

# Evaluación del receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> en esquizofrenia: un ejemplo de investigación traslacional basada en farmacología

J. Javier Meana, Rebeca Diez-Alarcia e Itziar Muneta-Arrate.

Departamento de Farmacología, Universidad del País Vasco UPV/EHU. Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental, CIBERSAM. Instituto de Investigación Biosanitaria Biocruces Bizkaia.

Correspondencia: J. Javier Meana. Dpto. Farmacología, Universidad del País Vasco, 48940 Leioa, Bizkaia. Email: javier.meana@ehu.es

## Resumen

El estado funcional del receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> en el cerebro de pacientes con esquizofrenia resulta de interés para comprender la sintomatología propia de este proceso. Los diferentes estudios realizados *in vivo* mediante tomografía de emisión de positrones e *in vitro* mediante estudios *postmortem* han mostrado hallazgos contradictorios. La aparente controversia puede explicarse mediante el uso del modelo ternario del complejo fármaco-receptor-proteína G. El receptor 5-HT<sub>2A</sub> presentaría en esquizofrenia un desequilibrio hacia la conformación funcionalmente activa, lo que explicaría las diferencias observadas entre radiotrazadores agonistas y agonistas inversos. La hiperactividad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> muestra una selectividad funcional hacia una vía de señalización que promueve la activación de proteínas G<sub>v/o</sub>. La actividad inducida por fármacos agonistas sobre esta vía de señalización es considerada una huella del potencial proalucinógeno. Por el contrario, la funcionalidad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> se muestra inalterada en la vía canónica, dependiente de proteínas G<sub>q/11</sub>. La utilización de agonistas inversos ha permitido demostrar que la hiperactividad funcional del receptor en esquizofrenia se vincula a un exceso de actividad constitutiva exclusivamente en la vía proalucinógena. Se propone que la actividad antipsicótica más eficaz correspondería a fármacos agonistas inversos sesgados de la vía proalucinógena, procurando dejar indemne la vía canónica de señalización.

## Palabras clave

Receptores serotonina 5-HT<sub>2A</sub>; esquizofrenia; antipsicóticos; agonismo inverso; agonismo sesgado; cerebro humano.

## Conflicto de intereses

Este artículo no presenta conflicto de interés.

## Summary

Alterations of the functional status of brain serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors play a key role in schizophrenia symptoms. *In vivo* positron emission tomography neuroimaging and *in vitro postmortem* studies have reported conflicting results on 5-HT<sub>2A</sub> receptors in schizophrenia. The apparent discrepancies could be explained in the context of the ternary complex model of ligand-receptor-G protein interaction. Schizophrenia shows an imbalance towards the active receptor conformation of 5-HT<sub>2A</sub>, which explains the different results obtained between agonist and inverse agonist radiotracer drugs. In schizophrenia, 5-HT<sub>2A</sub> receptor activation by agonists displays a selective functional hyperactivity for the signaling pathway involving G<sub>v/o</sub>-proteins. The activation of this pathway is considered a fingerprint of hallucinogenic properties. In contrast, the 5-HT<sub>2A</sub> receptor canonical signaling pathway, which involves G<sub>q/11</sub> activation, is not altered. Through the use inverse agonists, it was demonstrated an increased constitutive activity of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in brain cortex of schizophrenia subjects, that exclusively affects the G<sub>v/o</sub>-protein-mediated signaling pathway. According to these findings, the optimal antipsychotic activity would be represented by a biased inverse agonism on the pro-hallucinogenic pathway of 5-HT<sub>2A</sub> receptors, leaving the canonical signaling pathway unaltered.

## Key words

Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors; schizophrenia; antipsychotic drugs; inverse agonism; biased agonism; human brain.

## Conflict of interests

This article does not present a conflict of interest.

