

Contribució a l'Estudi dels Receptors de Serotonina. Molècules Basades en Indens i Indans

Sara López Pérez

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

**Contribució a l'Estudi dels Receptors de Serotonina.
Molècules Basades en Indens i Indans**

SARA LÓPEZ PÉREZ
Barcelona, 2010

6. Annex I

6.1. Receptor de Serotonina 5-HT₆

6.1 Receptor de Serotonina 5-HT₆

La 5-hidroxitriptamina (5-HT) va ser identificada com a neurotransmissor del sistema nerviós central (SNC) a finals de 1940, de forma independent, per dos grups d'investigació: a Estats Units on va ser anomenada serotonina i a Itàlia on s'anomenà enteramina. Però, no va ser fins a principis del 1950 que la seva síntesi es portà a terme.

La serotonina és un dels neurotransmissors més importants que presenta una gran diversitat d'efectes mediat per la seva unió a diferents receptors específics de membrana (Figura 6.1.1).

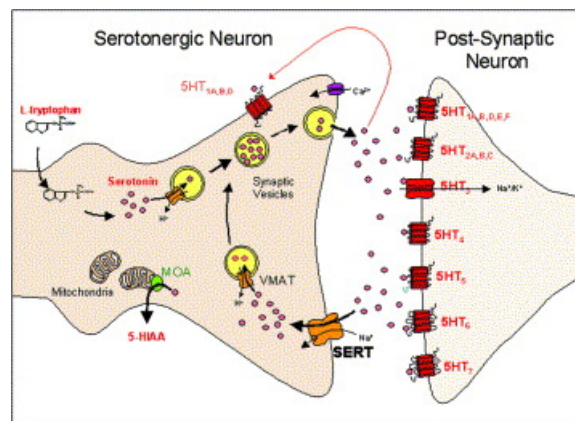


Figure 6.1.1. 5-HT Receptors¹

Tant la serotonina com els seus receptors es troben presents al SNC i perifèric, així com a nombrosos teixits no neuronals de l'intestí, sistema cardiovascular i en cèl·lules sanguínies, modulant una varietat de processos biològics importants, com per exemple la vasodilatació-vasoconstricció, regulació de la temperatura corporal, la son, regulació hormonal, la contractibilitat de la musculatura llisa, l'agregació plaquetària o la cognició-percepció. Per altra part, la seva similitud estructural entre ell i el, llavors, descobert agent al·lucinogènic LSD (àcid dietilamidalièrgic) feia especular que la serotonina devia estar implicada en el mecanisme d'acció de substàncies psicoactives jugant un paper en l'estat anímic així com en diferents desordres mentals.

Fins a la data, s'han identificat 7 famílies de receptors de serotonina (5HT₁-5HT₇) que alhora es divideixen en 14 subtipus (veure Taula 6.1.1), els quals es troben acoblats a proteïnes G (Figura 6.1.2), amb la excepció del receptor 5-HT₃ que actua a través de mecanismes de canals iònics.

¹ Imatge extreta de L. E. Schechter i col., *NeuroRx*[®]: *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutic*, 2005, 2, 590–611.

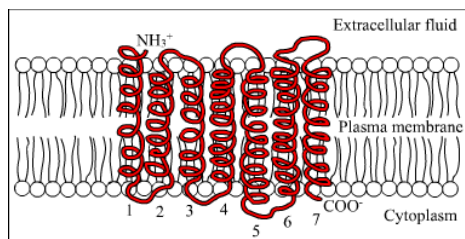


Figure 6.1.2. Schematic diagram of the general structure of G-protein-coupled receptors²

L'àmplia implicació d'aquests receptors en diferents funcions fan d'ells excel·lents dianes biològiques per molts agents terapèutics, com antidepressius, antipsicòtics, ansiolítics, antimigranyosos, antiemètics i al·lucinògens. En conseqüència, s'han focalitzat els estudis més recents al desenvolupament de lligands selectius pels receptors de serotonina, centrant especial atenció en el descobriment de candidats pel receptor 5-HT₆.

