disulfuro intra o inter-bucle (Wheatley y col., 2012). En GPCRS de la clase A, el segundo bucle extracelular (EL2) suele presentar el mayor tamaño. Pese a las posibles restricciones en la conformación de los bucles, se ha visto que el EL2 interviene en el acceso de ligandos al sitio de unión para receptores como el muscarínico M₂ (Avlani y col., 2007).

La estructura del receptor A_{2A} determinada en el trabajo de cristalización de Jaakola y col., (2008) aportó importante información, no bien conocida hasta ese momento, acerca de los elementos que confieren una ordenación estructurada a los dominios extracelulares del receptor A_{2A}. En esta estructura falta una parte de la secuencia de EL2 más alejada de los segmentos transmembrana (Jaakola y col., 2008) y en la misma, EL2 carece de una estructura secundaria destacable, aunque otras estructuras cristalográficas del receptor han permitido determinar que este bucle contiene una α -hélice de dos giros (Lebon y col., 2011; Katritch y col., 2012). Tanto este bucle como EL3 presentan una serie de enlaces mediante

puente disulfuro que determinan su conformación y la unión de ligandos. Uno de ellos se establece entre EL2 y EL1 (EL2-EL1); otros dos entre EL2 y el segmento transmembrana 3 (en las proximidades de EL1) (EL2-TM3); y otro como puente disulfuro intrabucle en EL3 (EL3-EL3), que orienta al imidazol de His264^{7,29} (posición designada alternativamente como 6.66 en algunos trabajos) en EL3 hacia la zona de acceso de ligandos al sitio de unión del receptor. En cuanto a la disposición del sitio de unión en el receptor A_{2A}, éste se encuentra muy desplazado hacia la mitad extracelular (la mitad del haz de hélices que se orienta hacia el espacio extracelular) del receptor en comparación con otros GPCRs, haciendo que los ligandos interactúen de manera importante con residuos de los bucles EL2 y EL3 (Jaakola y col., 2008) (**Fig. 32**).

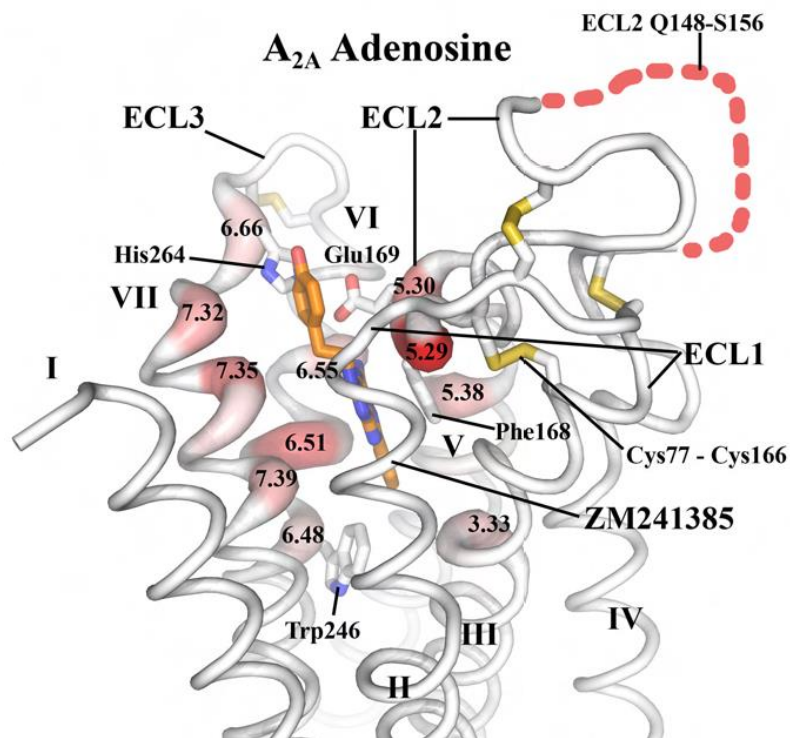


Fig. 32. Posición e interacciones del ligando ZM241385 con el receptor de adenosina A_{2A} humano en la estructura cristalográfica 3EML (código PDB) del complejo. El ligando interactúa principalmente con áreas de los segmentos transmembrana 6 y 7 (TM6 y TM7) (sombreado en rojo) y se dispone próximo a los bucles extracelulares 2 y 3, con los que también interactúa. (Tomado de Jaakola y col., 2008).

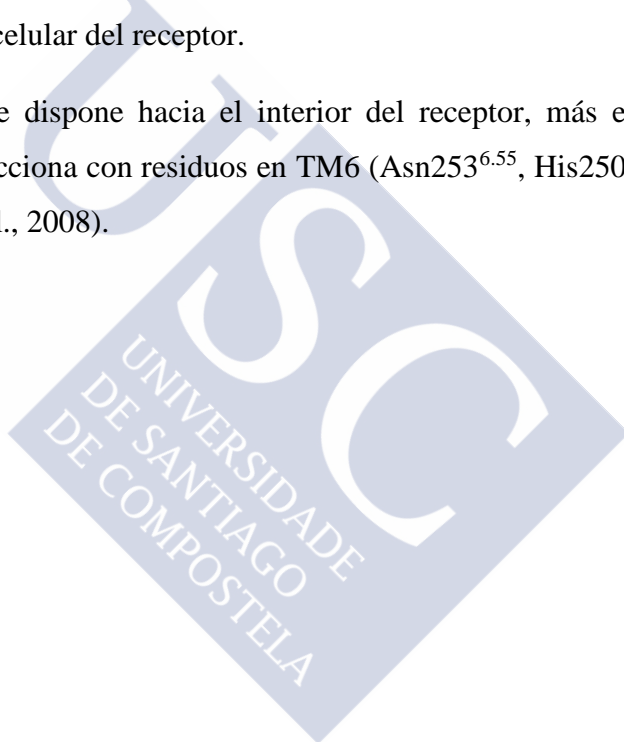
En relación con las interacciones del receptor A_{2A} con el ligando ZM241385, Jaakola y col. (2008) destacan las siguientes (**Fig. 33**):

1. El biciclo triazolotriazina central se une a residuos de TM6 y TM7, estableciendo con Phe168^{5.29}, Leu249^{6.51} (Jaakola y col., 2010) e Ile274^{7.39} interacciones hidrofóbicas y con Asn253^{6.55} un enlace mediante puente de hidrógeno (Jaakola y col., 2008).

2. El grupo amino exocíclico se une al residuo Glu169^{5.30} mediante un enlace de puente de hidrógeno.

3. El grupo fenólico se une a residuos de TM7 (Leu267^{7.32}, Met270^{7.35}) y se dispone hacia la cara extracelular del receptor.

4. El furano se dispone hacia el interior del receptor, más enterrado en la membrana celular, e interacciona con residuos en TM6 (Asn253^{6.55}, His250^{6.52}, Leu249^{6.51} y Trp246^{6.48}) (Jaakola y col., 2008).



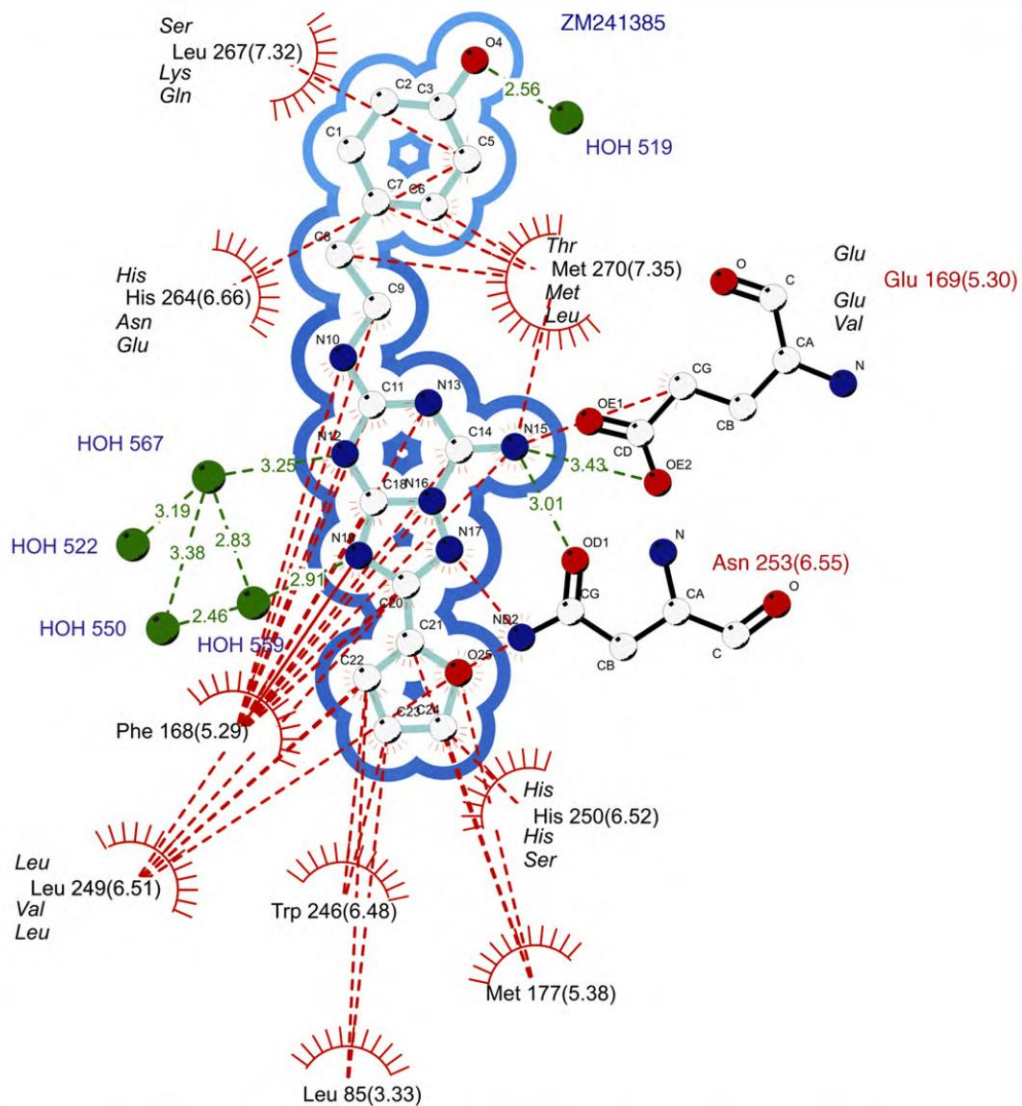


Fig. 33. Representación bidimensional del complejo receptor A_{2A} :ZM241385 donde se detallan las interacciones del ligando con residuos del receptor según se determinaron en el estudio de cristalización de Jaakola y col. (2008). Es destacable la interacción entre Glu5.30 en EL2 y el grupo amino exocíclico de la triazolotriazina. El grupo fenólico se orienta hacia la cara extracelular y participa en las interacciones del ligando con Phe5.29 en EL2 y con Leu7.32, Met7.35 e His7.29 (6.66), en EL3 o TM7. Las líneas con rayas rojas que conectan con átomos en blanco del ligando y que rodean a algunos aminoácidos señalan interacciones hidrofóbicas. Las columnas de aminoácidos señalan el aminoácido que ocupa la posición indicada en los receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 , en este orden. (Figura tomada de Jaakola e Ijzerman, 2010).

Con respecto a los enlaces mediante puente disulfuro descritos para los receptores A_{2A} y A_{2B} , el estudio de modelización de receptores de adenosina (Rodríguez y col., 2011;

ver más abajo) indica que dos de ellos (EL2-EL1 y uno de los enlaces EL2-TM3) serían comunes a ambos receptores. Estos serían los enlaces entre los residuos Cys71^{2.69}-Cys159^{5.20} en el receptor A_{2A} y Cys72-Cys167 en el receptor A_{2B}, en el caso de EL2-EL1, y entre los residuos Cys77^{3.25}-Cys166^{5.27} (A_{2A}) y Cys77-Cys171 (A_{2B}) en el caso de EL2-TM3. Este último elemento estructural también está presente en otros GPCRs (Jaakola y col., 2008; Rodríguez y col., 2011). Sin embargo, el enlace adicional EL2-TM3 que se establece en el caso del receptor A_{2A} entre las posiciones Cys74^{3.22}-Cys146^{4.67} y que restringiría a mayores el movimiento de este bucle no está presente en el receptor A_{2B}. Éste presenta un enlace intrabucle en EL2 entre Cys154-Cys166 (Rodríguez y col., 2011). El receptor A_{2B} carecería de un enlace intra-EL3 análogo al del receptor A_{2A} (Cys259-Cys261) y que orienta His264 en el receptor A_{2A} hacia la entrada del bolsillo de unión del receptor (Jaakola y col., 2008).

En el año 2011 se publicó un estudio realizado por colaboradores de nuestro grupo de investigación (Rodríguez y col., 2011) que modelizaba los receptores A_{2A} y A_{2B} partiendo de los datos de la estructura obtenidos en el trabajo de Jaakola y col., (2008) (código PDB 3EML). La secuencia de estos receptores presenta un grado de homología del 59% y 70% para todo el receptor y los segmentos transmembrana, respectivamente (Rodríguez y col., 2011). Los modelos incorporaban los fragmentos en EL2 e IL3 ausentes en la estructura determinada por Jaakola y col., (2008). Se optimizaron de forma protocolizada los aspectos estereoquímicos y energéticos de las dos estructuras, al igual que la simulación de inserción en membrana, la equilibración de la estructura o el acoplamiento del ligando ZM241385. Tras ello, se realizaron simulaciones de dinámica molecular para los receptores A_{2A} y A_{2B} y se estudiaron las interacciones y conformaciones en ausencia de ligandos o en presencia del antagonista A_{2A} selectivo ZM241385. Particularmente importante en relación a la hipótesis de este apartado fue la interacción descrita en el modelo de simulación del receptor A_{2A} entre el aminoácido Glu169^{5.30} en EL2 e His264^{7.29} en EL3. En el modelo de simulación dinámica de A_{2B} presentado por Rodríguez y col. tal interacción se establecería entre los residuos de Glu^{5.30} de EL2 (conservado entre los receptores A_{2A} y A_{2B}) y Asn266^{7.29} de EL3, apreciándose diferencias en la naturaleza de estas dos interacciones: en el caso del receptor A_{2A} se trataría de un enlace mediante puente de hidrógeno mientras que en el caso del receptor A_{2B} se trataría de una interacción polar (Rodríguez y col., 2011) (**Fig. 34**).

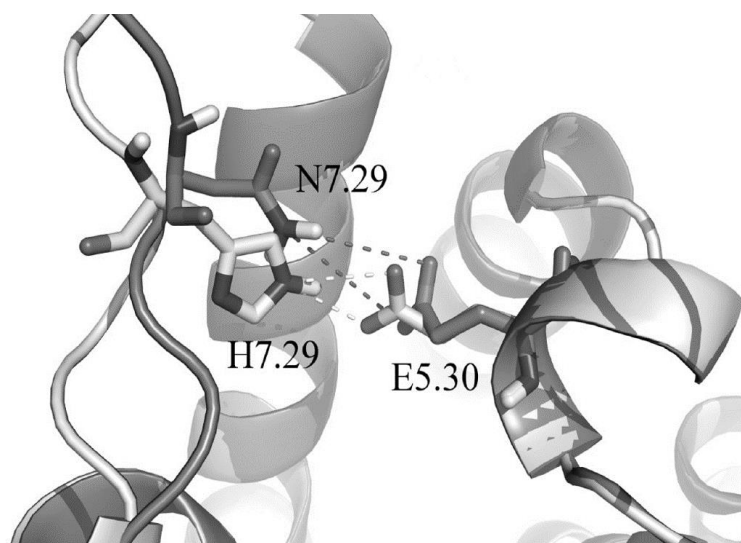


Fig. 34. Representación de la interacción entre Glu5.30 en EL2 de los receptores A_{2A} y A_{2B} con el aminoácido en posición 7.29 en EL3 (His264 en A_{2A}, Asn266 en A_{2B}), de acuerdo con los modelos de Rodríguez y col. para los dos receptores. (Tomado de Rodríguez y col., 2011).

El estudio de simulación de dinámica molecular mencionado sugería que la interacción entre Glu5.30 y His7.29 en el receptor A_{2A} determina la movilidad y posición de los bucles extracelulares del receptor, que podrían adoptar una conformación a modo de tapa sobre el sitio de unión del receptor estabilizando el complejo A_{2A}-ZM241385. La implicación de los bucles extracelulares en el acceso y estabilización del ligando en el sitio de unión estaría sustentada, en el caso del receptor A_{2A}, por las interacciones descritas para el ligando ZM241385 con los bucles EL2 y 3 (Jaakola y col., 2008), así como por la conformación parcialmente restringida que necesariamente adopta el bucle EL2 debido a varios enlaces puente disulfuro, lo que podría condicionar el acceso de ligandos al sitio de unión o su salida del mismo. Asimismo, las simulaciones de dinámica molecular del trabajo de Rodríguez y col. sugieren que la interacción entre Glu5.30-His7.29 en el receptor A_{2A}, de carácter fuerte, cumple una función estabilizadora del complejo A_{2A}-ZM241385 que podría reflejarse en una disociación lenta del ligando. Sin embargo, en el caso del receptor A_{2B}, la interacción Glu5.30-Asn7.29 sería de carácter más débil dotando de mayor flexibilidad estructural a ese dominio del receptor (Rodríguez y col., 2011).

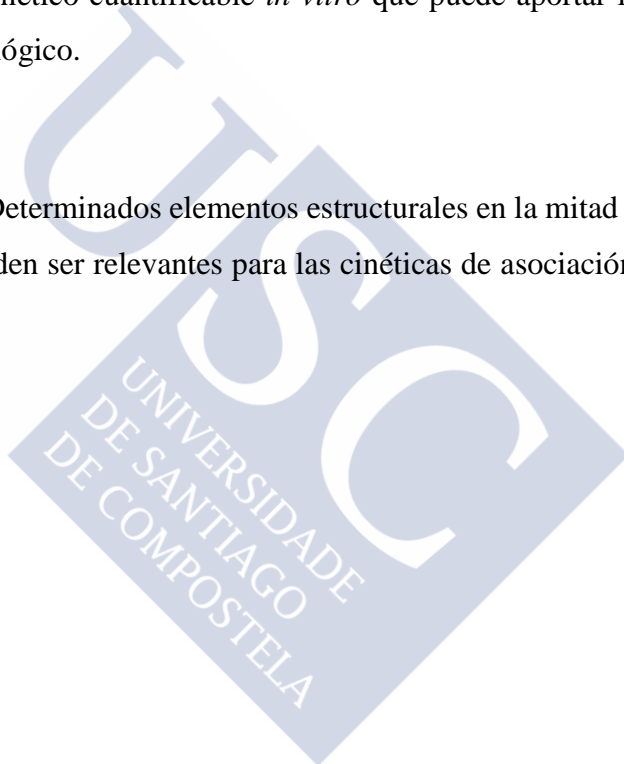
En base a esta información, en este apartado del trabajo se planteó la hipótesis de que la interacción entre los residuos 5.30-7.29 del receptor A_{2A} es relevante para las

cinéticas de asociación y/o disociación del ligando ZM241385 en este receptor y, en este sentido, puede resultar un determinante estructural diferencial respecto al receptor A_{2B}. Así, nos planteamos determinar las cinéticas de asociación y disociación del radioligando [³H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} humano y en un receptor A_{2A} mutado en el que el residuo His en posición 7.29 se ha intercambiado por el residuo que ocupa esta posición en el receptor A_{2B} (Asn).



2.4. HIPÓTESIS

- **Hipótesis I.** Determinados aminoácidos del bolsillo de unión de GPCRs pertenecientes al receptoroma de antipsicóticos pueden ser relevantes para el perfil de afinidad y selectividad de estos fármacos.
- **Hipótesis II.** El tiempo de residencia de antipsicóticos en sus GPCRs diana es un parámetro cinético cuantificable *in vitro* que puede aportar información de interés farmacológico.
- **Hipótesis III.** Determinados elementos estructurales en la mitad extracelular de los GPCRs pueden ser relevantes para las cinéticas de asociación y disociación de sus ligandos.



2.5. OBJETIVOS

El **Objetivo general** de este trabajo fue investigar las tres hipótesis enunciadas anteriormente, relacionadas con aspectos estructurales y cinéticos de la interacción ligando-receptor relevantes en la farmacología de la esquizofrenia. Para ello, se generaron las herramientas (receptores mutados puntualmente, líneas celulares) y se pusieron a punto las metodologías (ensayos cinéticos de unión de radioligandos) necesarias para abordar los siguientes **Objetivos específicos**:

- I. i. Comprobar experimentalmente si la identidad (Ser o Cys) del residuo en posición 3.36 en GPCRs del receptoroma de antipsicóticos es relevante para la mayor afinidad que clozapina y olanzapina presentan por GPCRs del grupo “Ser3.36” frente a GPCRs del grupo “Cys3.36”.

En un principio, se planteó llevar a cabo este estudio sobre los receptores 5-HT_{2A} y D₂, seleccionados como GPCRs prototipo de los grupos Ser3.36 y Cys3.36, respectivamente. Mediante mutagénesis dirigida se generaron los receptores mutados 5-HT_{2A} y D_{2S} en los que se intercambiaron los residuos Ser o Cys en la posición 3.36 con el fin de determinar la afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores mediante ensayos de unión de radioligandos de competición. Sin embargo, experimentalmente no fue posible completar el trabajo sobre el receptor D₂ mutado, por lo que la hipótesis se comprobó experimentalmente sobre la pareja de receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys. Con el fin de obtener información estructural adicional de cara a la interpretación de resultados, en este estudio se incluyeron también los ligandos serotonina y N-desmetil-clozapina.

- I. ii. Comprobar experimentalmente si la identidad de los residuos en las posiciones 5.43 y 5.46 en GPCRs del receptoroma de antipsicóticos es relevante para los distintos perfiles de afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina por GPCRs adscritos al grupo “Ser5.43/Ser5.46” (mayor afinidad de olanzapina en comparación con clozapina) y “Thr5.43/Ala5.46” (mayor afinidad de clozapina en comparación con olanzapina).

En un principio, se planteó llevar a cabo este estudio sobre los receptores D₂ y 5-HT_{1A}, seleccionados como GPCRs prototipo del grupo Ser5.43/Ser5.46 y Thr5.43/Ala5.46, respectivamente. Mediante mutagénesis dirigida se generaron los receptores mutados 5-HT_{1A} y D_{2S} en los que se intercambiaron los residuos Ser o Thr en posición 5.43 y los residuos Ser o Ala en posición 5.46, con el fin de determinar la afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores mediante ensayos de unión de radioligandos de competición. Sin embargo, experimentalmente no fue posible completar el trabajo sobre el receptor 5-HT_{1A} mutado, por lo que la hipótesis se comprobó experimentalmente sobre la pareja de receptores D₂ y D₂- Ser5.43Thr/Ser5.46Ala.

- I. iii. Comprobar experimentalmente si la identidad (Val o Tyr) del aminoácido en posición 3.33 en GPCRs diana (tales como el receptor D₂) y antidiana (en particular el receptor H₁) de antipsicóticos es relevante para el perfil de selectividad de clozapina y olanzapina por estos receptores.

Se planteó llevar a cabo este estudio sobre el receptor D₂, seleccionado como prototipo de GPCR diana que presenta el aminoácido Val en posición 3.33. Mediante mutagénesis dirigida se generó un receptor D₂ en el que se intercambió el residuo Val3.33 por un residuo Tyr que ocupa la posición 3.33 en el receptor H₁, con el fin de determinar la afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores mediante ensayos de unión de radioligandos de competición.

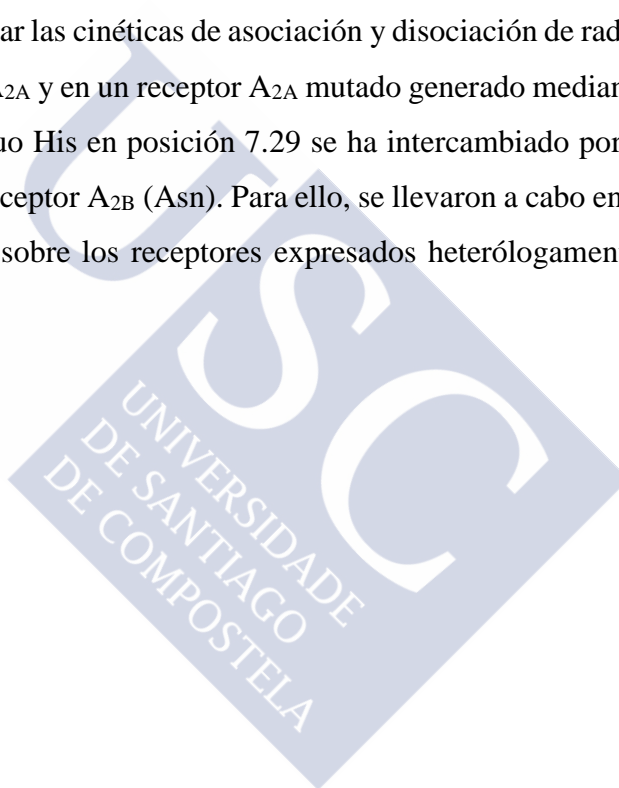
- II. Cuantificar el tiempo de residencia (t_R) del antipsicótico atípico lurasidona en el receptor 5-HT₇

Se planteó determinar en ensayos *in vitro* el t_R para la lurasidona en la diana por la que presenta mayor afinidad entre los GPCRs de su receptoroma, el receptor 5-HT₇, mediante el método de competición cinética descrito por Motulsky y Mahan (1984), que se puso a punto con este propósito. Así, se determinaron las constantes de velocidad de asociación y disociación (k_{on} y k_{off}) del radioligando 5-HT₇ selectivo [³H]-SB269970 en el receptor 5-HT₇ humano expresado heterológamente en una línea celular estable para, a

continuación, determinar las constantes k_{on} y k_{off} de lurasidona mediante ensayos de competición cinética y así, a partir de la k_{off} , conocer el t_R del fármaco.

- III. Investigar experimentalmente si la identidad del aminoácido que ocupa la posición 7.29 del receptor A_{2A} es relevante para las cinéticas de asociación y/o disociación del ligando ZM241385 en este receptor, y si esta constituye un determinante estructural diferencial respecto al receptor A_{2B} en términos de las cinéticas de unión del ligando.

Se planteó determinar las cinéticas de asociación y disociación de radioligando [3H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} y en un receptor A_{2A} mutado generado mediante mutagénesis dirigida, en el que el residuo His en posición 7.29 se ha intercambiado por el residuo que ocupa esta posición en el receptor A_{2B} (Asn). Para ello, se llevaron a cabo ensayos cinéticos de unión del radioligando sobre los receptores expresados heterológamente en una línea celular estable.



3. MATERIALES Y MÉTODOS





3.1. MATERIALES Y COMPUESTOS

Comenzando por los ensayos con receptores diana de antipsicóticos mutados en el sitio de unión, en las reacciones de PCR se emplearon las polimerasas de ADN Pfu AD clonada (Stratagene o Fermentas) y Vent (New England Biolabs). Las enzimas de restricción fueron de New England Biolabs, al igual que la fosfatasa antártica y la ligasa de ADN T4. El conjunto de reactivos para la extracción de ADN de geles de agarosa (GenElute gel extraction kit) y ampicilina fueron de Sigma-Aldrich. El conjunto de reactivos de extracción y purificación de plásmidos (Genopure plasmid midi kit) fue de Roche. Las bacterias *Escherichia coli* fueron de New England Biolabs. Otros reactivos químicos no mencionados aquí fueron de Sigma-Aldrich.

Se empleó el medio de cultivo DMEM/F12 (*Dulbecco's modified Eagle's medium-F12*) (Gibco). Otros productos utilizados en cultivo celular fueron suero fetal bovino (FBS) y suero fetal bovino dializado (ambos de Sigma-Aldrich), solución de penicilina y estreptomina (Sigma-Aldrich) y geneticina (G-418) (Gibco). Se utilizó NaCl (Sigma-Aldrich), KH_2PO_4 (Probus), Na_2HPO_4 (Panreac) y KCl (Probus). Para la transfección mediante el método de calcio fosfato se utilizaron BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)2-aminoetanosulfónico, para cultivo celular, Sigma-Aldrich), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Ultra para biología molecular, Fluka BioChemika) y CaCl_2 (para cultivo celular, Sigma-Aldrich). Otros reactivos utilizados en la preparación de tampones fueron el cóctel de inhibidores de proteasas, MgCl_2 , Tris HCl, sacarosa, EDTA, EGTA (hasta aquí todos de Sigma-Aldrich) y NaHCO_3 (Panreac).

Los radioligandos empleados fueron: [^3H]-espiperona (16.2 Ci/mmol) (Amersham); [^3H]-ketanserina HCl (67.0 Ci/mmol) (Perkin Elmer) y [^3H]-8-OH-DPAT (154.2 Ci/mmol) (Amersham). Otros ligandos comerciales empleados fueron: serotonina (Sigma), sulpirida (Sigma), mianserina HCl (Sigma) y clozapina (Sigma). La olanzapina se obtuvo mediante extracción a partir de comprimidos del medicamento Zyprexa (Eli Lilly) por cromatografía en columna de gel de sílice (Padín [tesis doctoral], 2007).

En cuanto a los ensayos con el receptor 5-HT₇, lurasidona fue suministrada por Sumitomo Dainippon Pharma (Japón). Se empleó el medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) alto en glucosa (Sigma-Aldrich). Metiotepina fue de Sigma-

Aldrich. El radioligando [³H]-SB269970 (39.9 Ci/mmol) fue adquirido a Perkin-Elmer. Otros reactivos utilizados fueron CaCl₂ (Probus), ácido L-ascórbico (Sigma) y pargilina (Sigma). Algunos reactivos utilizados en la investigación con este receptor ya han sido mencionados más arriba.

En el caso de los experimentos con el receptor A_{2A}, la enzima de restricción *NotI* fue adquirida de Fermentas. La formulación comercial del antibiótico de selección fleomicina D1 (Zeocin) fue de Invitrogen. NECA fue de Sigma-Aldrich. La enzima adenosina deaminasa (ADA) fue de Roche. El radioligando [³H]-ZM241385 (50 Ci/mmol, 1 mCi/mL) fue adquirido a ITISA (ARC). El ligando ZM241385 fue de Tocris.



3.2. MÉTODOS

3.2.1. Mutagénesis dirigida

Los receptores mutados se generaron por técnicas de mutagénesis dirigida mediante PCR, sobre los ADNc de los receptores humanos disponibles en el laboratorio. Las mutaciones se introdujeron en cada caso con dos cebadores (*forward* y *reverse*) incorporando el cambio de bases correspondiente. Estos cebadores, junto con cebadores complementarios a las regiones de los extremos del ADNc de cada receptor, permitieron amplificar dos fragmentos parciales mutados del ADNc, designados como los subproductos de PCR I y PCR II, solapantes en la secuencia conteniendo las mutaciones. Estos fragmentos de ADNc sirvieron como molde para una PCR total en la que se amplificó la secuencia total del receptor mutado, producto de PCR que se purificó siguiendo las instrucciones del kit comercial GenElute y constituyó el inserto para el paso de clonaje en el vector correspondiente. El inserto y el vector se cortaron con las enzimas de restricción correspondientes y se purificaron al igual que el producto de la PCR. Antes de la ligación vector-inserto, se pretrató el vector con fosfatasa antártica para eliminar los grupos fosfato del extremo 5'. Las bacterias transformadas se cultivaron en medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Las colonias positivas se identificaron por restricción y el constructo se amplificó y purificó siguiendo las instrucciones del kit comercial Genopure. Todas las construcciones se comprobaron mediante secuenciación.

Para la realización de cada mutagénesis dirigida se partió del ADNc del respectivo receptor humano insertado en un vector pcDNA3. En la siguiente tabla se indican las construcciones generadas, así como los cebadores, vectores y sitios de restricción utilizados en el proceso de clonaje (**Tablas 7 y 8**).

Constructo	Cebadores ^{a, b}	Sitios de restricción empleados
pcDNA3-5-HT _{2A} -Ser3.36Cys	<p>Interno <i>forward</i> 5'- GACGTGCTCTTCTGCACGGCCTCC</p> <p>Interno <i>reverse</i> 5'- GATGGAGGCCGTGCAGAAGAGCAC</p> <p>Externo <i>forward</i> 5'- AAAAAAAAAGGATCCGCCACCATGGATATTCTTTGTGAA GAAAATAC</p> <p>Externo <i>reverse</i> 5'- AAAAAAAAATCTAGATCACACACAGCTCACCTTTTC</p>	<i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I
pcDNA3-D _{2S} -Cys3.36Ser	<p>Interno <i>forward</i> 5'-GACGTCATGATGTCCACGGCGAGC</p> <p>Interno <i>reverse</i> 5'-GATGCTCGCCGTGGACATCATGAC</p> <p>Externo <i>forward</i> 5'- AAAAAAAAAGGTACCGCCACCATGGATCCACTGAATCTG TCC</p> <p>Externo <i>reverse</i> 5'- AAAAAAAAAACTCGAGTCAGCAGTGGAGGATCTTCA</p>	<i>Kpn</i> I/ <i>Xho</i> I
pcDNA3-D ₂ -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala	<p>Interno <i>forward</i> 5'- TGGTCTACTCCACCATCGTCGCCTTCTACGTG</p> <p>Interno <i>reverse</i> 5'- ACGTAGAAGGCAGCATGGTGGAGTAGACC</p> <p>Los cebadores externo <i>forward</i> y externo <i>reverse</i> fueron los mismos que los utilizados en el caso de pcDNA3-D_{2S}-Cys3.36Ser</p>	<i>Kpn</i> I/ <i>Xho</i> I

Tabla 7. Construcciones, secuencias de cebadores y enzimas de restricción utilizadas para la generación de receptores mutados mediante mutagénesis dirigida. ^a Se subrayan las bases que introducen la mutación. ^bSe señalan en negrita los sitios de restricción.

Constructo	Cebadores ^{a, b}	Sitios de restricción empleados
pcDNA3-5-HT _{1A} -Thr5.43Ser/Ala5.46Ser	<p style="text-align: center;">Interno <i>forward</i> 5'- CTATCTATTCC<u>T</u>CCTTTGGATCTTTCTACATCC</p> <p style="text-align: center;">Interno <i>reverse</i> 5'- GATGTAGAAAG<u>A</u>TCCAAAGG<u>A</u>GGAATAGATAGTGT</p> <p style="text-align: center;">Externo <i>forward</i> 5'- AAAAAAAAA<u>AGGT</u>ACCGCCACCATGGATGTGCTCAGCCCT GG</p> <p style="text-align: center;">Externo <i>reverse</i> 5'- AAAAAAAAA<u>ACTCGAGT</u>CACTGGCGGCAGAACTTACA</p>	<i>KpnI/ XhoI</i>
pcDNA3-D ₂ -Val3.33Tyr	<p style="text-align: center;">Interno <i>forward</i> 5'-TCACTCTGGACT<u>A</u>CATGATGTGCAC</p> <p style="text-align: center;">Interno <i>reverse</i> 5'-TGCACATCATGT<u>A</u>GTCCAGAGTGAC</p> <p style="text-align: center;">Los cebadores externo <i>forward</i> y externo <i>reverse</i> utilizados fueron los mismos que en el caso de pcDNA3-D_{2S}-Cys3.36Ser</p>	<i>KpnI/ XhoI</i>
pIRESneo3-A _{2A} -His7.29Asn	<p style="text-align: center;">Interno <i>forward</i> 5'-CGACTGCAGCA<u>A</u>CGCCCCCTCTCTG</p> <p style="text-align: center;">Interno <i>reverse</i> 5'-CAGAGAGGGGCGT<u>I</u>GCTGCAGTCCG</p> <p style="text-align: center;">Externo <i>forward</i> 5'- AAAAAAAAA<u>AGGAT</u>CCATGCCCATCATGGGCTCCTCG</p> <p style="text-align: center;">Externo <i>reverse</i> (SP6) 5'-ATTTAGGTGACACTATAG</p>	<i>BamHI/ NotI</i>

Tabla 8. Continuación de la tabla 7 de construcciones, secuencias de cebadores y enzimas de restricción utilizadas para la generación de receptores mutados mediante mutagénesis dirigida. ^a Se subrayan las bases que introducen la mutación. ^b Se señalan en negrita los sitios de restricción.

3.2.2. Cultivo celular y generación de líneas celulares expresando establemente los receptores a estudio

Como líneas parenterales disponibles en el laboratorio y utilizadas para la realización de transfecciones se utilizaron CHO-K1 (DMSZ) y HeLa229. La línea CHO-K1 se mantuvo en medio de crecimiento DMEM-F12 suplementado con 10% (v/v) de FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y Glutamax (1X). La línea HeLa229 se mantuvo en medio de crecimiento DMEM alto en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino FBS a una concentración final del 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL y L-glutamina 2 mM.

Las líneas estables ya disponibles en el laboratorio correspondientes a receptores no mutados objeto de estudio como D_{2S}, 5-HT_{2A}, 5-HT₇ o A_{2A} fueron CHO-5HT_{2A}, CHO-D_{2S}, HEK-5-HT₇ y HeLa-A_{2A}. En el caso del receptor 5-HT_{1A} se utilizó una línea comercial de células CHO que expresaba este receptor (6110501400UA, PerkinElmer) (CHO-5-HT_{1A}). La correspondiente al receptor 5-HT_{2A} fue cedida por el grupo de investigación del doctor William P. Clarke de la Universidad de Texas (EE.UU.) al grupo Biofarma. Las líneas CHO expresando establemente los receptores D_{2S} y 5-HT_{1A} se mantuvieron en el medio señalado para la línea parental CHO-K1, pero suplementado con geneticina 200 µg/mL. En el caso de la línea correspondiente al receptor 5-HT_{2A} (CHO-5-HT_{2A}) el medio de cultivo no contenía geneticina sino higromicina B (300 µg/mL). La línea celular HEK293 expresando establemente la isoforma del receptor humano 5-HT_{7(a)} (HEK-5-HT₇; clon 14; Varin y col., 2010), cedida por la empresa ESTEVE, se mantuvo en medio de cultivo DMEM alto en glucosa con un 10% de FBS no dializado, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, piruvato sódico 1 mM, Glutamax (1x), L-glutamina 2 mM y el antibiótico de selección geneticina a una concentración de 500 µg/mL. La línea HeLa-A_{2A} se mantuvo en medio DMEM alto en glucosa suplementado con suero fetal bovino FBS al 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 µg/mL, L-glutamina 2 mM y el antibiótico de selección fleomicina a una concentración de 300 µg/mL.

Para la generación de líneas celulares correspondientes a receptores mutados se utilizaron las líneas parentales CHO-K1 y HeLa. En concreto, se generaron las líneas CHO-5-HT_{2A}-Ser3.36Cys, CHO-D_{2S}-Cys3.36Ser, CHO-D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala, CHO-D_{2S}-Val3.33Tyr, CHO-5-HT_{1A}-Thr5.43Ser/Ala5.46Ser y HeLa-A_{2A}-His7.29Asn. La generación

de las mismas se basó en la transfección del plásmido adecuado en todos los casos mediante el método de fosfato cálcico (Graham y Van der Eb, 1973). El método consiste en una transfección en placas de 150 mm de diámetro con un grado de confluencia en torno al 70% mediante la adición de 2 mL de la mezcla de transfección compuesta por 10-15 µg de ADN/placa, 900 µL de H₂O milliQ, 100 µl de CaCl₂ 2.5 M y 1 mL de tampón BBS (2x) (tampón BBS (2X): BES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ (x 2 H₂O) 1.5 mM, pH 6.95, conservado a TA).

Con respecto al procedimiento de transfección, 24 horas después de la misma, se procedió en todos los casos a lavar la placa con PBS y al cambio del medio por medio de selección, compuesto por los medios de crecimiento mencionados para las líneas parentales CHO y HeLa229 y 400 µg/mL y 500 µg/mL de geneticina respectivamente para ambos medios. En estos medios se mantuvieron en selección durante 15 días tras lo que se redujo la concentración a 200 µg/mL. Tras ello se seleccionaron clones mediante inspección visual para su recuperación. De cada clon se guardó un stock a -80°C y también se expandieron en un medio igual al de selección salvo en la concentración de geneticina (200 µg/mL). Finalmente, de los cultivos se prepararon membranas celulares para la comprobación de la expresión del receptor mediante ensayos de unión de radioligandos.

Todas las líneas derivadas de CHO-K1 expresando establemente receptores mutados generadas se mantuvieron en medio de crecimiento DMEM-F12 complementado con 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 200 µg/mL de geneticina y Glutamax. La línea HeLa-A_{2A}-His7.29Asn se mantuvo en medio de crecimiento señalado para la línea HeLa-A_{2A}, pero suplementado con geneticina a 500 µg/mL., en vez del antibiótico fleomicina D1.

El pase de los cultivos celulares se realizó una vez alcanzado un grado de confluencia casi completo (generalmente a los dos días) utilizando en los lavados tampón de fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KCl 2.7 mM, pH 7.4). En todos los casos las líneas celulares tanto parentales como expresando establemente un receptor se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo un 5% de CO₂.

3.2.3. Preparación de membranas para ensayos de unión de radioligandos

3.2.3.1. Preparación de membranas de líneas celulares CHO-5-HT_{2A} y receptores CHO-D_{2S}

Este apartado corresponde a las preparaciones de membranas obtenidas a partir de las líneas celulares CHO-5-HT_{2A}, CHO-5-HT_{2A}-Ser3.36Cys, CHO-D_{2S}, CHO-D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y CHO-D_{2S}-Val3.33Tyr. El cultivo celular se realizó en placas de 150 mm de diámetro cuyo medio de crecimiento se reemplazó por medio con FBS dializado al menos 24 horas antes de comenzar la preparación. Para comenzar la preparación, se volcó el contenido en medio de las placas y se lavaron las células dos veces con PBS. Tras esto, las células se resuspendieron en tampón de homogeneización (Tris-HCl 5 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4) a 4°C con ayuda de un raspador de células, se recogieron en el mismo tampón y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador de membranas (Polytron PT 10-35GT, Kinematica) a 30000 rpm dos veces durante 30 s manteniendo la preparación en hielo. La suspensión de células se centrifugó a 1090 x g durante 10 min a 4°C en una centrífuga (Avant Centrifuge J-26XPI, Beckman Coulter) para eliminar restos celulares y el sobrenadante se recuperó y centrifugó a 48400 x g durante 1 hora a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en un pequeño volumen de tampón de resuspensión (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) a 4°C.