## Presentación

La controversia entre estudios de neuroimagen *in vivo* y estudios postmortem *in vitro* sobre el estado del receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> en la esquizofrenia puede resolverse considerando las diferentes propiedades farmacológicas de los compuestos utilizados como radiotrazadores. En el cerebro de pacientes con esquizofrenia, el receptor 5-HT<sub>2A</sub> muestra una hiperactividad funcional sesgada hacia una vía de señalización que activa proteínas G inhibitorias. En base a estos hallazgos, se propone el agonismo inverso sesgado sobre esta vía como un mecanismo de actividad farmacológica eficaz en el tratamiento de la psicosis.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la participación de Ane Miren Gabilondo, Aintzane García-Bea, Patricia Miranda-Azpiazu, Carolina Muguruza y Guadalupe Rivero en los diferentes apartados de este estudio. El trabajo ha sido financiado por la Agencia Estatal de Investigación y los Fondos FEDER (SAF2017-88126R), y el Gobierno Vasco (IT-1211/19 y KK2019/00049). Los autores son miembros del consorcio PSYBIAS, financiado por el Programa ERANET-NEURON. IM-A disfruta de una Ayuda predoctoral para formación de investigadores del Gobierno Vasco.

En un reciente artículo de opinión publicado en *Trends in Pharmacological Sciences*, el autor reconocía cierta frustración como neurofarmacólogo al comprobar que los importantes logros en el conocimiento de la etiopatogenia de las enfermedades del sistema nervioso central (SNC) no se han acompañado de avances paralelos en el desarrollo de fármacos que modificaran el curso de estas entidades nosológicas (Dragunow, 2020). El artículo reflexionaba sobre las diferentes razones que pueden explicar esta paradoja, y entre ellas, figuraba una que siempre nos ha preocupado, la excesiva simplicidad de los modelos experimentales sobre los que se ha estado construyendo el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos al SNC. No cabe duda que los sistemas de cribado basados en modelos simples como, por ejemplo, células artificialmente transfectadas representan herramientas tecnológicas útiles y, sobre todo, baratas. Sin embargo, la pregunta ha de ir más allá: ¿han aportado realmente estas tecnologías información crítica para el desarrollo de medicamentos eficaces y seguros destinados a enfermedades del SNC? ¿cuánta información biológicamente relevante hemos perdido o despreciado en el estudio de las acciones farmacológicas de compuestos mediante el uso de modelos excesivamente simples como estos? ¿hubiera ido el desarrollo de grupos farmacológicos por otros derroteros más óptimos?

A los problemas derivados de los modelos habría que añadir las premisas científicas con las que se sigue partiendo en la mayor parte de los estudios farmacológicos. La Farmacología ha evolucionado notablemente en los últimos veinte años de la mano de otras ciencias biomédicas pero los nuevos conceptos tardan en permeabilizar dentro de la práctica científica, lo que, posiblemente, ha contribuido al retraso en la aparición de auténticas novedades neuro- y psico-farmacológicas. Ideas como el agonismo inverso y el papel farmacológico que pudiera jugar para reducir un exceso de actividad constitutiva basal de una diana farmacológica siguen siendo observadas como exóticas y consideradas relativamente extravagantes en cuanto a utilidad terapéutica. Sin embargo, la denominada eficacia negativa de fármacos es un concepto bien asentado sobre el que Pubmed aporta miles de artículos, si la búsqueda se realiza adecuadamente (Costa y Cotecchia, 2005). Inicialmente descrita para explicar ciertas acciones farmacológicas sobre el canal de los recep-

tores  $GABA_A$ , en la actualidad, la eficacia negativa se aplica también a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), cuya actividad basal se logra reducir mediante los denominados agonistas inversos.