Table 6.1.1. Classification and nomenclature for the various populations of 5-HT receptors³

Populations and Subpopulations	Second Messenger System ^a	Currently Accepted Name ^b	Comments
5-HT ₁			
5-HT _{1A}	AC(-)	5-HT _{1A}	Cloned and pharmacological 5-HT _{1A} receptors
5-HT _{1B}	AC(-)	5-HT _{1B}	Rodent homologue of 5-HT _{1B} receptors
5-HT _{1BB}			A mouse homologue of h5-HT _{1B} receptors
5-HT _{1D}			Sites identified in binding studies using human and calf brain homogenates
5-HT _{1Dα}	AC(-)	h5-HT _{1D}	A cloned human 5-HT _{1D} subpopulation
5-HT _{1Dβ}	AC(-)	h5-HT _{1B}	A second cloned human 5-HT _{1D} subpopulation; human counterpart of rat 5-HT _{1B}
5-HT _{1E}	AC(-)	5-HT _{1E}	Sites identified in binding studies using brain homogenates and cloned receptors
5-HT _{1Eα}			An alternate name that has been used for cloned human 5-HT _{1E} receptors
5-HT _{1Eβ}	AC(-)	5-HT _{1F}	A cloned mouse homologue of 5-HT _{1F} receptors
5-HT _{1F}			A cloned human 5-HT ₁ receptor population
5-HT ₂			
5-HT ₂	PI	5-HT _{2A}	Original "5-HT ₂ " (sometimes called 5-HT _{2α}) receptors
5-HT _{2F}	PI	5-HT _{2B}	5-HT ₂ -like receptors originally found in rat fundus
5-HT _{1C}	PI	5-HT _{2C}	Originally described as 5-HT _{1C} (5-HT _{2β}) receptors
5-HT ₃			
5-HT ₃	Ion channel	5-HT ₃	An ion channel receptor
5-HT ₄	AC(+)	5-HT ₄	5-HT ₄ population originally described in functional studies
5-HT _{4S}			Short form of cloned 5-HT ₄ receptors
5-HT _{4L}			Long form of cloned 5-HT ₄ receptors
5-HT _{4(b)-4(d)}			Recently identified human 5-HT ₄ receptor isoforms
5-HT ₅			
5-HT _{5A}	?	5-HT _{5A}	Cloned mouse, rat and human 5-HT ₅ receptors
5-HT _{5B}	?	5-HT _{5A}	Cloned mouse and rat 5-HT _{5A} -like receptor
5-HT ₆			
5-HT ₆	AC(+)	5-HT ₆	Cloned rat and human 5-HT receptor
5-HT ₇			
5-HT ₇	AC(+)	5-HT ₇	Cloned rat, mouse, guinea pig and human 5-HT receptors

^aAC = adenylyl cyclase; (-) = negatively coupled; (+) = positively coupled; PI = phospholipase coupled.
^bCurrently accepted names are taken from Hoyer et al. (8).

² Imatge extreta de W. Kroeze i col. *J. Cell. Sci.*, 2003, 116, 4867–4869.

³ Taula extreta de R.A. Glennon i col. *In FOYE'S Principles of Medicinal Chemistry*, 6th. Ed, 2008, 417–443.

El receptor 5-HT₆ és un dels membres de la família de receptors de serotonina descobert més recentment, identificat al 1990 i clonat al 1993 i 1994 per la rata i el ratolí, respectivament, mentre que el primer receptor 5-HT₆ humà clonat fou en el 1996.

El receptor 5-HT₆ humà és un polipèptid de 440 aminoàcids que presenta un 89% d'homologia en la seqüència amb el receptor 5-HT₆ de rata. És una proteïna integral de membrana que presenta set dominis transmembranals (TM), on s'uneixen els lligands, tres segments intracel·lulars (i1-i3) i tres segments extracel·lulars (e1-e3), com es pot veure a la Figura 6.1.3, que es troben positivament acoblats a sistemes efectors de segon missatger de l'adenilat ciclasa.

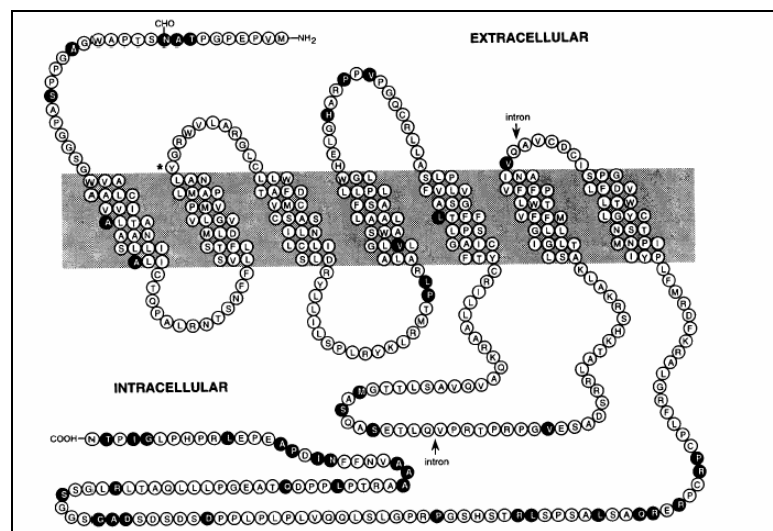


Figure 6.1.3. Schematic representation of a human 5-HT₆ receptor polypeptide chain⁴