3.2.3.2. Preparación de membranas de líneas CHO-5-HT_{1A}

Este apartado corresponde a las preparaciones de membranas obtenidas a partir de las líneas celulares CHO-5-HT_{1A} y CHO-5-HT_{1A}-Thr5.43Ser/Ala5.46Ser. El cultivo celular se realizó en placas de 150 mm de diámetro cuyo medio de crecimiento se reemplazó por medio con FBS dializado al menos 24 horas antes de comenzar la preparación. De forma similar a lo descrito en el anterior protocolo, se volcó el contenido en medio de las placas y se lavaron las células dos veces con PBS. Tras esto, las células se resuspendieron en tampón de homogeneización (compuesto por NaHCO₃ 10 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, pH 7.4, cóctel de inhibidores de proteasas (1 mL de solución de cóctel/100 mL tampón) a 4°C y se homogeneizó la suspensión con un homogeneizador manual de émbolo y tubo de teflón/vidrio (50 movimientos del émbolo). El homogeneizado se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos a 4°C para eliminar restos celulares y recoger el sobrenadante. Este se

centrifugó a 25000 x g durante 20 minutos a 4°C. El pellet obtenido de esta forma y resuspendido en tampón se sometió a otra centrifugación en las mismas condiciones que la centrifugación inmediatamente anterior. Finalmente, el pellet se resuspendió en tampón de resuspensión (Tris-HCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4, 4°C).

3.2.3.3. Preparación de membranas de la línea celular que expresa el receptor 5-HT₇

Este apartado corresponde a las preparaciones de membranas obtenidas a partir de la línea celular HEK-5-HT₇. El día anterior a la preparación, y una vez alcanzado un grado de confluencia adecuado, se cambió el medio de crecimiento por otro preparado con FBS dializado. Para comenzar la preparación se vació el medio de cultivo y se lavó el cultivo celular dos veces con 10 mL de PBS a 4°C. Se resuspendió el cultivo celular con un raspador en 10 mL de PBS por placa. Se centrifugó la suspensión durante 3 min a 1500 x g y el pellet de células se resuspendió en tampón de homogeneización (EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, NaHCO₃ 10 mM, pH 7.4, cóctel de inhibidores de proteasas) a 4°C. Esta suspensión se procesó con un homogeneizador manual de émbolo y tubo de teflón/vidrio 50 veces. A continuación, se centrifugó la suspensión de células a 500 x g durante 5 min y se recogió el sobrenadante. Éste se centrifugó a 25000 x g durante 20 min a 4°C. Se resuspendió el pellet obtenido de nuevo en tampón y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones que en el paso anterior. Finalmente, se resuspendió el pellet en tampón de resuspensión (Tris-HCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4) a 4°C.

3.2.3.4. Preparación de membranas de líneas celulares expresando receptores A_{2A}

Se partió de cultivos de las líneas celulares estables HeLa-A_{2A} y HeLa-A_{2A}-His7.29Asn en placas de 150 mm de diámetro. El día anterior a la preparación de membranas se cambió el medio de cultivo por otro sin antibiótico de selección y con FBS dializado. Para comenzar la preparación, tras retirar el medio de cultivo, se lavaron las placas dos veces con 10 mL de tampón de homogeneización (Tris-HCl 5 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4) a 4°C y se recuperaron las células con otros 10 mL de tampón de homogeneización con ayuda de un raspador de células. La suspensión de células se homogeneizó 2 veces durante 30 s con un homogeneizador de membranas (Polytron). Posteriormente se

centrifugó a 1150 x g durante 10 min a 4°C para eliminar restos celulares. El sobrenadante resultante se centrifugó a 45275 x g durante 1 h a 4°C. El pellet obtenido tras esta centrifugación se resuspendió en tampón de resuspensión (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4) 4°C.

3.2.3.5. Determinación de la concentración de proteína en las preparaciones de membranas

En todos los casos, tras la resuspensión final, las preparaciones de membranas se conservaron en alícuotas a -80°C hasta su uso, y se determinó la concentración de proteína total en cada preparación por el método de Bradford (Bradford y col., 1976) siguiendo las instrucciones del reactivo comercial (Biorad), utilizando una recta de calibrado realizada a partir de cantidades conocidas de proteína de albúmina sérica bovina (BSA). La absorbancia de la reacción colorimétrica se determinó a 595 nm en un espectrofotómetro (Ultrospec 4000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech).

3.2.4. Ensayos de unión de radioligandos

3.2.4.1. Ensayos sobre receptores 5-HT_{2A}, D₂ y 5-HT_{1A} para el estudio de determinantes estructurales en el sitio de unión del receptor relevantes para el perfil de afinidad y selectividad de antipsicóticos

3.2.4.1.1. *Determinaciones de unión específica para la selección de clones celulares expresando receptores mutados*

Selección de clones expresando el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys

La comprobación de la expresión del receptor se llevó a cabo en preparaciones de membrana de al menos 8 clones, obtenidos tras selección por crecimiento celular en medio con antibiótico de selección. Los ensayos de unión de radioligando se llevaron a cabo por triplicado en tubos conteniendo 70 µg de proteína y el radioligando [³H]-ketanserina 10 nM en tampón de incubación (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5). La unión inespecífica se determinó en presencia de metisergida a una concentración de 10 µM. Los tubos se incubaron en un baño a 37°C en agitación durante 30 minutos, tras lo cual su contenido se filtró a través de filtros Whatman GF/B tratados con PEI al 0.5%, en un aparato de filtración (Brandel Cell Harvester). Los filtros se lavaron 3 veces con 3 mL de tampón de filtración (Tris-HCl 50

mM, pH 6.6, 4°C) y se secaron en una estufa durante una hora a 60°C. Se colocaron en viales de centelleo a los que se añadió 4 mL de líquido de centelleo (Universol). Los viales se agitaron y transcurrido un periodo de al menos 4 horas se contó la radioactividad en un contador de centelleo (Beckman LS 6000 LL).

Los clones que mostraron una buena ventana de unión específica (en general, en torno al 90% de la unión total) fueron seleccionados para su empleo en los posteriores ensayos, caracterizándose su unión específica en ensayos de linealidad de proteína. Así, se llevaron a cabo ensayos en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, pero empleando distintas cantidades de proteína de membrana (15, 30, 60 y 120 µg proteína/tubo). Estos ensayos permitieron determinar la cantidad de proteína óptima para realizar posteriores ensayos de unión y de competición en el equilibrio con los clones seleccionados, y a partir de ellos se seleccionó un único clon (clon #2) para posteriores estudios.

Selección de clones expresando receptores D_{2S}-Cys3.36Ser, D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y D_{2S}-Val3.33Tyr

En estos casos se empleó el radioligando [³H]-espiperona a una concentración de 2 nM, en tampón de incubación Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 5mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1mM, pH 7.4 (“tampón de incubación D₂”). La unión inespecífica se determinó en presencia de sulpirida 10 µM y la incubación se realizó durante 2 horas a 25°C. El contenido de los tubos se filtró a través de filtros Whatman GF/B tratados con PEI al 0.5% y fueron lavados empleando el tampón de filtración Tris-HCl 50 mM, NaCl 0.9%, pH 7.4 (“tampón de filtración D₂”) a 4°C. El procesamiento de los filtros y contaje de la radiactividad se llevó a cabo como en el caso anterior.

Igualmente, para los clones seleccionados se llevaron a cabo ensayos de linealidad de proteína que permitieron hallar la concentración de proteína óptima para realizar posteriores ensayos de saturación y de competición. Mientras que en el caso del receptor D_{2S}-Cys3.36Ser no se identificó ningún clon celular que mostrase un nivel de expresión compatible con posteriores estudios, de los receptores D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y D_{2S}-Val3.33Tyr se seleccionaron los clones #29 y #16, respectivamente.

Selección de clones expresando el receptor 5-HT_{1A}-
Thr5.43Ser/Ala5.46Ser

En este caso, la selección de clones se realizó mediante experimentos de unión de [³H]-8-OH-DPAT (2 nM). Estos experimentos se realizaron en tampón de incubación Tris-HCl 50 mM, MgSO₄ 5 mM, pH 7.4. Los tubos de ensayo se incubaron durante 2 horas a 37°C y la unión no específica se determinó en presencia de 10 μM de serotonina. Tras la incubación, los tubos se filtraron con tampón de filtración (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 4°C) y se procesaron como en los casos anteriores. Tras estos procedimientos, en el caso de este receptor no se identificó ningún clon celular cuyos niveles de expresión permitiesen su empleo en posteriores estudios.

3.2.4.1.2. *Ensayos de saturación*

Ensayos de saturación en receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys

Mediante estos ensayos se cuantifica el número máximo de sitios de unión por mg de proteína (densidad de sitios de unión, B_{max}) y la afinidad del radioligando por el sitio de unión, expresada mediante la constante de disociación en el equilibrio (K_d). Los experimentos de saturación en los distintos receptores 5-HT_{2A} se realizaron en preparaciones de membrana de las líneas estables CHO-5-HT_{2A} y CHO-5-HT_{2A}-Ser3.36Cys (clon #2) utilizando [³H]-ketanserina como radioligando a concentraciones en el intervalo de 0.1 a 40 nM, en tampón de incubación compuesto por Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, ácido ascórbico 0.05%, pH 7.4 (“tampón de incubación 5-HT_{2A}”). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, en tubos conteniendo 30 μg de proteína (receptor 5-HT_{2A}) y 80 μg de proteína (receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys). La unión no específica se determinó en presencia de 60 μM de mianserina. Los tubos de ensayo se incubaron durante 1 hora a 25°C e inmediatamente se procedió a su aspiración, filtrado y lavado con tampón de filtración Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (“tampón de filtración 5-HT_{2A}”), procesándose a continuación los filtros como se ha descrito anteriormente para ensayos de unión de radioligandos.

Ensayos de saturación en receptores D_{2S}, D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y D_{2S}-Val3.33Tyr

Los experimentos de saturación en los distintos receptores D_{2S} se realizaron en preparaciones de membrana de las líneas estables CHO-D_{2S}, D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala (clon #29) y CHO-D_{2S}-Val3.33Tyr (clon #16) utilizando [³H]-espiperona como radioligando a concentraciones en el intervalo de 0.02 a 3 nM, en tampón de incubación D₂. Los tubos contenían 2 µg de proteína en el caso del receptor D_{2S}, 4 µg en el caso del receptor D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y 7.5 µg en el caso del receptor D_{2S}-Val3.33Tyr. La unión no específica se determinó en presencia de sulpirida 10 µM en todos los experimentos. Los tubos de ensayo se incubaron durante 2 horas a 25°C e inmediatamente tras la incubación se filtró su contenido lavando con tampón de filtración D₂ y los filtros se procesaron como en los ensayos anteriores.

3.2.4.1.3. *Ensayos de competición*

Ensayos de competición en receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys

Los ensayos de competición se realizaron en las mismas condiciones que los ensayos de saturación para estos receptores, pero empleando [³H]-ketanserina a una concentración 3 nM, en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de los competidores: 0.01 nM – 10 µM para clozapina y olanzapina, 10 nM – 300 µM para serotonina y 0.01 nM – 100 µM para N-desmetil-clozapina.

Ensayos de competición en receptores D_{2S}, D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y D_{2S}-Val3.33Tyr

Los experimentos de competición se realizaron en las mismas condiciones que los ensayos de saturación para estos receptores, pero utilizando 2 nM [³H]-espiperona, en ausencia o presencia de concentraciones en el rango 0.1 nM a 100 µM de clozapina u olanzapina.

3.2.4.2. Ensayos sobre el receptor 5-HT₇

3.2.4.2.1. Ensayos de saturación

Mediante estos ensayos se cuantifica el número máximo de sitios de unión por mg de proteína (B_{\max}) y la afinidad del radioligando por el sitio de unión, expresada mediante la constante de disociación en el equilibrio (K_d). Mediante estos ensayos se comprobó rutinariamente la capacidad de unir radioligando de las preparaciones de membrana de la línea HEK-5-HT₇ (clon 14) empleadas en nuestros experimentos, a modo de validación de las mismas. Para ello, se determinó la unión específica de radioligando [³H]-SB269970 en un rango de concentraciones de 0.03 nM a 30 nM a una cantidad de proteína de membrana de 2.5 µg por pocillo. La unión inespecífica se determinó en presencia de clozapina 25 µM. Los ensayos se llevaron a cabo en placa de fondo plano por duplicado en un volumen final de 250 µL utilizando el tampón de incubación compuesto por Tris-HCL 50 mM, CaCl₂ 4 mM, ácido L-ascórbico 1 mM, pargilina 0.1 mM, pH 7.4 (“tampón de incubación 5-HT₇”). La placa se incubó durante 1 h a 37°C antes de la transferencia de su contenido a una placa de 96 pocillos con filtro GF/C pretratada con tampón de incubación 5-HT₇. El contenido de los pocillos se filtró mediante un aspirador de placas procediéndose a lavar el filtro con el tampón de incubación 5-HT₇ cuatro veces. La placa se secó en una estufa a 60°C durante 1 h y se añadieron 30 µL de líquido de centelleo por pocillo. Transcurridas al menos cuatro horas se midió la radiactividad en los distintos pocillos en un contador de centelleo para placas de 96 pocillos (1450 Microbeta. Wallac/Trilux. Perkin Elmer).

El valor medio de la constante de disociación en el equilibrio (K_d) del radioligando [³H]-SB269970 en la línea celular HEK-5-HT₇ obtenido para nuestras preparaciones de membrana fue de 1.53 ± 0.16 nM y el valor de la unión específica máxima (B_{\max}) fue de 21.8 ± 0.76 pmol/mg de proteína (**Fig. 35**). Otros valores de constante de afinidad (K_d) que aparecen en la literatura para este radioligando y receptor son 1.25 ± 0.05 nM para el receptor expresado en células HEK293 (Thomas y col., 2000) y 2.3 ± 0.4 nM en homogeneizados de tálamo humano (Thomas y col., 2002), por tanto, de acuerdo con nuestros datos.

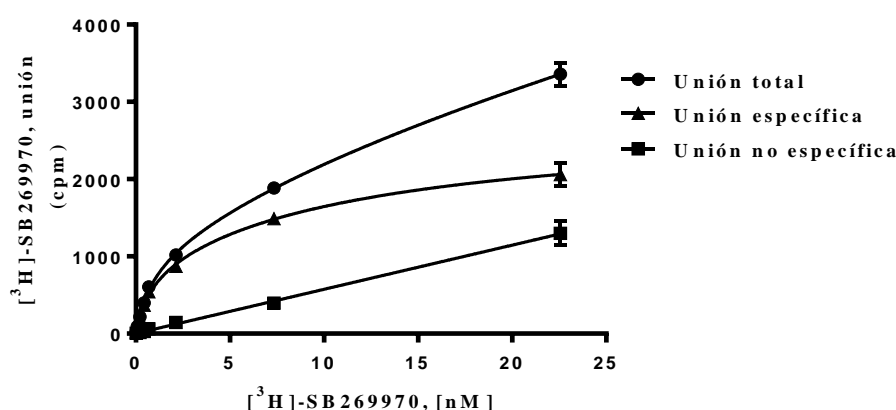


Fig. 35. Validación de una preparación de membranas HEK-5-HT₇ mediante ensayos de saturación con el radioligando [³H]-SB269970. Se representa la media ± EEM de un experimento representativo realizado por duplicado.

3.2.4.2.2. Ensayos de competición en el equilibrio

En este tipo de ensayos se determina la concentración de ligando competidor que es capaz de producir un desplazamiento del 50% del radioligando unido (IC₅₀). A partir de esta se calcula la constante de disociación en el equilibrio para el ligando competidor (K_i).

En este caso, se incubaron 2.5 µg de proteína de membranas HEK-5-HT₇ por pocillo con [³H]-SB269970 a una concentración de 1 nM y diez concentraciones de ligando competidor (lurasidona) en el rango de 10⁻¹² a 10⁻⁶ M, por octuplicado. Las membranas se incubaron como se indicó en el apartado anterior. La unión no específica se determinó en presencia de clozapina 25 µM. Los experimentos se realizaron en placas de fondo plano de 96 pocillos, siendo el procedimiento seguido tras la incubación igual al descrito en el apartado anterior.

3.2.4.2.3. Ensayos cinéticos de disociación de [³H]-SB269970 para la determinación de la constante de velocidad de disociación del radioligando

Con estos ensayos se pretende determinar la constante de velocidad de disociación k_{off} (unidades de tiempo⁻¹) del radioligando [³H]-SB269970. En estos ensayos se parte de una situación de equilibrio de unión del radioligando [³H]-SB269970 al receptor, alcanzado tras un tiempo de preincubación de 75 min a 37°C de las membranas HEK-5-HT₇ con el

radioligando a una concentración 1 nM. Transcurrido ese tiempo se inicia la disociación adicionando el ligando metiotepina 10 μM a distintos tiempos, hasta un máximo de 150 min de tiempo de disociación en nuestras condiciones experimentales, con el fin de obtener valores de unión de radioligando a los distintos tiempos, determinados por triplicado. Los ensayos se realizaron en placa de fondo plano de 96 pocillos y a 37°C. Se utilizaron 2.5 μg de proteína por pocillo y tampón de incubación 5-HT₇ en un volumen final de 250 μL . La unión inespecífica de radioligando se determinó a los distintos tiempos de adición de metiotepina en presencia de clozapina 25 μM . Tras la incubación, el procesamiento de la placa fue idéntico al realizado en el caso de los experimentos de unión en el equilibrio, computando además el tiempo transcurrido hasta la filtración para el ajuste y representación de los datos.

3.2.4.2.4. *Ensayos cinéticos de asociación de [³H]-SB269970 para la determinación de la constante de velocidad de asociación del radioligando*

Estos experimentos se realizan para determinar en primer lugar la constante de velocidad de asociación observada k_{obs} (unidades de tiempo⁻¹) del radioligando [³H]-SB269970. A partir de este valor, posteriormente se procede a calcular la constante de velocidad de asociación (k_{on}).

En el procedimiento, la asociación se inicia adicionando el radioligando [³H]-SB269970 (1 nM) a distintos tiempos, de forma que el tiempo máximo de asociación en nuestras condiciones experimentales fue de 150 min. Se utilizaron 2.5 μg de proteína de membranas por pocillo en un volumen final de 250 μL de tampón de incubación 5-HT₇, en placa de 96 pocillos de fondo plano que se incubó a 37°C. La unión inespecífica de radioligando se determinó a los distintos tiempos en presencia de clozapina 25 μM . Tras la incubación la placa se procesó siguiendo los mismos pasos que en el caso de los experimentos de unión en el equilibrio, computando además el tiempo hasta la filtración para el ajuste y representación de los datos.

3.2.4.2.5. *Ensayos de competición cinética para la determinación de las constantes de velocidad de asociación (k_{on} , k_3) y disociación (k_{off} , k_4) de lurasidona*

La determinación del t_R de lurasidona en el receptor 5-HT₇ se abordó mediante el método experimental de ensayo de competición cinética (Motulsky y Mahan, 1984). Mediante el ajuste de los datos al modelo de ecuación descrito por estos autores se pretenden determinar las constantes de velocidad asociación (k_{on} , k_3) y disociación (k_{off} , k_4) para el ligando no marcado de interés. Presenta varias ventajas con respecto a otros métodos: no es necesario disponer del compuesto cuyas constantes se quieren determinar marcado con un radioisótopo u otro marcaje, como es nuestro caso para lurasidona, y permite una miniaturización con la suficiente simplicidad como para realizar determinaciones de t_R en formatos de medio y alto rendimiento (Guo y col., 2012).

El diseño experimental consiste en un ensayo cinético de asociación, en el que dos ligandos, el radioligando y un ligando competidor no marcado a estudio, compiten por su unión al receptor. Estos ensayos se llevan a cabo para distintas concentraciones del competidor, en presencia de una concentración fija de radioligando. La asociación se inicia adicionando juntos a distintos tiempos el radioligando [³H]-SB269970 (1 nM) y el ligando competidor lurasidona a una concentración entre varias preseleccionadas en torno a su K_i (0.5, 2.5, 8 y 25 nM), con el fin de obtener una curva de competición cinética para cada concentración de competidor.

Este ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano a 37°C y se utilizaron 2.5 µg de proteína de membranas por pocillo en un volumen final de 250 µL de tampón de incubación 5-HT₇. La unión inespecífica de radioligando se determinó a los distintos tiempos en presencia de clozapina 25 µM. Tras la incubación se realizó el mismo procedimiento relativo al manejo de la placa que en el caso de los experimentos de unión en el equilibrio, computando además el tiempo hasta la filtración para el ajuste y representación de los datos.

3.2.4.3. Ensayos sobre receptores A_{2A}

3.2.4.3.1. *Determinaciones de unión específica para la selección de clones celulares expresando el receptor A_{2A}-His7.29Asn*

Tras realizar la transfección de las células HeLa229 con el vector pIRESneo3-A_{2A}-His7.29Asn y mantener las líneas en medio con antibiótico de selección, se comprobó la expresión del receptor de los distintos clones seleccionados tras la preparación de las correspondientes membranas. Se determinó la unión específica a unas cantidades de proteína en el rango de 5 µg a 45 µg utilizando como radioligando [³H]-ZM241385 a una concentración final en el ensayo de 3 nM. La unión inespecífica se determinó en presencia de NECA 50 µM. Los ensayos se realizaron por duplicado en un volumen final de 250 µL en tampón de incubación compuesto por Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.4 y 2 U/mL de adenosina deaminasa (“tampón de incubación A_{2A}”). La placa se incubó a 25°C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se realizó una filtración través de la propia placa (Filtros GF/C) y cuatro lavados consecutivos de la placa con 250 µL de tampón de filtración Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.4. Los filtros se secaron durante 1 h a 60°C. Posteriormente se añadieron 30 µL de líquido de centelleo, LSC Universol y se esperó al menos 4 h antes de su contaje. Transcurrido ese tiempo se midió la radiactividad (dpm) en un contador de centelleo para placas (Microbeta Trilux 1450. Perkin Elmer).

De los clones seleccionados por mostrar una ventana de unión específica en torno al 90% se realizaron preparaciones de membranas que se emplearon en la realización de ensayos de unión de radioligandos, concretamente en la realización de curvas de linealidad de proteína para realizar una caracterización más detallada de la capacidad de estos clones de unir ligandos específicos. En la realización de estos ensayos se determinó la unión específica a unas cantidades de proteína en el rango de 5 µg a 60 µg y usando como radioligando [³H]-ZM241385 a una concentración 3 nM. La determinación de la unión específica se llevó a cabo por duplicado en un volumen final de 250 µL en tampón de incubación A_{2A}. La placa se incubó a 25°C durante 30 min. El procedimiento tras la incubación de la placa fue igual al seguido tras la misma etapa en el ensayo de comprobación. Al evaluar los resultados se seleccionó el clon #5 de la línea HeLa-A_{2A}-His7.29Asn para posteriores estudios.

3.2.4.3.2. Ensayos de saturación

En estos experimentos las membranas HeLa-A_{2A} y HeLa-A_{2A}-His7.29Asn se incubaron con un rango de concentraciones de 0.029 nM a 50 nM de radioligando [³H]-ZM241385 durante 60 min a 25°C en un volumen final de 200 µL de tampón de incubación A_{2A}. Los ensayos se llevaron a cabo en placa con pocillos de fondo GF/C pretratada con tampón de incubación A_{2A} y por duplicado. La unión específica se determinó en presencia de NECA 50 µM. El procesamiento de la placa después de la incubación fue igual al descrito en el apartado anterior.

3.2.4.3.3. Ensayos cinéticos de disociación de [³H]-ZM241385 para la determinación de la constante de velocidad de disociación del radioligando

En estos experimentos se incubaron las cantidades de proteína de membrana de 8 µg/pocillo en el caso de HeLa-A_{2A} y 12 o 16 µg en el caso de HeLa-A_{2A}-His7.29Asn. La disociación de [³H]-ZM241385 se llevó a cabo a una concentración 3 nM en tampón de incubación A_{2A} en un volumen final de 200 µL. La unión inespecífica se determinó en presencia de NECA 50 µM. La placa de fondo GF/C de 96 pocillos del ensayo se incubó a 4°C con agitación (750 rpm) durante 75 min para completar la asociación y previamente a una disociación iniciada mediante la adición del ligando no marcado ZM241385 para obtener una concentración final 1 µM y a distintos tiempos para la construcción de una curva de disociación (hasta 150 min). El procesamiento de la placa tras la incubación fue igual al descrito en los apartados anteriores, computando además el tiempo hasta el instante de la filtración para el ajuste y análisis de los datos.

3.2.4.3.4. Ensayos cinéticos de asociación de [³H]-ZM241385 para la determinación de la constante de velocidad de asociación del radioligando

En estos experimentos se incubaron unas cantidades de proteína de membrana de 8 µg/pocillo de HeLa-A_{2A} y 12 o 16 µg de HeLa-A_{2A}-His7.29Asn. Los pocillos de unión total contenían [³H]-ZM241385 a una concentración 3 nM en tampón de incubación A_{2A} en un volumen final de 200 µL. La unión inespecífica se determinó en presencia de NECA 50 µM. La placa de fondo GF/C de 96 pocillos del ensayo se incubó a 4°C con agitación (750 rpm) durante un tiempo de asociación máximo de 150 min. El ensayo se inició mediante la

adición de membranas, manteniendo adecuadamente la suspensión. El procesamiento de la placa después de la incubación fue igual al descrito en los apartados anteriores.

3.2.4.4. Análisis de los resultados de ensayos de unión de radioligandos

3.2.4.4.1. *Ensayos de saturación*

La constante de disociación en el equilibrio (K_d) del radioligando y el nivel de expresión del receptor (B_{max}) se determinaron ajustando los datos de los experimentos de saturación a un modelo de regresión no lineal hiperbólico, bien para un sitio de unión o bien para dos sitios de unión, de acuerdo al modelo preferido según el test de F de suma extra de cuadrados. El modelo de un sitio de unión viene definido por la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{B_{max} \cdot X}{(K_d + X)}$$

[ec.1]

en la cual B_{max} es el número o la densidad de los sitios de unión, K_d es la concentración de radioligando necesaria para alcanzar la mitad de la unión máxima, X la concentración de radioligando libre en los distintos puntos del ensayo e Y el radioligando unido.

El modelo de dos sitios de unión viene definido por la ecuación:

$$Y = \frac{B_{maxHI} \cdot X}{(K_{dHI} + X)} + \frac{B_{maxLO} \cdot X}{(K_{dLO} + X)}$$

[ec.2]

ecuación en la que B_{maxHI} y B_{maxLO} son el número o la densidad de cada uno de los sitios de unión y K_{dHI} y K_{dLO} es la concentración de radioligando necesaria para alcanzar la mitad de la unión máxima en cada sitio de unión.

3.2.4.4.2. *Ensayos de competición en el equilibrio*

La constante de disociación en el equilibrio (K_d) del radioligando y el nivel de expresión del receptor (B_{max}) se determinaron ajustando los datos de los experimentos de competición a un modelo de regresión no lineal, comparándose el modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide con el modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide de

pendiente variable. Además, se comparó el ajuste de los datos al modelo de un sitio de unión con el correspondiente a dos sitios de unión. En todos los casos, se eligió el modelo de ajuste preferido según el test F de suma extra de cuadrados (nivel de significación $P < 0.05$). El modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide (coeficiente de Hill = 1) viene definido por la siguiente ecuación:

$$Y = Y_0 + \frac{Y_{\max} - Y_0}{(1 + 10^{(\log X - \log IC_{50})})}$$

[ec.3]

El modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide de pendiente variable se define mediante la ecuación que incorpora el coeficiente n (coeficiente de Hill), que es la siguiente:

$$Y = Y_0 + \frac{Y_{\max} - Y_0}{(1 + 10^{(\log X - \log IC_{50}) \cdot n})}$$

[ec.4]

En el caso del modelo de dos sitios de unión, éste se define mediante la ecuación:

$$Y = Y_0 + \frac{(Y_{\max} - Y_0) \cdot (\text{fracción}_{Hi})}{(1 + 10^{(\log X - \log IC_{50Hi})})} + \frac{(Y_{\max} - Y_0) \cdot (1 - \text{fracción}_{Hi})}{(1 + 10^{(\log X - \log IC_{50Lo})})}$$

[ec.5]

Mediante el ajuste a estas ecuaciones se determina la IC_{50} , esto es, la concentración de ligando competidor necesaria para inhibir en un 50% la unión específica de radioligando. X es la concentración de ligando competidor en los distintos puntos del ensayo, Y_{\max} la unión específica máxima e Y_0 la unión específica mínima. En el caso de la ecuación del modelo de dos sitios de unión fracción_{Hi} corresponde a los sitios de alta afinidad. En este modelo se determinan la IC_{50Hi} e IC_{50Lo} , correspondientes a los sitios de alta y baja afinidad respectivamente.

El cálculo de la constante de disociación en el equilibrio (K_i) se realizó de acuerdo con la ecuación descrita por Cheng y Prusoff (1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[L]}{K_d}\right)}$$

[ec.6]

siendo IC_{50} la concentración de competidor no marcado que inhibe en un 50% la unión específica, $[L]$ es la concentración del radioligando presente en el ensayo, y K_d es la afinidad del radioligando por el receptor.

3.2.4.4.3. *Ensayos cinéticos de disociación para la determinación de la constante de velocidad de disociación del radioligando*

Estos experimentos se realizaron con el fin de determinar la constante velocidad de disociación (k_{off}) del radioligando [3H]-SB269970 del receptor 5-HT₇ y del radioligando [3H]-ZM24385 de los receptores A_{2A}. Esto se consiguió mediante el ajuste de los datos de ensayos cinéticos de disociación de radioligandos a un modelo de regresión no lineal de disociación exponencial, bien el modelo monofásico, o bien el modelo bifásico. Para la elección de uno de ambos ajustes se aplicó un test F de suma extra de cuadrados (nivel de significación $P < 0.05$). El modelo de disociación monofásico viene descrito por la ecuación:

$$Y = (B_0 - plateau)^{(-k_{off} \cdot t)} + plateau$$

[ec. 7]

La ecuación describe la variación en el tiempo de la unión específica de radioligando desde los valores iniciales (B_0 , una vez alcanzado el equilibrio en la unión tras el periodo de preincubación) hasta el valor de unión mínima al que tiende la disociación ($plateau$) en función de la constante de velocidad de disociación (k_{off}) y del tiempo (t).

Asimismo, el modelo de disociación biexponencial viene descrito por la siguiente ecuación:

$$Y = B_1^{(-k_1 \cdot t)} + B_2^{(-k_2 \cdot t)} + plateau$$

[ec. 8]

Según esta ecuación biexponencial la unión específica decrece desde niveles máximos de unión definidos por la suma de dos amplitudes (B_1 y B_2) y del valor $plateau$ en función de dos términos exponenciales con sus respectivas constantes (k_1 y k_2).

3.2.4.4.4. Ensayos cinéticos de asociación para la determinación de la constante de velocidad de asociación observada del radioligando

Estos experimentos se realizaron con el fin de determinar la constante de velocidad de asociación (k_{on}) del radioligando [^3H]-SB269970 al receptor 5-HT₇ y del radioligando [^3H]-ZM24385 a los receptores A_{2A}. Esto se consiguió mediante el ajuste de los datos de ensayos cinéticos de asociación de radioligandos a un modelo de regresión no lineal de asociación exponencial, bien el modelo monofásico, o bien el modelo bifásico. Para la elección de uno de ambos ajustes se aplicó un test F de suma extra de cuadrados (nivel de significación $P < 0.05$). La regresión no lineal de las curvas de asociación al modelo monofásico proporciona los valores de constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}) (Motulsky y Christopoulos, 2003), a partir de los cuales puede obtenerse el valor de k_{on} (ver sección 3.2.4.4.5.). El modelo de asociación monoexponencial viene descrito por la ecuación que figura a continuación:

$$Y = B_F \cdot (1 - e^{(-k_{obs} \cdot t)})$$

[ec. 9]

La ecuación describe la variación en la unión específica de radioligando en función del producto de la unión máxima (B_F) a la que tiende la asociación por el término $(1 - e^{(-k_{obs} \cdot t)})$. El valor de éste depende de la constante de velocidad de asociación observada (k_{obs} ; min^{-1}) y del tiempo (t). B_F puede calcularse en función del valor de densidad de sitios de unión (B_{max}) multiplicado por el factor $[L]/([L]+K_d)$, en el que $[L]$ es la concentración de radioligando.

La ecuación que define el modelo de asociación bifásico es la siguiente:

$$Y = B_1 \cdot (1 - e^{(-k_1 \cdot t)}) + B_2 \cdot (1 - e^{(-k_2 \cdot t)})$$

[ec. 10]

Según esta ecuación biexponencial la unión específica de radioligando aumenta desde 0 a niveles máximos de unión definidos por la suma de dos valores de unión específica final (B_1 y B_2) en función de dos términos exponenciales con sus respectivas constantes de asociación (k_1 y k_2).

3.2.4.4.5. *Cálculo de la constante de velocidad de asociación (k_{on}) del radioligando a partir de datos de k_{off} y k_{obs}*

A partir del valor de k_{obs} obtenido y considerando el primer paso de unión del complejo binario ligando-receptor (Tummino y Copeland, 2008), se procedió a calcular el valor de la constante de velocidad de asociación del radioligando k_{on} ($M^{-1} \cdot min^{-1}$) mediante la siguiente ecuación:

$$k_{on} = \frac{(k_{obs} - k_{off})}{[L]}$$

[ec. 11]

Por tanto, para el cálculo del valor de la constante de velocidad de asociación (k_{on}) son necesarios además el valor de la constante de velocidad de disociación k_{off} , calculado previamente a partir de los ensayos cinéticos de disociación, y el valor medio de la concentración de radioligando [L] en estos experimentos.

3.2.4.4.6. *Cálculo de la “constante de disociación cinética” ($K_{d,cin}$) del radioligando y lurasidona a partir de datos de k_{off} y k_{on}*

A partir de los valores de las constantes de velocidad de asociación y disociación obtenidos experimentalmente en ensayos cinéticos de unión de radioligandos se puede calcular un valor de constante de disociación para el radioligando referida al primer paso de unión del complejo binario ligando-receptor (Tummino y Copeland, 2008), que aquí llamaremos “constante de disociación cinética” ($K_{d,cin}$) para distinguirla de la constante de disociación en el equilibrio (K_d) obtenida a partir de ensayos de saturación. Así, $K_{d,cin}$ se puede definir como el cociente:

$$K_{d,cin} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

[ec. 12]

El valor de $K_{d,cin}$ así calculado se espera que sea similar al valor de K_d obtenido para el radioligando en ensayos de saturación, de manera que nos puede informar acerca de la calidad de los resultados obtenidos en los ensayos cinéticos de unión de radioligandos.

En el caso de lurasidona, el cálculo de la $K_{d, \text{cin}}$ se realizó a partir de los valores de las constantes de velocidad de asociación y disociación que se obtuvieron mediante la ejecución de ensayos de competición cinética. Ese valor de $K_{d, \text{cin}}$ se comparó con la constante de disociación en el equilibrio (K_i) obtenida en los ensayos de competición en el equilibrio.

3.2.4.4.7. Determinación de las constantes de velocidad k_{off} y k_{on} de radioligandos a partir de los valores de constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}) mediante regresión.

A partir de los valores de las constantes de velocidad de asociación observada (k_{obs}) obtenidas experimentalmente en ensayos cinéticos de asociación de radioligandos realizados a distintas concentraciones se puede calcular los valores de las constantes de velocidad de asociación y disociación (k_{off} y k_{on}) de los radioligandos mediante el método de regresión.

En este caso, tras representar los valores de k_{obs} frente a la respectiva concentración del radioligando utilizada experimentalmente en los ensayos, se procedió a comparar el ajuste a un modelo de regresión lineal con el correspondiente a un modelo de hipérbola (se trata del modelo de un sitio de unión utilizado para analizar las saturaciones). Estos modelos describen, respectivamente, el comportamiento de la representación de los valores de k_{obs} frente a la concentración de radioligando, en el caso de que la unión ligando-receptor siga un mecanismo cinético de un solo paso (mecanismo A; Tummino y Copeland, 2008) o un mecanismo de dos pasos con un cambio conformacional tras unión inicial del ligando (mecanismo B). El mecanismo A se considera el más frecuente en procesos de unión de un ligando a un GPCR, mientras que el mecanismo B se considera que predomina en el caso de inhibidores enzimáticos o antagonistas de alta afinidad (Guo y col., 2014a).

En el caso de presentar el ajuste lineal correspondiente a este modelo, el valor del punto de la intersección de la recta de regresión con el eje Y corresponde al valor de k_{off} del radioligando. El valor de la pendiente de la recta corresponde al valor de k_{on} (Motulsky y Christopoulos, 2003).

3.2.4.4.8. *Ensayos de competición cinética para la determinación de las constantes de velocidad de asociación (k_{on} , k_3) y disociación (k_{off} , k_4) de un ligando competidor no marcado*

De nuevo, el modelo de ajuste de datos descrito por Motulsky y Mahan (1984) al que se van a ajustar los datos experimentales, parte de la asunción de que entre ligando y receptor se produce una asociación simple o de un solo paso. Este método ha sido aplicado previamente al análisis de la interacción del antagonista ZM241385 con el receptor A_{2A} (Guo y col., 2012), así como también a la interacción de otros ligandos y GPCRs, como el receptor muscarínico M₃ y su antagonista tiotropio (Dowling y Charlton, 2006), el receptor H₁ y dimetindeno (Malany y col., 2009) o el receptor β₂-adrenérgico y una serie de agonistas y antagonistas del mismo (Sykes y col., 2014).

A continuación, se exponen las ecuaciones que definen el modelo de competición cinética propuesto por Motulsky y Mahan (1984) (tomado y modificado de Motulsky y Mahan, 1984):

$$K_A = (k_1 \cdot L \cdot e^{-9}) + k_2$$

$$K_B = (k_3 \cdot I \cdot e^{-9}) + k_4$$

$$S = \sqrt{(K_A - K_B)^2 + 4 \cdot k_1 \cdot k_3 \cdot L \cdot I \cdot e^{-18}}$$

$$K_F = 0.5 \cdot (K_A + K_B + S)$$

$$K_S = 0.5 \cdot (K_A + K_B - S)$$

$$DIFF = K_F - K_S$$

$$Q = \frac{B_{max} \cdot k_1 \cdot L \cdot e^{-9}}{DIFF}$$

$$Y = Q \cdot \left(\frac{k_4 \cdot DIFF}{K_F \cdot K_S} + \frac{k_4 - K_F}{K_F} e^{-K_F \cdot t} - \frac{k_4 - K_S}{K_S} e^{-K_S \cdot t} \right) \quad [ec. 13]$$

La concentración de radioligando (L) e inhibidor (I) se expresan en unidades nanomolar (nM), convertidas a unidades Molar (M) mediante los factores 10^{-9} y 10^{-18} que aparecen en la ecuación. Las variables K_A , K_B , K_F y K_S aparecen definidas según Motulsky y Mahan (1984). Y es la cantidad de complejo receptor-radioligando (o complejo RL, esto es, los niveles de unión receptor-radioligando determinados experimentalmente); L es el radioligando; I , el competidor; k_1 , la constante de velocidad de asociación de radioligando; k_2 , la constante de velocidad de disociación de radioligando; k_3 , la constante de velocidad de asociación del competidor; k_4 , la constante de velocidad de disociación del competidor; y t , el tiempo. B_{\max} es la unión máxima de radioligando, lo que equivale a la concentración de receptores. La ecuación [ec. 11] define la variación del radioligando unido (complejo radioligando-receptor) en un ensayo de competición cinética.

Todos los datos de unión de radioligandos se analizaron con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.).





4. RESULTADOS





4.1. ESTUDIO DE DETERMINANTES ESTRUCTURALES EN EL SITIO DE UNIÓN DEL RECEPTOR RELEVANTES PARA EL PERFIL DE AFINIDAD Y SELECTIVIDAD DE ANTIPSICÓTICOS SOBRE GPCRS DE SU RECEPTOROMA

4.1.1. Relevancia del residuo en posición 3.36 para la unión de antipsicóticos a GPCRs de su receptoroma

4.1.1.1. Unión del radioligando [³H]-ketanserina a los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys

Se determinaron los valores de afinidad, en concreto, de la constante de disociación en el equilibrio (K_d) de [³H]-ketanserina en los receptores de serotonina 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys mediante ensayos de unión de radioligandos de saturación. Estos ensayos, al igual que los demás ensayos llevados a cabo para investigar las distintas hipótesis referidas a determinantes estructurales en el sitio de unión de GPCRs del receptoroma de antipsicóticos (presente sección 4.1), se realizaron con preparaciones de membranas de células CHO-K1 expresando establemente los receptores correspondientes.

Los datos se ajustaron al modelo de un sitio de unión, preferido sobre el de dos sitios de unión (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). Los valores de K_d de [³H]-ketanserina obtenidos fueron 2.15 ± 0.63 nM (media \pm EEM; $n = 3$) y 1.79 ± 0.33 nM (media \pm EEM; $n = 2$) para el receptor 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys, respectivamente. El valor de niveles de expresión del receptor 5-HT_{2A} (densidad de sitios de unión, B_{max}) en su correspondiente preparación de membrana fue de 1590 ± 90 fmol/mg de proteína (media \pm EEM; $n = 3$), y de 1117 ± 163 fmol/mg de proteína (media \pm EEM; $n = 2$) para las membranas correspondientes al receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys. En la **Fig. 36** se muestra un experimento representativo de los ensayos de unión de radioligandos de saturación para cada uno de los receptores.