Otro de los conceptos que ha revolucionado el estudio de la actividad farmacológica es el de agonismo sesgado (“biased agonism”), conocido también como selectividad funcional o señalización sesgada (“biased signaling”) cuando se hace referencia a la respuesta funcional derivada del agonismo sesgado. Bajo estas denominaciones se pretende recoger la posibilidad de que diferentes fármacos, actuando sobre el mismo receptor puedan poner en marcha diferentes vías de señalización celular, produciendo efectos variables, en contra de lo que pudiera esperarse de la interacción entre un receptor concreto y fármacos selectivos para el mismo (Violin et al., 2014). El modelo se ha extendido de manera notable para explicar la posibilidad de disociar la señalización dependiente de proteínas G de la dependiente de  $\beta$ -arrestinas en diversos GPCRs (Kenakin, 2019) y una de las aplicaciones terapéuticas más avanzada corresponde a la activación del receptor opioide  $\mu$ . Así, se ha logrado disociar el potencial analgésico mediado por este receptor tras activación con agonistas clásicos como morfina y que parece asociado a la activación de proteínas G, de la depresión respiratoria y otros efectos colaterales como el desarrollo de tolerancia o la reducción del peristaltismo, los cuales parecen depender de la activación de  $\beta$ -arrestinas (Manglik et al., 2016). Aunque esta propuesta se ha traducido en el desarrollo de un nuevo agonista selectivo para la señalización dependiente de proteínas G, la oliceridina o TRV130, existe una gran controversia sobre la existencia de una selectividad funcional tan trascendental y que pudiera revolucionar el desarrollo de fármacos dirigidos al sistema opioide (Gillis et al., 2020).

El presente artículo pretende mostrar la aplicación de estas reflexiones y conceptos al campo del tratamiento de los cuadros psicóticos y a la investigación del papel jugado por el receptor de serotonina  $5-HT_{2A}$  en la esquizofrenia, o al menos, en algunos de los síntomas más llamativos de la misma, como son las alucinaciones y los delirios. Pretendemos mostrar un ejemplo de cómo la investigación traslacional en una trayectoria concreta, en este caso en Neurociencia,

ha precisado del conocimiento profundo y actualizado de conceptos considerados fundamentales en la Farmacología moderna. Se describe cómo, siguiendo una línea de trabajo, se han ido proponiendo hipótesis que han necesitado ser evaluadas en el tejido sustrato de la esquizofrenia, el cerebro humano, que han obligado a utilización de conceptos farmacológicos como el agonismo inverso o la selectividad funcional, y cómo ello ha permitido proponer, para los antipsicóticos denominados atípicos, mecanismos de acción algo diferentes a los establecidos, lo que finalmente ha llevado a propuestas relativamente novedosas sobre cómo debe actuar un fármaco sobre el receptor 5-HT<sub>2A</sub> para convertirse en un adecuado candidato a antipsicótico.

### El receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> en el SNC

Aunque la mayor parte de la serotonina (5-HT) se genera en las células enterocromafines, la presencia de 5-HT como neurotransmisor en el SNC es fundamental para la regulación de diversas funciones como el sueño y la vigilia, el estado emocional, el apetito, el tono de la vascularización cerebral y meníngea, el control de los impulsos nociceptivos, y otras más. De los catorce subtipos de receptores de 5-HT existentes, siete se expresan en el SNC. Entre ellos figura la familia de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, constituida por los subtipos 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>. Los tres receptores se consideran receptores metabotrópicos, es decir, acoplados a proteínas G (Sharp y Barnes, 2020). El receptor 5-HT<sub>2A</sub> es el que se expresa con más densidad en el cerebro de mamíferos, con una especial presencia en áreas corticales e hipocampales. Entre los tipos celulares que expresan este receptor figuran las neuronas piramidales glutamatérgicas y las interneuronas GABAérgicas, encargadas de mantener el adecuado tono de excitación / inhibición de la actividad cortical (Barnes et al., 2021).

La implicación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en los procesos alucinatorios y los trastornos psicóticos atrajo la atención hace décadas, incluso desde antes de su definitiva caracterización farmacológica, molecular y genética. Está demostrado que las acciones psicoactivas de la dietilamida de ácido lisérgico (LSD) y otros análogos como psilocibina y mescalina dependen de su interac-