La seva importància clínica es troba associada a tres factors: *i*) la seva localització selectiva, quasi exclusiva a nivell del SNC, associat a les àrees d'aprenentatge i memòria, *ii*) la regulació que exerceix sobre l'activitat neuronal colinèrgica i glutaminèrgica, *iii*) l'elevada afinitat que presenta amb els antidepressius i antipsicòtics. Tots aquests factors suggereixen la implicació del receptor 5-HT₆ en malalties del SNC, relacionats amb la cognició (p.ex: esquizofrènia, malaltia d'Alzheimer), desordres del moviment com la malaltia de Parkinson o desordres alimentaris com la obesitat, la bulímia o l'anorèxia.

⁴ Imatge extreta de W.D. Hirst i col. *Mol. Pharmacol.*, **2003**, *64*, 1295–1308.

6.2. Glossari

6.2 Glossari

La literatura sobre farmacologia presenta diferents tipus de nomenclatura i de símbols. Per aquestes raons, és important establir una terminologia comú, on la proposta de la IUPHAR (The International Union of Basic and Clinical Pharmacology) sembla ser la més rellevant i la que es segueix com a principi general, tot i que amb possibles variacions i/o ampliacions, segons els requeriments farmacològics.¹

Conceptes general emprats per descriure l'acció del compost:

Fàrmac: substància química que modifica la funció fisiològica, d'una manera molt determinada.

Receptor: molècula diana amb la que es combina el fàrmac per produir un efecte fisiològic específic.

Agonista: molècula que activa el receptor. Lligand que s'uneix als receptors donant com a resultat una resposta biològica.

Antagonista: molècula que redueix l'acció d'altres compostos, generalment agonistes. Aquest s'uneix al receptor sense activar-lo. El terme fisiològic emprat, també, descriu l'acció d'una substància que exerceix un efecte oposat a la del agonista.

Mesura empírica en l'acció del compost:

a. Mesures generals

Activació del receptor s'entén quan la molècula unida altera al receptor de manera que indueix una resposta tissular.

Afinitat: capacitat d'un fàrmac d'unir-se al receptor. Si no hi ha afinitat no existeix possibilitat d'acció farmacològica.

Eficàcia: capacitat d'un fàrmac d'activar el receptor, un cop s'ha unit a ell i produir l'acció farmacològica.

L'afinitat i l'eficàcia són la base de l'acció farmacològica.

Potència: capacitat d'acció farmacològica d'una substància química per unitat de pes, ja sigui en termes de concentració com en quantitat necessària per produir un efecte determinat. Tot i que aquest concepte és imprecís i hauria de ser més concretat amb altres paràmetres (veure EC_{50} , IC_{50} , etc).

b. Agonistes

E_{max} : resposta màxima que pot produir un compost.

EC_{50} o $[A]_{50}$: concentració molar d'un agonista que produeix el 50% o meitat de l'efecte màxim possible d'aquest agonista.

pEC_{50} o $p[A]_{50}$: logaritme negatiu amb base 10 de l' EC_{50} d'un agonista. També es pot trobar el terme pD_2 , sobretot en la literatura més antiga.

c.

¹ R. R. Neubig, M. Spedding, T. Kenakin i A. Christopoulos, *Pharmacol. Rev.*, **2003**, *55*, 595–606.

Antagonistes

I_{max} : resposta inhibidora màxima que pot produir un compost.

IC_{50} : concentració molar d'un antagonista que redueix una resposta específica al 50% del seu valor màxim, o concentració molar d'un compost (agonista o antagonista) que causa la reducció del 50% de l'afinitat d'un radiolligand (veure determinació de l'afinitat).

➤ Activació d'un Receptor i Naturalesa de l'Eficàcia

Els agonistes i antagonistes s'uneixen als receptors, però només els primers els activen, de forma que el receptor ocupat pot canviar de conformació, des del seu estat de repòs (R) al seu estat activat (R*), sent R* afavorit per la unió d'un agonista però no per la d'un antagonista.