La diferencia entre los valores de K_d de [³H]-ketanserina obtenidos en las membranas CHO-5-HT_{2A} y CHO-5-HT_{2A}-Ser3.36Cys no fue estadísticamente significativa (test t de dos colas no pareado, $p > 0.05$). La diferencia entre los valores de densidad de sitios de unión (B_{max}) de las dos preparaciones de membranas tampoco fue estadísticamente significativa (test t de dos colas no pareado, $p > 0.05$).

Los valores de K_d de [^3H]-ketanserina en membranas CHO-5-HT $_2\text{A}$ y CHO-5-HT $_2\text{A}$ -Ser3.36Cys (2.15 nM y 1.79 nM para el receptor no mutado y mutado, respectivamente) son comparables a otros valores publicados para el mismo ligando, receptor y mutación (valores de K_d de 0.84 ± 0.14 y 0.66 ± 0.04 , para los receptores 5-HT $_2\text{A}$ y 5-HT $_2\text{A}$ -Ser3.36Cys respectivamente; Almaula y col., 1996).

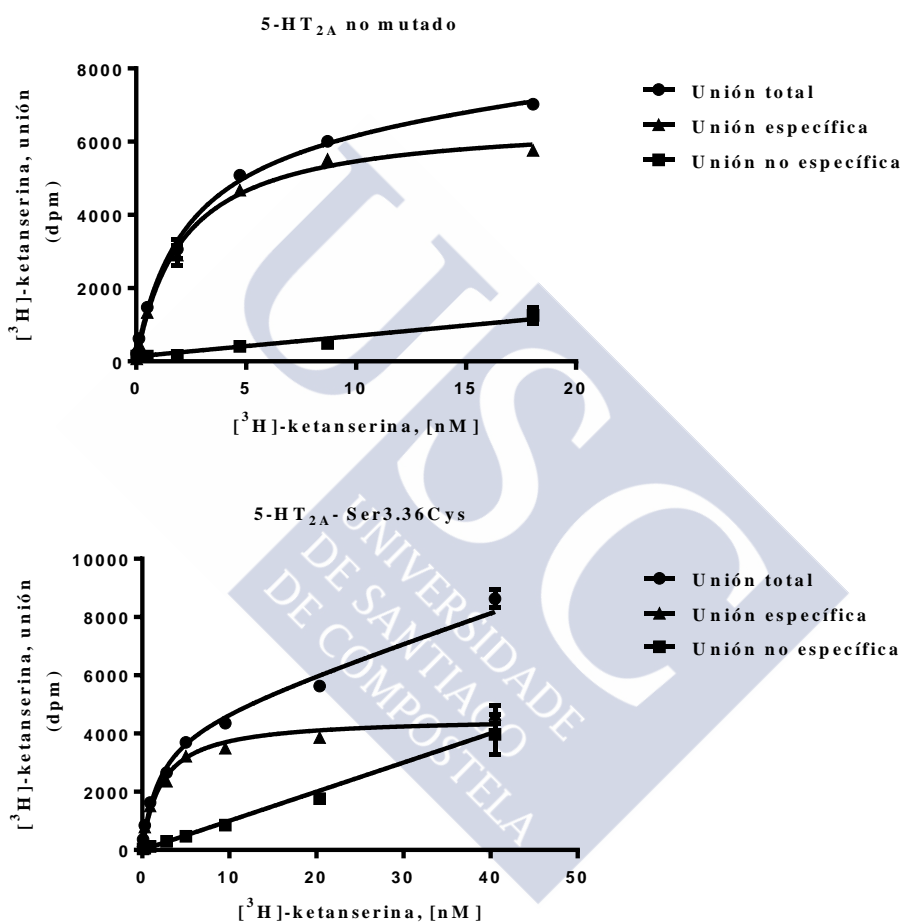


Fig. 36. Determinación de la afinidad de [^3H]-ketanserina por los receptores 5-HT $_2\text{A}$ no mutado y 5-HT $_2\text{A}$ -Ser3.36Cys mediante ensayos de unión de [^3H]-ketanserina de saturación. Se muestra la media \pm EEM de un experimento representativo realizado por triplicado para cada uno de los dos receptores.

4.1.1.2. Unión del radioligando [³H]-espiperona a los receptores D₂ y D₂-Cys3.36Ser

Como ya se ha mencionado en la sección 3.2. Métodos, con respecto al receptor de dopamina mutado D_{2S}-Cys3.36Ser ninguno de los clones de la línea CHO-D_{2S}-Cys3.36Ser aislados mostraron unión específica de [³H]-espiperona en ensayos de unión de radioligandos dirigidos a la selección de clones. Por ello, la presente hipótesis sobre la relevancia del residuo 3.36 no fue evaluada experimentalmente en el receptor D₂.

4.1.1.3. Afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys

Como ensayo determinante para la comprobación de la hipótesis principal, el valor de la constante de disociación en el equilibrio (K_i) de los antipsicóticos clozapina y olanzapina se determinó en ensayos de unión de radioligandos de competición en el equilibrio. Estos ligandos desplazaron completamente y de forma dependiente de la concentración la unión de [³H]-ketanserina a los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys. Los resultados se ajustaron preferentemente a un modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). Con respecto a clozapina y olanzapina, para ambos ligandos se observa un aumento notable, aunque no estadísticamente significativo (ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni, $P > 0.05$), de la afinidad por el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys con respecto al receptor 5-HT_{2A} no mutado, obteniéndose unos valores de K_i (media \pm EEM; nM) de 25.02 ± 5.48 y 3.89 ± 1.32 para clozapina y receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys, respectivamente, y de 7.68 ± 0.67 y 2.16 ± 0.57 para olanzapina y receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys, respectivamente (**Tabla 9**).

Los valores de afinidad de clozapina y olanzapina por el receptor 5-HT_{2A} obtenidos son comparables a los valores publicados previamente para los mismos ligandos y receptor obtenidos en ensayos de competición llevados a cabo en condiciones experimentales similares (valores de pK_i de 8.3 y 8.8 para clozapina y olanzapina, respectivamente, en el receptor 5-HT_{2A} no mutado y utilizando [³H]-ketanserina como radioligando; Selent y col., 2008, tomado de Lange y col., 2007; y media de valores de K_i determinados en el receptor 5-HT_{2A} clonado y el mismo radioligando [³H]-ketanserina de 5.92 y 3.13 nM para clozapina y olanzapina, respectivamente, publicados por la base PDSP: Roth y col., 2000).

De cara a obtener información estructural adicional, en estos experimentos se incluyeron los ligandos serotonina y N-desmetil-clozapina. N-desmetil-clozapina experimentó un aumento notable de la afinidad por el receptor mutado, ajustándose los resultados preferentemente a un modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). Se obtuvieron unos valores de K_i (media \pm EEM; nM) de 16.45 ± 2.25 y 1.96 ± 0.29 para el receptor 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys, respectivamente. La diferencia entre valores no fue estadísticamente significativa (ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni, $P > 0.05$). El valor de K_i de N-desmetil-clozapina determinado en el receptor 5-HT_{2A} es comparable al determinado en el mismo receptor (clonado) y con el mismo radioligando publicado por la base PDSP de 10.90 (Roth y col., 2000).

Por último, la serotonina mostró una disminución de la afinidad estadísticamente significativa, ajustándose los resultados preferentemente a un modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). Se obtuvieron unos valores de K_i (media \pm EEM; nM) de 890 ± 320 y $5077 \pm 539^{****}$, para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys respectivamente ($^{****}P < 0.0001$, ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni) (véase **Tabla 9**). Los valores de afinidad de serotonina son comparables a otros publicados anteriormente de K_i de 396 ± 107 y 1947 ± 528 nM (media \pm EEM; nM) para los receptores 5-HT_{2A} no mutado y mutado Ser3.36Cys (Almaula y col., 1996), obtenidos en ensayos de competición también con [³H]-ketanserina con los mismos receptores. Las **figuras 37 y 38** muestran un experimento de competición representativo de los realizados para los cuatro ligandos mencionados en cada receptor. Los valores de la constante de afinidad (K_i , pK_i) de los cuatro ligandos mencionados, así como el número de experimentos (n) se muestran en la **Tabla 9**.

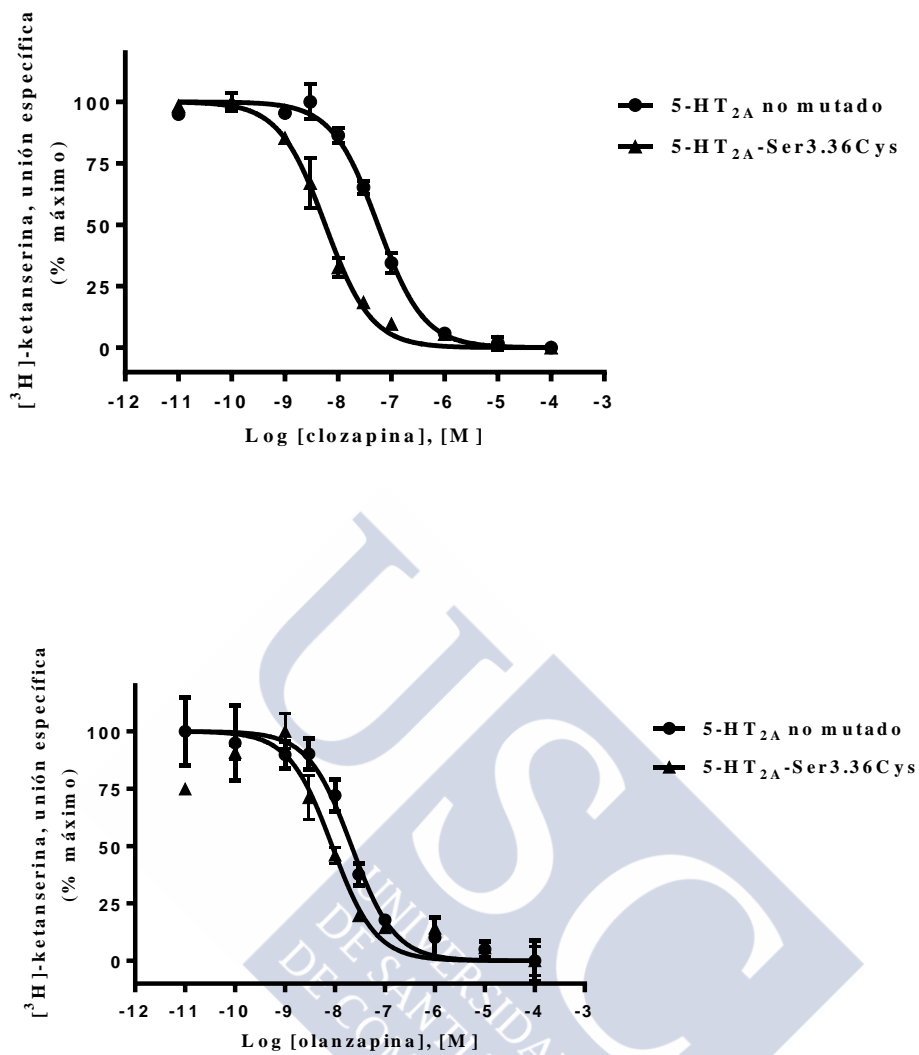


Fig. 37. Determinación de la afinidad de los antipsicóticos clozapina y olanzapina por los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys mediante ensayos de unión de radioligandos de competición utilizando [³H]-ketanserin. Se representa en cada caso la media ± EEM de los resultados correspondientes a un experimento independiente representativo, realizado por duplicado.

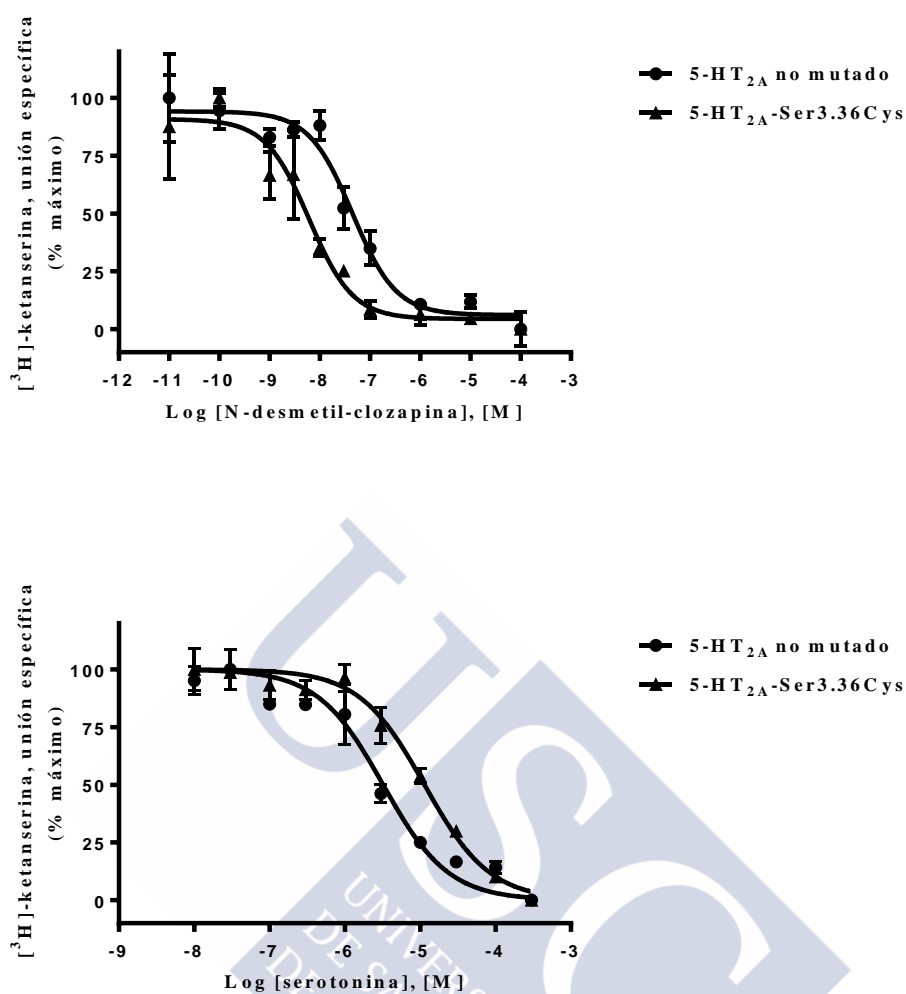


Fig. 38. Determinación de la afinidad de N-desmetil-clozapina y serotonina por los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys mediante ensayos de unión de radioligandos de competición utilizando [³H]-ketanserina. Se representa en cada caso la media ± EEM de los resultados correspondientes a un experimento independiente representativo, realizado por duplicado.

	5-HT _{2A} no mutado		5-HT _{2A} -Ser3.36Cys	
	<i>K_i</i> (nM; media ± EEM)	p <i>K_i</i>	<i>K_i</i> (nM; media ± EEM)	p <i>K_i</i>
clozapina	25.02 ± 5.48, n = 5	7.60	3.89 ± 1.32, n = 4	8.41
olanzapina	7.68 ± 0.67, n = 5	8.11	2.16 ± 0.57, n = 4	8.66
serotonina	890 ± 320, n = 2	6.05	5077 ± 539****, n = 4	5.29
N-desmetil-clozapina	16.45 ± 2.25, n = 2	7.78	1.96 ± 0.29, n = 2	8.71

Tabla 9. Valores de la constante de disociación en el equilibrio (*K_i*) (nM) y de p*K_i* de distintos ligandos obtenidos en ensayos de unión de radioligandos de competición frente a [³H]-ketanserina. Los valores se expresan como la media ± EEM del número de experimentos independientes indicado (n), realizados por triplicado. *****P* < 0.0001 para los valores de *K_i* de serotonina en los receptores 5-HT_{2A} no mutado y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys (ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni).

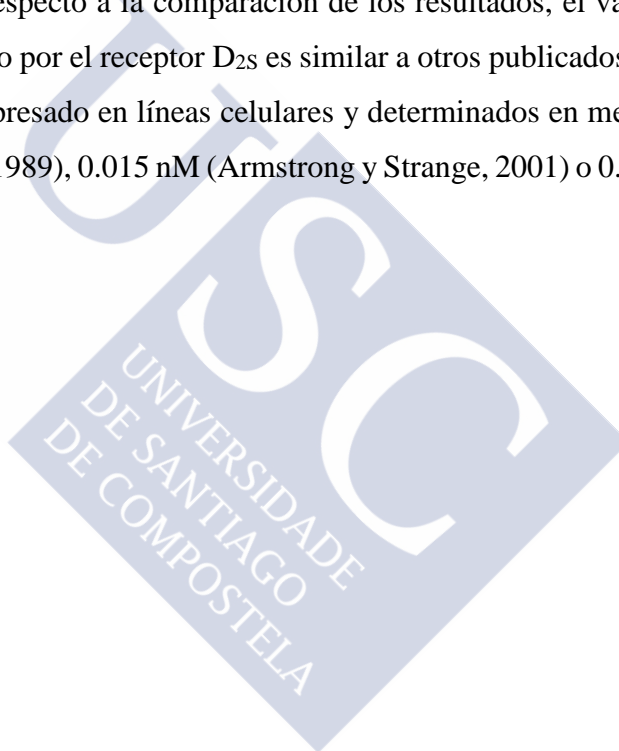
4.1.2. Relevancia de los residuos en las posiciones 5.43 y 5.46 para la unión de antipsicóticos a GPCRs de su receptoroma

4.1.2.1. Unión del radioligando [³H]-espiperona a los receptores D₂ y D₂-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala

Se determinaron los valores de afinidad, en concreto, de la constante de disociación en el equilibrio (*K_d*) de [³H]-espiperona en los receptores de dopamina D_{2S} y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala mediante ensayos de unión de radioligandos de saturación. Los datos se ajustaron al modelo de un sitio de unión, preferido sobre el de dos sitios de unión (test F de suma extra de cuadrados, *P* > 0.05). Los valores determinados de *K_d* para [³H]-espiperona en estos receptores fueron 0.033 ± 0.002 nM (media ± EEM; n = 3) y 0.031 ± 0.005 nM (media ± EEM; n = 3), para el receptor D_{2S} y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala,

respectivamente. El valor de densidad de sitios de unión (B_{\max}) correspondiente a las membranas del receptor D_{2S} no mutado fue de 2971 ± 98 fmol/mg de proteína (media \pm EEM; n = 3) y de 749 ± 93 fmol/mg de proteína (media \pm EEM; n = 3) en el caso de las membranas del receptor D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala. La **Fig. 39** muestra un ejemplo representativo de estos ensayos para cada receptor.

La diferencia entre las afinidades de [³H]-espiperona por ambos receptores no fue estadísticamente significativa (test t de dos colas no pareado, $p > 0.05$). La diferencia en los niveles de expresión de las dos preparaciones de membranas CHO-D_{2S} y CHO-D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala fue estadísticamente significativa (**** $p < 0.0001$, test t no pareado, dos colas). Con respecto a la comparación de los resultados, el valor de afinidad de [³H]-espiperona obtenido por el receptor D_{2S} es similar a otros publicados para el mismo radioligando y receptor expresado en líneas celulares y determinados en membranas como ~0.05 nM (Dal Toso y col. 1989), 0.015 nM (Armstrong y Strange, 2001) o 0.065 nM (Payne y col., 2002).



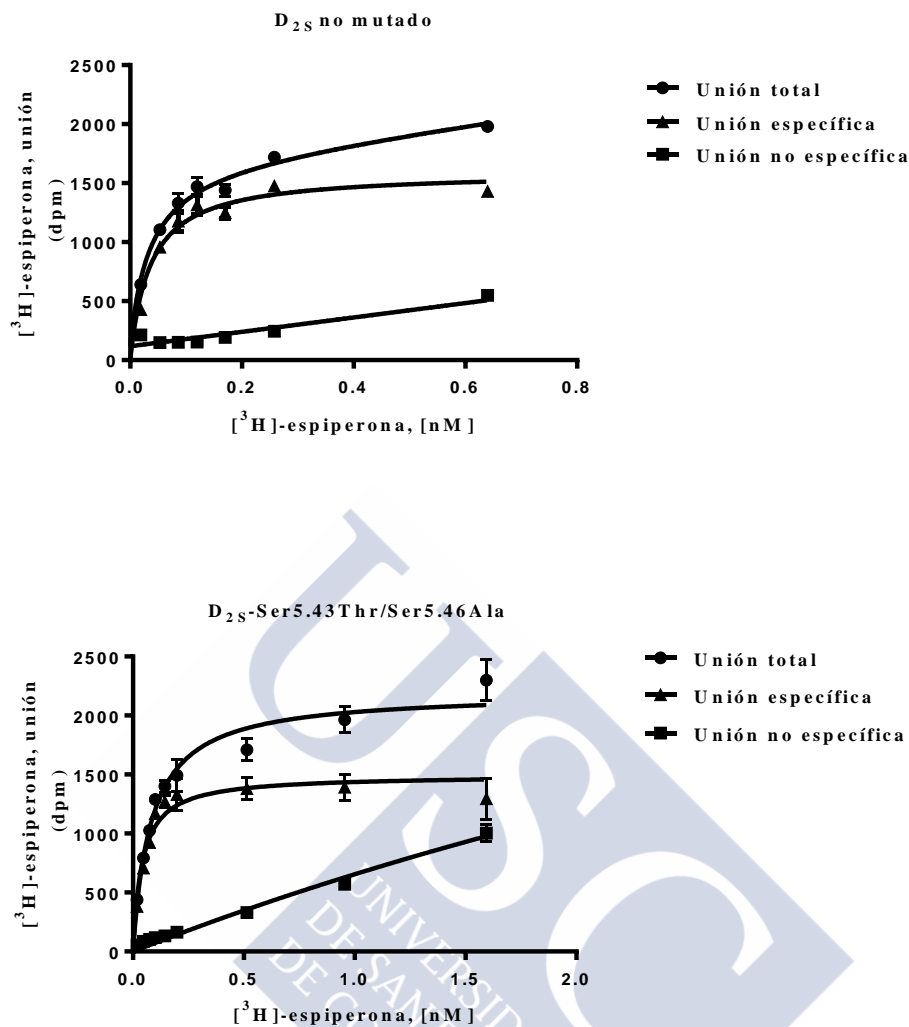


Fig. 39. Determinación de la afinidad de [³H]-espiperona por los receptores D_{2S} no mutado y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala mediante ensayos de unión de [³H]-espiperona de saturación. Se muestra la media ± EEM de un experimento representativo realizado por triplicado para cada uno de los dos receptores.

4.1.2.2. Unión del radioligando [³H]-8-OH-DPAT a los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1A}-Thr5.43Ser/Ala5.46Ser

De nuevo en el caso del receptor 5-HT_{1A}-Thr5.43Ser/Ala5.46Ser, después de la generación de la construcción plasmídica y su transfección en la línea celular CHO-K1, los clones aislados no mostraron unión específica del radioligando [³H]-8-OH-DPAT en ensayos de unión de radioligandos, por lo que no se llevaron a cabo estudios para investigar la relevancia de los residuos 5.43/5.46 en este receptor.

4.1.2.3. Afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores D₂ y D₂-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala

Para obtener los valores de afinidad que permitirán contrastar la hipótesis planteada se realizaron ensayos de unión de radioligandos de competición utilizando [³H]-espiperona. Clozapina y olanzapina desplazaron completamente y de forma concentración-dependiente la unión de [³H]-espiperona a los receptores D_{2S} y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala. Los datos para ambos antipsicóticos en los dos receptores se ajustaron preferentemente al modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). La afinidad de olanzapina por el receptor mutado disminuyó de manera estadísticamente significativa y en una magnitud muy considerable con respecto al receptor no mutado. Los valores de afinidad obtenidos y expresados mediante la constante de disociación en el equilibrio (K_i) (media \pm EEM) fueron de 23.45 ± 4.38 nM en el caso de olanzapina y el receptor D_{2S} y de $173.90 \pm 31.56^{***}$ nM para el receptor D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y el mismo ligando ($^{***}P < 0.001$ para la diferencia entre ambas afinidades; ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni). Por su parte, la afinidad de clozapina por el receptor mutado aumentó, aunque de manera no estadísticamente significativa, con respecto al receptor no mutado, obteniéndose unos valores de K_i (media \pm EEM) de 88.65 ± 10.04 nM y 58.04 ± 9.65 nM para los receptores D_{2S} y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala, respectivamente (ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni; $P > 0.05$). La **Fig. 40** muestra un experimento de competición representativo de los realizados para cada antipsicótico en cada receptor. Los valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_i , pK_i) así como el número de experimentos (n) para ambos antipsicóticos en los dos receptores se muestran en la **Tabla 10**.

Otros valores de afinidad (K_i) de clozapina y olanzapina por el receptor D₂ humano clonado obtenidos mediante competición en el equilibrio con [³H]-espiperona y publicados por la base PDSP (Roth y col., 2000), son 157 nM en el caso de clozapina y 34.23 nM en el caso de olanzapina. Los valores de K_i obtenidos para clozapina y olanzapina por el receptor D_{2S}, 88.65 y 23.45 nM respectivamente, son comparables a los valores medios de K_i publicados por la base PDSP anteriormente mencionados.

Los resultados muestran la verificación de la hipótesis inicialmente planteada, por la que se esperaba una inversión del perfil de afinidades de ambos antipsicóticos por el par

de receptores D_{2S} y D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala. Así, clozapina experimenta un aumento de afinidad por el receptor mutado y olanzapina experimenta el cambio contrario. El resultado final es la mayor afinidad y selectividad de clozapina por el receptor D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala.

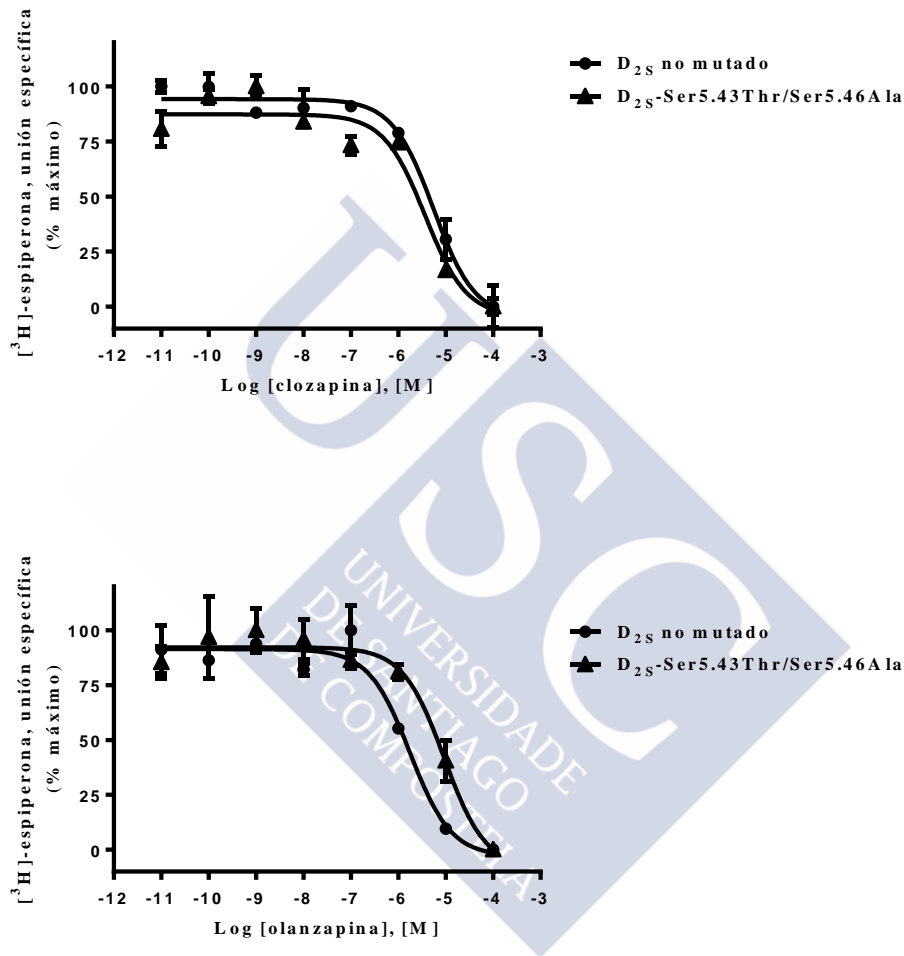


Fig. 40. Determinación de la afinidad de los antipsicóticos clozapina y olanzapina por los receptores D_{2S} y D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala mediante ensayos de unión de radioligandos de competición utilizando $[^3H]$ -espiperona. Se representa en cada caso la media \pm EEM de los resultados correspondientes a un experimento independiente representativo, realizado por triplicado.

	D _{2S} no mutado		D _{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala	
	K _i (nM; media ± EEM)	pK _i	K _i (nM; media ± EEM)	pK _i
Clozapina	88.65 ± 10.04, n = 5	7.05	58.04 ± 9.65, n = 3	7.24
Olanzapina	23.45 ± 4.38, n = 5	7.63	173.90 ± 31.56***, n = 4	6.76

Tabla 10. Valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_i) (nM) y de pK_i de clozapina y olanzapina obtenidos en ensayos de unión de radioligandos de competición frente a [³H]-espiperona. Los valores se expresan como la media ± EEM del número de experimentos independientes indicado (n), realizados por triplicado. ****P* < 0.001 para los valores de K_i de olanzapina en los receptores D_{2S} no mutado y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala (ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni).

4.1.3. Relevancia del residuo en posición 3.33 para la unión de antipsicóticos a GPCRs diana y antidiana de su receptoroma

4.1.3.1. Unión del radioligando [³H]-espiperona al receptor D_{2S}-Val3.33Tyr

Se determinó el valor de la constante de disociación en el equilibrio (K_d) de [³H]-espiperona en el receptor D_{2S}-Val3.33Tyr mediante ensayos de unión de radioligandos de saturación. Los datos se ajustaron al modelo de un sitio de unión, preferido sobre el de dos sitios de unión (test F de suma extra de cuadrados, *P* > 0.05). Se obtuvo un valor de afinidad (K_d) de [³H]-espiperona 0.057 ± 0.002 nM (media ± EEM; n = 4) para el receptor D_{2S}-Val3.33Tyr. El valor de densidad de sitios de unión (B_{max}) de las membranas del receptor D_{2S}-Val3.33Tyr utilizadas en estos experimentos fue de 1027 ± 58 fmol/mg de proteína (media ± EEM; n = 3). Los valores de afinidad para el receptor D_{2S} no mutado (valor de K_d de [³H]-espiperona de 0.033 ± 0.002 nM (media ± EEM; n = 3) y de densidad de sitios de unión (B_{max}) de 2971 ± 98 fmol/mg de proteína (media ± EEM; n = 3), así como la comparación del valor de afinidad con otros valores de la literatura, han sido descritos previamente en la sección 4.1.2.1. La **Fig. 41** muestra un experimento representativo

correspondiente a un ensayo de saturación de [^3H]-espiperona en el receptor $\text{D}_{2\text{S}}$ -Val3.33Tyr.

La diferencia de afinidades [^3H]-espiperona por los receptores $\text{D}_{2\text{S}}$ y $\text{D}_{2\text{S}}$ -Val3.33Tyr fue estadísticamente significativa ($***p < 0.001$, test t de dos colas no pareado). La diferencia en los niveles de expresión de las dos preparaciones de membranas CHO- $\text{D}_{2\text{S}}$ y CHO- $\text{D}_{2\text{S}}$ -Val3.33Tyr fue estadísticamente significativa ($****p < 0.0001$, test t de dos colas no pareado)

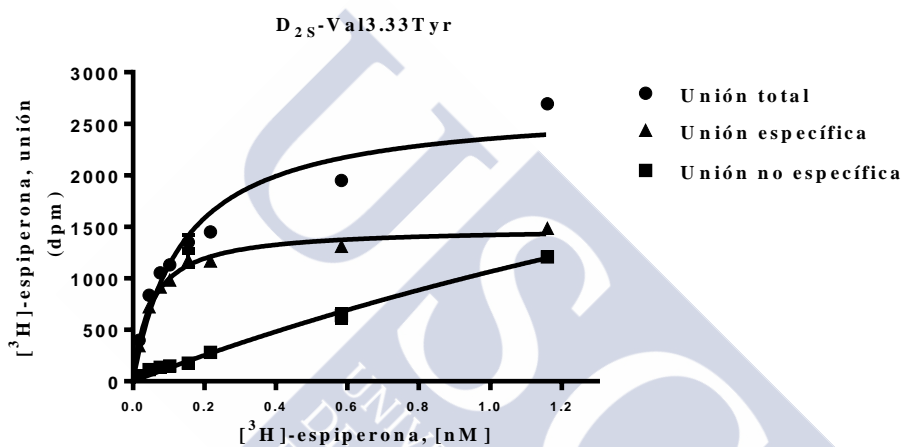


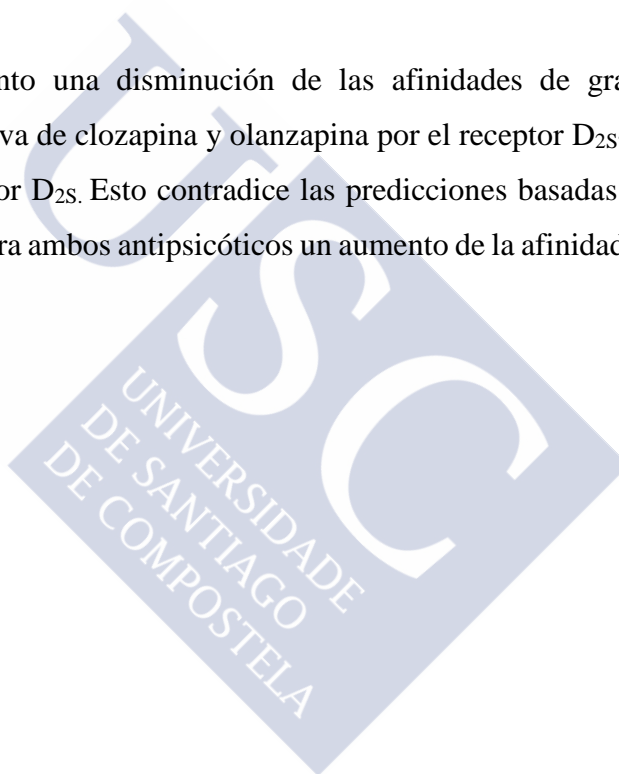
Fig. 41. Determinación de la afinidad de [^3H]-espiperona por el receptor $\text{D}_{2\text{S}}$ -Val3.33Tyr mediante ensayos de unión de [^3H]-espiperona de saturación. Se muestra la media \pm EEM de un experimento representativo realizado por triplicado.

4.1.3.2. Afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores D_2 y $\text{D}_{2\text{S}}$ -Val3.33Tyr

La comprobación de la hipótesis se abordó experimentalmente mediante la ejecución de los correspondientes ensayos de competición en el equilibrio. Clozapina y olanzapina desplazaron completamente y de forma concentración-dependiente la unión de [^3H]-espiperona a los receptores $\text{D}_{2\text{S}}$ y $\text{D}_{2\text{S}}$ -Val3.33Tyr. Los datos para ambos antipsicóticos en el receptor $\text{D}_{2\text{S}}$ -Val3.33Tyr se ajustaron preferentemente al modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). Se obtuvieron unos valores de constante de disociación en el equilibrio (K_i) para clozapina de 88.65 ± 10.04 nM

y $307.73 \pm 96.29^{**}$ nM (media \pm EEM) en los receptores D_{2S} no mutado y D_{2S}-Val3.33Tyr, respectivamente ($^{**}P < 0.01$ para la comparación entre ambos valores, ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni). En el caso de olanzapina, se obtuvieron unos valores de K_i de 23.45 ± 4.38 nM y $383.22 \pm 48.81^{***}$ nM (media \pm EEM) para los receptores D_{2S} no mutado y D_{2S}-Val3.33Tyr, respectivamente ($^{***}P < 0.001$ para la comparación entre ambos valores, ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni). La **Fig. 42** muestra un experimento de competición representativo de los realizados para cada antipsicótico en cada receptor. Los valores de la constante de afinidad (K_i , pK_i) para ambos antipsicóticos, así como el número de experimentos (n) se recogen en la **Tabla 11**.

Se observa por tanto una disminución de las afinidades de gran magnitud y estadísticamente significativa de clozapina y olanzapina por el receptor D_{2S}-Val3.33Tyr en comparación con el receptor D_{2S}. Esto contradice las predicciones basadas en la hipótesis planteada que esperaban para ambos antipsicóticos un aumento de la afinidad por el receptor mutado.



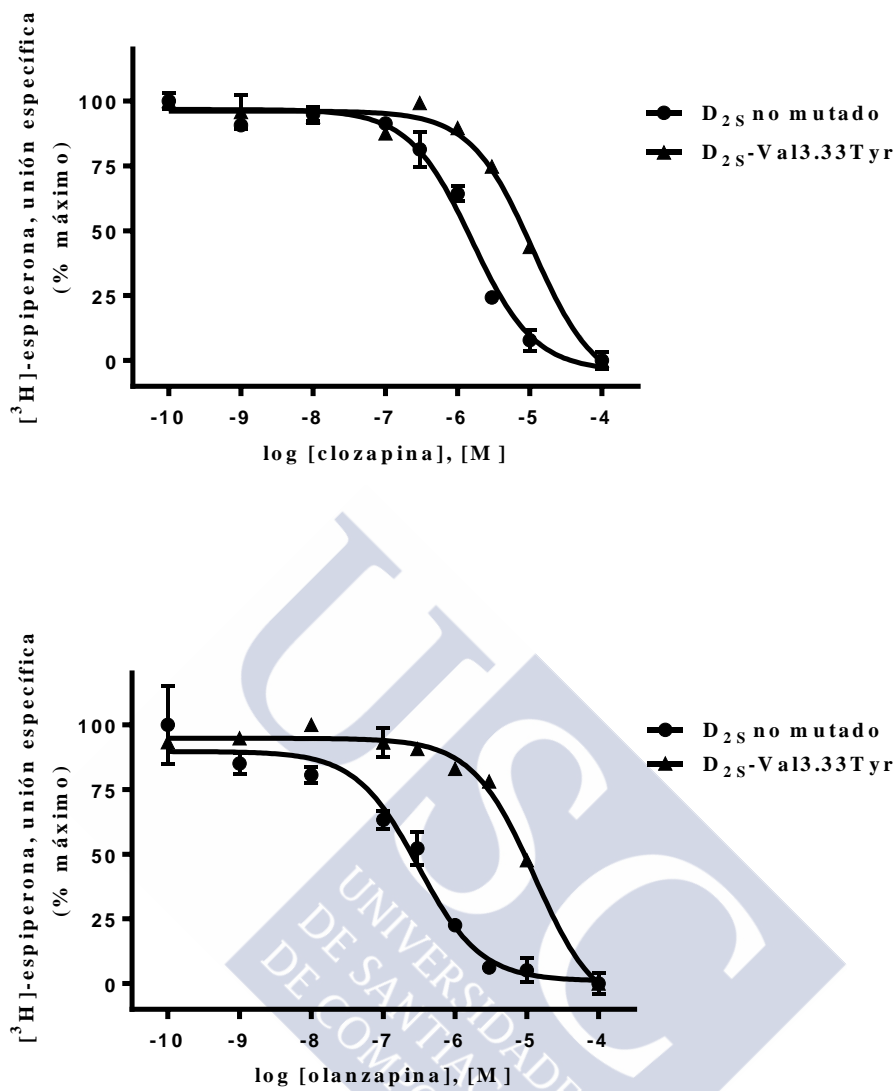


Fig. 42. Determinación de la afinidad de clozapina y olanzapina por los receptores D_{2S} y D_{2S}-Val3.33Tyr mediante ensayos de unión de radioligandos de competición utilizando [³H]-espiperona. Se representa en cada caso la media ± EEM de los resultados correspondientes a un experimento independiente representativo, realizado por triplicado.

	D _{2S} no mutado		D _{2S} -Val3.33Tyr	
	<i>K_i</i> (nM; media ± EEM)	p <i>K_i</i>	<i>K_i</i> (nM; media ± EEM)	p <i>K_i</i>
clozapina	88.65 ± 10.04, n = 5	7.05	307.73 ± 96.29**, n = 3	6.51
olanzapina	23.45 ± 4.38, n = 5	7.63	383.22 ± 48.81***, n = 3	6.42

Tabla 11. Valores de la constante de disociación en el equilibrio (*K_i*) (nM) y de p*K_i* de clozapina y olanzapina obtenidos en ensayos de unión de radioligandos de competición frente a [³H]-espiperona. Los valores se expresan como la media ± EEM del número de experimentos independientes indicado (n), realizados por triplicado. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 para los valores de *K_i* de clozapina u olanzapina en el receptor D_{2S} con respecto al receptor D_{2S}-Val3.33Tyr (ANOVA de una vía y test de comparación múltiple de Bonferroni).



4.2. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS: TIEMPO DE RESIDENCIA DEL ANTIPSICÓTICO ATÍPICO LURASIDONA EN EL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT₇

4.2.1. Afinidad de lurasidona por el receptor 5-HT₇

Antes de caracterizar la cinética de unión de lurasidona al receptor 5-HT₇ se abordó la determinación de su afinidad por el mismo en condiciones de equilibrio. Así, mediante ensayos de unión de radioligandos de competición en el receptor 5-HT₇, empleando el radioligando [³H]-SB269970, se determinó la concentración de lurasidona capaz de inhibir en un 50% la unión específica de radioligando (IC₅₀) y, a partir de este valor, se calculó la constante de disociación en el equilibrio (K_i) de lurasidona.