ción con receptores 5-HT<sub>2A</sub>, dado que esta actividad farmacológica es bloqueada en presencia del antagonista selectivo ketanserina (Holze et al., 2021). La similitud entre algunos de los síntomas psicóticos (alucinaciones visuales, auditivas y/o sensoriales, ideación delirante con pérdida del sentido de la realidad) y los efectos sobre el estado mental tras la administración de LSD llevaron a sugerir una posible alteración de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en el cerebro de sujetos con esquizofrenia (Geyer y Vollenweider, 2008). Esta hipótesis se vio reforzada tras demostrarse que los fármacos con actividad antagonista sobre receptores 5-HT<sub>2A</sub> asociada a un antagonismo dopaminérgico (olanzapina, clozapina, risperidona, etc) se comportaban como excelentes antipsicóticos, que además podían eludir los indeseables efectos extrapiramidales de los fármacos más clásicos como haloperidol. Sin embargo, la posibilidad de una eficacia antipsicótica basada exclusivamente en las propiedades antagonistas sobre el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, evitando la interacción con receptores de la familia dopamina D<sub>2</sub>, no pudo demostrarse, asentándose el axioma de la necesidad de antagonismo dopaminérgico como algo imprescindible para lograr eficacia antipsicótica (Miyamoto et al., 2005). Este axioma ha quedado en entredicho una vez se ha demostrado que un fármaco carente de afinidad por receptores de la dopamina, como el caso de la pimavanserina, puede ser eficaz frente a determinados tipos de psicosis (Cummings et al., 2014).

En base a los hallazgos previos es razonable proponer la evaluación del estado de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> en el cerebro de pacientes con esquizofrenia, bajo la hipótesis de una posible disfunción de los mismos en relación con la enfermedad. Esta posibilidad estaba abierta debido a la existencia de radiotrazadores bastante útiles para su uso *in vivo* mediante tomografía de emisión de positrones (PET) y de radioligandos selectivos para ser utilizados en evaluaciones *in vitro* desarrolladas sobre tejido cerebral *postmortem*.

Los estudios desarrollados mediante ambas tecnologías han sido múltiples, con diferentes metodologías y condiciones experimentales y, sobre todo, con hallazgos controvertidos. Abreviando un debate científico que ha perdurado más de una década, podríamos reseñar que mientras los estudios *in vivo* mediante PET apuntan a un descenso de la densidad de receptores

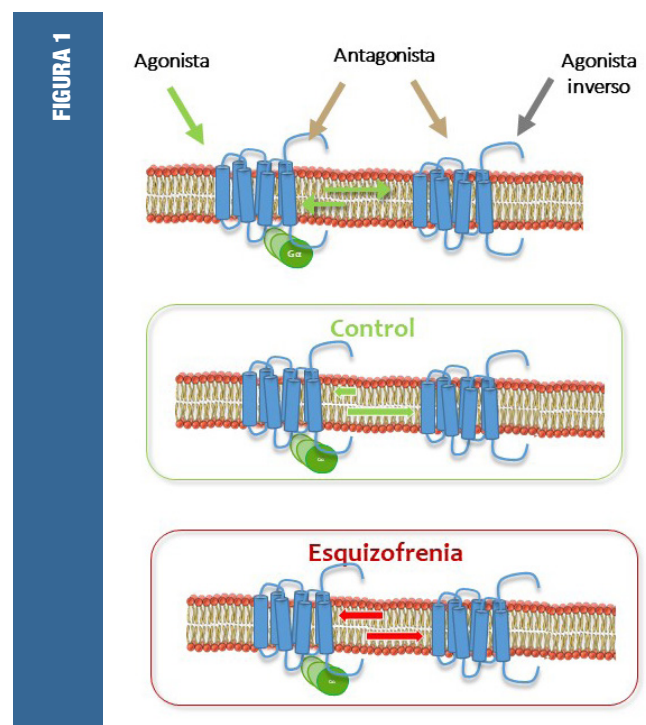
5-HT<sub>2A</sub> en la corteza cerebral de pacientes con esquizofrenia, los estudios *postmortem* parecen indicar justo lo opuesto, es decir, un incremento en la densidad de estos mismos receptores (Diez-Alarcia et al., 2021a).