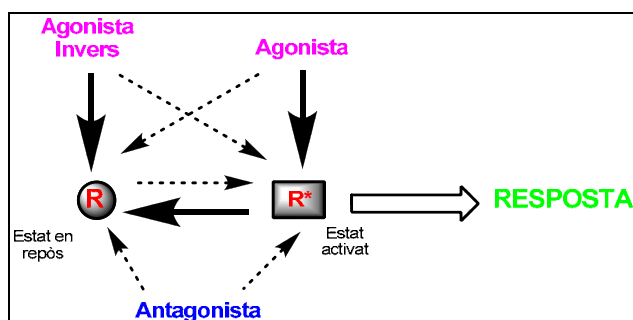


Figura 6.2.1

Normalment, quan no hi ha un lligand present, l'equilibri es desplaça molt cap a l'esquerra, observant pocs receptors en estat R*.

En el cas dels receptors actius de forma constitutiva, una proporció considerable d'ells adopten la configuració R* en absència de lligands.

Els agonistes mostren més afinitat per R* que per R, afavorint l'activació del receptor, i l'equilibri es desplaça cap a la dreta. Quant més gran es l'afinitat relativa per R* en comparació amb R, més gran és l'eficàcia de l'agonista.

Si té preferència important per R*, quasi tots els receptors ocupats adoptaran la configuració R* i el compost serà un agonista total o complet (amb eficàcia positiva).

Un agonista invers mostra més afinitat per R que per R*, el que desplaça l'equilibri cap a l'esquerra (eficàcia negativa).

Un antagonista neutre competitiu té la mateixa afinitat per R que per R* i no altera l'equilibri de configuracions, tot i que redueix la unió d'altres lligands per competició.

L'eficàcia és una propietat que depèn de l'afinitat relativa d'un lligand per R i R*.

➤ Determinació de l'Afinitat

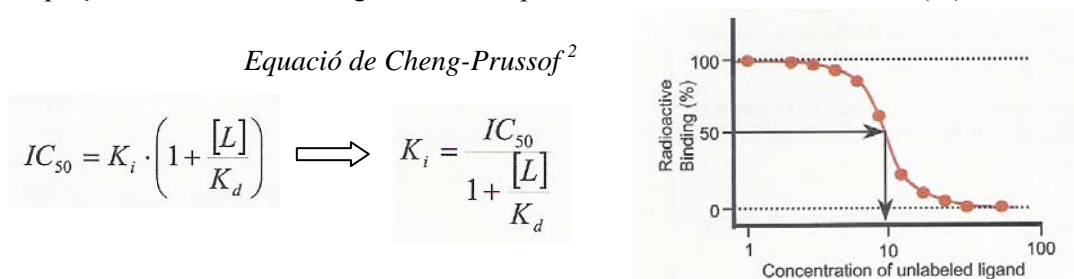
En els últims anys els radiolligands han permès l'examen específic de la interacció inicial entre una substància i els seu lloc d'acoblament.

Podem distingir dos tipus d'assajos d'acoblament amb radiolligands:

- Assajos d'unió directes que mesuren la interacció directa d'un radiolligand amb un receptor, permetent la determinació de propietats cinètiques i d'equilibri, i proporcionant estimacions de la densitat de receptors.
- Assajos d'unió indirecta o de desplaçament. Utilitzats, com és el nostre cas, per determinar l'afinitat dels compostos pel receptor.

Els assajos d'unió indirecta determinen la inhibició d'acoblament d'un radiolligand a un receptor per competència amb un altre compost no marcat pels mateixos llocs d'unió del receptor. D'aquesta manera es dedueix indirectament l'afinitat dels receptors pel lligand no marcat, o dit d'una altra forma, les interaccions de lligands no marcats amb un receptor poden caracteritzar-se estudiant la seva capacitat d'inhibir la unió d'un radiolligand.

La metodologia emprada en els assajos de desplaçament competitiu indirectes es: (a) s'equilibra la concentració de radiolligand a la preparació del receptor; (b) s'addicionen diferents concentracions del lligand no marcat i (c) es determina l' IC_{50} , concentració necessària per desplaçar el 50% dels radiolligands del receptor i la seva constant d'inhibició (K_i).



IC_{50} : concentració que produeix un 50%

d'inhibició de la unió del radiolligand als seus receptors

[L]: concentració de radiolligand lliure

K_d : constant de dissociació del radiolligand al receptor

K_i : constant indirecta que mesura la concentració de molècula no marcada necessària per al desplaçament del 50% del radiolligand del receptor.

Interessen valors de K_i baixos → [L] ↑ → ↑ [Lligand o molècules no marcades unides]

Vist d'una altra manera, en funció als equilibris establerts dels radiolligands i el compost no marcat amb el receptor:



k_{+1} : constant de l'interval d'associació.

k_{-1} : constant de l'interval de dissociació.