Lurasidona desplazó al radioligando [³H]-SB269970 del sitio de unión al receptor completamente y de forma concentración-dependiente, mostrando un ajuste al modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide con una pendiente de Hill (n_H) de 1. Este ajuste se comparó con respecto al modelo de dosis-respuesta de inhibición sigmoide de pendiente variable (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). El valor de K_i obtenido fue de 13.23 ± 2.65 nM (media \pm EEM, $n = 3$ experimentos independientes realizados por octuplicado). La **Fig. 43** muestra un experimento representativo correspondiente a la determinación de la afinidad de lurasidona en mediante ensayos de unión de radioligandos de competición en el equilibrio.

Otros valores de afinidad (K_i) para lurasidona por el receptor 5-HT₇ citados en la literatura se encuentran también en el rango nanomolar bajo, por ejemplo $K_i = 0.495 \pm 0.090$ nM empleando el radioligando [³H]-5-CT (Ishibashi y col. 2010). Aunque este valor se corresponde con un valor de mayor afinidad, este resultado se ha obtenido en experimentos utilizando un radioligando agonista. En ausencia de datos que comparen la afinidad obtenida frente al radioligando [³H]-SB269970, disponemos de los datos de afinidad (K_i) de un estándar incluido en nuestros experimentos (metiotepina) (2.31 ± 0.2 nM, media \pm EEM, $n = 3$), y que se corresponde con el valor descrito en la literatura para el mismo ligando obtenido en preparación de membranas de células HEK293 (3.89 ± 0.831 nM, media \pm EEM) (Thomas y col., 2000).

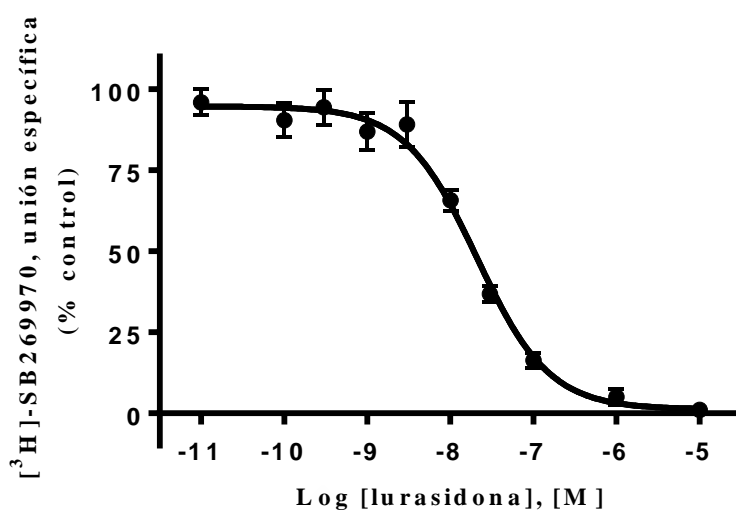


Fig. 43. Determinación de la afinidad de lurasidona por el receptor 5-HT₇ mediante ensayos de unión de radioligandos de competición en el equilibrio utilizando [³H]-SB269970. La gráfica representa la media ± EEM de los resultados correspondientes a un experimento independiente representativo realizado por octuplicado.

4.2.2. Determinación de parámetros cinéticos de unión del radioligando [³H]-SB269970 y lurasidona al receptor 5-HT₇

Con el objetivo de poder determinar las constantes de velocidad de asociación y disociación de lurasidona al receptor 5-HT₇ mediante el método de competición cinética, se procedió en primer lugar a determinar las constantes de velocidad de disociación y asociación (k_{off} y k_{on}) del radioligando [³H]-SB269970 en este receptor. Esto se llevó a cabo mediante ensayos cinéticos de disociación y asociación del radioligando. Los valores de k_{off} y k_{on} del radioligando así obtenidos se utilizaron posteriormente para la determinación de las constantes de velocidad de asociación y disociación de lurasidona mediante ensayos de competición cinética entre el radioligando y lurasidona.

4.2.2.1. Determinación de la constante de velocidad de disociación del radioligando [³H]-SB269970 del receptor 5-HT₇

Estos fueron los experimentos que se llevaron a cabo en primer lugar dentro de esta sección, pues el valor de la constante de velocidad de disociación del radioligando (k_{off}) será

empleado en cálculos posteriores de la constante de velocidad de asociación del radioligando (k_{on}) y las constantes cinéticas de lurasidona.

La cinética de disociación de [^3H]-SB269970 del receptor 5-HT $_7$ se ajustó a un modelo exponencial, con unos valores de disociación que se aproximaron asintóticamente al valor de unión mínima, el cual alcanzaron en torno a los 80 min. Se continuaron los experimentos hasta los 150 min. El ajuste al modelo exponencial monofásico de disociación se comparó con el correspondiente al modelo bifásico, resultando elegido el primero (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). La **Fig. 44** muestra un experimento cinético de disociación de [^3H]-SB269970 representativo.

Se obtuvo un valor de constante de velocidad de disociación de $0.083 \pm 0.007 \text{ min}^{-1}$ (media \pm EEM, $n = 12$ experimentos individuales realizados por triplicado). Este valor de k_{off} obtenido para [^3H]-SB269970 es comparable al valor de $0.050 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ (media \pm EEM) descrito en la literatura para este radioligando y el receptor 5-HT $_7$ humano expresado en membranas de células HEK293 (Thomas y col., 2000).

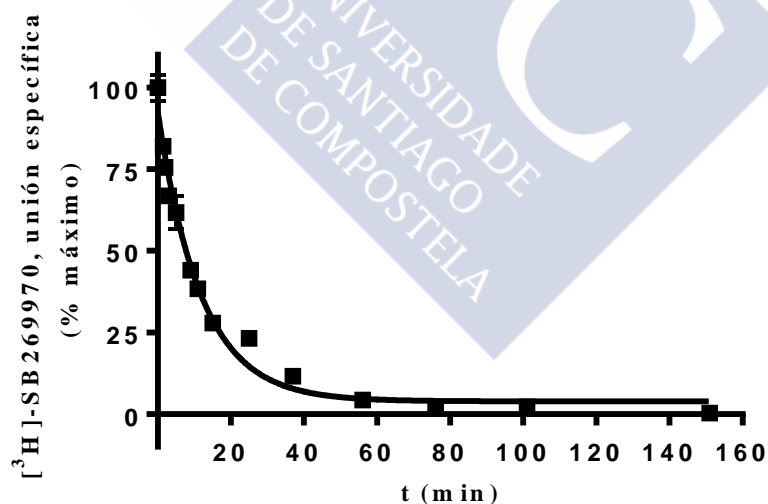


Fig. 44. Determinación de la constante de velocidad de disociación (k_{off}) del radioligando [^3H]-SB269970 del receptor 5-HT $_7$ mediante ensayos cinéticos de disociación. La gráfica representa la media \pm EEM de los resultados de un experimento representativo, realizado por triplicado.

4.2.2.2. Determinación de la constante de velocidad de asociación del radioligando [³H]-SB269970 al receptor 5-HT₇

En estos ensayos se determina la unión específica del radioligando [³H]-SB269970 a distintos tiempos. Mediante estos ensayos y el ajuste al correspondiente modelo se obtiene un valor de constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}), que junto con el valor de k_{off} ya determinado, permite obtener el valor de la constante de velocidad de asociación k_{on} del radioligando al receptor.

Los valores de unión específica siguieron en el tiempo una evolución exponencial, alcanzándose unos niveles de asociación próximos a los valores de asociación máxima en torno a los 60 min. Los experimentos se continuaron hasta los 150 min y los resultados se ajustaron al modelo monofásico de asociación al comparar el ajuste con respecto al modelo bifásico de asociación (test F de suma extra de cuadrados, seleccionando el modelo más simple al ser $P > 0.05$). El ajuste de los datos experimentales a este modelo aportó un valor de constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}). La **Fig. 45** muestra un experimento cinético de asociación de [³H]-SB269970 representativo.

El valor de k_{on} se obtuvo a partir de los datos de k_{obs} obtenidos experimentalmente, aplicando la ecuación $k_{on} = (k_{obs} - k_{off})/[L]$, siendo [L] la concentración experimental del radioligando que se asocia (ver sección 3.2.4.4.5.). El valor de k_{on} para [³H]-SB269970 en el receptor 5-HT₇ así obtenido fue de $0.086 \cdot 10^9 \pm 0.014 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (media \pm EEM, $n = 7$ experimentos independientes realizador por sextuplicado ($n = 5$) o triplicado ($n = 2$)). Este valor es comparable al valor de $k_{on} = 0.049 \pm 0.003 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (media \pm EEM) descrito en la literatura para este radioligando y el receptor 5-HT₇ humano expresado en membranas de células HEK293 (Thomas y col., 2000).

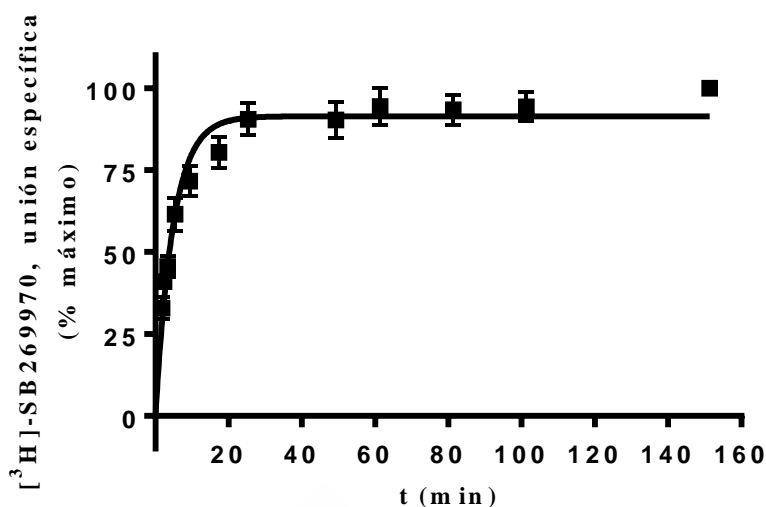


Fig. 45. Determinación de la constante de velocidad de asociación (k_{on}) del radioligando [^3H]-SB269970 al receptor 5-HT₇ mediante ensayos cinéticos de asociación. Con el ajuste al modelo se obtiene el valor de la constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}). La gráfica representa a media \pm EEM de los resultados de un experimento representativo, realizado por sextuplicado.

4.2.2.3. Determinación de las constantes de velocidad k_{off} y k_{on} del radioligando [^3H]-SB269970 a partir de valores de constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}) mediante regresión

La representación de los valores de constante de asociación observada en función de la concentración de radioligando obtenidos en ensayos de asociación con distintas concentraciones del radioligando [^3H]-SB269970, mostró un ajuste lineal (comparación con el modelo de hipérbola correspondiente al mecanismo de dos pasos o mecanismo B de Tummino y Copeland, 2008; test F suma extra de cuadrados: $P > 0.05$) indicativo de un mecanismo cinético de unión ligando-receptor de un solo paso (mecanismo A de Tummino y Copeland, 2008) (**Fig. 46**).

De acuerdo con el método de determinación de k_{on} y k_{off} descrito en la sección de materiales y métodos (sección 3.2.4.4.6.) la intersección con el eje Y de la recta de regresión correspondiente al modelo lineal proporcionó un valor de k_{off} de $0.0688 \pm 0.0283 \text{ min}^{-1}$. La pendiente de dicha recta proporciona el valor de k_{on} . Éste fue de $0.160 \pm 0.0172 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ lo que equivale a $0.160 \cdot 10^9 \pm 0.0172 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Estos valores resultan comparables a

los determinados mediante ajuste a los correspondientes modelos de disociación y asociación cinéticos (k_{on} para $[^3H]$ -SB26997 de $0.086 \cdot 10^9 \pm 0.014 \cdot 10^9 M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ y k_{off} de $0.083 \pm 0.007 \text{ min}^{-1}$) (ver secciones 4.2.2.1. y 4.2.2.2.)

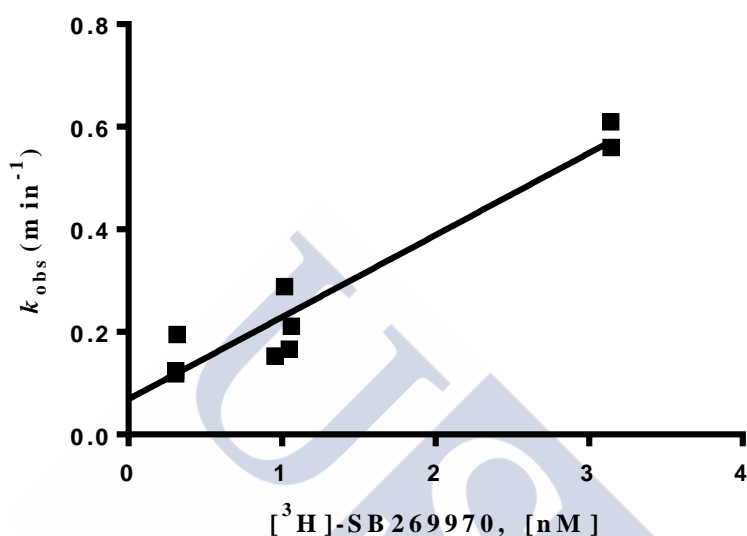


Fig. 46. Representación del valor de k_{obs} obtenido en distintos experimentos de asociación ($n = 9$) realizados en el receptor 5-HT₇ con varias concentraciones del radioligando $[^3H]$ -SB269970 y determinación de los valores de k_{on} y k_{off} . La regresión de los valores se ajustó a un modelo lineal, propio del mecanismo de unión cinético de un solo paso (mecanismo A, Tummino y Copeland, 2008). En este caso el valor de la pendiente se corresponde con k_{on} y el valor de la intersección con el eje Y con k_{off} .

4.2.2.4. Cálculo del valor de la “constante de disociación cinética” ($K_{d, cin}$) del radioligando $[^3H]$ -SB269970 en el receptor 5-HT₇

El valor de la constante de disociación (K_d) de un ligando puede ser definido como el cociente entre las constantes cinéticas k_{off}/k_{on} . Ello permite el cálculo de un valor de “constante de disociación cinética” ($K_{d, cin}$), que nos informa acerca de la calidad de los datos obtenidos en los ensayos de unión del radioligando cinéticos, sirviéndonos como método de validación de la calidad de nuestras determinaciones cinéticas experimentales.

Así, a partir de los resultados de nuestros experimentos de disociación y asociación de [³H]-SB269970 en el receptor 5-HT₇ se obtuvo un valor de $K_{d, \text{cin}}$ para el radioligando de 0.96 nM, que resulta comparable al valor de constante de disociación en el equilibrio (K_d) determinado en nuestros ensayos de unión del radioligando de saturación empleando en la misma línea celular ($K_d = 1.53 \pm 0.16$ nM; media \pm EEM) así como al valor de $K_{d, \text{cin}}$ de 1.04 ± 0.1 nM (media \pm EEM) descrito en la literatura para este radioligando en el receptor 5-HT₇ humano expresado en células HEK293 (Thomas y col., 2000). Asimismo, el valor de las constantes cinéticas determinadas mediante regresión permitió calcular de la misma manera otro valor de $K_{d, \text{cin}}$ de 0.43 nM, que resulta comparable a los mismos valores con los que se comparó el valor de $K_{d, \text{cin}}$ de 0.96 nM que se acaba de validar. La **Tabla 12** resume los valores correspondientes a los dos tipos de K_d (determinada mediante ensayos de unión en el equilibrio y “cinética”) determinados experimentalmente y ejemplos de los mismos tipos de valores que aparecen en otros estudios en la literatura.

K_d^a (presente trabajo)	$K_{d, \text{cin}}^b$ (presente trabajo)	$K_{d, \text{cin}}^c$ (presente trabajo)	K_d^d (Thomas y col., 2000)	$K_{d, \text{cin}}^e$ (Thomas y col., 2000)
1.53 \pm 0.16 nM (media \pm EEM)	0.96 nM	0.43 nM	1.25 \pm 0.05 nM (media \pm EEM)	1.04 \pm 0.1 nM (media \pm EEM)

Tabla 12. Valores de la constante de disociación en el equilibrio (K_d) y de la “constante de disociación cinética” ($K_{d, \text{cin}}$) del radioligando [³H]-SB269970 en el receptor 5-HT₇ obtenidos en este estudio y recogidos en la literatura. ^aA partir de ensayos de saturación en el equilibrio.

^bA partir de valores medios de k_{on} y k_{off} obtenidos en ensayos cinéticos. ^cA partir de valores de k_{on} y k_{off} obtenidos mediante regresión de datos experimentales de k_{obs} . ^dA partir de ensayos de saturación. ^eA partir de valores medios de k_{on} y k_{off} obtenidos en ensayos cinéticos.

4.2.2.5. Determinación de las constantes de velocidad de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) de lurasidona en el receptor 5-HT₇

Las constantes de velocidad de asociación (k_{on} o k_3) y disociación (k_{off} o k_4) de lurasidona en el receptor 5-HT₇ se determinaron mediante el método de competición

cinética de Motulsky y Mahan (1984), empleando distintas concentraciones de lurasidona (0.5, 2.5, 8 y 25 nM) como ligando competidor, próximas al valor de K_i determinado en ensayos de competición en el equilibrio con el mismo radioligando que ahora se utiliza.

En ausencia o presencia del competidor, la asociación del radioligando tendió a valores máximos de unión asintóticos, cuya magnitud fue inversamente proporcional a la concentración del competidor presente. Los resultados se ajustaron de manera global al modelo de competición cinética de Motulsky y Mahan (1984). Los valores de las constantes de velocidad de asociación y disociación obtenidos para lurasidona fueron $k_{on} = 0.0046 \cdot 10^9 \pm 0.0013 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ y $k_{off} = 0.099 \pm 0.031 \text{ min}^{-1}$ (media \pm EEM, $n = 4$ a 11 experimentos independientes realizados por duplicado o triplicado). La **Fig. 47** muestra el ajuste global de los resultados al modelo del ensayo de los distintos experimentos realizados con distintas concentraciones de lurasidona.

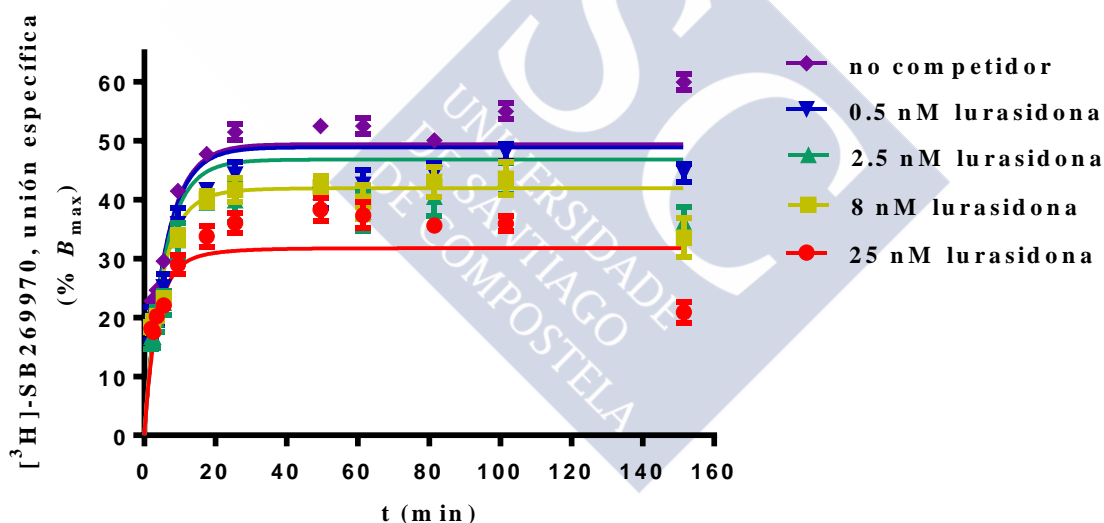


Fig. 47. Determinación de las constantes de velocidad de asociación y disociación de lurasidona en el receptor 5-HT₇ mediante ensayos de competición cinética con [³H]-SB269970. La gráfica representa la media \pm EEM de los resultados de los distintos experimentos de competición independientes llevados a cabo con cada concentración de competidor ($n = 4 - 11$), normalizados a su respectiva B_{max} , así como el ajuste global de los mismos al modelo de competición cinética de Motulsky y Mahan (1984).

4.2.2.6. Cálculo del tiempo de residencia (t_R) de lurasidona en el receptor 5-HT₇

A partir del valor de k_{off} de lurasidona obtenido, se procedió a calcular el tiempo de residencia del antipsicótico en los receptores 5-HT₇ según la ecuación $t_R = 1/k_{off}$, resultando un $t_R = 10$ min, un valor que resultó ser del mismo orden que el del radioligando [³H]-SB269970 sobre el receptor (~ 12 min).

4.2.2.7. Cálculo del valor de la “constante de disociación cinética” ($K_{d, cin}$) de lurasidona en el receptor 5-HT₇

De modo similar al caso del radioligando y con el fin de comprobar los resultados y la ejecución de los ensayos de competición cinética, se calculó un valor de constante de disociación cinética ($K_{d, cin}$) para lurasidona en el receptor 5-HT₇ a partir de los datos de k_{on} y k_{off} obtenidos en los ensayos de competición cinética. El valor resultante es de 21.5 nM, que es comparable al valor de constante de disociación en el equilibrio (K_i) para lurasidona obtenido mediante ensayos de radioligandos de competición en el equilibrio (13.2 nM).

4.3. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS: RELEVANCIA DEL RESIDUO HIS264 EN EL3 PARA LAS CINÉTICAS DE ASOCIACIÓN Y DISOCIACIÓN DE [³H]-ZM241385 AL RECEPTOR DE ADENOSINA A_{2A}

4.3.1. Afinidad de [³H]-ZM241385 por los receptores A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn

La afinidad del radioligando [³H]-ZM241385 por los receptores A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn se caracterizó mediante ensayos de unión de radioligando de saturación, determinándose su constante de disociación en el equilibrio (K_d) en cada receptor.

Los datos de unión del radioligando a ambos receptores se ajustaron al modelo de unión hiperbólico de un sitio de unión, al resultar preferido sobre el de dos sitios de unión (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). Los valores de K_d de [³H]-ZM241385 obtenidos fueron de 0.65 ± 0.15 nM y $4.98 \pm 0.86^{**}$ (nM) para el receptor A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn, respectivamente (media \pm EEM, $n = 3$ y 4 experimentos individuales realizados por duplicado, respectivamente). Estos valores difieren de forma estadísticamente significativa ($**p < 0.01$, test t no pareado, dos colas). Los valores de densidad de sitios de unión (B_{max}) obtenidos a partir de estos experimentos fueron de 18212 ± 2022 fmol/mg proteína y $7361 \pm 1150^{**}$ fmol/mg proteína, para las membranas correspondientes al receptor A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn, respectivamente ($**p < 0.01$, test t no pareado, dos colas). La **Fig. 48** muestra un experimento representativo llevado a cabo con ambos receptores.

El valor de K_d para el receptor A_{2A} no mutado es comparable a otros descritos en la literatura (0.60 ± 0.07 ; Guo y col., 2012) determinado también en membranas de este receptor de células HEK293 y a 5°C.

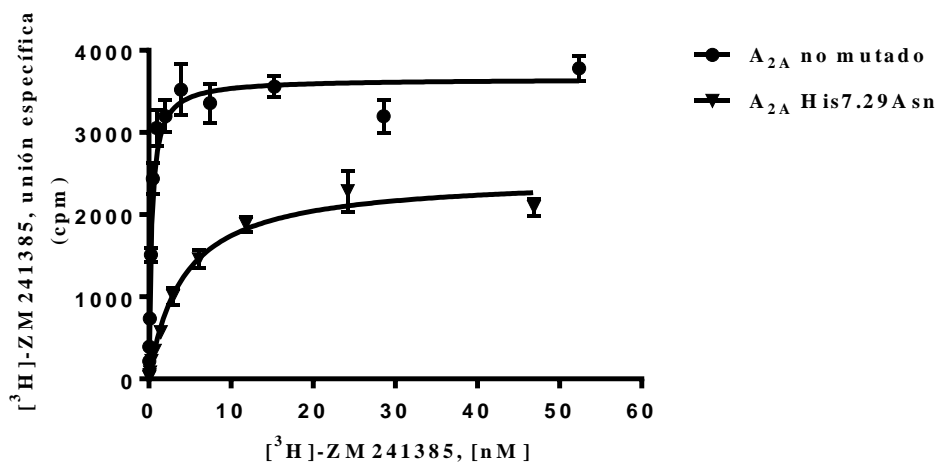


Fig. 48. Determinación de la constante de disociación en el equilibrio del radioligando [³H]-ZM241385 en los receptores A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn mediante ensayos de unión de radioligando de saturación. La gráfica representa la media ± EEM de los resultados de un experimento representativo llevado a cabo con ambos receptores por duplicado.

4.3.2. Determinación de parámetros cinéticos de unión del radioligando [³H]-ZM241385 a los receptores A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn

4.3.2.1. Determinación de la constante de velocidad de disociación de [³H]-ZM241385 de ambos receptores

Como ya se ha mencionado, los ensayos cinéticos de disociación permiten obtener el valor de la constante de velocidad de disociación (k_{off}), que será posteriormente utilizado para calcular el valor de la constante de velocidad de asociación (k_{on}) a partir de la constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}), determinada experimentalmente.

Los datos cinéticos de disociación de [³H]-ZM241385 de los receptores A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn se ajustaron al modelo exponencial monofásico, siendo la disociación notablemente más rápida en el caso del receptor mutado. Así, los niveles de unión específica alcanzaron el valor asintótico de unión mínima, en torno a los 60 min en el caso del receptor A_{2A}-His7.29Asn y a los 240 min en el del receptor A_{2A} no mutado, tiempo este en el que se detuvo la disociación. El ajuste al modelo de disociación exponencial monofásico se comparó con el correspondiente al modelo bifásico, resultando elegido el primero (test F de suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). En el caso del receptor no mutado, este ajuste fue

también el observado para el mismo radioligando por otros autores (Guo y col., 2012). Los valores medios de constante de velocidad de disociación (k_{off}) de [^3H]-ZM241385 obtenidos fueron de $0.014 \pm 0.0020 \text{ min}^{-1}$ y $0.15 \pm 0.026^{**} \text{ min}^{-1}$ (media \pm EEM; $n = 4$) para el receptor A_{2A} no mutado y A_{2A} -His7.29Asn respectivamente. Estos valores difieren entre sí de forma estadísticamente significativa (** $p < 0.01$, test t no pareado, dos colas). La **Fig. 49** muestra un experimento cinético de disociación de [^3H]-ZM241385 llevado a cabo con ambos receptores.

El valor de k_{off} obtenido para el radioligando [^3H]-ZM241385 en el receptor humano A_{2A} no mutado es comparable a valores recogidos en la literatura, obtenidos en experimentos llevados a cabo en membranas de células HEK293 expresando el receptor y en condiciones experimentales similares a las empleadas en nuestro trabajo (5°C), tales como $0.011 \pm 0.0 \text{ min}^{-1}$ (Guo y col., 2012) o $0.014 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ (Guo y col., 2014).

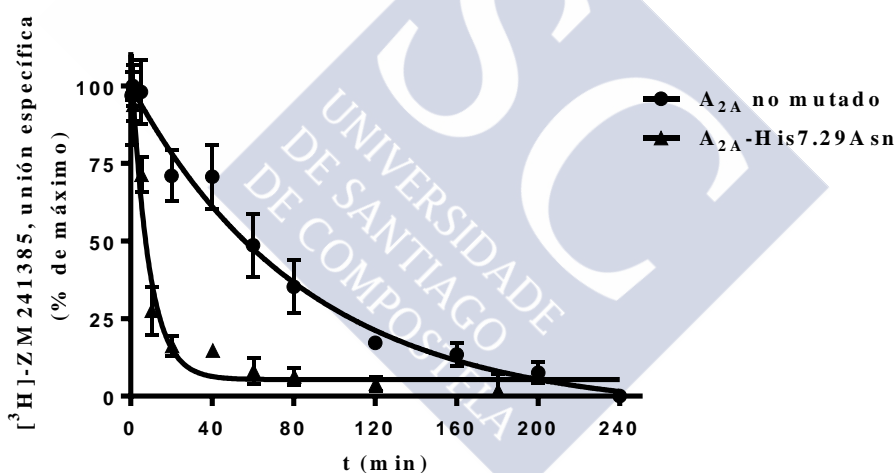


Fig. 49. Determinación de la constante de velocidad de disociación (k_{off}) del radioligando [^3H]-ZM241385 de los receptores A_{2A} no mutado y A_{2A} -His7.29Asn mediante ensayos cinéticos de disociación. La gráfica representa la media \pm EEM de los resultados de un experimento representativo llevado a cabo con ambos receptores, realizado por triplicado.

4.3.2.2. Cálculo del tiempo de residencia (t_R) del radioligando [^3H]-ZM241385 en los receptores A_{2A} y A_{2A} -His7.29Asn

En este caso, partiendo de la definición de tiempo de residencia (t_R) como la inversa de la constante de velocidad de disociación (k_{off}), se utilizaron los valores de k_{off} obtenidos en los experimentos cinéticos de disociación para el cálculo del t_R . Así, se obtuvieron valores de t_R de 70.57 min y 6.59 min para los receptores A_{2A} y A_{2A} -His7.29Asn, respectivamente. El valor de t_R obtenido para el receptor A_{2A} y el radioligando [^3H]-ZM241385 es muy similar al valor descrito para este receptor y radioligando, obtenido en ensayos en condiciones experimentales similares a las seguidas en nuestro trabajo (71 ± 21 min; Guo y col., 2014).

4.3.2.3. Determinación de la constante de velocidad de asociación del radioligando [^3H]-ZM241385 al receptor A_{2A}

En el caso del receptor A_{2A} no mutado, se llevaron a cabo experimentos cinéticos de asociación del radioligando [^3H]-ZM241385 que, tras el ajuste de los datos al modelo monoexponencial de asociación, permitieron obtener un valor medio de constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}). Sin embargo, este tipo de experimentos no permitió una determinación experimental adecuada del valor de k_{obs} del radioligando en el caso del receptor A_{2A} -His7.29Asn, por lo que seguimos otra aproximación experimental para este receptor (sección 4.3.2.4).

Los valores de unión específica de [^3H]-ZM241385 al receptor A_{2A} alcanzaron el valor asintótico de asociación máxima aproximadamente a los 80 min, continuándose los experimentos hasta los 150 min. Los datos cinéticos de asociación se ajustaron al modelo de asociación exponencial monofásica, comparándose con el ajuste al modelo de asociación bifásica (test F suma extra de cuadrados, $P > 0.05$). De acuerdo con esto, previamente otros autores han descrito curvas de asociación monofásicas del radioligando [^3H]-ZM241385 al receptor A_{2A} (Guo y col., 2012).

Estos experimentos permitieron calcular el valor de la constante de velocidad de asociación (k_{on}) de [^3H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} no mutado según la ecuación $k_{\text{on}} = (k_{\text{obs}} - k_{\text{off}})/[L]$, siendo $[L]$ la concentración experimental del radioligando que se asocia (ver sección 3.2.4.4.5.). Se obtuvo un valor de k_{on} de $4.4 \cdot 10^7 \pm 0.58 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (media \pm

EEM, $n = 7$ experimentos individuales realizados por triplicado). La **Fig. 50** muestra un experimento cinético de asociación de [^3H]-ZM241385 al receptor A_{2A} no mutado representativo.

El valor de k_{on} resulta comparable a valores citados en la literatura para el mismo radioligando, así como para el ligando no marcado ZM241385, obtenidos en experimentos llevados a cabo en membranas de células HEK293 expresando el receptor A_{2A} y realizados a 5°C ($k_{\text{on}} = 1.50 \cdot 10^7 \pm 0.06 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para [^3H]-ZM241385 en ensayos cinéticos de asociación; $k_{\text{on}} = 2.0 \cdot 10^7 \pm 0.2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para ZM241385 en ensayos de competición cinética; ambos en Guo y col., 2012).

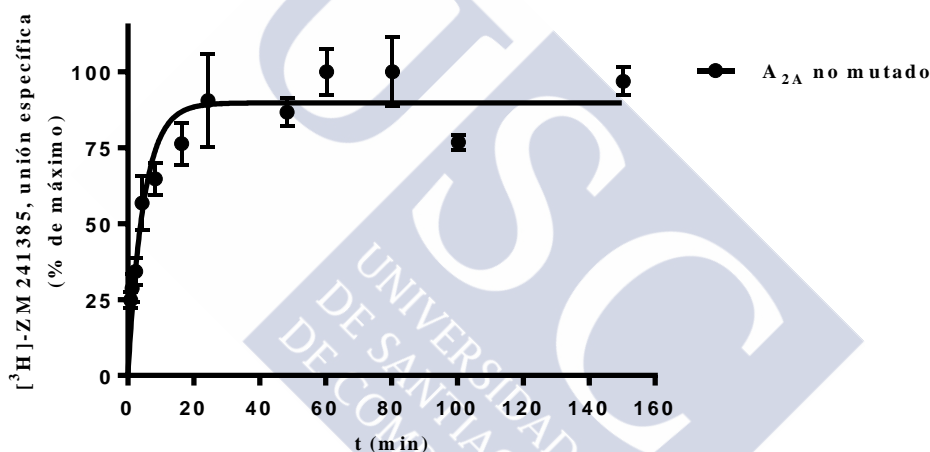


Fig. 50. Determinación de la constante de velocidad de asociación (k_{on}) del radioligando [^3H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} mediante ensayos cinéticos de asociación. La gráfica representa la media \pm EEM de los resultados de un experimento representativo realizado por triplicado.

4.3.2.4. Determinación de las constantes de velocidad k_{off} y k_{on} del radioligando [^3H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} -His7.29Asn a partir de valores de constante de velocidad de asociación observada (k_{obs}) mediante regresión

Siguiendo el método de determinación de k_{on} y k_{off} descrito en la sección de materiales y métodos (sección 3.2.4.4.6.), se representaron los valores medios de la constante de asociación observada (k_{obs}) en función de la concentración de radioligando, obtenidos a partir de un total de $n = 23$ experimentos independientes de asociación de [^3H]-

ZM241385 al receptor A_{2A} -His7.29Asn, llevados a cabo con cuatro concentraciones distintas del radioligando. Los datos mostraron un ajuste lineal (comparación con el modelo de hipérbola correspondiente al mecanismo de unión en dos pasos de Tummino y Copeland, 2008; test F suma extra de cuadrados: $P > 0.05$) indicativo de un mecanismo cinético de unión ligando-receptor de un solo paso (mecanismo A de Tummino y Copeland, 2008) (**Fig. 51**). De acuerdo con este método, la intersección con el eje Y de la recta de regresión correspondiente al modelo lineal proporcionó un valor de k_{off} para el radioligando de 0.1102 min^{-1} (EE 0.01985 min^{-1}), y a partir de la pendiente de la recta de regresión se obtuvo un valor de k_{on} para el radioligando de $1.962 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (EE $0.005568 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). El valor de k_{off} así obtenido es comparable al citado anteriormente en la sección 4.3.2.1. y calculado mediante la ejecución de ensayos cinéticos (k_{off} (media \pm EEM) = $0.15 \pm 0.026 \text{ min}^{-1}$).

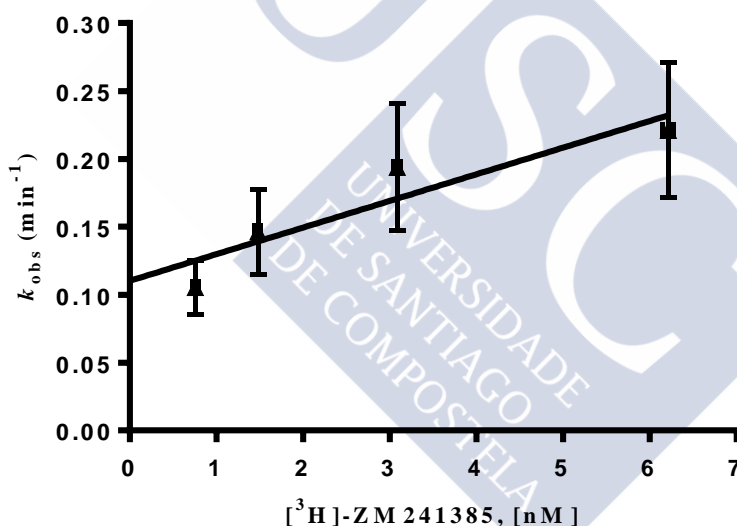


Fig. 51. Determinación de los valores de k_{on} y k_{off} mediante regresión, a partir de los valores de k_{obs} obtenidos en experimentos de asociación con el receptor A_{2A} -His7.29Asn realizados con cuatro concentraciones del radioligando [^3H]-ZM241385. La regresión de los valores se ajustó a un modelo lineal, propio del mecanismo cinético de unión de un solo paso (mecanismo A, Tummino y Copeland, 2008). En este modelo el valor de la pendiente se corresponde con k_{on} y el valor de la intersección con el eje de ordenadas con k_{off} .

4.3.2.5. Cálculo del valor de la “constante de disociación cinética” ($K_{d, \text{cin}}$) del radioligando [^3H]-ZM241385 en los receptores A_{2A} y estimación de la constante de velocidad de asociación (k_{on}) de [^3H]-ZM241385 al receptor A_{2A} -His7.29Asn a partir de datos experimentales de K_d en el equilibrio y k_{off}

Los valores de k_{on} y k_{off} obtenidos experimentalmente para [^3H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} no mutado permiten calcular el valor de una “constante de disociación cinética” ($K_{d, \text{cin}}$) según la ecuación $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. De esta forma, se obtuvo un valor de $K_{d, \text{cin}}$ de 0.32 nM para el receptor A_{2A} no mutado, que está en el rango del valor obtenido en experimentos de unión del radioligando de saturación en el equilibrio (0.65 nM) y que nos permite valorar la calidad de nuestros experimentos cinéticos. Este valor es comparable al valor de $K_{d, \text{cin}}$ citado en la literatura para este radioligando y receptor, calculado a partir de valores de constantes cinéticas k_{off} y k_{on} obtenidas en experimentos cinéticos realizados en condiciones similares a las empleadas en nuestro trabajo (5°C) (0.70 ± 0.01 nM; Guo y col., 2012).

Siguiendo el mismo razonamiento y considerándose validada esta aproximación para el receptor A_{2A} no mutado, se procedió a estimar el valor de k_{on} para [^3H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} -His7.29Asn a partir del valor de la constante de disociación en el equilibrio (K_d), obtenido en ensayos de saturación, y del valor de la constante de velocidad de disociación (k_{off}), obtenido experimentalmente en los ensayos cinéticos de disociación. Esto da como resultado un valor de k_{on} para [^3H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} -His7.29Asn de $3.0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Éste resulta comparable al valor de k_{on} de $1.962 \cdot 10^7 \pm 0.005568 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ obtenido mediante métodos de regresión y anteriormente citado.

A partir de los valores de k_{on} y k_{off} obtenidos mediante regresión (sección 4.3.2.4.) para [^3H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} -His7.29Asn se calculó un valor de “constante de disociación cinética” ($K_{d, \text{cin}}$) de 5.62 nM que resulta comparable al valor obtenido de K_d en los correspondientes ensayos de unión en el equilibrio (4.98 ± 0.86 nM, media \pm EEM).

Los valores de las constantes determinadas experimentalmente en nuestro trabajo, así como las estimadas a partir de datos experimentales para el radioligando [^3H]-ZM241385 en los receptores A_{2A} no mutado y A_{2A} - His7.29Asn se resumen en la **tabla 13**.

[³ H]- ZM241385	k_{on} ($M^{-1} \times min^{-1}$)	k_{off} (min^{-1})	t_R (min)	K_d (nM) ^a	$K_{d,cin}$ (nM)
A_{2A} no mutado	$4.4 \cdot 10^7 \pm 0.58 \cdot 10^7$ (n = 7)	0.014 ± 0.0020 (n = 4)	70.57	0.65 ± 0.15 (n = 3)	0.32
A_{2A}- His7.29Asn	$3.0 \cdot 10^7$ ^b	$0.15 \pm 0.026^{**}$ (n = 4)	6.59	$4.98 \pm$ 0.86^{**} (n = 4)	
	$1.962 \cdot 10^7 \pm$ $0.005568 \cdot 10^7$ ^c	$0.1102 \pm$ 0.01985 ^c			5.62 ^c

Tabla 13. Resumen de los valores de las constantes calculadas en los ensayos realizados con los receptores de adenosina A_{2A} no mutado y A_{2A}-His7.29Asn. ^aConstante de disociación en el equilibrio. ^bvalor estimado a partir de los valores de K_d y k_{off} determinados experimentalmente. ^cvalor calculado a partir de valores de k_{off} y k_{on} obtenidos mediante regresión de k_{obs} . ^{**} $p < 0.01$ para A_{2A} no mutado *versus* A_{2A}-His7.29Asn. test t no pareado, dos colas.





5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES





5.1. ESTUDIO DE DETERMINANTES ESTRUCTURALES EN EL SITIO DE UNIÓN DEL RECEPTOR RELEVANTES PARA EL PERFIL DE AFINIDAD Y SELECTIVIDAD DE ANTIPSICÓTICOS SOBRE GPCRS DE SU RECEPTOROMA

El objetivo común de este bloque de estudio fue investigar determinados residuos localizados en el sitio de unión de GPCRs del receptoroma de antipsicóticos en relación a su relevancia para el perfil de afinidad y selectividad de dos antipsicóticos de gran importancia clínica, como son la olanzapina y la clozapina. Para ello, partimos de hipótesis basadas en resultados de estudios biocomputacionales multirreceptoriales sobre el receptoroma de estos fármacos, que fueron evaluadas experimentalmente en nuestro trabajo.