**La importancia de las propiedades farmacológicas del radiotrazador para entender el estado funcional del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la esquizofrenia**

La aparente discrepancia entre resultados *in vivo* y resultados *in vitro* ha podido ser resuelta recientemente considerando, una vez controlados otros factores tales como el efecto del tratamiento concomitante, las propiedades de los diferentes radiotrazadores utilizados. Un análisis de la literatura previa, nos permitió detectar que los estudios que mejor demostraban el descenso de receptores 5-HT<sub>2A</sub> en cerebro de esquizofrénicos utilizaban como radiotrazador para PET la [<sup>18</sup>F]altanserina, un isótopo generado a partir de altanserina. Por el contrario, los estudios *postmortem* estaban desarrollados con radioligandos como [<sup>3</sup>H]ketanserina o [<sup>3</sup>H]LSD y apuntaban hacia incrementos de la densidad de receptores 5-HT<sub>2A</sub>. En estudios paralelos desarrollados para evaluar la actividad intrínseca de cada uno de estos dos fármacos sobre la activación de proteínas G en tejido cortical humano pudimos comprobar que la altanserina, teóricamente un antagonista 5-HT<sub>2A</sub>,

se comportaba realmente como un agonista inverso (Diez-Alarcia et al., 2019) y que la ketanserina, un antagonista 5-HT<sub>2A</sub> clásico, tenía un perfil más propio de agonista parcial (Muguruza et al., 2013). Conforme al modelo ternario de la interacción entre fármaco, receptor y proteína G, estábamos ante un receptor, el 5-HT<sub>2A</sub>, con diferentes estados conformacionales donde los agonistas reconocerían preferentemente un estado, funcionalmente activo y acoplado a proteínas G, mientras que los agonistas inversos reconocerían preferentemente el estado desacoplado de estas proteínas. Ambos estados conformacionales son intercambiables y los resultados acumulados parecían sugerir que en el cerebro de pacientes con esquizofrenia el equilibrio estaría desplazado hacia el estado de alta afinidad, el mejor reconocido por agonistas (Calebiro et al., 2021). En consecuencia, los radiotrazadores agonistas indicarían un incremento de receptores 5-HT<sub>2A</sub> mientras que los radiotrazadores agonistas inversos apuntarían hacia un descenso de los mismos en la esquizofrenia (Figura 1). Si esta hipótesis fuera cierta, debían concurrir una serie de hallazgos que fueron confirmándose: a) los nucleótidos de guanina debieran promover un mayor desacople en esquizofrenia respecto a sujetos control (Muguruza et al., 2013); b) el uso de [<sup>18</sup>F]altanserina en tejido *postmortem* debía reproducir un descenso de densidad de receptores 5-HT<sub>2A</sub> mientras que

**Figura 1.** Para los GPCRs, el modelo ternario de la interacción entre fármaco, receptor y proteína G propone que los fármacos agonistas poseen afinidad preferente por el estado funcionalmente activo, es decir el acoplado a la proteína G. Los agonistas inversos presentan afinidad preferente por el estado inactivo, el desacoplado de la proteína G. Los fármacos antagonistas no discriminan entre ambos estados, poseyendo similar afinidad por ambos. En condiciones basales existe un equilibrio entre las conformaciones activa e inactiva del receptor. Ambas conformaciones son intercambiables y el equilibrio puede ser desplazado hacia el estado activo (agonistas) o inactivo (agonistas inversos). La presencia de una proporción de receptores en su conformación activa aún en ausencia de agonista podría explicar la existencia de actividad constitutiva basal del receptor. En la esquizofrenia, el receptor 5-HT<sub>2A</sub> expresado en la corteza cerebral mantendría un equilibrio desplazado hacia el estado conformacional activo en relación con las condiciones control. Ello se reflejaría en una mayor densidad de receptores 5-HT<sub>2A</sub> cuando se identifican con radiotrazadores agonistas mientras que, en las mismas condiciones, el marcaje con radiotrazadores agonistas inversos sugeriría una densidad reducida.