Nombre de receptors units al radiolligand: $\frac{d[L^*R]}{dt} = K_{-1}[L^*][R] - K_1[L^*R]$

En equilibri: $K_{-1}[L^*][R] = K_1[L^*R] \Rightarrow K_i = \frac{K_1}{K_{-1}} = \frac{[L^*R]}{[L^*][R]}$

Interessen valors de radiolligand lliure $[L^*]$ elevats i valors de radiolligand unit al receptor $[L^*R]$ baixos, fet que es tradueix en el fet que el compost d'estudi l'ha desplaçat per unir-se ell al receptor. Així, s'explica que quant més baix és el valor de K_i , millor és l'afinitat del compost pel receptor.

² J. Gabrielson i D. Weiner, *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: concepts and applications*, 3rd. Ed. 2000.

➤ **Determinació de la Funcionalitat**

La monitorització de les concentracions d'AMP_c intracel·lular és una de les tècniques més emprades per la caracterització farmacològica dels receptors acoblats a proteïnes G (GPCR). Així, les concentracions d'AMP_c augmenten quan s'uneix un lligand a GPCR per activació de l'adenil ciclase (AC), la qual converteix l'ATP en AMP_c (Figura 6.2.2)

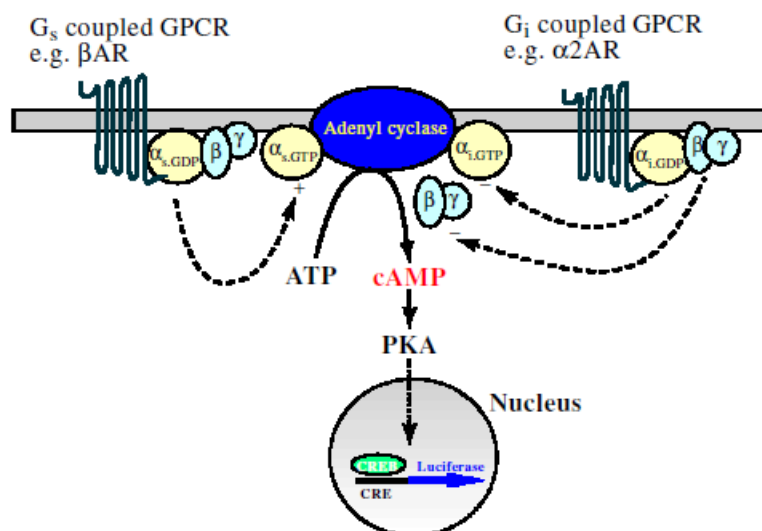


Figura 6.2.2. Agonist-sensitive AC system³

La tècnica de fluorescència emesa en el temps o *Homogeneous time-resolved fluorescent* (HTRF) són immunoassaigs competitiu no radioactiu, que permeten la detecció d'AMP_c mitjançant la determinació de la fluorescència emesa pel complex anticòs-AMP_c marcat. Així, la producció d'AMP_c per la cèl·lula provoca un desplaçament del AMP_c marcat de l'anticòs, amb la conseqüent disminució de la fluorescència (Figura 6.2.3).

L'assaig de funcionalitat de la ciclase s'utilitza per identificar la potència o afinitat dels agonistes per estimulació de l'adenilil ciclase, amb l'augment de producció d'AMP_c i la conseqüent disminució de fluorescència en HTRF i dels antagonistes per la inhibició de l'AMP_c induït per la serotonina, que es tradueix amb un increment de fluorescència.

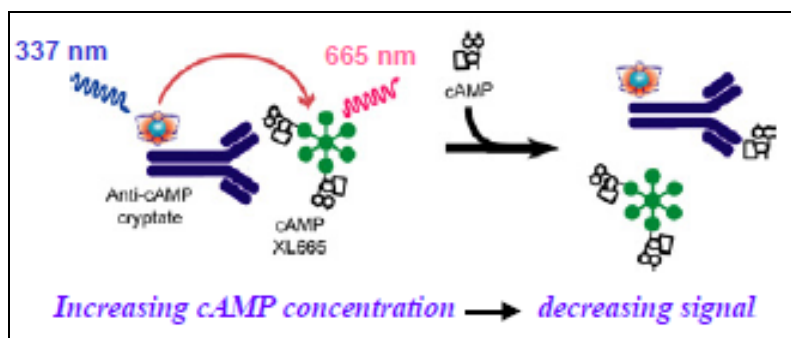


Figura 6.2.3

³ Imatge extreta de D. Gabriel i col., *ASSAY and Drug Devel.Techn.*, 2003, 1, 291–303.