5.1.1. Relevancia del residuo en posición 3.36 para la unión de antipsicóticos a GPCRs de su receptoroma

Como ya se ha mencionado, nuestra hipótesis partió de la observación de la mayor afinidad de olanzapina y clozapina por GPCRs de su receptoroma que presentan un residuo Ser en posición 3.36 frente a aquellos que presentan un residuo Cys en esa posición (ver **Fig. 26**) (Selent y col., 2008). Esto permite agrupar a los GPCRs del receptoroma de los antipsicóticos en dos grupos atendiendo al aminoácido en dicha posición, y sugiere que la identidad del residuo en posición 3.36 podría ser de relevancia para el perfil de afinidad y selectividad de estos ligandos.

En particular, entre los representantes de ambos grupos se encuentran los receptores 5-HT_{2A} (Ser3.36) y D₂ (Cys3.36). Los antipsicóticos atípicos, y clozapina y olanzapina entre ellos, presentan un perfil multirreceptorial que se distingue por poseer mayor afinidad por los receptores 5-HT_{2A} que por los receptores D₂. Esta característica se ha considerado como determinante de atipicidad, y se ha descrito mediante el denominado índice de Meltzer como la ratio pK_i 5-HT_{2A}/ pK_i D₂, que consistentemente tomaría valores > 1.12 para antipsicóticos atípicos (Meltzer y col., 2003).

Los trabajos de modelización y acoplamiento de clozapina y olanzapina en los receptores 5-HT_{2A} y D₂ llevados a cabo por Selent y col. (2008) describen una diferencia en el tipo de enlace de puente de hidrógeno que se establece entre el átomo de nitrógeno N10 (en el sistema tricíclico) de clozapina y olanzapina y el residuo en posición 3.36 de los

receptores 5-HT_{2A} (puente de hidrógeno normal) y D₂ (puente de hidrógeno más débil). De cara a verificar experimentalmente la relevancia del residuo 3.36 para el perfil de afinidades de clozapina y olanzapina por estos receptores, en concreto para la mayor afinidad de ambos antipsicóticos por 5-HT_{2A} que por D₂, llevamos a cabo ensayos de unión de radioligandos de competición con olanzapina y clozapina frente a [³H]-ketanserina en el receptor 5-HT_{2A} no mutado y un receptor 5-HT_{2A} mutado en el que se intercambió el residuo Ser en posición 3.36 por un residuo Cys, aminoácido presente en la posición 3.36 en el receptor D₂.

Con respecto a clozapina y olanzapina (**Fig. 52**), para ambos ligandos se observó un aumento de la afinidad por el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys con respecto al receptor 5-HT_{2A} no mutado, aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre la afinidad que cada ligando mostró por cada uno de los receptores, siendo los valores de la ratio de afinidades K_i 5-HT_{2A} no mutado/ K_i 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys de 6.4 y 3.5 para clozapina y olanzapina, respectivamente.

A la vista de estos resultados, que se oponían a lo predicho en base a los estudios de modelización y acoplamiento, quisimos completar nuestro estudio con los ligandos serotonina y N-desmetil-clozapina (**Fig. 52**). Este último es un metabolito activo de la clozapina con unos efectos más débiles y menor duración y un perfil farmacológico similar a la clozapina, aunque se le ha descrito actividad agonista parcial en el receptor D₂ frente al agonismo inverso de clozapina y distinta afinidad por receptores muscarínicos (Burstein y col., 2005; Li y col., 2005). Esto se llevó a cabo en primer lugar para validar nuestros resultados experimentales en base a datos disponibles en la literatura, en concreto aquellos aportados por los trabajos de Almaula y col., (1996) y Ebersole y col. (2003) en los que se investiga el bolsillo de unión del receptor 5-HT_{2A} y su interacción con distintos ligandos, y que incluyen resultados de afinidad para distintos ligandos en los receptores mutados en esta posición 5-HT_{2A}-Ser3.36Ala y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys. En segundo lugar, se pretendía aportar información estructural adicional que pudiese ayudar a la interpretación de los resultados obtenidos para clozapina y olanzapina.

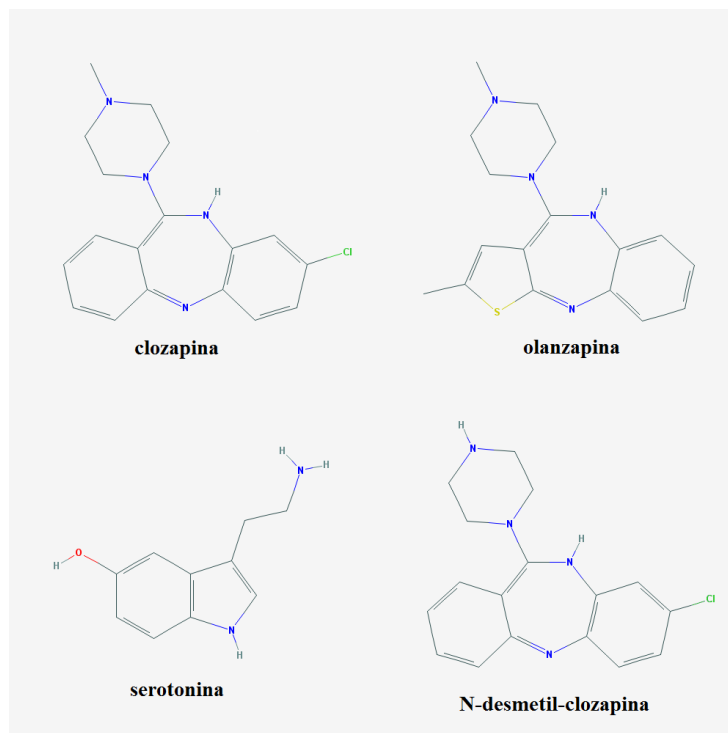


Fig. 52. Estructura química de los ligandos usados en este apartado del trabajo: clozapina (dibenzodiazepina), olanzapina (tienobenzodiazepina), serotonina y N-desmetilclozapina.

En nuestro trabajo, serotonina experimentó una importante pérdida de afinidad, estadísticamente significativa ($***p < 0.001$) por el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys con respecto al receptor 5-HT_{2A} no mutado, con una ratio de K_i 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys/ K_i 5-HT_{2A} no mutado de 5.7. Estos resultados estaban de acuerdo con los obtenidos por Almaula y col. (1996), que describe una pérdida de afinidad para 5-HT de 4.9 veces al mutar el residuo Ser3.36 en el receptor 5-HT_{2A} a Cys, y de hasta 17.6 veces al mutar dicho residuo a Ala (Almaula y col., 1996). Los resultados del trabajo de Almaula y col. 1996 fueron posteriormente confirmados en el trabajo de Ebersole y col. (2003), donde se describe una pérdida de afinidad para 5-HT sobre el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Ala de 27.9 veces, así como una disminución de la afinidad menor (de 8 veces) para N-metil-5-HT (amina secundaria) sobre el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Ala ($K_i = 197 \pm 19$ nM y 1589 ± 145 nM, para el receptor 5-HT_{2A} no mutado y 5-HT_{2A}-Ser3.36Ala, respectivamente). Los valores absolutos de afinidad para 5-HT obtenidos en nuestro trabajo también están de acuerdo con los recogidos en los citados artículos para los receptores empleados en nuestro estudio (K_i de 5-HT en 5-

HT_{2A} no mutado = 396 nM (Almaula y col., 1996) o 267 nM (Ebersole y col., 2003); K_i de 5-HT en 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys = 1947 nM (Almaula y col., 1996)).

La disminución de la afinidad de 5-HT en el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys se considera consecuencia de la imposibilidad de la formación del enlace mediante puente de hidrógeno entre Ser3.36 y el grupo amino alifático primario de la serotonina (Almaula y col., 1996). Para otros ligandos con el grupo amino con un fuerte impedimento estérico, como sería el caso de N,N-dimetil-5-hidroxitriptamina (amina terciaria), la pérdida de afinidad por el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys fue apenas detectable (K_i (media \pm EEM) = 162 \pm 14 nM y 224 \pm 44 nM para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys, respectivamente) (Almaula y col., 1996), aunque aún pudo ser observada en el caso de la mutación Ser3.36Ala (K_i (media \pm EEM) = 645 \pm 88 nM) (Almaula y col., 1996). En el caso de la dietilamida del ácido lisérgico (LSD), en el que el N del grupo amino está dentro de un heterociclo, no se encontró un impacto de la mutación del aminoácido en posición 3.36 sobre la afinidad del ligando por el receptor 5-HT_{2A} (K_i (media \pm EEM) = 0.38 \pm 0.05 nM, 0.33 \pm 0.04 nM y 0.54 \pm 0.13 nM para los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys y 5-HT_{2A}-Ser3.36Ala, respectivamente) (Almaula y col., 1996). Así, los resultados experimentales obtenidos por Almaula y col. para N,N-dimetil-5-hidroxitriptamina y LSD en los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys y 5-HT_{2A}-Ser3.36Ala, en los que afinidad no se ve afectada o lo hace levemente, podrían explicarse, de acuerdo con los estudios de simulación de dinámica molecular, por la existencia de impedimento estérico causado por los enlaces adicionales con átomos de carbono del grupo amino del ligando (Almaula y col., 1996). Estos resultados estarían de acuerdo con una interacción mediante un puente de hidrógeno del grupo amino primario catiónico de 5-HT con el residuo 3.36 en el receptor 5-HT_{2A}, de manera que este grupo amino cargado del ligando interaccionaría mediante puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de 2 aminoácidos del receptor: el residuo Ser3.36 y el residuo Asp3.32. En particular, la interacción con el residuo 3.36 estaría ausente debido a impedimentos estéricos en ligandos como LSD o N,N-dimetil-5-HT (Almaula y col., 1996), ligandos que establecerían únicamente interacción de sus grupos amino con el residuo Asp3.32. El establecimiento o no de la interacción con el residuo 3.36 para diferentes ligandos serotoninérgicos afectaría a la orientación de los ligandos en el bolsillo de unión, lo que tendría un reflejo en el grado de activación del receptor por parte de los ligandos y, por

tanto, en la eficacia de los mismos como agonistas del receptor (Almaula y col., 1996; Ebersole y col., 2003).

Así pues, a partir de nuestros resultados podemos concluir que, mientras que en el caso de serotonina parece determinante para su afinidad la interacción de Ser3.36 con el grupo amino alifático del ligando, tal y como han propuesto otros autores (Almaula y col., 1996), esta interacción podría no ser reproducida por el átomo N10 de clozapina y olanzapina según se planteaba en nuestra hipótesis inicial, posiblemente por tratarse de átomos de N estructuralmente no análogos entre estos ligandos.

Mediante la incorporación de N-desmetilclozapina en nuestro estudio (**Fig. 52**) quisimos obtener información acerca de una posible interacción del grupo amino del anillo piperazina de clozapina, un posible análogo estructural del grupo amino alifático de serotonina, con el residuo en posición 3.36 del receptor 5-HT_{2A}. En principio, tal interacción no fue observada en los estudios de acoplamiento llevados a cabo por Selent y col. (2008). Sin embargo, ese grupo amino del anillo piperazina de clozapina sí interacciona en el modelo con el residuo Asp3.32 del receptor 5-HT_{2A} al igual que lo hace el grupo amino alifático de serotonina. Así, y al tratarse de una amina terciaria, se podría especular que el sustituyente metilo en el grupo amino piperazínico de clozapina podría introducir un cierto impedimento estérico a la hora de establecer una segunda interacción con el residuo Ser3.36, al igual que se describe en la literatura para los derivados de serotonina que presentan variaciones en la sustitución del grupo amino alifático. De esta forma, la ausencia de grupo metilo en N-desmetilclozapina podría hacer que este último ligando perdiese sensibilidad ante cualquier posible impacto que la mutación Ser3.36Ala pudiese tener sobre la afinidad de clozapina por el receptor 5-HT_{2A}. Sin embargo, y al igual que clozapina y olanzapina, este ligando también presentó una mayor afinidad por el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys que por el receptor 5-HT_{2A} no mutado, con una ratio K_i 5-HT_{2A} no mutado/ K_i 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys = 8.4, muy similar a la obtenida para clozapina (6.4). Así pues, los resultados obtenidos con N-desmetilclozapina apuntan de nuevo a que el residuo Ser3.36 del receptor 5-HT_{2A} no establece con clozapina interacciones que resulten relevantes para su afinidad o que, al menos, no puedan ser compensadas por otras interacciones establecidas por el ligando en el bolsillo de unión, sin poder excluir reorientaciones de los ligandos en el

bolsillo de unión del receptor mutado que enmascaren el efecto de la mutación predicho por los estudios de acoplamiento llevados a cabo sobre el modelo del receptor no mutado.

En base a nuestros resultados no puede confirmarse la hipótesis inicial, por la que se esperaba una disminución de la afinidad por el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys con respecto al receptor no mutado para los antipsicóticos clozapina y olanzapina, al haberse observado un aumento no significativo de la afinidad de los dos antipsicóticos, así como de N-desmetilclozapina por el receptor mutado.

Por tanto, con los datos obtenidos y careciendo de los correspondientes a la pareja de receptores D₂ y D₂-Cys3.36Ser para validar nuestra hipótesis inicial, podría decirse que el residuo Ser3.36 del receptor 5-HT_{2A} no es determinante para el perfil de afinidad preferente de clozapina y olanzapina por el receptor 5-HT_{2A} con respecto al receptor D₂ y, por extensión, por receptores del grupo Ser3.36 con respecto a receptores del grupo Cys3.36.

5.1.2. Relevancia de los residuos en las posiciones 5.43 y 5.46 para la unión de antipsicóticos a GPCRs de su receptoroma

Al igual que en el caso anterior, nuestra hipótesis en este apartado del trabajo partió de los resultados de los estudios de afinidad de los antipsicóticos clozapina y olanzapina por GPCRs de su receptoroma y su relación con la secuencia de aminoácidos de los receptores (Selent y col., 2008). Tras la asignación de receptores a grupos en función del valor de la diferencia $pK_i \text{ olanzapina} - pK_i \text{ clozapina}$ (se tomó como relevante un valor superior a 0.3) y análisis de la secuencia se encontró una afinidad mayor de olanzapina por los receptores con residuos Ser en las posiciones 5.43 y 5.46, tales como el receptor D₂ como ejemplo más notable, y una afinidad mayor de clozapina por receptores que presentan residuos más hidrofóbicos en estas posiciones, tales como el receptor 5-HT_{1A}.

El objetivo fue comprobar si la diferencia de afinidades entre clozapina y olanzapina, en concreto su perfil de afinidad selectivo e inverso, por determinados receptores, podría ser debida a diferencias determinantes en la interacción ligando-receptor en la que estuvieran implicados los residuos de las posiciones 5.43 y 5.46. De manera que se planteó la mutación en los receptores D₂ y 5-HT_{1A} (los receptores que muestran mayor preferencia por olanzapina frente a clozapina, y por clozapina frente a olanzapina, respectivamente, esto es, grupo 1 y 2, respectivamente), de los residuos localizados en las posiciones 5.43 y 5.46,

de tal forma que cada receptor incorporase el aminoácido correspondiente presente en el otro receptor. Con respecto al par de receptores D_{2S} no mutado y mutado D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala, con el que se realizaron los ensayos, se esperaba una inversión del perfil de afinidades de clozapina y olanzapina al comparar las mismas por ambos receptores (pK_i olanzapina $>$ pK_i clozapina para el receptor D_{2S} ; pK_i olanzapina $<$ pK_i clozapina para el receptor D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala).

Los resultados obtenidos en los ensayos de unión de radioligandos de competición con clozapina y olanzapina en los receptores D_{2S} y D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala mostraron una disminución de la afinidad de olanzapina (ratio de K_i D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala/ D_{2S} = 7.41) y un aumento de la afinidad de clozapina (no significativo) (ratio de K_i D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala/ D_{2S} = 0.65) por el receptor D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala. Además, hubo una inversión en el perfil de afinidades de ambos ligandos: las diferencias de afinidad pK_i (olanzapina-clozapina) en el receptor D_{2S} y D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala pasó de ser 0.58 a -0.48, respectivamente. Estos datos experimentales estarían de acuerdo con una interacción de los ligandos con los aminoácidos mutados, de manera que clozapina incrementa ligeramente su afinidad en presencia de residuos de polaridad reducida en esas posiciones (Thr y Ala), mientras que olanzapina (con un anillo de tiofeno en su estructura) presenta mayor afinidad por el bolsillo de unión con un doblete de aminoácidos polares (Ser5.43 y Ser5.46) en esas posiciones.

Por tanto, podemos concluir que nuestros datos experimentales confirman la hipótesis inicialmente planteada acerca del carácter determinante de los residuos en las posiciones 5.43/5.46 para el perfil de afinidades relativo de clozapina y olanzapina en el receptor D_{2S} . Por extensión, los resultados son compatibles con un posible carácter determinante de los residuos en las posiciones 5.43 y 5.46 para el perfil de afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina por receptores pertenecientes al grupo 1 y 2, según se estableció en nuestra hipótesis de partida. Esta hipótesis partía de resultados de estudios de acoplamiento sobre modelos receptoriales generados en base a la estructura cristalina del receptor β_2 -adrenérgico (código PDB 2RH1), publicada en 2007. Sin embargo, nuestra interpretación estructural de los resultados fue corroborada en el trabajo más reciente de Selent y col. (2014) donde se generaron nuevos modelos de los receptores D_2 y $5-HT_{1A}$ distintos de los iniciales que se habían utilizado para plantear la hipótesis (Selent y col.,

2008), al encontrarse disponibles nuevas estructuras cristalinas de diversos GPCRs. En concreto, en el trabajo de Selent y col. (2014) se utilizaron los datos de las estructuras, no disponibles en el momento de realizar los modelos publicados en 2008 por Selent y col., determinadas mediante estudios cristalográficos y correspondientes a los receptores D₃ unido a eticloprida (Chien y col., 2013; código PDB 3PBL) y 5-HT_{1B} en complejo con ergotamina (Wang y col., 2013; código PDB 4IAR) como punto de partida para la realización de modelos de los receptores D₂ y 5-HT_{1A}, respectivamente. La identidad de secuencia a nivel del sitio de unión con respecto al par D₂-D₃ alcanza un grado de homología del 85.7%, siendo este valor de 87.5% en el caso de los receptores de serotonina 5-HT_{1A}-5-HT_{1B} (Selent y col., 2014). En ambos casos, el grado de homología para los nuevos modelos es muy superior al existente en los modelos basados en el receptor β₂-adrenérgico y publicados en 2008, que disponían de un grado de identidad de secuencia a nivel del sitio de unión de 57.1% y 53.5% los modelos de receptores D₂ y 5-HT_{1A}, respectivamente. Esto permitió refinar los modelos receptoriales generados.

Así, los trabajos de modelización basados en el nuevo modelo de receptor D₂ sobre el que se llevaron a cabo estudios de acoplamiento de clozapina y olanzapina, analizados a la luz de nuestros datos experimentales, aportan información estructural detallada sobre los complejos de clozapina y olanzapina en el receptor D₂ (**Fig. 53**) (Selent y col., 2014). Específicamente, se pudo determinar que la forma protonada tautomérica predominante de ambos antipsicóticos sería la protonada en N5, y que clozapina y olanzapina se dispondrían con el sistema tricíclico de forma perpendicular al plano de la membrana y próximo a TM5, predominantemente con el átomo N10 orientado hacia la cara extracelular del receptor (Selent y col., 2014).

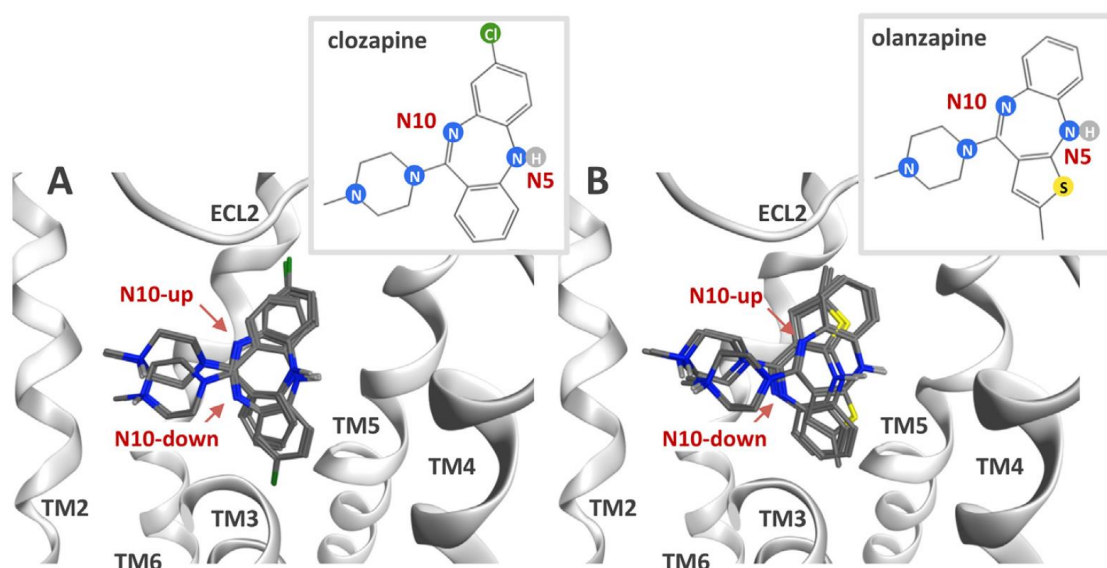


Fig. 53. Acoplamiento de clozapina y olanzapina en el sitio de unión ortostérico del receptor D₂. Ambos ligandos se disponen con el sistema tricíclico de forma perpendicular al plano de la membrana en frente a TM5. Dos configuraciones son posibles: con N10 orientado hacia la cara extracelular o con el mismo átomo orientado hacia el fondo del sitio de unión. (Tomado de Selent y col., 2014).

En particular, esta orientación del N10 pudo ser confirmada a partir de nuestros resultados experimentales, de manera que el posicionamiento “N10-hacia el exterior” del bolsillo de unión es la compatible con nuestros resultados de mutagénesis frente al posicionamiento “N10-hacia el interior”, de forma que se explica la afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina por receptores con aminoácidos más o menos polares en las posiciones 5.43/5.46 cuando los ligandos se disponen con N10 hacia el exterior.

En los modelos publicados en 2014 se observan varias interacciones similares de clozapina y olanzapina, tanto en el receptor D_{2S} como en el mutado D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala, cuando los ligandos se disponen con el átomo de nitrógeno N10 hacia la cara extracelular del receptor: 1) un enlace iónico entre Asp3.32 y el átomo de nitrógeno protonado del anillo piperazina; 2) un enlace por puente de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno N5 y Ser5.42; 3) dos interacciones hidrofóbicas con los residuos Val5.39 y Ile6.56; y 4) interacciones con residuos que forman el bolsillo hidrofóbico (Val3.33 y Phe6.52) (Selent y col., 2014). La inspección del sitio de unión en el caso del

receptor D₂, permitió encontrar una clara diferencia estructural entre las interacciones que presentan clozapina y olanzapina: la interacción con Ser5.46 (véase **Fig. 54**). En el primer caso clozapina no es capaz de interaccionar, mientras que en el segundo olanzapina es capaz de formar un enlace mediante puente de hidrógeno. Esta interacción podría explicar la afinidad y selectividad de olanzapina por el receptor D₂, con respecto a clozapina. Con respecto al sitio de unión de los receptores D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y 5-HT_{1A} examinados en los modelos, se vio que Thr5.43 introdujo un grupo metilo adicional que formaba un bolsillo hidrofóbico junto con Ile6.56 y Val5.39. La interacción de esta posición y el sistema tricíclico de los ligandos clozapina y olanzapina es similar en ambos casos. La introducción de 5.46Ala hace que el átomo de S del anillo tiofeno de olanzapina y un anillo bencénico de olanzapina se localicen en un área más hidrofóbica y posicionados frente a un grupo no polar.

Respecto a la contribución relativa y diferencial de cada posición estudiada a los resultados obtenidos para la afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina por los receptores D_{2S} y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala, decir que en el caso de la posición 5.43, esta corresponde a aminoácidos localizados en las proximidades del átomo de nitrógeno 5 en el anillo diazepina de clozapina y olanzapina. La introducción de la mutación Ser5.43Thr introduce un grupo más hidrofóbico que afectaría de forma equivalente a la afinidad de ambos ligandos al interaccionar con un área estructural similar de ambos antipsicóticos (Selent y col., 2014). Por eso se esperaría que la relevancia para el perfil de afinidad diferencial de los dos antipsicóticos sea mínima. Por el contrario, la posición 5.46 corresponde a residuos próximos al anillo tieno de la olanzapina y a un anillo bencénico de la clozapina. La introducción de la mutación Ser5.46Ala suprimiría el enlace del heteroátomo de azufre de olanzapina y el aminoácido Ala no sería capaz de formar ninguna interacción o enlace con ese heterociclo. En el caso de la clozapina el aminoácido Ala5.46 se colocaría de manera próxima al anillo bencénico no sustituido, existiendo entre ambos afinidad por ser ambos hidrofóbicos (Selent y col., 2014). Esta mutación (Ser5.46Ala) fue introducida previamente en otro receptor del grupo Ser5.43/Ser5.46, como es el receptor 5-HT_{2A}, lo que causó un incremento de afinidad de mesulergina (un ligando con un sistema policíclico parcialmente aromático) (Almaula y col., 1996a).

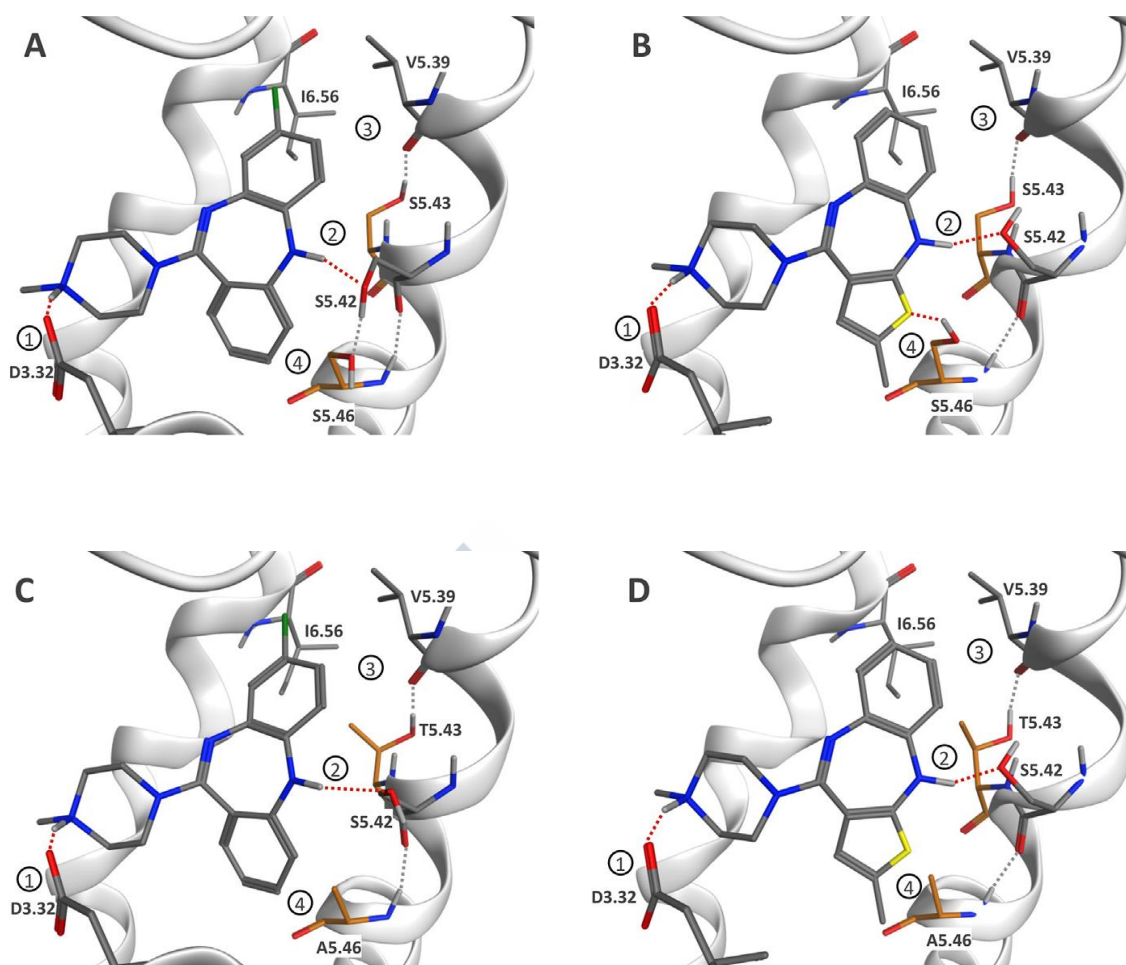


Fig. 54. Representación de las interacciones de clozapina (A, C) y olanzapina (B, D) con residuos del sitio de unión de los receptores D_{2S} no mutado (A, B) y D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala (C, D). El número 4) corresponde al enlace determinante del perfil de afinidades de clozapina y olanzapina en los receptores D_{2S} no mutado y D_{2S} -Ser5.43Thr/Ser5.46Ala. Los residuos mutados se muestran en naranja. Los enlaces mediante puente de hidrógeno entre antipsicótico y receptor se muestran en rojo. Se numeran las siguientes interacciones comunes a las cuatro situaciones: 1) el enlace iónico entre Asp3.32 y el átomo de N protonado del anillo piperazina, 2) el enlace por puente de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno N5 y Ser5.42; 3) interacciones hidrofóbicas con los residuos Val5.39 y Ile6.56. No se muestran las interacciones con residuos que forman el bolsillo hidrofóbico (Val3.33 y Phe6.52) y que también son comunes a las cuatro combinaciones de antipsicótico y receptor. (Selent y col., 2014).

En conclusión, la presencia de los residuos Ser5.43/Ser5.46 en el receptor D_2 es determinante para el perfil de afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina por este receptor, por lo que se considera verificada la hipótesis planteada en el presente apartado.

Por extensión y pese a carecer de datos experimentales sobre un modelo de receptor del grupo 2, podríamos concluir que esas posiciones resultan potencialmente determinantes para la afinidad y selectividad de estos antipsicóticos por los receptores de los grupos 1 y 2. De hecho, en el modelo del receptor 5-HT_{1A}, realizado a partir de los datos de la estructura del receptor 5-HT_{1B} en complejo con ergotamina (Wang y col., 2013; código PDB 4IAR) se observa que Ala en posición 5.46 se sitúa próxima al anillo tiofeno de olanzapina y a un anillo benceno de clozapina, existiendo una diferencia entre ambas interacciones similar a la ya vista para ambos ligandos sobre el receptor D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala, además de observarse otras interacciones que aparecen conservadas entre los modelos de ambos ligandos en complejo con los dos receptores (**Fig. 55**). A la vista de los determinantes estructurales para la unión de clozapina y olanzapina en el sitio de unión en el modelo del receptor 5-HT_{1A}, puede esperarse que la mutación Thr5.43Ser/Ala5.46Ser en este receptor produzca la inversión en la afinidad y selectividad de los dos antipsicóticos esperada de acuerdo con la hipótesis inicialmente planteada en este apartado.

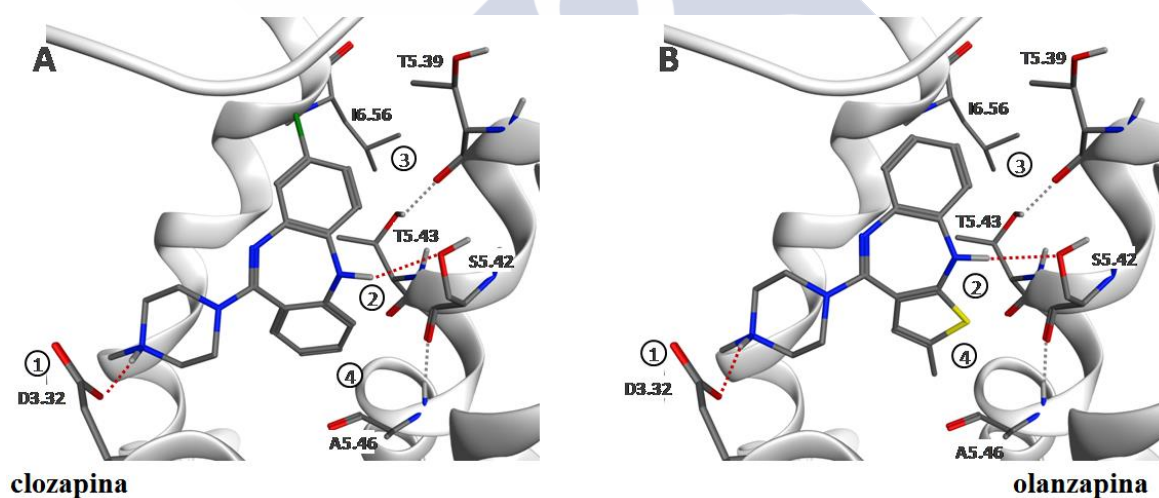


Fig. 55. Modelización de los complejos de clozapina (A) y olanzapina (B) con el receptor 5-HT_{1A}. Se numeran las siguientes interacciones comunes: 1) el enlace iónico entre Asp3.32 y el átomo de N protonado del anillo piperazina de clozapina y olanzapina, 2) el enlace por puente de hidrógeno entre el átomo de nitrógeno N5 y Ser5.42; 3) interacciones hidrofóbicas con los residuos Val5.39 y Ile6.56; 4) un anillo benceno de clozapina y el anillo tiofeno de olanzapina se sitúan próximos a Ala5.46 (tomado de Selent y col., 2014; Información suplementaria).

5.1.3. Relevancia del residuo en posición 3.33 para la unión de antipsicóticos a GPCRs diana y antidiana de su receptoroma

Mediante estudios de acoplamiento de los antipsicóticos clozapina y olanzapina en modelos de distintos GPCRs de su receptoroma basados en la estructura cristalina del receptor β_2 -adrenérgico 2RH1 se pudo determinar que el sistema tricíclico de ambos ligandos, en su interacción con los receptores 5-HT_{2A} y D₂, se encuentra emparedado en un sándwich hidrofóbico formado entre los residuos Phe6.52 y Val3.33 (Selent y col., 2008). Ese sándwich hidrofóbico del sistema tricíclico fue igualmente apreciado en los estudios de acoplamiento en el receptor D₂ modelizado sobre la más reciente estructura cristalina del receptor D₃ 3PBL (Selent y col., 2014). Los residuos Phe6.52 y Val3.33 se encuentran también en otros receptores del receptoroma de los antipsicóticos como los dopaminérgicos D₃ y D₄, de serotonina 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT₇ y adrenérgicos α_2 . Sin embargo, el análisis de afinidad de clozapina y olanzapina por distintos GPCRs de su receptoroma junto con el alineamiento múltiple de secuencias de esos GPCRs llevado a cabo por Selent y col. (2008) puso de manifiesto que, en general, clozapina y olanzapina presentan mayor afinidad por determinados GPCRs que presentan en posición 3.33 un residuo Tyr, tales como el receptor H₁ de histamina o receptores muscarínicos como el M₁ (Selent y col., 2008). El hecho de que la mayoría de los GPCRs diana de estos antipsicóticos presenten un residuo valina en posición 3.33 mientras que algunas de sus antidianas clínicamente relevantes, como receptores histaminérgicos y muscarínicos, presenten un residuo tirosina en la misma posición, resulta llamativo y justifica un estudio más detallado de dicha posición, pues una mejor comprensión de su papel en la interacción ligando-receptor podría ser útil en el diseño de nuevos fármacos antipsicóticos.

Se comenzó comprobando la importancia de la interacción de Val3.33 del receptor D_{2S} realizando una mutación a Tyr que, de acuerdo con la hipótesis planteada, debería incrementar la afinidad de clozapina y olanzapina por este receptor. Sin embargo, nuestros resultados mostraron una gran disminución, estadísticamente significativa, de la afinidad de ambos ligandos por el receptor D_{2S}-Val3.33Tyr (** $p < 0.01$ para la diferencia entre el valor de afinidad de clozapina por cada receptor y *** $p < 0.001$ en el caso de olanzapina). Por tanto, estos resultados en principio no apoyan la hipótesis inicial por la que se esperaba un aumento de la afinidad de los dos ligandos por el receptor D_{2S}-Val3.33Tyr.

Sin embargo, ayuda a interpretar nuestros resultados experimentales una observación detallada de la información cristalográfica que recientemente está siendo generada para diferentes GPCRs, tales como el receptor D₃ (Chien y col., 2010; código PDB 3PBL en complejo con eticloprida), el receptor histaminérgico H₁ (Shimamura y col., 2011; código. PDB 3RZE en complejo con doxepina) y el receptor M₂ (conteniendo Tyr3.33) (Haga y col., 2012; código PDB 3UON en complejo con N-quinuclidinilo bencilato). Resulta particularmente útil disponer de la estructura determinada mediante cristalización del receptor D₃ (Chien y col., 2010), cuya identidad de secuencia a nivel del sitio de unión con respecto al receptor D₂ alcanza un grado de homología del 85.7%.

En el caso del receptor D₃, la estructura 3PBL mostró que el anillo aromático del antagonista eticloprida encaja en una cavidad hidrofóbica formada, entre otros, por residuos de TM5 (Ser5.42 y Ser5.43), Val3.33 en TM3 e Ile183 en EL2 (Chien y col., 2010). Analizando las consecuencias conformacionales de la mutación Val3.33Tyr introducida en nuestro trabajo en el receptor D₂ en complejo con clozapina, sobre el modelo de este receptor basado en la estructura cristalográfica del receptor D₃ en complejo con eticloprida, podemos observar que el residuo tirosina adopta una orientación diferente a la esperada en el receptor D₂ (**Fig. 56**). Específicamente, la proximidad de EL2 al sitio de unión no permite una conformación de Tyr3.33 de manera que se oriente hacia el interior del sitio de unión, sino que la cadena lateral de este residuo se ve forzada a orientarse hacia el exterior del sitio de unión en dirección al segmento TM4, de manera que pierde la interacción con el ligando (**Fig. 56**). Basándose en estos datos estructurales, todo parece indicar que la pérdida de interacción del residuo en posición 3.33 con los sistemas tricíclicos de clozapina y olanzapina en el receptor D_{2s}-Val3.33Tyr podría explicar la disminución de afinidad de los dos ligandos por el receptor mutado. Consistentemente con esta interpretación, la estructura cristalográfica del receptor H₁ (receptor antidiana de antipsicóticos con un aminoácido Tyr en posición 3.33) en complejo con doxepina, un ligando que también posee un anillo tricíclico al igual que clozapina y olanzapina, permite apreciar una interacción de Tyr3.33 con los anillos del sistema tricíclico del ligando (**Fig. 57**) (Shimamura y col., 2011). La modelización de este complejo siguiendo las metodologías empleadas para modelizar el receptor D_{2s}-Val3.33Tyr y previamente descritas (Selent y col., 2014) muestran que, efectivamente, el residuo Tyr3.33 en el receptor H₁ puede acomodarse de manera que se

orienta adecuadamente para establecer interacciones con el ligando doxepina (**Fig. 57, panel B**).

En la misma línea, las estructuras cristalográficas de receptores muscarínicos M₂ y M₃, antidianas de los antipsicóticos, muestran también una interacción de Tyr3.33 con el ligando, concretamente con un anillo aromático del ligando N-quinuclidinilo bencilato en el caso del receptor M₂ (Haga y col., 2012, código PDB 3UON), y con un anillo tiofeno del fármaco tiotropio en el caso del receptor M₃ (Kruse y col., 2012; código PDB 4DAJ).

Así, en base a los datos estructurales y de modelización de que disponemos actualmente, podemos concluir que nuestros resultados experimentales apoyan una pérdida de interacción de la cadena lateral del aminoácido en posición 3.33 con el ligando en el receptor D_{2S}-Val3.33Tyr que justificaría la pérdida de afinidad observada para los antipsicóticos clozapina y olanzapina en nuestros experimentos. Esta situación parece que sería diferente en el caso de receptores antidia de antipsicóticos como el H₁ de histamina, cuyo residuo Tyr en posición 3.33 podría mantener interacciones con el sistema tricíclico de los ligandos que contribuyesen a estabilizar el complejo. De esta forma, nuestros datos experimentales apoyan la hipótesis de que la identidad del aminoácido en posición 3.33 en receptores diana y antidia de antipsicóticos puede jugar un papel relevante en las afinidades de los antipsicóticos por esos receptores.

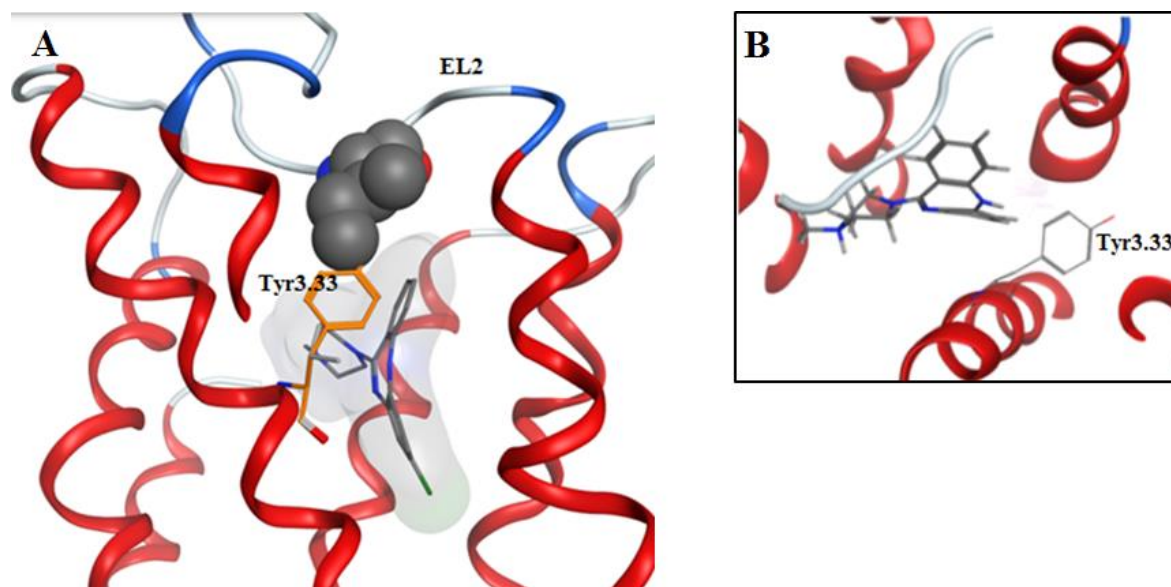


Fig. 56. A) Modelo del receptor D₂ en complejo con clozapina basado en la reciente estructura cristalográfica del receptor D₃, mostrando la mutación Val3.33Tyr. La cadena lateral de Tyr3.33 en el receptor mutado D₂-Val3.33Tyr se dispondría enfrente de Ile187 de EL2 donde no podría acomodarse. **B) Representación del reordenamiento de Tyr3.33 en el receptor D₂-Val3.33Tyr predicho por el modelo.** La cadena lateral de Tyr3.33 se dispone de forma que no interacciona con el ligando en el sitio de unión. (Selent J., Marti-Solano M., Pastor M., comunicación personal).