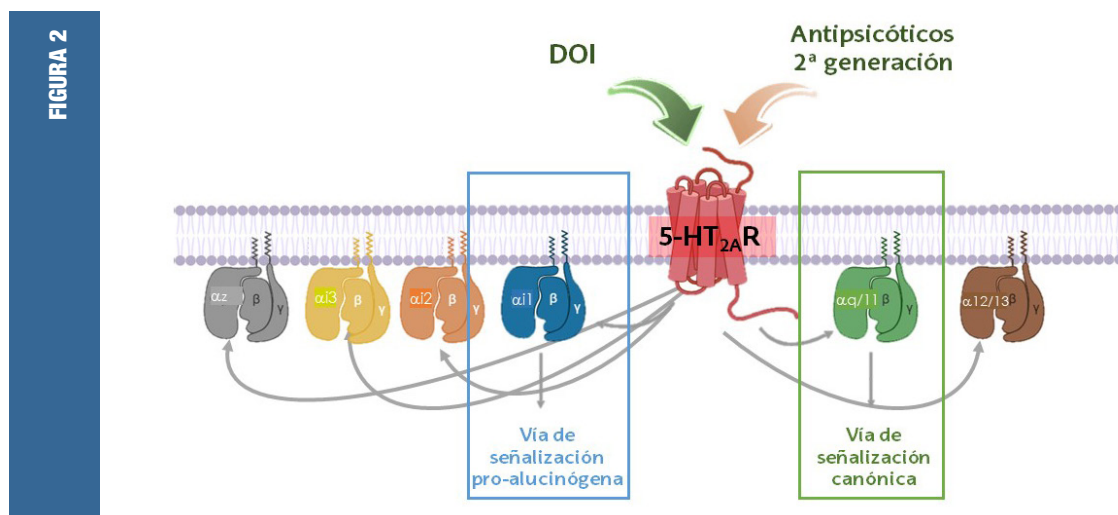
en la misma preparación los agonistas tipo [<sup>3</sup>H]LSD, [<sup>3</sup>H]DOI e incluso el agonista parcial [<sup>3</sup>H]ketanserina debían mostrar un incremento (Diez-Alarcia et al., 2021a); c) los radioligandos antagonistas como [<sup>3</sup>H]MDL100907, que identificarían ambas conformaciones moleculares con igual afinidad, y la cuantificación de la expresión total de la proteína receptora mediante inmunodetección no debieran mostrar diferencias entre sujetos esquizofrénicos y controles (García-Bea et al., 2019; Diez-Alarcia et al., 2021a); d) la activación de proteínas G por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> en respuesta a un agonista debía ser superior en esquizofrenia (García-Bea et al., 2019).

**La hiperactividad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> está mediada por una vía no canónica, dependiente de proteínas G inhibitorias**

El receptor 5-HT<sub>2A</sub> se considera habitualmente como un receptor metabotrópico acoplado a un subtipo de proteínas G, las denominadas G<sub>q/11</sub>, las cuales activan la fosfolipasa C, induciendo la formación de inositol trifosfato y diacilglicerol. Esta vía de señalización está considerada como la vía “canónica” del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, aunque también se ha descrito la existencia de otros tipos de mecanismos de activación celular

(Martí-Solano et al., 2015). En células transfectadas y en modelizaciones informáticas parece demostrarse que la interacción entre el receptor 5-HT<sub>2A</sub> y las proteínas inhibitorias G<sub>i/o</sub> en respuesta a un agonista 5-HT<sub>2A</sub> alucinógeno es altamente improbable (Kim et al., 2020), reforzando el papel del acople preferencial a la proteína G<sub>q/11</sub>. Sin embargo, este dato fue puesto en entredicho hace ya más de una década por el grupo de González-Maeso, al demostrar que la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> podía llevar a diferentes vías de señalización en tejido cerebral de roedor en función de que el agonista utilizado presentara o no propiedades alucinógenas (Gonzalez-Maeso et al., 2003). Así el LSD o la dimetoxi-iodo-anfetamina (DOI), ambos agonistas del receptor 5-HT<sub>2A</sub> con potencial alucinógeno, eran capaces de activar la vía canónica dependiente de proteínas G<sub>q/11</sub> pero también otra vía que utilizaba como mediador las proteínas G<sub>i/o</sub>. Por el contrario, la lisurida y la ergotamina, agonistas del receptor 5-HT<sub>2A</sub> sin potencial alucinógeno, solo activaban la vía mediada por G<sub>q/11</sub>. Por lo tanto, la activación de las proteínas G inhibitorias parecía representar una huella del potencial alucinógeno de agonistas del receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Figura 2). Este hallazgo significaba la presencia de selectividad funcional en la activación del receptor y la existencia de agonistas sesgados para el mismo, con la particularidad de que estos fenómenos involu-