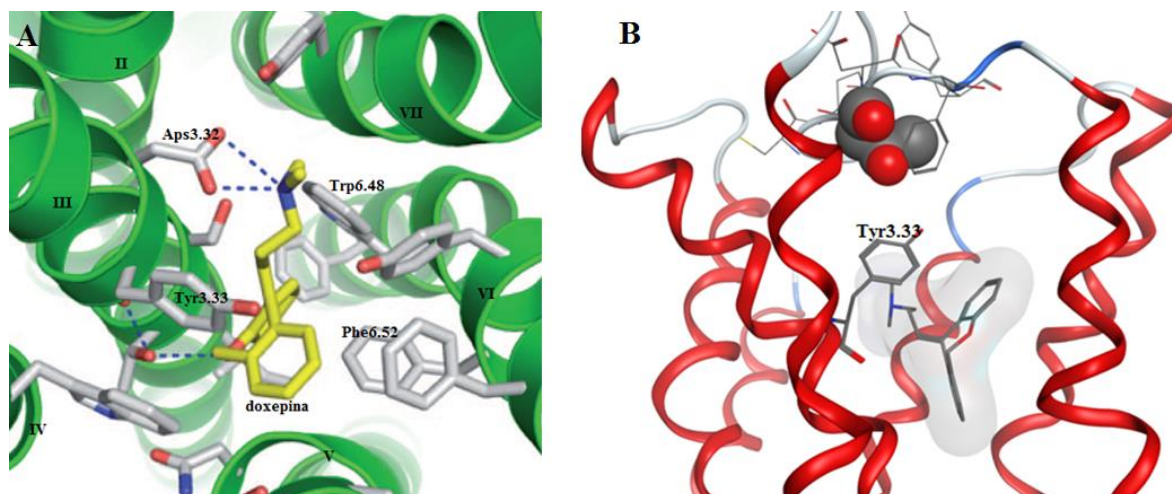


Fig. 57. A) Representación de la estructura cristalográfica del receptor H_1 en complejo con doxepina, donde se aprecia la interacción del residuo Tyr3.33 con el sistema tricíclico del ligando (Shimamura y col., 2011). El grupo fenólico de la cadena lateral de Tyr3.33 se dispone hacia el sitio de unión permitiendo la interacción con doxepina. B) Acoplamiento del ligando doxepina en el modelo del receptor H_1 basado en la estructura cristalográfica del complejo descrita por Shimamura y col. (2011), donde consistentemente se observa que la cadena lateral de Tyr3.33 puede acomodarse adecuadamente en el sitio de unión permitiendo su interacción con el ligando (Selent J., Marti-Solano M., Pastor M., comunicación personal).

5.2. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRs: TIEMPO DE RESIDENCIA DEL ANTIPSICÓTICO ATÍPICO LURASIDONA EN EL RECEPTOR DE SEROTONINA 5-HT₇

Lurasidona es un fármaco antipsicótico atípico de relativamente reciente aprobación en Europa indicado en el tratamiento de la esquizofrenia (Ficha técnica de Latuda, 2015). En Estados Unidos este fármaco está también indicado en el tratamiento de la fase depresiva del trastorno bipolar tipo I.

La determinación de los t_R de un fármaco en distintas dianas de interés permite la determinación del perfil de selectividad cinético de fármacos con perfil multirreceptorial, entre los cuales los fármacos para tratar patologías psiquiátricas como antipsicóticos o antidepresivos son el principal exponente. La determinación del valor de este parámetro cinético constituye un primer paso en la determinación del perfil de selectividad cinético de lurasidona, que permitirá extraer las primeras conclusiones farmacocinético-farmacodinámicas.

La determinación del t_R de lurasidona en el receptor 5-HT en nuestro trabajo se abordó haciendo uso del método de competición cinética descrito por Motulsky y Mahan (1984). Para la aplicación de este método, fue necesario determinar previamente las constantes k_{on} y k_{off} del radioligando [³H]-SB269970 en el receptor mediante ensayos cinéticos de asociación y disociación. Los valores de k_{on} y k_{off} de [³H]-SB269970 en el receptor 5-HT₇ obtenidos en nuestros ensayos resultaron ser comparables a los valores que aparecen en la literatura (Thomas y col., 2000) (ver resultados).

De cara a la interpretación de los resultados de los experimentos cinéticos llevados a cabo en el receptor 5-HT₇, es importante destacar que la representación de los valores de k_{obs} obtenidos para [³H]-SB269970 en función de la concentración de radioligando empleada mostró un mejor ajuste al modelo de regresión lineal (mecanismo A; Tummino y Copeland., 2008) que a un modelo hiperbólico (mecanismo B de Tummino y Copeland, 2008) (test F suma extra de cuadrados: $P > 0.05$) (ver resultados), lo que nos llevó a aceptar que la unión del radioligando [³H]-SB269970 al receptor 5-HT₇ sigue un mecanismo cinético de un solo paso (mecanismo A; Tummino y Copeland., 2008). El valor de $K_{d, cin}$ de 0.96 nM para [³H]-SB269970 calculado como el cociente entre los valores medios de k_{on} y

k_{off} obtenidos a partir de los experimentos de asociación y disociación llevados a cabo con el radioligando es similar al valor de K_d de [3H]-SB269970 en el equilibrio obtenido en el presente trabajo (1.53 nM), lo cual nos sirve como validación interna de los resultados obtenidos en nuestros experimentos cinéticos. Además, tanto los valores de K_d en el equilibrio como de la constante de disociación “cinética” ($K_{d,cin}$) obtenidos en nuestro trabajo, resultan comparables a valores de estas constantes publicados para este radioligando en este receptor (K_d en el equilibrio = 1.25 nM; $K_{d,cin}$ = 1.04 nM; Thomas y col., 2000).

Con respecto a la determinación de las constantes cinéticas de lurasidona y su tiempo de residencia en el receptor 5-HT₇, en nuestro trabajo se puso a punto el método de competición cinética, estableciendo el protocolo y el diseño experimental adecuados y realizando la validación del mismo. La validación se realizó del mismo modo en que se llevó a cabo en otros trabajos publicados (Dowling y Charlton, 2006; Guo y col., 2012), esto es, mediante comparación del valor de afinidad de lurasidona por el receptor 5-HT₇ obtenido en ensayos de competición en el equilibrio y el valor de $K_{d,cin}$ calculado como el cociente de los valores de k_{on} y k_{off} obtenidos en los ensayos de competición cinética. Así, el valor de $K_{d,cin}$ obtenido para lurasidona en el receptor 5-HT₇ en nuestro trabajo fue de 21.5 nM, que resulta similar al valor de K_i de 13.2 nM obtenido en nuestros ensayos de competición en el equilibrio. De esta forma, la comparación de estos valores nos permitió validar internamente la metodología y los resultados de nuestros experimentos cinéticos con lurasidona.

Con respecto a la determinación del t_R de lurasidona en el receptor 5-HT₇ se obtuvo un valor de 10 min. Estimamos que el tiempo de ocupación de lurasidona de este receptor puede considerarse como intermedio, por comparación y analogía con la clasificación de propuesta por Seeman (2014; ver más abajo).

Como consideraciones a tener en cuenta en cuanto al perfil farmacológico de lurasidona y el receptor 5-HT₇ como diana terapéutica, recordar que lurasidona presenta afinidad y distintos tipos de actividad por y en otros receptores de serotonina, entre ellos los receptores 5-HT_{1A} (agonismo) y 5-HT_{2A} (antagonismo), actividades que se han relacionado con la mejoría sintomatológica producida por fármacos antipsicóticos de segunda generación (Gray y Roth, 2007; Sumiyoshi y col., 2013). De forma destacada, lurasidona no presenta afinidad apreciable por receptores muscarínicos e histaminérgicos, lo que se ha

sugerido que podría explicar en parte la superioridad de lurasidona frente a quetiapina en el tratamiento de síntomas cognitivos en un ensayo clínico (Harvey y col., 2015a).

En cualquier caso, estas consideraciones no son en absoluto incompatibles con un papel importante del antagonismo 5-HT₇ en el tratamiento de sintomatología de la esquizofrenia. El receptor 5-HT₇ se relaciona, entre otras áreas, con el sistema de neuromodulación difuso de serotonina y la actividad del sistema límbico (Martín-Cora y Pazos, 2004), sistemas de interés en la esquizofrenia. Se ha relacionado el receptor 5-HT₇ con modulación de la actividad de neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral, aunque no se ha precisado el sitio de acción de sus antagonistas relacionado con esa modulación (ensayos *in vivo*; Mnie-Filali y col., 2007). Como ya se ha comentado, el receptor 5-HT₇ está presente en hipocampo donde se relaciona con modulación de la actividad neuronal con implicaciones en la memoria y aprendizaje (Hedlund y Sutcliffe, 2004). En general los métodos de evaluación de la función cognitiva utilizados en ensayos clínicos en esquizofrenia (Harvey y col., 2015a) evalúan como aspectos de interés memoria de trabajo, atención o aprendizaje visual y verbal, relacionadas con el funcionamiento, al menos en parte, de áreas como corteza, vía dopaminérgicas mesocortical y otras zonas del sistema límbico. De modo contrario a la relación de 5-HT₇ y efectos terapéuticos, el antagonismo de este receptor no se relaciona de forma destacada con algún efecto adverso.

El tiempo de residencia de un fármaco en su diana puede considerarse un parámetro farmacocinético. De hecho, se han propuesto modelos farmacocinéticos que integran los parámetros cinéticos de unión a receptores con parámetros de distribución a nivel de compartimentos corporales (modelo *target-mediated drug disposition*, TMDD; Peletier y Gabrielsson, 2009). Como parámetro farmacocinético que es, su influencia o alcance en un modelo de distribución a nivel corporal puede verse determinada por otros factores o parámetros que definen cada distribución de un fármaco concreto. Son ejemplos de éstos las características del paso a través de la barrera hematoencefálica, en el que algunos antipsicóticos pueden verse influidos por la glucoproteína-P (reducción de la penetración de olanzapina; Lin y col., 2006). Puede esperarse que la distribución inmediata hacia el SNC sea un factor cinético limitante del acceso al sitio de acción, y que tienda a acumularse en el mismo en administración crónica, dado los niveles de unión a proteínas plasmáticas (del 99%) (Micromedex [base de datos], 2014) y los valores que a modo de ejemplo se citan de

razón (*ratio*) de concentraciones fármaco libre en fluido intersticial de cerebro con respecto al plasma (para tiroridazina de 1; $K_{p,uu,brain}$; Hammarlund-Udenaes, 2014; Fridén, 2014) o razón (*ratio*) o coeficiente de partición de concentración total en cerebro con respecto a la total en plasma de 4 (para risperidona toma un valor de 4; $K_{p,brain}$; Uchida y col., 2014). Este hecho podría favorecer los fenómenos de *rebinding*, que se asocian con la prolongación en el tiempo de la acción farmacológica una vez eliminado el fármaco de otros compartimentos de distribución, al favorecerse la unión del fármaco en el tiempo desde compartimentos fisiológicos e histológicos secundarios que engloban los receptores diana (Vauquelin y Charlton, 2010).

Lurasidona presenta una vida media de eliminación plasmática de unas 18 h (Micromedex [base de datos], 2014). Conocido este dato, y a pesar de las consideraciones realizadas puede decirse que el t_R no determinará la duración de la acción farmacológica asociada al antagonismo 5-HT₇, en el sentido de que el t_R no será un factor que determine la acción farmacológica una vez que se haya producido la eliminación de los distintos compartimentos de distribución (Dahl y Akerud, 2013).

La caracterización del t_R de fármacos antipsicóticos puede ser importante para su caracterización farmacodinámica y explicación del perfil farmacológico. La descripción de este perfil que incorpora la dimensión tiempo define la *selectividad cinética* sobre dianas y antidianas: puede determinar la eficacia clínica y el perfil de seguridad. Algunos autores relacionan un t_R reducido de clozapina en el receptor D₂ con una menor aparición de efectos adversos extrapiramidales (Seeman, 2014). Concretamente en el caso de clozapina se considera que este tiempo reducido con respecto a otros fármacos como haloperidol permite la unión de dopamina y la neurotransmisión en áreas implicadas en el control de los movimientos motores.

En cuanto a la relación entre tiempo de residencia y modulación de la señalización serotoninérgica en el caso de lurasidona y el receptor 5-HT₇, se trata de un valor de tiempo de residencia que permitiría preservar una cierta función fisiológica del neurotransmisor endógeno serotonina, al existir una tasa de disociación que se podría calificar de intermedia por analogía con la clasificación expuesta por Seeman (2014) y que permitiría una cierta competición con la unión de la serotonina. Se considera, además, un t_R adecuado para conseguir un antagonismo consistente y prolongado en el tiempo durante una

administración crónica de cara a modular la neurotransmisión mediada por receptores no relacionados de forma de especial con la provocación de efectos adversos.

Con respecto a la actividad funcional, estudios recientes han encontrado una buena correlación entre la eficacia de agonistas en distintos ensayos funcionales celulares y su tiempo de residencia, a diferencia de lo observado entre eficacia y afinidad, que no correlacionan (Guo y col., 2012). Esto sugiere que los determinantes moleculares del tiempo de residencia de ligandos en sus dianas podrían estar relacionados con aquellos determinantes estructurales de su eficacia. Adicionalmente, se ha sugerido que el tiempo de residencia podría estar relacionado con aspectos de selectividad funcional o agonismo sesgado de ligandos (Roed y col., 2014), aunque en el caso de lurasidona, el hecho de tratarse de un antagonista limita *a priori* la relevancia de estos aspectos. Por otra parte, se han descrito antagonistas del receptor 5-HT₇ (SB269970) que presentan actividad de agonismo inverso (Gellynck y col., 2013), algo que puede ser relevante en fármacos antagonistas de este receptor dado que presenta una elevada actividad constitutiva en determinados sistemas (Krobert y Levy, 2002; Krobert y col., 2006). Sin embargo, no hemos encontrado en la literatura indicios de que lurasidona pueda comportarse como agonista inverso del receptor 5-HT₇, por lo que resulta difícil especular acerca de la posible relevancia del tiempo de residencia de lurasidona en 5-HT₇ sobre la actividad constitutiva del receptor.

5.3. ESTUDIO DE LAS CINÉTICAS DE INTERACCIÓN LIGANDO-RECEPTOR EN GPCRS: RELEVANCIA DEL RESIDUO HIS264 EN EL3 PARA LAS CINÉTICAS DE ASOCIACIÓN Y DISOCIACIÓN DE [³H]-ZM241385 AL RECEPTOR DE ADENOSINA A_{2A}

Con respecto a la interacción del ligando ZM241385 con el receptor A_{2A}, conviene mencionar que se ha descrito que el sitio de unión en este receptor se encuentra muy desplazado hacia la mitad superior en comparación con otros GPCRs, haciendo que el ligando ZM241385 interaccione con residuos de los bucles EL2 y EL3 (Jaakola y col., 2008; Wheatley y col., 2012). Asimismo, los estudios de simulación de dinámica molecular de Rodríguez y col., (2011) en los receptores A_{2A} y A_{2B} describen diferencias en la interacción que se establece entre los aminoácidos 5.30 (EL2) y 7.29 (EL3) en ambos receptores. Teniendo presente la distinta naturaleza de la interacción Glu-His (puente de hidrógeno o iónica) en A_{2A} y Glu-Asn (polar) en A_{2B} (Rodríguez y col., 2011) y la posible relación de dicha interacción con el cierre de los bucles EL2 y EL3 en el receptor A_{2A} y con la estabilización del complejo con el antagonista A_{2A} selectivo ZM241385, se planteó determinar la posible relevancia de la interacción Glu5.30-His7.29 en el receptor A_{2A} para las cinéticas de interacción del radioligando [³H]-ZM241385 con el receptor y para el t_R del complejo ligando-receptor.

Comenzado por los ensayos de saturación en el equilibrio, el valor de afinidad (K_d) de [³H]-ZM241385 por el receptor A_{2A} obtenido resultó casi idéntico al descrito previamente en la literatura (Guo y col., 2012). Sobre el receptor mutado A_{2A}-His7.29Asn el radioligando experimenta una pérdida de afinidad de aproximadamente 8 veces, lo que resulta en una diferencia de afinidades por ambos receptores estadísticamente significativa (** $p < 0.01$, test t no pareado, dos colas). Esta pérdida de afinidad podría ser reflejo de un aumento en la velocidad de disociación del ligando, una disminución en su velocidad de asociación, o de cambios no paralelos en ambos parámetros cinéticos.

Para la comprobación de la hipótesis inicial se llevaron a cabo ensayos cinéticos de disociación del radioligando [³H]-ZM241385 en los receptores A_{2A} no mutado y A_{2A}-His7.29Asn y determinándose el t_R del ligando en ambos receptores. Los ensayos cinéticos se realizaron a 4°C, una temperatura que mejora la precisión y reproducibilidad de la determinación experimental en este sistema receptorial (Guo y col., 2012). El valor de tiempo de residencia de ~71 min obtenido para el radioligando en el receptor no mutado en

nuestro estudio, calculado como la inversa de k_{off} , es prácticamente idéntico al valor de t_R de 71 min para el mismo complejo ligando-receptor descrito en la literatura empleando la misma metodología (ensayo cinético de disociación de radioligandos) y en condiciones experimentales comparables a las nuestras (4°C) (Guo y col., 2014). Sobre el receptor mutado A_{2A}-His7.29Asn, el radioligando experimenta una aceleración en su velocidad de disociación claramente apreciable mediante la simple observación de los perfiles de las curvas de disociación, con un incremento de aproximadamente 11 veces de su k_{off} (t_R de 6.59 min) lo que resulta en una diferencia estadísticamente significativa respecto al receptor no mutado (** $p < 0.01$, test t no pareado, dos colas). Estos resultados sugieren que la pérdida de afinidad observada para el radioligando por el receptor mutado es en gran medida un reflejo de la aceleración del proceso de disociación del ligando, esto es, de una mayor facilidad para salir del bolsillo de unión. De esta manera, los resultados se interpretan como indicativos de una relevancia determinante de la interacción Glu5.30-His7.29 para la duración del complejo entre el ligando [³H]-ZM241385 y el receptor A_{2A}, interacción que no reproduce adecuadamente el par Glu5.30-Asn7.29 en las mismas posiciones y que, por tanto, permite hipotetizar sobre posibles cinéticas de disociación rápidas de ligandos en el receptor A_{2B}.

En el caso del receptor A_{2A} no mutado, la ejecución de los experimentos de asociación permitió extraer un valor medio de k_{on} de $4.4 \pm 0.58 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, calculado directamente a partir de los datos de k_{obs} y k_{off} obtenidos experimentalmente y teniendo en cuenta la concentración de radioligando empleada en cada experimento. Este valor resultó similar a valores de k_{on} [³H]-ZM241385 en el receptor A_{2A} descritos en la literatura, obtenidos en condiciones experimentales similares a las nuestras ($1.50 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; $2.0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Guo y col., 2012). Así, los valores de k_{off} y k_{on} del radioligando en el receptor no mutado obtenidos experimentalmente en nuestro trabajo arrojan un valor de $K_{\text{d,cin}}$ ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) de 0.35 nM, que resultó ser próximo al valor de K_{d} obtenido en condiciones de equilibrio (0.65 nM), validando nuestros protocolos experimentales en ensayos cinéticos. Esta buena correlación de valores en el receptor no mutado nos permite estimar un valor de k_{on} para el receptor A_{2A}-His7.29Asn de $3.0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ indirectamente a partir de los datos medios de K_{d} en el equilibrio y k_{off} obtenidos experimentalmente.

No obstante, en el caso del receptor A_{2A}-His7.29Asn, la k_{on} de [³H]-ZM241385 pudo ser determinada mediante regresión lineal a partir de los valores de k_{obs} obtenidos experimentalmente en estudios de asociación empleando distintas concentraciones de radioligando. Esta aproximación reportó por una parte un valor de k_{off} de 0.11 min⁻¹, muy próximo al valor medio de k_{off} obtenido directamente a partir de experimentos de disociación (0.15 min⁻¹). Por otra parte, el valor de k_{on} extraído fue de $1.96 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, similar al valor de $3.0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ estimado indirectamente. Esto está de nuevo de acuerdo con que la pérdida de afinidad reflejada por la K_d del radioligando en el receptor mutado proviene en mayor medida de una rápida disociación del complejo, y no de un importante cambio en la cinética de asociación. Estos valores de k_{off} y k_{on} calculados mediante regresión para el receptor mutado arrojan un valor de $K_{d, cin}$ de 5.62 nM, similar al valor de K_d 4.98 nM obtenido experimentalmente a partir de ensayos de saturación en el equilibrio, validando igualmente de forma interna los resultados de nuestros experimentos cinéticos. Adicionalmente, la representación de los valores de k_{obs} obtenidos en ensayos de asociación en el receptor A_{2A}-His7.29Asn para distintas concentraciones de [³H]-ZM241385 nos permitió comprobar su buen ajuste a un modelo de regresión lineal (ver resultados), lo que nos llevó a considerar un mecanismo de unión radioligando-receptor de un solo paso (mecanismo A de Tummino y Copeland, 2008).

Nuestra interpretación estructural de los resultados se basa principalmente en la información estructural aportada por el trabajo de Rodríguez y col., (2011). En este trabajo se describe la interacción entre el aminoácido en posición 5.30 (EL2) de los receptores A_{2A} y A_{2B} y el aminoácido en posición 7.29 (EL3) de A_{2A} (His) y A_{2B} (Asn). La interacción Glu5.30-His7.29 modelizada por Rodríguez y col. (2011) en el receptor A_{2A} contempla dos estados de His: neutro y cargado positivamente. En el primer caso, la interacción Glu5.30-His7.29 se rompe fácilmente durante las simulaciones con el receptor desocupado (forma apo), lo que sugiere que, en esta situación, el acceso al bolsillo de unión desocupado del receptor por parte de ligandos difusibles se vería facilitado por la apertura de los bucles EL2 y EL3. En el segundo caso, la interacción Glu5.30-His7.29 es frecuentemente observada en el receptor desocupado (en torno al 60% del tiempo de simulación). La simulación en presencia del ligando ZM241385 (receptor en forma holo) en esta situación (His cargada positivamente) estabiliza el cierre en forma de tapa formado por EL2 y EL3 que se observa en la estructura cristalográfica 3EML del complejo A_{2A}:ZM241385, la cual sirvió de base

para la modelización de los receptores en el trabajo de Rodríguez y col., (2011), favoreciendo la estabilización del complejo A_{2A}-ZM241385. Así, las simulaciones de dinámica molecular indican que la interacción Glu5.30-His7.29 gobierna la estabilidad de la “tapa” conformada por los bucles EL2 y EL3 sobre el bolsillo de unión.

La diferencia entre las interacciones modelizadas por Rodríguez y col. (2011) en el receptor A_{2A} (entre los aminoácidos Glu5.30 e His7.29) y o A_{2B} (entre los aminoácidos Glu5.30 y Asn7.29) sería análoga a la diferencia entre la interacción en el receptor A_{2A} no mutado y mutado A_{2A}-His7.29Asn estudiados experimentalmente en nuestro trabajo, por lo que podríamos concluir que esa diferencia sería la principal causante de las diferencias observadas entre los t_R del ligando [³H]-ZM241385 sobre ambos receptores en el presente estudio. Este carácter determinante puede explicarse por la unión más estable y duradera de los aminoácidos Glu5.30-His7.29 con respecto a la que forman Glu5.30-Asn.7.29 en el receptor A_{2A}, de forma que, como consecuencia, la conformación más cerrada de los bucles extracelulares sobre el bolsillo de unión del receptor estabiliza al ligando unido dificultando su salida del mismo, resultando en un mayor tiempo de residencia de ZM241385 en el receptor no mutado.

En general, las diferencias en t_R entre complejos ligando-receptor se relacionan teóricamente con determinados factores físicos-químicos como la accesibilidad del bolsillo de unión a ligandos difusibles o el tamaño molecular del propio ligando (Pan y col., 2013). En el caso del receptor A_{2A}, la localización del bolsillo de unión muy próxima a la zona extracelular, el hecho de que EL2 sea la segunda región con mayor movilidad del receptor A_{2A} de acuerdo a resultados de dinámica molecular (Rodríguez y col., 2011), y el hecho de que EL3 presenta una movilidad reducida, son aspectos estructurales que deben considerarse a la hora de estimar la cinética de unión de ligandos. En el caso de la interacción de este receptor y el ligando ZM243185 y con respecto a EL3, el cierre de EL2, tras estabilizarse la unión de Glu5.30 con el aminoácido en posición 7.29, favorecería especialmente las interacciones descritas de residuos como Leu7.32 y Met7.35 situados en EL3 con el grupo fenol del ligando (Jaakola e Ijzerman, 2011). La aproximación de EL2 a EL3 y al bolsillo de unión permitiría también la formación de interacciones de Phe168^{5.29} y Glu169^{5.30} con el ligando (Jaakola y col., 2008). Así, diversas interacciones observadas en la estructura cristalográfica del complejo A_{2A}:ZM241385 que implican a residuos de los

bucles extracelulares contribuirían a producir una estabilización del ligando ZM241385 en el bolsillo de unión del receptor.

Algunas diferencias importantes en la interacción de EL2 con los ligandos encontradas en las distintas estructuras de A_{2A} determinadas mediante cristalografía con respecto a la de Jaakola (2008) comprenden un desplazamiento de los bucles extracelulares (entre ellos EL2), alejándose del bolsillo de unión para dar cabida a los sustituyentes voluminosos del agonista UK 432097 (Jacobson, 2013; Xu y col., 2011). Otros agonistas como adenosina y NECA también interaccionan con EL2 (Lebon y col., 2011). Estas diferencias pueden estar relacionadas con la distinta identidad de los ligandos co-cristalizados. Sin embargo, existe una diferencia fundamental con la otra estructura del complejo A_{2A}-ZM241385 descrita por Doré y col., (2011) en cuanto a la orientación del grupo fenólico de ZM241385, en este caso dirigido hacia las proximidades de los extremos extracelulares de TM1, TM2 y TM7. Las diferencias se atribuyen a la flexibilidad del área extracelular y a las distintas condiciones de cristalización (Doré y col., 2011). Aun así, esta diferencia no descarta una influencia decisiva del cierre de los bucles EL2-EL3 en la cinética de interacción de ligandos en el receptor A_{2A}.

Con respecto a las características del ligando y su relación con el tiempo de residencia del mismo, la presencia en la estructura de un anillo de ribosa en compuestos como UK 432097 se ha asociado a un considerablemente mayor t_R por interacción con aminoácidos de la zona más profunda del bolsillo de unión, tales como His7.43, Ser7.42 o Leu6.51 (Guo y col., 2012; Xu y col., 2011). Con mayor relevancia para la presente hipótesis, la longitud (dos átomos de C) de la cadena alifática uniendo la triazina y el fenol en una serie de derivados de ZM241385, así como la presencia de un átomo de N en el extremo en un anillo piperazina análogo al grupo fenol del mismo ligando, se asocian con un t_R prolongado determinado en condiciones experimentales similares a las que fueron utilizadas en el presente trabajo (Guo y col., 2014). En estos ligandos, el alargamiento de la cadena o la supresión del átomo de N piperazínico produjo una reducción del t_R de gran magnitud (Guo y col., 2014). De esta forma, los citados estudios han permitido extraer conclusiones en cuanto a relaciones estructura-cinética (*Structure–Kinetics Relationships*, SKR) en el receptor A_{2A}.

La asociación entre t_R y movilidad de los bucles extracelulares ya ha sido señalada como relevante en otros GPCRs y ligandos. Para otros receptores como los receptores muscarínicos M_3 y M_2 se encontró una diferencia entre los dos receptores en cuanto a la flexibilidad de EL2, siendo mayor la del receptor M_2 . Así, en simulaciones de dinámica molecular se ha observado que EL2 permanece durante más tiempo en un estado de conformación abierto en el receptor M_2 en comparación con M_3 . Esto se relaciona con una salida más fácil del ligando fuera del bolsillo de unión, lo que se relacionó con el t_R más reducido del antagonista muscarínico y broncodilatador de larga duración de acción tiotropio en el receptor M_2 con respecto al receptor M_3 (Kruse y col, 2013; Pan y col., 2013). Esta selectividad cinética de tiotropio por M_3 con respecto a M_2 se ha señalado como relevante para su perfil clínico (Sykes y col. 2012). Estas observaciones que se comentan guardan evidentes similitudes con las diferencias en los tiempos de residencia obtenidos en el presente trabajo y su relación con la mayor o menor movilidad de EL2 en los receptores A_{2A} y A_{2A} -His7.29Asn.

Por último, mencionar que con respecto a EL2 del receptor A_{2A} , ya se había propuesto previamente una función de control de acceso de ligandos al sitio de unión, su implicación en la unión de ligandos o la selectividad de ligandos, entre otros aspectos (Seibt y col., 2013). También existen referencias previas en algunos trabajos a la posible importancia de la identidad de los residuos en bucles extracelulares de receptores de adenosina en relación al acceso y unión de ligandos a los receptores. Un trabajo previo ha señalado que el carácter polar de una buena parte de los aminoácidos localizados en la entrada al sitio de unión del receptor A_{2A} , y especialmente de la pareja Glu5.30-His7.29, en contraposición al carácter apolar de residuos como una Val en el receptor A_3 que ocupa una posición análoga a Glu5.30 en A_{2A} , sería relevante para diferencias en el acceso y la unión de ligandos en estos dos receptores (Lenzi y col., 2009).

5.4. CONCLUSIONES

1. La herramienta generada, el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys, ha permitido investigar experimentalmente la relevancia del aminoácido 3.36 para el perfil de afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina por GPCRs de su receptoroma.
2. La afinidad de [³H]-ketanserina por el receptor 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys determinada en ensayos de saturación y la afinidad de serotonina por el mismo receptor determinada en ensayos de competición fueron similares a las descritas previamente por otros autores sobre un receptor 5-HT_{2A} portando la misma mutación.
3. Los datos de afinidad obtenidos para clozapina y olanzapina sobre los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2A}-Ser3.36Cys indican que el aminoácido Ser3.36 del receptor 5-HT_{2A} no es determinante para el perfil de afinidad preferente de clozapina y olanzapina por el receptor 5-HT_{2A} con respecto a receptores del grupo Cys3.36. Por extensión, se podría concluir que el aminoácido en posición 3.36 no resulta definitorio de los grupos de GPCRs Ser3.36 y Cys3.36 establecidos en base a secuencia y perfil de afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina.
4. La herramienta generada, el receptor D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala, ha permitido investigar experimentalmente la relevancia de los aminoácidos en posición 5.43 y 5.46 para el perfil de afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina por GPCRs de su receptoroma.
5. Nuestros resultados experimentales para clozapina y olanzapina en los receptores D_{2S} y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala han permitido determinar que la orientación del N10 hacia el exterior del bolsillo de unión es la forma de posicionamiento predominante de ambos ligandos.

6. Los resultados obtenidos mediante ensayos de competición en el equilibrio han confirmado la relevancia de los aminoácidos en posición 5.43 y 5.46 para el perfil de afinidad selectivo de clozapina y olanzapina por el receptor D₂. Por extensión, se podría concluir que estas posiciones son potencialmente determinantes para la afinidad y selectividad de estos antipsicóticos por los GPCRs de los grupos 1 (Ser5.43/Ser5.46) y 2 (aminoácidos más hidrofóbicos en estas posiciones).
7. Nuestros resultados experimentales para clozapina y olanzapina en los receptores D_{2S} y D_{2S}-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala están de acuerdo con los resultados de modelización de los receptores D₂, D₂-Ser5.43Thr/Ser5.46Ala y 5-HT_{1A} en complejo con ambos antipsicóticos. Estos modelos indican que la posición 5.46 sería la más determinante de las dos estudiadas para el perfil de afinidad y selectividad de clozapina y olanzapina por los receptores modelizados.
8. La herramienta generada, el receptor D_{2S}-Val3.33Tyr, ha permitido demostrar la importancia del aminoácido en posición 3.33 para la afinidad de clozapina y olanzapina por el receptor D₂.
9. Nuestros resultados experimentales para clozapina y olanzapina en los receptores D_{2S} y D_{2S}-Val3.33Tyr, están de acuerdo con los resultados de modelización de los receptores D₂ y D₂-Val3.33Tyr en complejo con estos antipsicóticos, en modelos receptoriales basados en estructuras cristalográficas recientemente publicadas. Estos modelos indican la pérdida de interacción del ligando clozapina con el aminoácido Tyr3.33 en el receptor D₂ mutado, mientras que predicen que una antidiaria de antipsicóticos conteniendo Tyr en posición 3.33, como es el receptor H₁, es capaz de establecer una fuerte interacción con los ligandos a través de este aminoácido, lo que podría contribuir a la alta afinidad de los ligandos por este receptor.

10. Nuestros resultados experimentales para clozapina y olanzapina en los receptores D_{2S} y D_{2S} -Val3.33Tyr, junto con los más recientes resultados de modelización, indican que la identidad del aminoácido 3.33 puede ser relevante para la afinidad y selectividad de los antipsicóticos por GPCRs diana y antidiana de su receptoroma.
11. Se han determinado las constantes de velocidad de asociación y disociación del radioligando [3 H]-SB269970 sobre el receptor 5-HT $_7$, obteniéndose valores de acuerdo con la literatura, así como coherentes con los valores de afinidad (K_d) en el equilibrio del radioligando. Esto valida los experimentos cinéticos de asociación y disociación llevados a cabo. Los resultados son indicativos de un mecanismo cinético de unión radioligando-receptor de un solo paso.
12. Se ha establecido el método competición cinética descrito por Motulsky y Mahan (1984) para la determinación de constantes de velocidad de asociación y disociación de ligandos no marcados, aplicado al receptor 5-HT $_7$ y empleando el radioligando [3 H]-SB269970, en un formato de ensayo implementable en actividades de cribado de alto rendimiento.
13. Se han determinado las constantes de velocidad de asociación y disociación de lurasidona en el receptor 5-HT $_7$ mediante el método indicado anteriormente obteniéndose valores consistentes con el valor de afinidad (K_i) obtenido en ensayos de competición en el equilibrio, lo que sirvió como validación del método establecido.
14. Se ha determinado el t_R de lurasidona en el receptor 5-HT $_7$, lo que constituye un primer paso en la caracterización del perfil de selectividad cinética de este antipsicótico.
15. El t_R de 10 min en el receptor 5-HT $_7$ obtenido para lurasidona en nuestros ensayos, se puede considerar adecuado desde el punto de vista farmacológico

para lograr eficacia terapéutica derivada del antagonismo de una diana no asociada a reacciones adversas destacables, manteniendo una cierta acción fisiológica del neurotransmisor endógeno serotonina.

16. Considerando parámetros farmacocinéticos conocidos de lurasidona, el valor de 10 min de t_R obtenido para el fármaco en el receptor 5-HT₇ sugiere que este parámetro no será determinante para la duración de su acción farmacológica sobre este receptor una vez que se haya eliminado el fármaco del compartimento diana.
17. La herramienta generada, el receptor A_{2A}-His7.29Asn, ha permitido investigar experimentalmente la relevancia del aminoácido en posición 7.29 del receptor A_{2A} para las cinéticas de asociación y disociación del radioligando [³H]-ZM241385 en este receptor, y su posible carácter diferencial respecto al receptor A_{2B} en términos de cinética de unión de ligandos.
18. Se han determinado las constantes de velocidad de asociación y disociación del radioligando [³H]-ZM241385 sobre el receptor A_{2A} no mutado, obteniéndose valores de acuerdo con la literatura así como coherentes con los valores de afinidad (K_d) en el equilibrio del radioligando. Esto valida los experimentos cinéticos de asociación y disociación llevados a cabo.
19. Se han determinado las constantes de velocidad de asociación y disociación del radioligando [³H]-ZM241385 sobre el receptor A_{2A}-His7.29Asn, obteniéndose valores indicativos de un mecanismo cinético de unión radioligando-receptor de un solo paso.
20. Nuestros resultados experimentales de ensayos cinéticos de [³H]-ZM241385 en los receptores A_{2A} y A_{2A}-His7.29Asn, indican que la identidad del aminoácido 7.29 es determinante para la cinética de disociación del radioligando y sugieren que la pérdida de afinidad observada para el

radioligando por el receptor mutado es consecuencia en gran medida de la aceleración de su disociación. Los resultados son indicativos de un mecanismo cinético de unión radioligando-receptor de un solo paso.

21. De acuerdo con resultados de simulaciones de dinámica molecular en los receptores A_{2A} y A_{2B} disponibles, nuestros resultados experimentales son compatibles con una interacción Glu5.30-His7.29 que posibilita una conformación cerrada de los bucles extracelulares EL2 y EL3 sobre el bolsillo de unión del receptor, estabilizando el complejo ZM241385-receptor A_{2A}. Esa interacción no sería adecuadamente reproducida por el par de aminoácidos Glu5.30-Asn7.29 en las mismas posiciones del receptor A_{2A}-His7.29Asn. Por tanto, nos parece esperable que las cinéticas de disociación de los ligandos en el receptor A_{2B} serán rápidas.





6. BIBLIOGRAFÍA





BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AI, Hedlund PB, Huang XP, Tran TB, Meltzer HY, Roth BL. Amisulpride is a potent 5-HT₇ antagonist: relevance for antidepressant actions in vivo. *Psychopharmacology*. 2009; 205(1): 119–128.
- Aberg KA, Liu Y, Bukszár J, McClay JL, Khachane AN, Andreassen OA y col. A comprehensive family-based replication study of schizophrenia genes. *JAMA Psychiatry*. 2013; 70(6): 573-81.
- Adell A, Bortolozzi A, Díaz-Mataix LL, Noemí S, Celada P, Artigas F. Serotonin interaction with other transmitter systems. En: Müller CP, Jacobs BL, editores. *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. 1ª Ed. EE.UU.: Elsevier, Academic Press; 2010. p. 259-276.
- Adrover-Roig D, Muñoz Marrón E, Sánchez-Cubillo I, Miranda García R. Neurobiología de los sistemas de aprendizaje y memoria. En: Redolar D. *Neurociencia Cognitiva*. 1ª Ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2014.
- Álamo C, Cuenca E, López F, García P. Neurolepticos y fármacos antipsicóticos. Aspectos farmacológicos de la evolución del tratamiento de la esquizofrenia. En: Chinchilla A. *Las esquizofrenias. Sus hechos y valores clínicos y terapéuticos*. 1ª Ed. Barcelona: Elsevier, Masson; 2007. p. 209-217.
- Álamo C, Cuenca E, López F. Farmacología básica de los antipsicóticos. Mecanismos de acción implicados en efectos terapéuticos y adversos. En: Gastó C. *Esquizofrenia y Trastornos Afectivos. Avances en el diagnóstico y la terapéutica*. 1ª Ed. Madrid. Editorial Médica Panamericana; 2007a. p. 63-74.
- Álamo C, Cuenca E, López-Muñoz F. Avances en psicofarmacología y perspectivas de futuro. En: Avendaño MC, Tamargo J, editores. *Nuevos avances en medicamentos*. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 2004. p. 351-431.
- Alex KD, Pehek EA. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther*. 2007; 113(2): 296-320. Revisión.

- Alexander SP, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Spedding y col. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: G Protein-Coupled Receptors. *Br J Pharmacol.* 2013; 170: 1459–1581.
- Alexander SP, Millns PJ. [³H]-ZM241385, an antagonist radioligand for adenosine A_{2A} receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol.* 2001; 411 (3): 205-10.
- Allen JA, Yadav PN, Roth BL. Insights into the regulation of 5-HT_{2A} serotonin receptors by scaffolding proteins and kinases. *Neuropharmacology.* 2008; 55(6): 961-8.
- Almaula N, Ebersole BJ, Ballesteros JA, Weinstein H, Sealfon SC. Contribution of a helix 5 locus to selectivity of hallucinogenic and nonhallucinogenic ligands for the human 5-hydroxytryptamine_{2A} and 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors: direct and indirect effects on ligand affinity mediated by the same locus. *Mol Pharmacol.* 1996a; 50(1): 34-42.
- Almaula N, Ebersole BJ, Zhang D, Weinstein H, Sealfon SC. Mapping the binding site pocket of the serotonin 5-hydroxytryptamine(2A) receptor. Ser3.36(159) provides a second interaction site for the protonated amine of serotonin but not of lysergic acid diethylamide or bufotenin. *J Biol Chem.* 1996; 271(25): 14672-5.
- Aloyo VJ, Berg KA, Spampinato U, Clarke WP, Harvey JA. Current status of inverse agonism at serotonin (2A) (5-HT_{2A}) and 5-HT_{2C} receptors. *Pharmacol Ther.* 2009; 121(2): 160-73.
- Anthes JC, Gilchrest H, Richard C, Eckel S, Hesk D, West RE Jr y col. Biochemical characterization of desloratadine, a potent antagonist of the human histamine H₁ receptor. *Eur J Pharmacol.* 2002; 449(3): 229-37.
- Antipsicóticos. N05A En: Catálogo de Medicamentos. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (CGCOF); 2015. p. 2287-2339.
- Armstrong D, Strange PG. Dopamine D₂ receptor dimer formation: evidence from ligand binding. *J Biol Chem.* 2001; 276(25): 22621-9.
- Arnold SE, Talbot K, Hahn CG. Neurodevelopment, neuroplasticity, and new genes for schizophrenia. *Prog Brain Res.* 2005; 147: 319-345.

- Atanes P, Lacivita E, Rodríguez J, Brea J, Burgueño J, Vela JM, Castro M. The arylpiperazine derivatives N-(4-cyanophenylmethyl)-4-(2-diphenyl)-1-piperazinehexanamide and N-benzyl-4-(2-diphenyl)-1-piperazinehexanamide exert a long-lasting inhibition of human serotonin 5-HT₇ receptor binding and cAMP signaling. *Pharmacol Res Perspect*. 2013; 1(2): 1-13.
- Avlani VA, Gregory KJ, Morton CJ, Parker MW, Sexton PM, Christopoulos A. Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *J Biol Chem*. 2007; 282(35): 25677-86.
- Ballesteros JA, Weinstein H. Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci*. 1995; 25: 366-428.
- Banihashemi, B, Albert PR. Dopamine-D_{2S} receptor inhibition of calcium influx, adenylyl cyclase, and mitogen-activated protein kinase in pituitary cells: distinct G_α and G_{βγ} requirements. *Molecular Endocrinology*. 2002; 16(10): 2393-2404.
- Bard JA, Zgombick J, Adham N, Vaysse P, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem*. 1993; 268(31): 23422-6.
- Bayburt TH, Vishnivetskiy SA, McLean MA, Morizumi T, Huang CC, Tesmer JJ y col. Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. *J Biol Chem*. 2011; 286(2): 1420-8.
- Beaulieu JM, Espinoza S, Gainetdinov RR. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol*. 2015; 172(1): 1-23.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR, Caron MG. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009; 49: 327-47.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2011; 63: 182-217.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR y col. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an

- AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 5099–5104.
- Benedí J, Iglesias I. Fármacos antipsicóticos. En: *Terapéutica farmacológica de los trastornos del sistema nervioso. Programa de Actualización en Farmacología y Farmacoterapia*. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2012. p. 215-240.
- Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, Clarke WP. Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol*. 1998; 54(1): 94-104.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, I.N y col. The Protein Data Bank *Nucleic Acids Research*. 2000; 28: 235-242. www.rcsb.org
- Bernardo M, Vioque M. Esquizofrenia. En: Vallejo Ruiloba, director. *Introducción a la Psicopatología y la Psiquiatría*. 8ª Ed. Barcelona. Ed. Elsevier Masson; 2015. p. 226-234.
- Bertolino A, Breier A, Callicott JH, Adler C, Mattay VS, Shapiro M y col. The relationship between dorsolateral prefrontal neuronal N-acetylaspartate and evoked release of striatal dopamine in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 22: 125-132.
- Bhattacharya A, Sankar S, Panicker MM. Differences in the C-terminus contribute to variations in trafficking between rat and human 5-HT_{2A} receptor isoforms: identification of a primate-specific tripeptide ASK motif that confers GRK-2 and beta arrestin-2 interactions. *J Neurochem*. 2010; 112 (3):723-32.
- Blasco-Fontecilla H, Baca-Garcia E, de Leon J. Do atypical antipsychotic drugs reduce the risk of ischemic heart disease and mortality? Possible role of 5-HT_{2A} receptor blockade. *Schizophrenia Research*. 2010; 119(1-3): 160–163.
- Bockaert J, Claeysen S, Dumuis A, Marin P. Clasificación and Signaling Characteristics of 5-HT receptors. En: Müller CP, Jacobs BL. *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. 1ª Ed. USA: Elsevier, Academic Press; 2010. p. 102.

- Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 1999; 18(7): 1723-9. Revisión.
- Bokoch MP, Zou Y, Rasmussen SG, Liu CW, Nygaard R, Rosenbaum DM y col. Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G protein-coupled receptor. *Nature.* 2010; 463(7277): 108-12.
- Bonaventure P, Kelly L, Aluisio L, Shelton J, Lord B, Galici R y col. Selective blockade of 5-hydroxytryptamine 5-HT₇ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321(2): 690-8.
- Borroto-Escuela DO, Romero-Fernandez W, Tarakanov AO, Ciruela F, Agnati LF, Fuxe K. On the existence of a possible A_{2A}-D₂-β-Arrestin2 complex: A_{2A} agonist modulation of D₂ agonist-induced β-arrestin2 recruitment. *J Mol Biol.* 2011; 406(5): 687-99.
- Bortolato A, Tehan BG, Bodnarchuk MS, Essex JW, Mason JS. Water network perturbation in ligand binding: adenosine A_{2A} antagonists as a case study. *J Chem Inf Model.* 2013; 53(7): 1700-13.
- BOT PLUS 2.0 [Base de datos en Internet]. Madrid: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos (España); 2015, [acceso en mayo de 2015]. Disponible en <http://www.portalfarma.com/inicio/botplus20/Paginas/Bot-PLUS-2-0.aspx>
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- Branchek T, Adham N, Macchi M, Kao HT, Hartig PR. [³H]-DOB(4-bromo-2,5-dimethoxyphenylisopropylamine) and [³H]-ketanserin label two affinity states of the cloned human 5-hydroxytryptamine₂ receptor. *Mol Pharmacol.* 1990; 38(5): 604-9.
- Branchek T, Adham N, Macchi M, Kao HT, Hartig R. Ketanserin Label Two Affinity States of the Cloned Human 5- Receptor. *Mol Pharm.* 1990; 9: 604–609.

- Brea J, Castro M, Giraldo J, López-Giménez JF, Padín JF, Quintián F y col. Evidence for distinct antagonist-revealed functional states of 5-hydroxytryptamine(2A) receptor homodimers. *Mol Pharmacol*. 2009; 75(6): 1380-91.
- Burgueño J, Blake DJ, Benson MA, Tinsley CL, Esapa CT, Canela EI y col. The adenosine A_{2A} receptor interacts with the actin-binding protein α -actinin. *Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278(39): 37545–37552.
- Burstein ES, Ma J, Wong S, Gao Y, Pham E, Knapp AE y col. Intrinsic efficacy of antipsychotics at human D₂, D₃, and D₄ dopamine receptors: identification of the clozapine metabolite N-desmethylclozapine as a D₂/D₃ partial agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 315(3): 1278-87.
- Canals M, Burgueño J, Marcellino D, Cabello N, Canela EI, Mallol J y col. Homodimerization of adenosine A_{2A} receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Neurochem*. 2004; 88: 726–734.
- Canals M, Marcellino D, Fanelli F, Ciruela F, de Benedetti P, Goldberg SR y col. Adenosine A_{2A}-dopamine D₂ receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *J Biol Chem*. 2003; 278(47): 46741-9.
- Canela L, Luján R, Lluís C, Burgueño J, Mallol J, Canela EI y col. The neuronal Ca⁺²-binding protein 2 (NECAB2) interacts with the adenosine A_{2A} receptor and modulates the cell surface expression and function of the receptor. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 2007; 36: 1-12.
- Carlsson A, Waters N, Carlsson ML. Neurotransmitter interactions in schizophrenia: therapeutic implications. *Biol Psychiatry*. 1999; 46: 1388-1395.
- Carlsson ML, Carlsson A, Nilsson M. Schizophrenia: from dopamine to glutamate and back. *Curr Med Chem*. 2004; 11: 267-277.
- Carlsson ML, Martin P, Nilsson M, Sorensen SM, Carlsson A, Waters S y col. The 5-HT_{2A} receptor antagonist MDL100907 is more effective in counteracting NMDA

- antagonist- than dopamine agonist-induced hyperactivity in mice. *J Neural Transm.* 1999a; 106: 123-129.
- Cates LN, Roberts AJ, Huitron-Resendiz S, Hedlund PB. Effects of lurasidone in behavioral models of depression. Role of the 5-HT₇ receptor subtype. *Neuropharmacology.* 2013; 70, 211–217.
- Cheng JF, Lee CF, Chern Y. Adenosine Receptor Neurobiology: Overview. En: Mori A, editor. *International Review of Neurobiology. Adenosine receptors in Neurology and Psychiatry.* 1ªEd. Elsevier, Academic Press; 2014 (119). p. 1-49.
- Cheng JF. Adenosine receptor control of cognition in normal and disease. En: Mori A, editor. *International Review of Neurobiology. Adenosine receptors in Neurology and Psychiatry.* 1ªEd. Elsevier, Academic Press; 2014a (119). p. 257-308.
- Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 1973; 22(23): 3099-108.
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS y col. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* 2007; 318(5854): 1258-65.
- Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA y col. Structure of the human dopamine D₃ receptor in complex with a D₂/D₃ selective antagonist. *Science.* 2010; 330(6007): 1091-5.
- Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, Luján R, Burgueño J, Canals M y col. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers. *J Neurosci.* 2006; 26: 2080–2087.
- Ciruela F, Gómez-Soler M, Guidolin D, Borroto-Escuela DO, Agnati LF, Fuxe K y col. Adenosine receptor containing oligomers: Their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes.* 2011; 1808(5): 1245–1255.

- Citrome L, Cucchiaro J, Sarma K, Phillips D, Silva R, Tsuchiya S y col. Long-term safety and tolerability of lurasidone in schizophrenia: a 12-month, double-blind, active-controlled study. *Int Clin Psychopharmacol.* 2012; 27(3): 165–176.
- Citrome L, Ketter TA, Cucchiaro J, Loebel A. Clinical assessment of lurasidone benefit and risk in the treatment of bipolar I depression using number needed to treat, number needed to harm, and likelihood to be helped or harmed. *J Affect Disord.* 2014a; 155: 20-7.
- Citrome L, Weiden PJ, McEvoy JP, Correll CU, Cucchiaro J, Hsu J y col. Effectiveness of lurasidone in schizophrenia or schizoaffective patients switched from other antipsychotics: a 6-month, open-label, extension study. *CNS Spectr.* 2014b; 19(4): 330-9.
- Collins KD. Why continuum electrostatics theories cannot explain biological structure, polyelectrolytes or ionic strength effects in ion-protein interactions. *Biophys Chem.* 2012; 167: 43-59.
- Copeland RA, Pompliano DL, Meek TD. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(9): 730-9.
- Copeland RA. Conformational adaptation in drug-target interactions and residence time. *Future Med Chem.* 2011; 3 (12): 1491-501.
- Copeland RA. The dynamics of drug-target interactions: drug-target residence time and its impact on efficacy and safety. *Expert Opin Drug Discov.* 2010; 5(4): 305-10.
- Crespo B, Vázquez-Bourgon J, Pérez I. Esquizofrenia y trastornos delirantes. En: Vázquez-Barquero, editor. *Psiquiatría en atención primaria.* 2ªEd. Madrid: Grupo Aula Médica; 2007. p. 195-221.
- Cuesta MJ, Martínez A, Peralta V. Subtipos clínicos de esquizofrenia. En: Gastó C. *Esquizofrenia y Trastornos Afectivos. Avances en el diagnóstico y la terapéutica.* 1ª Ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 37-45.
- Cullen BR. Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Methods Enzymol.* 1987; 152: 684-704.

- Cunha RA, Agostinho PM. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *Journal of Alzheimer Disease*. 2010; 20 (Sup1):95-116.
- Cunha RA, Ferre S, Vaugeois JM, Chen JF. Potential therapeutic interest of adenosine A_{2A} receptors in psychiatric disorders. *Current Pharmaceutical Design*. 2008; 14: 1512-1524.
- Cussac D, Boutet-Robinet E, Ailhaud MC, Newman-Tancredi A, Martel JC, Danty N y col. Agonist-directed trafficking of signalling at serotonin 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C}-VSV receptors mediated G_{q/11} activation and calcium mobilisation in CHO cells. *Eur J Pharmacol*. 2008; 594(1-3): 32-8.
- Dahl G, Akerud T. Pharmacokinetics and the drug-target residence time concept. *Drug Discovery Today*. 2013; 18(15-16): 697–707.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A y col. The dopamine D₂ receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J*. 1989; 8(13): 4025-34.
- Damian M, Marie J, Leyris JP, Fehrentz JA, Verdié P, Martinez J y col. High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *J Biol Chem*. 2012; 287(6): 3630-41.
- Davidson M, Galderisi S, Weiser M, Werbeloff N, Fleischhacker WW, Keefe RS y col. Cognitive effects of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: a randomized, open-label clinical trial (EUFEST). *Am J Psychiatry*. 2009; 166(6): 675-82.
- Davis JM, Chen N, Glick ID. A meta-analysis of the efficacy of second-generation antipsychotics. *Arch Gen Psychiatry*. 2003; 60: 553–564.
- De Almeida J, Mengod G. Quantitative analysis of glutamatergic and GABAergic neurons expressing 5-HT_{2A} receptors in human and monkey prefrontal cortex. *J Neurochem*. 2007; 103: 475-486.

- Del Arco A, Mora F, Mohammed AH, Fuxe K. Stimulation of D₂ receptors in the prefrontal cortex reduces PCP-induced hyperactivity, acetylcholine release and dopamine metabolism in the nucleus *accumbens*. *J Neural Transm*. 2007; 114(2): 186-193.
- Deng C, Weston-Green K, Huang XF. The role of histaminergic H₁ and H₃ receptors in food intake: a mechanism for atypical antipsychotic-induced weight gain? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010; 34(1): 1-4.
- Derendorf H, Lesko LJ, Chaikin P, Colburn WA, Lee P, Miller R y col. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug research and development. *J Clin Pharmacol*. 2000; 40 (12): 1399-418.
- Dezi C, Brea J, Alvarado M, Raviña E, Masaguer CF, Loza MI y col. Multistructure 3D-QSAR studies on a series of conformationally constrained butyrophenones docked into a new homology model of the 5-HT_{2A} receptor. *J Med Chem*. 2007; 50(14): 3242-55.
- Díaz A, Valdizán EM, Pazos A, Castro E. Neurotransmisión serotoninérgica. En: Zarranz JJ. *Neurofarmacología contemporánea*. 1ª Ed. Barcelona: Elsevier; 2011. p. 117-139.
- Diccionario de términos médicos. Real Academia Nacional de Medicina. 1ª Ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 2012.
- Dierynck I, De Wit M, Gustin E, Keuleers I, Vandermissem J, Hallenberger S y col. Binding kinetics of darunavir to human immunodeficiency virus Type 1 protease explain the potent antiviral activity and high genetic barrier. *J Virology*. 2007; 81: 13845-51.
- Disse B, Speck GA, Rominger KL, Witek TJ Jr, Hammer R. Tiotropium (Spiriva): mechanistical considerations and clinical profile in obstructive lung disease. *Life Sci*. 1999; 64: 457-464.
- Dopazo Blázquez J. Bioinformática Médica. En: Rozman C, Cardellach F. *Farreras. Medicina Interna*. 17ª Ed. Barcelona: Elsevier; 2012. p. 1124-1129.

- Doré AS, Robertson N, Errey JC, Ng I, Hollenstein K, Tehan B y col. Structure of the adenosine A_{2A} receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine. *Structure*. 2011; 19(9): 1283–1293.
- Dowling MR, Charlton SJ. Quantifying the association and dissociation rates of unlabelled antagonists at the muscarinic M₃ receptor. *Br J Pharmacol*. 2006; 148: 927–937.
- Dror RO, Pan AC, Arlow DH, Borhani DW, Maragakis P, Shan Y y col. Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors. *Proc Natl Sci USA*. 2011; 108(32): 13118-23.
- Ebersole BJ, Visiers I, Weinstein H, Sealfon SC. Molecular basis of partial agonism: orientation of indoleamine ligands in the binding pocket of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor determines relative efficacy. *Mol Pharmacol*. 2003; 63(1): 36-43.
- Ellis J, Padiani JD, Canals M, Milasta S, Milligan G. Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem*. 2006; 281(50): 38812-24.
- Fañanás L, Papiol S, Rosa A. Mecanismos genéticos de las psicosis. En: Gastó C. *Esquizofrenia y Trastornos Afectivos*. 1^a Ed. Madrid. Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 11-20.
- Fanelli F, Felling A. Dimerization and ligand binding affect the structure network of A_{2A} adenosine receptor. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 2011; 1808(5): 1256–1266.
- Fanous AH, Zhao Z, van den Oord EJ, Maher BS, Thiselton DL, Bergen SE y col. Association study of SNAP25 and schizophrenia in Irish family and case-control samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010; 153B(2): 663-74.
- Faure C, Mnie-Filali O, Gondard E, Berod A, Didier A, Blier P y col. Serotonin 7 receptor antagonists as putative antidepressant with safer and faster onset of actions. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006; 16: S335.
- Felder CC, Kanterman RY, Ma AL, Axelrod J. Serotonin stimulates phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin

- receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(6): 2187-91.
- Ferré S, Baler R, Bouvier M, Caron MG, Devi LA, Durroux T y col. Building a new conceptual framework for receptor heteromers. *Nat Chem Biol*. 2009; 5(3): 131-4.
- Ferré S, Ciruela F, Borycz J, Solinas M, Quarta D, Antoniou K y col. Adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers: new targets for caffeine in the brain. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 13: 2391-2399.
- Ferré S, O'Connor WT, Snaprud P, Ungerstedt U, Fuxe K. Antagonistic interaction between adenosine A_{2A} receptors and dopamine receptors in the ventral striatopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience*. 1994; 63(3): 765-773.
- Ferré S, Karcz-Kubicha M, Hope BT, Popoli P, Burgueño J, Gutiérrez MA y col. Synergistic interaction between adenosine A_{2A} and glutamate mGlu5 receptors: implications for striatal neuronal function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 11940–11945.
- Fleischhacker WW. New drugs for the treatment of schizophrenic patients. *Acta Psychiatr Scand*. 1995; 388 (Suppl): 24-30.
- Fountoulakis KN, Gazouli M, Kelsoe J, Akiskal H. The pharmacodynamic properties of lurasidone and their role in its antidepressant efficacy in bipolar disorder. *European Neuropsychopharmacology*. 2014; 25(3): 335–342.
- Fredholm BB, Irenius E, Kull B, Schulte G. Comparison of the potency of adenosine as an antagonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochemical Pharmacology*. 2001; 61: 443-448.
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003; 63(6): 1256-72.
- Fridén M. Prediction of drug exposure in the brain from the chemical structure. En: Hammarlund-Udenaes M, de Lange E, Thorne R. *Drug delivery to the brain*. 1ª Ed. Nueva York: Springer; 2014. p. 317-338.

- Fuxe K, Ferré S, Canals M, Torvinen M, Terasmaa A, Marcellino D y col. Adenosine A_{2A} and Dopamine D₂ Heteromeric Receptor Complexes and Their Function. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2005; 26: 209-220.
- Fuxe K, Ferré S, Genedani S, Franco R, Agnati LF. Adenosine receptor-dopamine receptor interactions in the basal ganglia and their relevance for brain function. *Physiol Behav*. 2007; 92(1-2): 210-7.
- Fuxe K, Guidolin D, Agnati LF, Borroto-Escuela DO. Dopamine heteroreceptor complexes as therapeutic targets in Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19(3): 377-98.
- Fuxe K, Marcellino D, Borroto-Escuela DO, Guescini, M, Fernández-Dueñas V, Tanganelli S y col. Adenosine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2010; 16(3), 18–42.
- Fuxe K, Marcellino D, Genedani S, Agnati L. Adenosine A_{2A} receptors, dopamine D₂ receptors and their interactions in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2007a; 22(14): 1990-2017.
- Gabrielsson J, Dolgos H, Gillberg PG, Bredberg U, Benthem B, Duker G. Early integration of pharmacokinetic and dynamic reasoning is essential for optimal development of lead compounds: strategic considerations. *Drug Discovery Today*. 2009; 14(7-8): 358–372.
- Gabrielsson J, Green AR. Quantitative pharmacology or pharmacokinetic pharmacodynamic integration should be a vital component in integrative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 331(3): 767-74.
- Galici R, Boggs JD, Miller KL, Bonaventure P, Atack JR. Effects of SB269970, a 5-HT₇ receptor antagonist, in mouse models predictive of antipsychotic-like activity. *Behav Pharmacol*. 2008; 19(2): 153-9.
- Gao ZG, Ijzerman AP. Allosteric modulation of A_{2A} adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. *Biochemical Pharmacology*. 2000; 60(00): 669–676.

- Gao ZG, Jiang Q, Jacobson KA, Ijzerman AP. Site-directed mutagenesis studies of human A2A adenosine receptors: involvement of Glu13 and His278 in ligand binding and sodium modulation. *Biochemical Pharmacology* 2000 Sep; 60(5): 661-668.
- García-Porrero JA, Hurlé JM Sistemas moduladores difusos del sistema nervioso central. En: García-Porrero JA, Hurlé JM. *Neuroanatomía Humana*. 1ªEd. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2015. p. 193-202.
- Gasbarri A, Cifariello A, Pompili A, Meneses A. Effect of 5-HT₇ antagonist SB269970 in the modulation of working and reference memory in the rat. *Behav Brain Res*. 2008; 195(1): 164-70.
- Gasbarri A, Pompili A. Serotonergic 5-HT₇ receptors and cognition. *Rev Neurosci*. 2014; 25(3): 311-23.
- Gavaldà A, Miralpeix M, Ramos I, Otal I, Carreño C, Viñals M y col. characterization of aclidinium bromide, a novel inhaled muscarinic antagonist, with long duration of action and a favorable pharmacological profile. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 331: 740-751.
- Gavaldà A, Ramos I, Carcasona C, Calama E, Otal R, Montero JL y col. The in vitro and in vivo profile of aclidinium bromide in comparison with glycopyrronium bromide. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014; 28: 114-121.
- Geddes J, Harrison P, Freemantle N. New generation versus conventional antipsychotics. *Lancet*. 2003; 362(9381): 404; contestación 404-5.
- Gellynck E, Heyninck K, Andressen KW, Haegeman G, Levy FO, Vanhoenacker P y col. The serotonin 5-HT₇ receptors: two decades of research. *Exp Brain Res*. 2013; 230(4): 555-68.
- George S. Dopamine and psychosis. En: Dopamine. International PhD program in Neuroscience. Summaries of Lecturae. 12ª Escuela de verano de neurociencia. Catania (Italia): Departamento de Biomedicina Clínica y Molecular. Sección de Farmacología y Bioquímica. Universidad de Catania; 2014. 28 de junio – 4 de julio.
- Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, Lee TW, Farrens DL, Lakowicz JR y col. Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein

- coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 2001; 276(27): 24433-6.
- Gil P, Huete H. Antagonistas del receptor de la dopamina. Antipsicóticos de primera generación. En: Salazar M, Peralta C, Pastor FJ. *Tratado de Psicofarmacología. Bases y aplicación clínica.* 2ªEd. Buenos Aires, Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2009. p. 433-450.
- Gill SS, Bronskill SE, Normand SL, Anderson GM, Sykora K, Lam K y col. Antipsychotic drug use and mortality in older adults with dementia. *Ann Intern Med.* 2007; 146: 775-786.
- Giner J y col. Consenso español de expertos para recomendaciones de actuación en el tratamiento de la esquizofrenia. Madrid: Sociedad Española de Psiquiatría; 2000.
- Ginovart N, Kapur S. Role of dopamine D₂ receptors for antipsychotic activity. *Handb Exp Pharmacol.* 2012; (212): 27-52.
- Glass JD, Grossman GH, Farnbauch L, DiNardo L. Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci.* 2003; 23: 7451-7460.
- Goldman-Rakic PS, Muly EC 3rd, Williams GV. D₁ receptor in prefrontal cells and circuits. *Brain Res Rev.* 2000; 31: 295-301.
- Goldstein B, Dembo M. Approximating the effects of diffusion on reversible reactions at the cell surface: ligand-receptor kinetics. *Biophys J.* 1995; 68: 1222-30
- González-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, López-Giménez JF y col. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature.* 2008; 452 (7183): 93-7.
- González-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R y col. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT_{2A} receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron.* 2007; 53: 439-452.
- Goodwin GM. Consensus group of the British Association for Psychopharmacology. Evidence-based guidelines for treating bipolar disorder: revised second edition-

- recommendations from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacology*. 2009; 23(4): 346-388.
- Gould RA, Mueser KT, Bolton E, Mays V, Goff D. Cognitive therapy for psychosis in schizophrenia: an effect size analysis. *Schizophr Res*. 2001; 48(2-3): 335-42.
- Graham FL, Van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA. *Virology*. 1973; 52(2): 456-467.
- Gray JA, Roth B. Molecular targets for treating cognitive dysfunction in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2007; 33 (5): 1100-1119.
- Guerrero MJ, Hormaeche I, Uribarri M, Masse J, Palacios JM. Exocytotic machinery as a target for the development of new drugs for schizophrenia. En: Botana LM, Loza MI, editores. *Therapeutic Targets. Modulation, inhibition and activation*. 1ª Ed. EE.UU.: John Wiley and Sons; 2012. p. 375-408.
- Guía de Práctica Clínica sobre la Esquizofrenia y el Trastorno Psicótico Incipiente. Fòrum de Salut Mental, coordinació. Guía de Práctica Clínica sobre la Esquizofrenia y el Trastorno Psicótico Incipiente. Madrid: Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud del Ministerio de Sanidad y Consumo. Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques; 2009. Guía de Práctica Clínica: AATRM. Nº 2006/05-2.
- Guillin O, Abi-Dargham A, Laruelle M. Neurobiology of Dopamine in Schizophrenia. *Int Rev Neurobiol*. 2007; 78: 1-39.
- Guillin O, Demily C, Thibaut F. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Schizophrenia and Its Relation With Dopamine. *Integrating the Neurobiology of Schizophrenia*. 2007; 78: 377-395.
- Guo D, Hillger JM, IJzerman AP, Heitman LH. Drug-target residence time--a case for G protein-coupled receptors. *Med Res Rev*. 2014a; 34(4): 856-92.
- Guo D, Mulder-Krieger T, IJzerman AP, Heitman LH. Functional efficacy of adenosine A_{2A} receptor agonists is positively correlated to their receptor residence time. *Br J Pharmacol*. 2012; 166(6): 1846-1859.

- Guo D, van Dorp EJH, Mulder-Krieger T, van Veldhoven JPD, Brussee J, IJzerman P y col. Dual-point competition association assay: a fast and high-throughput kinetic screening method for assessing ligand-receptor binding kinetics. *Journal of Biomolecular Screening*. 2012a; 18(3): 309-320.
- Guo D, Xia L, van Veldhoven JP, Hazeu M, Mocking T, Brussee J y col. Binding kinetics of ZM241385 derivatives at the human adenosine A_{2A} receptor. *ChemMedChem*. 2014; 9(4): 752-61.
- Guscott M, Bristow LJ, Hadingham K, Rosahl TW, Beer MS, Stanton JA y col. Genetic knockout and pharmacological blockade studies of the 5-HT₇ receptor suggest therapeutic potential in depression. *Neuropharmacology*. 2005; 48(4): 492-502.
- Guseva D, Holst K, Kaune B, Meier M, Keubler L, Glage S y col. Serotonin 5-HT₇ receptor is critically involved in acute and chronic inflammation of the gastrointestinal tract. *Inflamm Bowel Dis*. 2014a; 20(9): 1516-29.
- Guseva D, Wirth A, Ponimaskin E. Cellular mechanisms of the 5-HT₇ receptor-mediated signaling. *Front Behav Neurosci*. 2014;8 :306.
- Gutiérrez-de-Terán H, Massink A, Rodríguez D, Liu W, Joseph JS, Katritch I y col. The role of a sodium ion binding site in the allosteric modulation of the A_{2A} adenosine G protein-coupled receptor. *Structure*. 2013; 21: 1–11.
- Haga K, Kruse AC, Asada H, Yurugi-Kobayashi T, Shiroishi M, Zhang C y col. Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature*. 2012; 482(7386): 547-51.
- Hagan JJ, Price GW, Jeffrey P, Deeks NJ, Stean T, Piper D y col. Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT₇ receptor antagonist. *Br J Pharmacol*. 2000; 130: 539–548.
- Hammarlund-Udenaes M. Pharmacokinetic concepts in brain drug delivery. En: Hammarlund-Udenaes M, de Lange E, Thorne R. *Drug delivery to the brain*. 1ª Ed. Nueva York: Springer; 2014. p. 127-162.
- Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res*. 2008; 195(1): 198-213. Revisión.

- Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*. 1999; 122: 593-624.
- Harsing LG Jr, Prauda I, Barkoczy J, Matyus P, Juranyi Z. A 5-HT₇ heteroreceptor-mediated inhibition of [³H]-serotonin release in raphe nuclei slices of the rat: evidence for a serotonergic-glutamatergic interaction. *Neurochem Res*. 2004; 29: 1487–1497.
- Harvey PD, Siu CO, Hsu J, Cucchiaro J, Maruff P, Loebel A. Effect of lurasidone on neurocognitive performance in patients with schizophrenia: a short-term placebo- and active-controlled study followed by a 6-month double-blind extension. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2013; 23(11): 1373–1382.
- Harvey PD. The clinical utility of lurasidone in schizophrenia: patient considerations. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015; 11: 1103-9.
- Harvey PD, Siu CO, Ogasa M, Loebel A. Effect of lurasidone dose on cognition in patients with schizophrenia: post-hoc analysis of a long-term, double-blind continuation study. *Schizophr Res*. 2015a; 166(1-3): 334-8.
- Heckers S, Konradi C. GABAergic mechanisms of hippocampal hyperactivity in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2014; S0920-9964 (14): 533-7.
- Hedlund PB, Huitron-Resendiz S, Henriksen SJ, Sutcliffe JG. 5-HT₇ receptor inhibition and inactivation induce antidepressant like behavior and sleep pattern. *Biol Psychiatry*. 2005; 58: 831-837.
- Hedlund PB, Leopoldo M, Caccia S, Sarkisyan G, Fracasso C, Martelli G y col. LP-211 is a brain penetrant selective agonist for the serotonin 5-HT₇ receptor. *Neuroscience Letters*. 2010; 481(1): 12–16.
- Hedlund PB, Sutcliffe JG. Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT₇ receptor research. *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25 (9): 481-486.
- Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 206(3): 345-54.
- Heidmann DE, Metcalf MA, Kohen R, Hamblin MW. Four 5-hydroxytryptamine₇ (5-HT₇) receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species

- differences due to altered intron-exon organization. *J Neurochem.* 1997; 68(4): 1372-81.
- Hernández I, Sokolov BP. Abnormalities in 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in frontal cortex of chronic elderly schizophrenics with varying histories of neuroleptic treatment. *J Neurosci Res.* 2000; 59: 218-225.
- Hernández-López S, Tkatch T, Pérez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H y col. D₂ dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca⁺² currents and excitability via a novel PLC[β]1-IP₃-calcineurin-signaling cascade. *The Journal of Neuroscience; The Official Journal of the Society for Neuroscience.* 2000; 20(24): 8987–8995.
- Hoffmann C, Castro M, Rinken A, Leurs R, Hill SJ, Vischer HF. Ligand residence time at G-protein-coupled receptors-Why we should take our time to study it. *Mol Pharmacol.* 2015; 88(3): 552-60.
- Hoffmann C, Gaietta G, Bünemann M, Adams SR, Oberdorff-Maass S, Behr B y col. A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells. *Nat Methods.* 2005 Mar; 2(3): 171-6.
- Horiguchi M, Huang M, Meltzer HY. The role of 5-hydroxytryptamine 7 receptors in the phencyclidine-induced novel object recognition deficit in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 338(2): 605-14.
- Horiguchi M, Meltzer HY. Blonanserin reverses the phencyclidine (PCP)-induced impairment in novel object recognition (NOR) in rats: role of indirect 5-HT_{1A} partial agonism. *Behav Brain Res.* 2013; 247: 158-64.
- Horiguchi M, Meltzer HY. The role of 5-HT_{1A} receptors in phencyclidine (PCP)-induced novel object recognition (NOR) deficit in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2012; 221(2): 205-15.
- Horisawa T, Nishikawa H, Toma S, Ikeda A, Horiguchi M, Ono M, Ishiyama T, Taiji M. The role of 5-HT₇ receptor antagonism in the amelioration of MK-801-induced learning and memory deficits by the novel atypical antipsychotic drug lurasidone. *Behav Brain Res.* 2013; 244: 66-9.

- Huang M, Horiguchi M, Felix AR, Meltzer HY. 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors contribute to lurasidone-induced dopamine efflux. *Neuroreport*. 2012; 23(7): 436-40.
- Huerta M. El déficit cognitivo y su tratamiento. En: Chinchilla A. Las esquizofrenias. Sus hechos y valores clínicos y terapéuticos. 1ª Ed. Barcelona: Elsevier, Masson; 2007. p. 209-217.
- Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, O'Laughlin IA, Meltzer HY. 5-HT_{2A} and D₂ receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT_{1A} receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J Neurochem*. 2001; 76(5): 1521–1531.
- Ichikawa O, Okazaki K, Nakahira H, Maruyama M, Nagata R, Tokuda K y col. Structural insight into receptor-selectivity for lurasidone. *Neurochem Int*. 2012; 61(7): 1133-43.
- Isberg V, Vroling B, van der Kant R, Li K, Vriend G, Gloriam DE. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors *Nucleic Acids Res*. Submitido. www.gpcr.org/7tm
- Ishibashi T, Horisawa T, Tokuda K, Ishiyama T, Ogasa M, Tagashira R y col.. Pharmacological profile of lurasidone, a novel antipsychotic agent with potent 5-hydroxytryptamine 7 (5-HT₇) and 1A (5-HT_{1A}) receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 334 (1): 171-81.
- Ishiyama T, Tokuda K, Ishibashi T, Ito A, Toma S, Ohno Y. Lurasidone (SM-13496), a novel atypical antipsychotic drug, reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the rat passive-avoidance test. *Eur J Pharmacol*. 2007; 572(2-3): 160-70.
- Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR y col. The 2.6 Ångstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. *Science*. 2008; 322(5905): 1211-1217.
- Jaakola VP, Ijzerman AP. The crystallographic structure of the human adenosine A_{2A} receptor in a high-affinity antagonist-bound state: implications for GPCR drug screening and design. *Curr Opin Struct Biol*. 2010; 20(4): 401-14.

- Jaakola VP, Lane JR, Lin JY, Katritch V, Ijzerman AP, Stevens RC. Ligand binding and subtype selectivity of the human A_{2A} adenosine receptor: identification and characterization of essential amino acid residues. *J Biol Chem.* 2010; 285(17): 13032-44.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther.* 1994; 64(2): 291-370. Revisión.
- Jacobson KA. Crystal structures of the A_{2A} adenosine receptor and their use in medicinal chemistry. *In Silico Pharmacol.* 2013; 1: 22.
- Javitt DC, Coyle JT. Decoding Schizophrenia. *Sci Am.* 2004; 290: 48-55
- Javitt DC, Laruelle M. Teorías Neuroquímicas. En: Lieberman JA, Stroup TS, Perkins DO. Tratado de esquizofrenia. Barcelona: Ars Medica; 2008. p. 83-114.
- Javitt DC. Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *Hillside J Clin Psychiatry.* 1987; 9: 12-35.
- Jentsch J, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 1999; 20: 201-225.
- Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 1996; 153: 466-476.
- Kapur S, Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine D₂ receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry.* 2001; 158(3): 360-9.
- Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures. *Trends Pharmacol Sci.* 2012; 33(1): 17-27.
- Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013; 53: 531-56.
- Kawashima K, Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y col. No association between tagging SNPs of SNARE complex genes (STX1A, VAMP2

- and SNAP25) and schizophrenia in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008; 147B(7): 1327-31.
- Kenakin T. Allosteric agonist modulators. *J Recept Signal Transduct Res.* 2007a; 27: 247–259.
- Kenakin T. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007b; 28(8): 407-15. Revisión.
- Kenakin T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol.* 2007; 72: 1393-1401.
- Kenakin T. New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR review 2. *Br J Pharmacol.* 2013; 168(3): 554-75.
- Klein MT, Teitler M. Antagonist interaction with the human 5-HT₇ receptor mediates the rapid and potent inhibition of non-G-protein-stimulated adenylate cyclase activity: a novel GPCR effect. *Br J Pharmacol.* 2011; 162: 1843–1854.
- Knight AR, Misra A, Quirk K, Benwell K, Revell D, Kennett G y col. Pharmacological characterisation of the agonist radioligand binding site of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 2004; 370(2): 114–123.
- Kobe F, Guseva D, Jensen TP, Wirth A, Renner U, Hess D y col. 5-HT₇R/G₁₂ signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *Journal of Neuroscience.* 2012; 32(9): 2915–2930.
- Kobilka B. Agonist binding: a multistep process. *Mol Pharmacol.* 2004; 65(5): 1060-2.
- Kobilka BK, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28(8): 397-406.
- Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1768(4): 794-807.
- Komossa K, Depping AM, Gaudchau A, Kissling W, Leucht S. Second-generation antipsychotics for major depressive disorder and dysthymia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; (12): CD008121.

- Konradi C, Heckers S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther.* 2003; 97: 153-79.
- Koshland DE. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1958; 44: 98–104.
- Krobert KA, Andressen KW, Levy FO. Heterologous desensitization is evoked by both agonist and antagonist stimulation of the human 5-HT₇ serotonin receptor. *Eur J Pharmacol.* 2006; 532(1-2): 1-10.
- Krobert KA, Levy FO. The human 5-HT₇ serotonin receptor splice variants: constitutive activity and inverse agonist effects. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(6): 1563-71.
- Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA, Renock SM, Steinberg S, Ernsberger P y col. H₁-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology.* 2003; 28, 519-526.
- Kruse Ac, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaun DM, Rosemond E y col. Structure and dynamics of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor. 2012; 482 (7386): 552-559.
- Kuszak AJ, Pitchiaya S, Anand JP, Mosberg HI, Walter NG, Sunahara RK. Purification and functional reconstitution of monomeric mu-opioid receptors: allosteric modulation of agonist binding by G₁₂. *J Biol Chem.* 2009; 284(39): 26732-41.
- Kvachnina E, Liu G, Dityatev A, Renner U, Dumuis A, Richter DW y col. 5-HT₇ receptor is coupled to G_α subunits of heterotrimeric G₁₂-protein to regulate gene transcription and neuronal morphology. *J Neurosci.* 2005; 25(34): 7821-30.
- Lane JR, Donthamsetti P, Shonberg J, Draper-Joyce CJ, Dentry S, Michino M y col. A new mechanism of allostery in a G protein-coupled receptor dimer. *Nat Chem Biol.* 2014; 10(9): 745-52.
- Lange JH, Reinders JH, Tolboom JT, Glennon JC, Coolen HK, Kruse CG. Principal component analysis differentiates the receptor binding profiles of three antipsychotic drug candidates from current antipsychotic drugs. *J Med Chem.* 2007; 50(21): 5103-8.

- Lara DR, Dall'Igna OP, Ghisolfi ES, Brunstein MG. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2006; 30: 617-629.
- Lebon G, Bennett K, Jazayeri A, Tate CG. Thermostabilisation of an agonist-bound conformation of the human adenosine A_{2A} receptor. *Journal of Molecular Biology*. 2011; 409(3): 298–310.
- Lebon G, Warne T, Edwards PC, Bennett K, Langmead CJ, Leslie AG y col. Agonist-bound adenosine A_{2A} receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature*. 2011; 474(7352): 521-5.
- Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lança AJ y col. Dopamine D₁ and D₂ receptor co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem*. 2004; 279(34): 35671-8.
- Lencz T, Guha S, Liu C, Rosenfeld J, Mukherjee S, DeRosse P y col. Genome-wide association study implicates NDST3 in schizophrenia and bipolar disorder. *Nat Commun*. 2013; 4: 2739.
- Lenzi O, Colotta V, Catarzi D, Varano F, Poli D, Filacchioni G y col. 2-Phenylpyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one as a new scaffold to obtain potent and selective human A₃ adenosine receptor antagonists: new insights into the receptor-antagonist recognition. *J Med Chem*. 2009; 52(23): 7640-52.
- Leopoldo M, Berardi F, Colabufo NA, Contino M, Lacivita E, Perrone R y col. Studies on 1-arylpiperazine derivatives with affinity for rat 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56(2): 247-55.
- Leopoldo M, Lacivita E, Berardi F, Perrone R, Hedlund PB. Serotonin 5-HT₇ receptor agents: structure-activity relationships and potential therapeutic applications in central nervous system disorders. *Pharmacol Ther*. 2011; 129: 120–148.
- Leopoldo M, Lacivita E, Contino M, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R. Structure-activity relationship study on N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-4-aryl-1-piperazinehexanamides, a class of 5-HT₇ receptor agents. Part II. *J Med Chem*. 2007; 50: 4214–4221.

- Leopoldo M, Lacivita E, De Giorgio P, Fracasso C, Guzzetti S, Caccia S, Contino M, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R. Structural modifications of N-(1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)-4-aryl-1-piperazinehexanamides: influence on lipophilicity and 5-HT₇ receptor activity. Part III. *J Med Chem.* 2008; 51(18): 5813-22.
- Leponex. Ficha Técnica. Madrid: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS); actualizada en octubre de 2014.
- Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Orey D, Richter F y col. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet.* 2013; S0140-6736(13): 60733-3.
- Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet.* 2009; 373: 31-41.
- Levy G. Pharmacologic target mediated drug disposition. *Clin Pharmacol Ther.* 1994; 56: 248-252.
- Li Z, Huang M, Ichikawa J, Dai J, Meltzer HY. N-desmethylozapine, a major metabolite of clozapine, increases cortical acetylcholine and dopamine release in vivo via stimulation of M1 muscarinic receptors. *Neuropsychopharmacology.* 2005; 30(11): 1986-95.
- Lieberman JA, Perkins D, Belger A, Chakos M, Jarskog F, Boteva K y col. The early stages of schizophrenia: speculations on pathogenesis, pathophysiology and therapeutic approaches. 2001; 50: 884-897.
- Lin YC, Ellingrod VL, Bishop JR, Miller DD. The relationship between P-glycoprotein (PGP) polymorphisms and response to olanzapine treatment in schizophrenia. *Ther Drug Monit.* 2006; 28(5): 668-72.
- Lipton S. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(2): 160-70.