**Figura 2.** La vía de señalización más conocida del receptor cerebral de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> es a través de proteínas G<sub>q/11</sub>, por lo que suele denominarse como vía canónica. Complementariamente el receptor 5-HT<sub>2A</sub> es capaz de activar también proteínas G inhibitorias de la familia G<sub>i/o</sub>. Esta vía de señalización es activada por los agonistas del receptor que poseen actividad alucinógena, tales como LSD, DOI, etc., mientras que los agonistas sin potencial alucinógeno (lisurida, pergolida, ergotamina) no son capaces de activarla, un fenómeno que se conoce como selectividad funcional o agonismo sesgado. El receptor 5-HT<sub>2A</sub> es una de las dianas farmacológicas de los antipsicóticos de segunda generación tales como clozapina, olanzapina, risperidona, paliperidona, etc. Clásicamente se ha considerado que estos fármacos actuarían como antagonistas del receptor.



craban dos vías diferentes pero ambas asociadas a proteínas G, a diferencia de lo descrito habitualmente donde una vía suele ser dependiente de proteínas G y la otra de  $\beta$ -arrestinas.

Con la sospecha de una hiperactividad del receptor 5-HT<sub>2A</sub> y la presencia de una selectividad funcional por el acople a proteínas inhibitorias G<sub>i/o</sub> por parte de los agonistas alucinógenos, lo que procedía en un siguiente paso era evaluar el acople de cada uno de los subtipos de proteínas G al receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la corteza cerebral de pacientes con esquizofrenia. Para ello, se puso a punto una técnica denominada “scintillation proximity assay” (SPA) que permite medir el intercambio de GDP/GTP sobre la subunidad  $\alpha$  de la proteína G en respuesta a la activación del receptor por un agonista y aísla cada proteína G mediante inmunoprecipitación con anticuerpos selectivos para cada subtipo. Esta metodología puede considerarse de naturaleza funcional, dado que exige cambios conformacionales de la proteína G (acople al receptor, disociación de subunidades, intercambio de GDP por GTP) en respuesta a la interacción fármaco-receptor, y es viable en tejido cerebral humano *postmortem* (Diez-Alarcia et al., 2021b).

La caracterización inicial mostró cómo diferentes agonistas del receptor 5-HT<sub>2A</sub> con propiedades alucinógenas eran capaces de activar muy selectivamente el subtipo G<sub>i1</sub> de proteínas inhibitorias además de la proteína G<sub>q</sub> en corteza prefrontal humana (Miranda-Azpiazu et al., 2013; García-Bea et al., 2019). Complementariamente, los agonistas 5-HT<sub>2A</sub> no alucinógenos como la lisurida o la pergolida solo activaban la proteína G<sub>q</sub> (Miranda-Azpiazu et al., 2013; Muneta-Arrate et al., 2020a). Con esta premisa, se evaluó la respuesta de ambas proteínas a la activación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> mediante el agonista DOI, comprobándose que la vía “pro-alucinógena” vinculada a G<sub>i1</sub> estaba hiperactiva en el cerebro de sujetos con esquizofrenia mientras que la vía canónica, dependiente de G<sub>q</sub>, permanecía inalterada (García-Bea et al., 2019). El hallazgo representaba una de las primeras demostraciones, posiblemente la primera, de alteraciones en la señalización sesgada de un receptor en relación a una entidad psiquiátrica. La exploración de la funcionalidad de un receptor en el SNC mediante diversos fármacos, a priori todos ellos agonistas, evaluando cuidadosamente las