- Liu JJ, Horst R, Katritch V, Stevens RC, Wüthrich K. Biased signaling pathways in β_2 -adrenergic receptor characterized by 19F-NMR. *Science*. 2012; 335(6072): 1106–1110.
- Loebel A, Cucchiaro J, Sarma K, Xu L, Hsu C, Kalali AH y col. Efficacy and safety of lurasidone 80 mg/day and 160 mg/day in the treatment of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled trial. *Schizophr Res*. 2013; 145(1–3): 101–109.
- Loebel A, Cucchiaro J, Xu J, Sarma K, Pikalov A, Kane JM. Effectiveness of lurasidone vs quetiapine XR for relapse prevention in schizophrenia: a 12-month, double-blind, noninferiority study. *Schizophr Res*. 2013; 147(1): 95–102.
- Lohse MJ, Maiellaro I, Calebiro D. Kinetics and mechanism of G protein-coupled receptor activation. *Curr Opin Cell Biol*. 2014; 27: 87-93.
- López-Giménez JF, Villazon M, Brea J, Loza MI, Palacios JM, Mengod G y col. Multiple conformations of native and recombinant human 5-hydroxytryptamine 2A receptors are labelled by agonists and discriminated by antagonists. *Mol Pharmacol*. 2001; 60: 690-699.
- López-Muñoz F, Alamo C. Active metabolites as antidepressant drugs: the role of norquetiapine in the mechanism of action of quetiapine in the treatment of mood disorders. *Front Psychiatry*. 2013; 4: 102.
- Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Miller JD, Prosser RA, Rea MA y col. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron*. 1993; 11(3): 449-58.
- Lu H, Tonge PJ. Drug-target residence time: critical information for lead optimization. *Curr Opin Chem Biol*. 2010; 14(4): 467-74.
- Lu R, Alioua A, Kumar Y, Kundu P, Eghbali M, Weisstaub NV y col. c-Src tyrosine kinase, a critical component for 5-HT_{2A} receptor-mediated contraction in rat aorta. *J Physiol*. 2008; 586(16): 3855-69.
- Łukasiewicz S, Faron-Górecka A, Kędracka-Krok S, Dziejzicka-Wasylewska M. Effect of clozapine on the dimerization of serotonin 5-HT_{2A} receptor and its genetic variant

- 5-HT_{2A}-H425Y with dopamine D₂ receptor. *Eur J Pharmacol.* 2011; 659(2-3): 114-23.
- Lukasiewicz S, Polit A, Kędracka-Krok S, Wędzony K, Maćkowiak M, Dziedzicka-Wasylewska M. Hetero-dimerization of serotonin 5-HT_{2A} and dopamine D₂ receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803(12): 1347-58.
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL y col. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(5): 2449-54.
- Malany S, Hernandez LM, Smith WF, Crowe PD, Hoare SRJ. Analytical method for simultaneously measuring ex vivo drug receptor occupancy and dissociation rate: application to (R)-dimethindene occupancy of central histamine H₁ receptors. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research.* 2009; 29(2): 84–93.
- Manglik A, Kobilka B. The role of protein dynamics in GPCR function: insights from the β_2 AR and rhodopsin. *Curr Opin Cell Biol.* 2014; 27: 136-43.
- Marder SR, Wirshing DA. Clozapina. En: Schatzberg A, Nemeroff C. *Tratado de psicofarmacología.* 3ª Ed. Barcelona: Elsevier, Masson; 2006. p. 65-482.
- Marder SR. Integrating pharmacological and psychosocial treatments for schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand Suppl.* 2000; 407: 87-90.
- Martin JLR, Pérez V, Sacristán M, Rodríguez-Artalejo F, Martínez C, Álvarez E. Meta-analysis of drop-out rates in randomised clinical trials, comparing typical and atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Eur Psychiatry.* 2006; 21: 11-20.
- Martín-Cora FJ, Pazos A. Autoradiographic distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain using [³H]-mesulergine: comparison to other mammalian species. *Br J Pharmacol.* 2004; 141(1): 92-104.
- Martínez-Cué C, Flórez J. Fármacos antipsicóticos neurolépticos. En: Flórez J, director. *Farmacología Humana.* 6ª Ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2014. P. 16-45.

- Masri B, Salahpour A, Didriksen M, Ghisi V, Beaulieu JM, Gainetdinov RR. Antagonism of dopamine D₂ receptor/ β -arrestin-2 interaction is a common property of clinically effective antipsychotics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(36): 13656-61.
- Matsumoto I, Inoue Y, Ywazaki T, Pavey G, Dean B. 5-HT_{2A} and muscarinic receptors in schizophrenia: a postmortem study. *Neurosci Lett*. 2005; 379: 164-168.
- McElroy SL, Weisler RH, Chang W, Olausson B, Paulsson B, Brecher M y col. EMBOLDEN II (Trial D1447C00134) Investigators. A double-blind, placebo-controlled study of quetiapine and paroxetine as monotherapy in adults with bipolar depression (EMBOLDEN II). *J Clin Psychiatry*. 2010; 71(2): 163-74.
- Meltzer H, Horiguchi M, Massey B. The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. *Psychopharmacology*. 2011; 213: 289-305.
- Meltzer HY, Cucchiaro J, Silva R, Ogasa M, Phillips D, Xu J y col. Lurasidone in the treatment of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo- and olanzapine-controlled study. *Am J Psychiatry*. 2011a; 168(9): 957-967.
- Meltzer HY, Huang M. In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems. *Prog Brain Res*. 2008; 172: 177-197.
- Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003; 27(7): 1159-72.
- Meltzer HY, Massey BW, Horiguchi M. Serotonin receptors as targets for drugs useful to treat psychosis and cognitive impairment in schizophrenia. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13(8): 1572-86. Review.
- Meltzer HY, Massey BW. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Current Opinion in Pharmacology*. 2011; 11: 59-67.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D₁, D₂ and serotonin₂ pK_i values. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989; 251(1): 238-46.

- Meltzer HY, McGurk SR. The effects of clozapine, risperidone and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1999; 25: 233-255.
- Meltzer HY, Mills R, Revell S, Williams H, Johnson A, Bahr D y col. Pimavanserin, a serotonin(2A) receptor inverse agonist, for the treatment of Parkinson's disease psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 2010; 35: 881-892.
- Meltzer HY, Stahl SM. The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull.* 1976; 2: 19-76.
- Meltzer HY, Thompson PA, Lee MA, Ranjan R. Neuropsychologic deficits in schizophrenia: relation to social function and effect of antipsychotic drug treatment. 1996; 14: 27S-33S.
- Meltzer HY. What's atypical about atypical antipsychotic drugs? *Curr Opin Pharmacol.* 2004; 4: 53-7.
- Meng EC, Bourne HR. Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22(11): 587-93. Revisión.
- Mengod G, Cortés R, Vilaró MT, Hoyer D. Distribution of 5-HT receptors in the Central Nervous System. En: Müller CP, Jacobs BL. *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin.* 1ª Ed. EE.UU.: Elsevier, Academic Press; 2010. p. 123-138.
- Mestres J, Gregori-Puigjané E. Conciliating binding efficiency and polypharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2009; 30(9): 470-474.
- Micromedex. Evaluaciones de Drugdex [Base de datos]. Lurasidone. Micromedex. Ann Arbor, Michigan: Truven Analytics Health (US). [2014] [última actualización: 10 septiembre 2014]; [sobre 60 páginas] Disponible en: <http://micromedex.com>
- Millan MJ, Brocco M, Gobert A, Joly F, Bervoets K, Rivet JM y col. Contrasting mechanisms of action and sensitivity to antipsychotics of phencyclidine versus amphetamine: importance of nucleus *accumbens* 5-HT_{2A} site for PCP-induced locomotion in the rat. *Eur J Neurosci.* 1999; 11: 4419-4432.

- Mnie-Filali O, Dahan L, Zimmer L, Haddjeri N. Effects of the serotonin 5-HT₇ receptor antagonist SB-269970 on the inhibition of dopamine neuronal firing induced by amphetamine. *Eur J Pharmacol.* 2007; 570(1-3): 72-6.
- Mnie-Filali O, Faure C, Lambás-Señas L, et al. Pharmacological Blockade of 5-HT₇ Receptors as a Putative Fast Acting Antidepressant Strategy. *Neuropsychopharmacology.* 2011; 36(6): 1275-1288.
- Molina V, Sanz J, Samarrea F, Benito C, Palomo T. Lower prefrontal gray matter volume in schizophrenia in chronic but not in first episode schizophrenia patients. *Psychiatry Res Neuroimaging.* 2004; 131: 45-56.
- Moreno JL, Holloway T, Albizu L, Sealfon SC, González-Maeso J. Metabotropic glutamate mGlu₂ receptor is necessary for the pharmacological and behavioral effects induced by hallucinogenic 5-HT_{2A} receptor agonists. *Neurosci Lett.* 2011; 493(3): 76-9.
- Morris MB, Dastmalchi S, Church WB. Rhodopsin: structure, signal transduction and oligomerisation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(4): 721-4. Revisión.
- Mortimer AM, Joyce E, Balasubramaniam K, Choudhary PC, Saleem PT; SOLIANOL Study Group. Treatment with amisulpride and olanzapine improve neuropsychological function in schizophrenia. *Hum Psychopharmacol.* 2007; 22(7): 445-54.
- Motulsky H y Christopoulos S. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. San Diego (EE.UU.): GraphPad Software Inc.; 2003. p. 242.
- Motulsky HJ, Mahan LC. The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action. *Mol Pharmacol.* 1984; 25(1): 1-9.
- Nakamura M, Ogasa M, Guarino J, Phillips D, Severs J, Cucchiari J y col. Lurasidone in the treatment of acute schizophrenia: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry.* 2009; 70(6): 829-836.

- Nasrallah HA, Silva R, Phillips D, Cucchiaro J, Hsu J, Xu J y col. Lurasidone for the treatment of acutely psychotic patients with schizophrenia: a 6-week, randomized, placebo-controlled study. *J Psychiatr Res.* 2013; 47(5): 670–677.
- Naumenko VS, Popova NK, Lacivita E, Leopoldo M, Ponimaskin EG. Interplay between serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors in depressive disorders. *CNS Neurosci Ther.* 2014; 20(7): 582-90.
- Navarro G, Aymerich Ms, Marcellino D, Cortes A, Casado V, Mallol J y col. Interactions between calmodulin, adenosine A_{2A}, and dopamine D₂ receptors. *The Journal of Biological Chemistry.* 2009; 284: 28058- 28068.
- Navarro G, Hradsky J, Lluís C, Casado V, McCormick PJ, Kreutz MR, y col. NCS-1 associates with adenosine A_{2A} receptors and modulates receptor function. *Frontiers in Molecular Neuroscience.* 2012; 5: 53.
- Nelson JC, Papakostas GI. Atypical antipsychotic augmentation in major depressive disorder: a meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. *Am J Psychiatry.* 2009; 166: 980-991.
- Nota informativa AEMPS Ref: 2004/03. Antipsicóticos clásicos y aumento de mortalidad en pacientes ancianos con demencia. Comunicación sobre riesgos de medicamentos para profesionales sanitarios. Madrid: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Subdirección General de Medicamentos de Uso Humano. Ministerio de Sanidad y Consumo; 2004.
- Nota informativa Ref: 2008/19. Antipsicóticos clásicos y aumento de mortalidad en pacientes ancianos con demencia. Comunicación sobre riesgos de medicamentos para profesionales sanitarios. Madrid: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Subdirección General de Medicamentos de Uso Humano. Ministerio de Sanidad y Consumo; 2008.
- Núñez S, Venhorst J, Kruse CG. Target-drug interactions: first principles and their application to drug discovery. *Drug Discov Today.* 2012; 17(1-2): 10-22.
- Nygaard R, Zou Y, Dror RO, Mildorf TJ, Arlow DH, Manglik A y col. The dynamic process of β_2 -adrenergic receptor activation. *Cell.* 2013; 152(3): 532-42.

- Ogasa M, Kimura T, Nakamura M, Guarino J. Lurasidone in the treatment of schizophrenia: a 6-week, placebo-controlled study. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013; 225(3): 519–530.
- Okada T, Palczewski K. Crystal structure of rhodopsin: implications for vision and beyond. *Curr Opin Struct Biol*. 2001 Aug;11(4):420-6.
- Olney JW, Farber NB. NMDA receptor hypofunction and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1995; 37: 667.
- Osmond H, Smythies J. Schizophrenia: a new approach. *J Ment Sci*. 1952; 98: 309-315.
- Oufkir T, Arseneault M, Sanderson JT, Vaillancourt C. The 5-HT_{2A} serotonin receptor enhances cell viability, affects cell cycle progression and activates MEK-ERK1/2 and JAK2-STAT3 signalling pathways in human choriocarcinoma cell lines. *Placenta*. 2010; 31(5): 439-47.
- Packeu A, Wennerberg M, Balendran A, Vauquelin G. Estimation of the dissociation rate of unlabelled ligand-receptor complexes by a “two-step” competition binding approach. *Br J Pharmacol*. 2010; 161: 1311–1328.
- Padín J. Estudios de neuroimagen en esquizofrenia. En: Chinchilla A. *Las esquizofrenias. Sus hechos y valores clínicos y terapéuticos*. 1ª Ed. Barcelona: Elsevier, Masson; 2007. p. 209-217.
- Padín JF. Análisis comparativo de la interacción ligando-receptor entre sistemas nativos y recombinantes, comportamiento conformacional de GPCRs [tesis doctoral]. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2007.
- Padín JF, Rodríguez MA, Domínguez E, Dopeso-Reyes IG, Buceta M, Cano E y col. Parallel regulation by olanzapine of the patterns of expression of 5-HT_{2A} and D₃ receptors in rat central nervous system and blood cells. *Neuropharmacology*. 2006; 51: 923-932.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA y col. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. 2000; 289 (5480): 739-45.

- Palmer TM, Poucher SM, Jacobson KA, Stiles GL. 125I-4-(2-[7-amino-2-[2-furyl][1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-yl-amino]ethyl)phenol, a high affinity antagonist radioligand selective for the A_{2A} adenosine receptor. *Mol Pharmacol*. 1995; 48(6): 970-974.
- Pan AC, Borhani DW, Dror RO, Shaw DE. Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics. *Drug Discov Today*. 2013; 18(13-14): 667-73.
- Payne SL, Johansson AM, Strange PG. Mechanisms of ligand binding and efficacy at the human D₂(short) dopamine receptor. *J Neurochem*. 2002; 82(5): 1106-17.
- PDSP K_i Database [Base de Datos en Internet]. Chapel Hill (Carolina del Norte): Universidad de Carolina del Norte (EE.UU.); 2015 [acceso en julio de 2015]. Disponible en: <http://pdsp.med.unc.edu/>
- Pehek EA, Hernan AE. Stimulation of glutamate receptors in the ventral tegmental area is necessary for serotonin-2 receptor-induced increases in mesocortical dopamine release. *Neuroscience*. 2015; 290: 159-64.
- Pehek EA, Nocjar C, Roth BL, Byrd TA, Mabrouk OS. Evidence for the preferential involvement of 5-HT_{2A} serotonin receptors in stress- and drug-induced dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31(2): 265-77.
- Peletier LA, Gabrielsson J. Dynamics of target-mediated drug disposition. *Eur J Pharm Sci*. 2009; 38(5): 445-464.
- Perkins DO, Lieberman JA, Lewis S. El primer episodio. En: Lieberman JA, Stroup TS, Perkins DO. *Tratado de esquizofrenia*. 1ªEd. Barcelona: Grupo Ars XXI de comunicación, Ars Medica; 2008. p. 351-362.
- Perry DC, Mullis KB, Oie S, Sadee W. Opiate antagonist receptor binding in vivo: evidence for a new receptor binding model. *Brain Res*. 1980; 199: 49-61
- Pietraszek M. Significance of dysfunctional glutamatergic transmission for the development of psychotic symptoms. *Pol J Pharmacol*. 2003; 55: 133-154.

- Pietrzak RH, Olver J, Norman T, Piskulic D, Maruff P, Snyder PJ. A comparison of the CogState Schizophrenia Battery and the Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia (MATRICS) Battery in assessing cognitive impairment in chronic schizophrenia. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2009; 31(7): 848-59.
- Piscitelli CL, Kean J, de Graaf C, Deupi X. A Molecular Pharmacologist's Guide to G Protein-Coupled Receptor Crystallography. *Mol Pharmacol*. 2015; 88(3): 536-51.
- Ploeger BA, van der Graaf PH, Danhof M. Incorporating receptor theory in mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009; 24: 3-15.
- Potkin SG, Ogasa M, Cucchiaro J, Loebel A. Double-blind comparison of the safety and efficacy of lurasidone and ziprasidone in clinically stable outpatients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Schizophr Res*. 2011; 132(2-3): 101-7.
- Poucher SM, Keddie JR, Singh P, Stoggall SM, Caulkett PW, Jones G y col. The in vitro pharmacology of ZM241385, a potent, non-xanthine, A_{2A} selective adenosine receptor antagonist. *Br J Pharmacol*. 1995; 115(6): 1096-1102.
- Puente R, Riaza C, Dolengevich H, Picouto MD. Neurotransmisión en la esquizofrenia: dopamina y esquizofrenia En: Chinchilla A. Las esquizofrenias. Sus hechos y valores clínicos y terapéuticos. 1ª Ed. Barcelona: Elsevier, Masson; 2007. p. 41-48.
- Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M. Serotonin receptors – from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res*. 2011; 60(1): 15-25.
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC y col. Crystal structure of the human β_2 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2007; 450(7168): 383-7.
- Rebola N, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A_{2A} receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience*. 2005; 132: 893-903.

- Latuda®. Resumen del plan de seguridad y de gestión de riesgos (RMP) para Latuda (lurasidona HCl). Versión 2-2014. Londres: Agencia Europea de Medicamentos (EMA); 2014. p. 1–8.
- Latuda®. Ficha técnica. Última actualización 12-10-2015. Londres: Agencia Europea de Medicamentos (EMA); 2015. p. 1–66.
- Rial D, Lara DR, Cunha R. The adenosine neuromodulation system in schizophrenia. En: Mori A. *International Review of Neurobiology. Adenosine receptors in Neurology and Psychiatry*. 1ª Ed. Elsevier, Academic Press; 2014. p. 395-449.
- Riaza C, Chinchilla A, Baca E. Fenómenos moleculares relacionados con el neurodesarrollo y la patología sináptica en esquizofrenia. En: Chinchilla A. *Las esquizofrenias. Sus hechos y valores clínicos y terapéuticos*. 1ª Ed. Barcelona: Elsevier, Masson; 2007c. p. 49-74.
- Riaza C, Chinchilla A, Quintero FJ. Hipótesis inmunológica en esquizofrenia. En: Chinchilla A. *Las esquizofrenias. Sus hechos y valores clínicos y terapéuticos*. 1ª Ed. Barcelona: Elsevier, Masson; 2007b. p. 169-192.
- Riaza C, Chinchilla A. Hipótesis glutamatérgica en esquizofrenia. En: Chinchilla A. *Las esquizofrenias. Sus hechos y valores clínicos y terapéuticos*. 1ª Ed. Barcelona: Elsevier, Masson; 2007. p. 143-167.
- Riaza C, Puente R, Chinchilla A, Rodríguez J, Vega M y Crespo MD. Neurodesarrollo, esquizotaxia y modelo diátesis-estrés. En: Chinchilla A. *Las esquizofrenias. Sus hechos y valores clínicos y terapéuticos*. 1ª Ed. Barcelona: Elsevier, Masson; 2007a. p. 75-99.
- Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kähler AK, Akterin S y col. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet*. 2013; 45(10): 1150-9.
- Risperdal®. Ficha Técnica. Madrid: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS); actualizada en diciembre de 2013.

- Riva MA, Tascadda F, Lovati E, Racagni G. Regulation of NMDA receptor subunit messenger RNA levels in the rat brain following acute and chronic exposure to antipsychotic drug. *Brain Res Mol.* 1997; 50: 136-142.
- Roberts AJ, Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor in learning and memory. *Hippocampus.* 2012; 22: 762-771.
- Roberts AJ, Krucker T, Levy CL, Slanina KA, Sutcliffe JG, Hedlund PB. Mice lacking 5-HT receptors show specific impairments in contextual learning. *Eur J Neurosci.* 2004; 19(7): 1913-22.
- Rocca P, Villari V, Bogetto F. Managing the aggressive and violent patient in the psychiatry emergency. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006; 30: 586-598.
- Rodríguez D, Piñeiro A, Gutiérrez-de-Terán H. Molecular dynamics simulations reveal insights into key structural elements of adenosine receptors. *Biochemistry.* 2011 May; 50(19): 4194-4208.
- Rodríguez D. Computational approaches for the characterization of the structure and dynamics of G protein-coupled receptors: applications to drug design [tesis doctoral]. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2012.
- Roed SN, Wismann P, Underwood CR, Kulahin N, Iversen H, Cappelen KA y col. Real-time trafficking and signaling of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 382(2): 938-49.
- Roed SN, Nøhr AC, Wismann P, Iversen H, Bräuner-Osborne H, Knudsen SM y col. Functional consequences of glucagon-like peptide-1 receptor cross-talk and trafficking. *J Biol Chem.* 2015; 290: 1233–1243.
- Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS y col. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β_2 -adrenergic receptor function. *Science.* 2007; 318: 1266-1273.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein coupled receptors. *Nature.* 2009; 459(7245): 356-63.

- Roth BL, Craigo SC, Choudhary MS, Uluer A, Monsma FJ Jr, Shen Y y col. Binding of typical and atypical antipsychotic agents to 5-hydroxytryptamine-6 and 5-hydroxytryptamine-7 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 268(3): 1403-10.
- Roth BL, Kroeze WK, Patel S, Lopez E. The Multiplicity of Serotonin Receptors: Uselessly diverse molecules or an embarrassment of riches? *The Neuroscientist.* 2000; 6: 252-262.
- Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(4): 353-9.
- Rouge-Pont F, Usiello A, Benoit-Marand M, Gonon F, Piazza P, Borrelli E. Changes in extracellular dopamine induced by morphine and cocaine: crucial control by D₂ receptors. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience.* 2002; 22(8): 3293–3301.
- Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM y col. Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(18): 8547-51.
- Rubio-Valladolid G. Trastornos psicóticos. En: Rubio-Valladolid G, director. *Fundamentos de Psiquiatría. Bases científicas para el manejo clínico.* Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2015. p. 103-126.
- Sallés J, Flórez J. Acciones de los fármacos II. Dianas y mecanismos moleculares. En: Flórez J, director. *Farmacología Humana. 6ª Ed.* Barcelona: Elsevier Masson; 2014. P. 16-45.
- Samalin L, Ben Gharbia M, Garnier M, Llorca PM. Short-term efficacy and safety of lurasidone in the treatment of schizophrenia. *L'Encéphale.* 2014; 40(6): 507–17.
- Sánchez C, Asin KE, Artigas F. Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data. *Pharmacology and Therapeutics;* 2014. p. 1–15.

- Sarkisyan G, Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor is involved in allocentric spatial memory information processing. *Behav Brain Res.* 2009; 202(1): 26-31.
- Sarkisyan G, Roberts AJ, Hedlund PB. The 5-HT₇ receptor as a mediator and modulator of antidepressant-like behavior. *Behav Brain Res.* 2010; 209(1): 99-108.
- Scarr E, Pavey G, Copolov D, Dean B. Hippocampal 5-hydroxytryptamine receptors: abnormalities in postmortem brain from schizophrenic subjects. *Schizophr Res.* 2004; 71: 383-392.
- Schmid CL, Raehal KM, Bohn LM. Agonist-directed signaling of the serotonin 2A receptor depends on β -arrestin-2 interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(3): 1079-84.
- Schneeweiss S, Setoguchi S, Brookhart A, Dormuth C, Wang PS. Risk of death associated with the use of conventional versus atypical antipsychotic drugs among elderly patients. *CMAJ.* 2007; 176 (5):627-32
- Schulte G, Fredholm BB. Signaling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular Signaling.* 2003; 15: 813-827.
- Schwartz TW, Holst B. Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol Sci.* 2007; 28(8): 366-73. Revisión.
- Schwarz MJ, Muller N, Riedel M, Ackenheil M. The Th₂-hypothesis of schizophrenia: a strategy to identify a subgroup of schizophrenia caused by immune mechanisms. *Med Hypotheses.* 2001; 56: 483-486.
- Scruggs JL, Schmidt D, Deutch AY. The hallucinogen 1-[2,5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2-aminopropane (DOI) increases cortical extracellular glutamate levels in rats. *Neuroscience Letters.* 2003; 346(3): 137-140.
- Seeman P. An update of fast-off dopamine D₂ atypical antipsychotics. *Am J Psychiatry.* 2005; 162(10): 1984-5.
- Seeman P. Clozapine, a fast-off-D₂ antipsychotic. *ACS Chem Neurosci.* 2014; 5: 24-29.

- Seibt BF, Schiedel AC, Thimm D, Hinz S, Sherbiny FF, Müller CE. The second extracellular loop of GPCRs determines subtype-selectivity and controls efficacy as evidenced by loop exchange study at A₂ adenosine receptors. *Biochem Pharmacol.* 2013; 85(9): 1317-29.
- Selent J, López L, Sanz F, Pastor M. Multi-receptor binding profile of clozapine and olanzapine: a structural study based on the new β_2 -adrenergic receptor template. *ChemMedChem.* 2008; 3(8): 1194-8.
- Selent J, Marti-Solano M, Rodríguez J, Atanes P, Brea J, Castro M y col. Novel insights on the structural determinants of clozapine and olanzapine multi-target binding profiles. *Eur J Med Chem.* 2014; 77: 91-5.
- Semenova S, Geyer MA, Sutcliffe JG, Markou A, Hedlund PB. Inactivation of the 5-HT₇ receptor partially blocks phencyclidine-induced disruption of prepulse inhibition. *Biol Psychiatry.* 2008; 63: 98–105.
- Shen Y, Monsma FJ Jr, Metcalf MA, Jose PA, Hamblin MW, Sibley DR. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem.* 1993; 268(24): 18200-4.
- Shimamura T, Shiroishi M, Weyand S, Tsujimoto H, Winter G, Katritch V y col. Structure of the human histamine H₁ receptor complex with doxepin. *Nature.* 2011; 475(7354): 65-70.
- Silva CG, Métin C, Fazeli W, Machado NJ, Darmopil S, Launay PS y col. Adenosine receptor antagonists including caffeine alter fetal brain development in mice. *Science Translational Medicine.* 2013; 5: 59-70.
- Sjögren B, Hamblin MW, Svenningsson P. Cholesterol depletion reduces serotonin binding and signaling via human 5-HT_{7(a)} receptors. *European Journal of Pharmacology.* 2006; 552: 1–10.
- Sjögren B, Svenningsson P. Caveolin-1 affects serotonin binding and cell surface levels of human 5-HT_{7(a)} receptors. *FEBS Letters.* 2007; 581: 5115–5121.

- Sjögren B, Svenningsson P. Depletion of the lipid raft constituents, sphingomyelin and ganglioside, decreases serotonin binding at human 5-HT_{7(a)} receptors in HeLa cells. *Acta Physiologica*. 2007; 190: 47–53.
- Smith C, Toohey N, Knight J, Klein MT, Teitler M. Risperidone-induced inactivation and clozapine-induced reactivation of rat cortical astrocyte 5-hydroxytryptamine₇ receptors: evidence for in situ G protein-coupled receptor homodimer protomer cross-talk. *Mol Pharmacol*. 2011; 79(2): 318–325.
- Snigdha S, Horiguchi M, Huang M, Li Z, Shahid M, Neill JC y col. Attenuation of phencyclidine-induced object recognition deficits by the combination of atypical antipsychotic drugs and pimavanserin (ACP 103), a 5-hydroxytryptamine(2A) receptor inverse agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 332: 622-631.
- Solinas M, Ferre S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus *accumbens*. *Journal of Neuroscience*. 2002; 22: 6321-6324.
- Speranza L, Giuliano T, Volpicelli F, De Stefano ME, Lombardi L, Chambery A y col. Activation of 5-HT₇ receptor stimulates neurite elongation through mTOR, Cdc42 and actin filaments dynamics. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2015; 9: 1–14.
- Stahl SM. Psicosis e Schizofrenia. En: Stahl SM. *Psicofarmacología esencial*. 2ªEd. Turín: Centro Científico Editore; 2002. p. 365-399.
- Stoll WA. Lysergsäure-diäthylamid, ein Phantastikum aus der Mutterkorngruppe. *Schweiz Arch. Neurol Psychiatr*. 1947; 64: 279-323.
- Sumiyoshi T, Higuchi Y, Matsui M, Arai H, Takamiya C, Meltzer HY y col. Effective adjunctive use of tandospirone with perospirone for enhancing verbal memory and quality of life in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2007; 31: 965-967.
- Sumiyoshi T, Higuchi Y, Uehara T. Neural basis for the ability of atypical antipsychotic drugs to improve cognition in schizophrenia. *Front Behav Neurosci*. 2013; 7: 140.

- Sumiyoshi T, Matsui M, Yamashita I, Nohara S, Kurachi M, Uehara T y col. The effect of tandospirone, a serotonin(1A) agonist, on memory function in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2001; 49: 861-868.
- Svenningsson P, Hall H, Sedvall G, Fredholm BB. Distribution of adenosine receptors in the postmortem human brain: an extended autoradiographic study. *Synapse*. 1997; 27: 322-335.
- Swartz MS, Stroup TS, McEvoy JP, Davis SM, Rosenheck RA, Keefe RS y col. What CATIE found: results from the schizophrenia trial. *Psychiatr Serv*. 2008; 59(5): 500-6.
- Swinney DC. Applications of Binding Kinetics to Drug Discovery. *Pharmaceutical Medicine*. 2008; 22(1): 23-34.
- Sykes DA, Charlton SJ. Slow receptor dissociation is not a key factor in the duration of action of inhaled long-acting β_2 -adrenoceptor agonists. *Br J Pharmacol*. 2012; 165(8): 2672-83.
- Sykes D, Dowling MR, Charlton SJ. Measuring receptor target coverage: a radioligand competition binding protocol for assessing the association and dissociation rates of unlabeled compounds. *Current Protocols in Pharmacology*. 2010; (Suppl. 50): 1-30.
- Sykes DA, Dowling MR, Leighton-Davies J, Kent T, Fawcett L, Renard E y col. The influence of receptor kinetics on the onset and duration of action and the therapeutic index of NVA237 and tiotropium. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012; 343: 520-528.
- Sykes DA, Parry C, Reilly J, Wright P, Fairhurst RA, Charlton SJ. Observed drug-receptor association rates are governed by membrane affinity: the importance of establishing "micro-pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships" at the β_2 -adrenoceptor. *Mol Pharmacol*. 2014; 85(4): 608-17.
- Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, Just the Facts. 4 Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res*. 2009; 110: 1-23.

- Tandon R, Loebel A, Phillips D, Pikalov A, Hernandez D, Mao Y col. EPA-1722 – A double-blind, placebo-controlled, randomized withdrawal study of lurasidone for the maintenance of efficacy in patients with schizophrenia. *Eur Psychiatry*. 2014; 29(Supplement 1): S372.
- Tautermann CS, Kiechle T, Seeliger D, Diehl S, Wex E, Banholzer R y col. Molecular basis for the long duration of action and kinetic selectivity of tiotropium for the muscarinic M₃ receptor. *J Med Chem*. 2013; 56(21): 8746-56.
- Teitler M, Klein MT. A new approach for studying GPCR dimers: Drug-induced inactivation and reactivation to reveal GPCR dimer function in vitro, in primary culture, and in vivo. *Pharmacology and Therapeutics*. 2012; 133: 205–217.
- Teitler M, Toohey N, Knight J, Klein MT, Smith C. Clozapine and other competitive antagonists reactivate risperidone-inactivated (h)5-HT₇ receptors: Radioligand binding and functional evidence for GPCR homodimer protomer interactions. *Psychopharmacology*. 2010; 212: 687–697.
- Terrillon S, Bouvier M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep*. 2004; 5(1): 30-4. Revisión.
- Thomas DR, Atkinson PJ, Ho M, Bromidge SM, Lovell PJ, Villani AJ y col. [³H]-SB269970-A selective antagonist radioligand for 5-HT₇ receptors. *Br J Pharmacol*. 2000 May; 130(2): 409–17.
- Thomas DR, Atkinson PJ, Hastie PG, Roberts JC, Middlemiss DN, Price GW. [³H]-SB-269970 radiolabels 5-HT₇ receptors in rodent, pig and primate brain tissues. *Neuropharmacology*. 2002; 42(1): 74-81.
- Tiihonen J, Lönnqvist J, Wahlbeck K, Klaukka T, Niskanen L, Tanskanen A y col. 11-year follow-up of mortality in patients with schizophrenia: a population-based cohort study (FIN11 study). *Lancet*. 2009; 374(9690): 620-7.
- Tresadern G, Bartolome JM, Macdonald GJ, Langlois X. Molecular properties affecting fast dissociation from the D₂ receptor. *Bioorg Med Chem*. 2011; 19(7): 2231-41.
- Trincavelli ML, Daniele S, Orlandini E, Navarro G, Casadó V, Giacomelli C y col. A new D₂ dopamine receptor agonist allosterically modulates A_{2A} adenosine receptor

- signalling by interacting with the A_{2A}/D₂ receptor heteromer. *Cell Signal*. 2012; 24(4): 951-60.
- Tummino PJ, Copeland RA. Residence time of receptor-ligand complexes and its effect on biological function. *Biochemistry*. 2008; 47(20): 5481-92.
- Turner JH, Raymond JR. Interaction of calmodulin with the serotonin 5-Hydroxytryptamine 2A receptor. A putative regulator of G protein coupling and receptor phosphorylation by protein kinase C. *J Biol Chem*. 2005; 280: 30741-30750.
- Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S, Terasaki T. Blood-Brain Barrier (BBB) pharmacoproteomics: A new research field opened up by Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP). En: Hammarlund-Udenaes M, de Lange E, Thorne R. *Drug delivery to the brain*. 1ª Ed. Nueva York: Springer; 2014. p. 63-100.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000; 24(1): 125-32.
- Vanover KE, Weiner DM, Makhay M, Veinbergs I, Gardell LR, Lamah J y col. Pharmacological and behavioral profile of N-(4-fluorophenylmethyl)-N-(1-methylpiperidin-4-yl)-N'-(4-(2-methylpropyloxy) phenylmethyl)carbamide (2R, 3R)-dihydroxybutanedioate (2:1) (ACP-103), a novel 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor inverse agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 317: 910–918.
- Varela MJ, Lage S, Caruncho HJ, Cadavid MI, Loza MI, Brea J. Reelin influences the expression and function of dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{2A} receptors: a comparative study. *Neuroscience*. 2015; 290: 165-74.
- Varin T, Gutiérrez-de-Terán H, Castro M, Brea J, Fabis F, Dauphin F y col. Phe369(7.38) at human 5-HT₇ receptors confers interspecies selectivity to antagonists and partial agonists. *Br J Pharmacol*. 2010; 159(5): 1069–81.
- Varnäs K, Thomas DR, Tupala E, Tiihonen J, Hall H. Distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain: a preliminary autoradiographic study using [³H]-SB269970. *Neurosci Lett*. 2004; 367(3): 313-6.
- Vasefi MS, Yang K, Li J, Kruk JS, Heikkila JJ, Jackson MF y col. Acute 5-HT₇ receptor activation increases NMDA-evoked currents and differentially alters NMDA

- receptor subunit phosphorylation and trafficking in hippocampal neurons. *Molecular Brain*. 2013; 6(1): 24.
- Vauquelin G, Charlton SJ. Long-lasting target binding and rebinding as mechanisms to prolong in vivo drug action. *Br J Pharmacol*. 2010; 161(3): 488–508.
- Vauquelin G, Fierens F, Van Liefde I. Long-lasting angiotensin type 1 receptor binding and protection by candesartan: comparison with other biphenyl-tetrazole sartans. *J Hypertens Suppl*. 2006; 24(1): S23-30.
- Vauquelin G, Szczuka A. Kinetic versus allosteric mechanisms to explain insurmountable antagonism and delayed ligand dissociation. *Neurochemistry International*. 2007; 51(5): 254–260.
- Vauquelin G. Rebinding: or why drugs may act longer in vivo than expected from their in vitro target residence time. *Expert Opin Drug Discov*. 2010; 5(10): 927-941.
- Vauquelin G, Van Liefde I. Slow antagonist dissociation and long-lasting in vivo receptor protection. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(7): 356-9.
- Vieta E, Torrent C, Goikolea JM, Murru A. Nuevos tratamientos: Antipsicóticos atípicos. En: Vieta E, Pacchiarotti I. *Novedades en el Tratamiento del Trastorno Bipolar*. 3ªEd. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2014. p. 11-38.
- Villardaga JP, Bünemann M, Krasel C, Castro M, Lohse MJ. Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nat Biotechnol*. 2003; 21 (7): 807-12.
- Vogel R, Mahalingam M, Lüdeke S, Huber T, Siebert F, Sakmar TP. Functional role of the "ionic lock"--an interhelical hydrogen-bond network in family A heptahelical receptors. *J Mol Biol*. 2008; 380(4): 648-55.
- Volpicelli F, Speranza L, di Porzio U, Crispino M, Perrone-Capano C. The serotonin receptor 7 and the structural plasticity of brain circuits. *Front Behav Neurosci*. 2014; 8: 318.
- Wacker D, Wang C, Katritch V, Han GW, Huang XP, Vardy E y col. Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*. 2013; 340(6132): 615-9.

- Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V y col. Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science*. 2013; 340(6132): 610-4.
- Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R y col. Structure of a β_1 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):486-91.
- Weiner DM, Burstein ES, Nash N, Croston GE, Currier EA, Vanover KE y col. 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor inverse agonists as antipsychotics. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 299(1): 268-76.
- Wheatley M, Wootten D, Conner MT, Simms J, Kendrick R, Logan RT y col. Lifting the lid on GPCRs: the role of extracellular loops. *Br J Pharmacol*. 2012; 165(6): 1688–1703.
- Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SG, Huang B, Zare RN, Kobilka B y col. A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(18): 7682-7.
- Whorton MR, Jastrzebska B, Park PS, Fotiadis D, Engel A, Palczewski K y col. Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer. *J Biol Chem*. 2008; 283(7): 4387-94.
- Wilkaitis J, Mulvihill T, Nasrallah H. Antipsicóticos clásicos. En: Schatzberg A, Nemeroff C. *Tratado de psicofarmacología*. 3ªEd. Barcelona: Elsevier, Masson; 2006. p. 65-482.
- Wirshing DA, Boyd JA, Meng LR, Ballon JS, Marder SR, Wirshing WC. The effects of novel antipsychotics on glucose and lipid levels. *J Clin Psychiatry*. 2002; 63(10): 856-865.
- Woehler A, Ponimaskin EG. G protein--mediated signaling: same receptor, multiple effectors. *Curr Mol Pharmacol*. 2009; 2(3): 237-48. Revisión.
- Wonodi I, Gopinath HV, Liu J, Adami H, Hong LE, Allen-Emerson R y col. Dipyridamole monotherapy in schizophrenia: Pilot of a novel treatment approach by modulation of purinergic signaling. *Psychopharmacology*. 2011; 218(2): 341-345.

- Woodward ND, Purdon SE, Meltzer HY, Zald DH. A meta-analysis of neuropsychological change to clozapine, olanzapine, quetiapine and risperidone in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2005; 8: 1-16.
- Xia Z, Gray JA, Compton-Toth BA, Roth BL. A direct interaction of PSD95 with 5-HT_{2A} serotonin receptors regulates receptor trafficking and signal transduction. *J Biol Chem.* 2003; 278: 21901-21908.
- Xia Z, Hufensein SJ, Gray JA, Roth BL. The PDZ-binding domain is essential for the dendritic targeting of 5-HT_{2A} serotonin receptors in cortical pyramidal neurons in vitro. *Neuroscience.* 2003; 122: 907-920.
- Xiberas X, Martinot JL, Mallet L, Artiges E, Canal M, Loc'h C y col. In vivo extrastriatal and striatal D₂ dopamine receptor blockade by amisulpride in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacology.* 2001; 21: 207-214.
- Xu F, Wu H, Katritch V, Han GW, Jacobson KA, Gao ZG y col. Structure of an agonist-bound human A_{2A} adenosine receptor. *Science.* 2011; 332: 322–327.
- Yasui-Furukori N. Update on the development of lurasidone as a treatment for patients with acute schizophrenia. *Drug Design, Development and Therapy.* 2012; 6: 107–115.
- Yatham LN, Kennedy S, Schaffer A. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and the International Society for Bipolar Disorder (ISBD) collaborative update of CANMAT guidelines for the management of patients with bipolar disorder: update 2009. *Bipolar Disord.* 2009; 11(3): 225-255.
- Young AH, McElroy SL, Bauer M, Philips N, Chang W, Olausson B y col; EMBOLDEN I (Trial 001) Investigators. A double-blind, placebo-controlled study of quetiapine and lithium monotherapy in adults in the acute phase of bipolar depression (EMBOLDEN I). *J Clin Psychiatry.* 2010; 71(2): 150-62.
- Young JW, Powell S, Risbrough V, Marston HM, Geyer MA. Using the MATRICS to guide development of a preclinical cognitive test battery for research in schizophrenia. *Pharmacol Ther.* 2009; 122(2): 150–202.