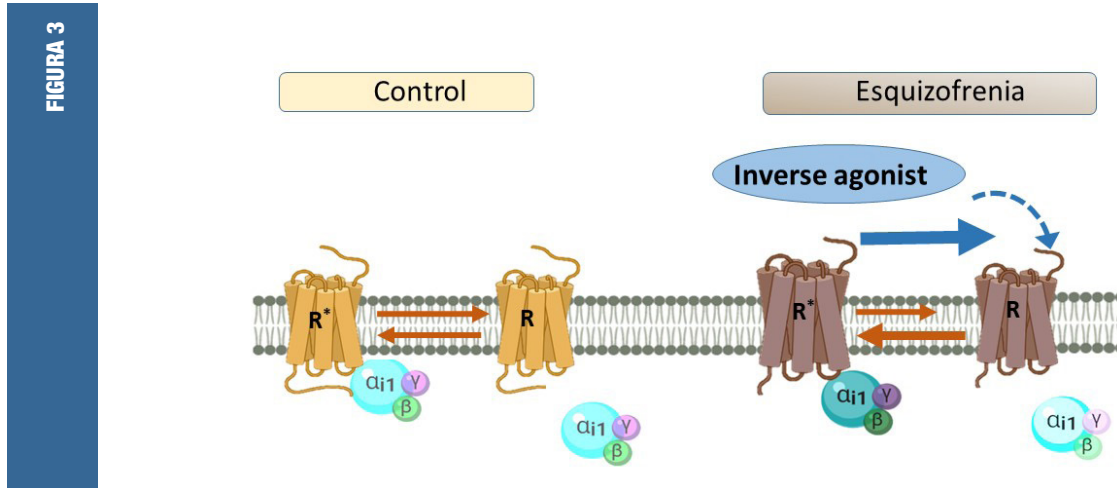
diferentes respuestas observadas mostraba la importancia de conceptos farmacológicos como el agonismo sesgado como instrumento clave que permitía discernir alteraciones moleculares subyacentes a una enfermedad tan abigarrada como la esquizofrenia.

### **¿Está la hiperactividad selectiva del receptor 5-HT<sub>2A</sub> a través de proteínas G<sub>i1</sub> vinculada a un exceso de actividad constitutiva del receptor a través de esta vía de señalización? La necesidad de agonistas inversos**

La actividad intrínseca de diferentes GPCRs para activar la señalización a través de proteínas G en ausencia de agonista es un hecho bastante aceptado (Costa y Cotecchia, 2005). Para el caso del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, ya se había propuesto la posible existencia de una actividad constitutiva en condiciones basales en tejido cerebral, aunque también ha sido cuestionada (Aloyo et al., 2005; De Deurwaerdère et al., 2020). La demostración de actividad constitutiva basal en un receptor requiere de una serie de condiciones tales como disponer de agonistas inversos que permitan reducirla, que el efecto agonista inverso sea sensible a antagonistas, estar presente en ausencia del neurotransmisor endógeno y desaparecer en animales “knock-out” del receptor correspondiente (Muneta-Arrate et al., 2020a).

Una de las primeras tareas para poder responder a la pregunta que encabeza esta sección fue comprobar si el receptor 5-HT<sub>2A</sub> en corteza cerebral humana presentaba actividad constitutiva. Para ello, se utilizó la tecnología SPA porque podía informar complementariamente si esta actividad constitutiva ofrecía un carácter sesgado, es decir, si estaba presente en el acople del receptor solamente a ciertas vías de señalización, pero no a todas. Fue necesaria una evaluación preliminar de multitud de compuestos, definidos *a priori* como antagonistas, pero cuyas propiedades farmacológicas podían corresponderse o sospecharse como agonismo inverso para dar con la herramienta farmacológica adecuada (Diez-Alarcia et al., 2019). Uno de los compuestos más atractivos resultó ser la pimavanserina. Este fármaco está comercializado en EEUU como antipsicótico para indicaciones ajenas a la esquizofrenia, por ejemplo, la psicosis en pacientes

**Figura 3.** La hipótesis de un exceso de actividad constitutiva del receptor 5-HT<sub>2A</sub> sesgada hacia la señalización pro-alucinógena mediada por proteínas G<sub>i1</sub> en la esquizofrenia sugiere que esta alteración pudiera ser susceptible de reversión mediante el uso de agonistas inversos propios de esa vía, procurando dejar indemne la señalización de la vía canónica, dependiente de G<sub>q/11</sub>. La pimavanserina y algunos de los fármacos antipsicóticos de segunda generación parecen poseer propiedades como agonistas inversos sobre la activación de G<sub>i1</sub> y como antagonistas neutros sobre el acople a G<sub>q/11</sub>.



con enfermedad de Parkinson. Tal y como se reseñaba anteriormente, puede considerarse el único antipsicótico comercializado que carece de afinidad por los receptores de dopamina, lo que rompe el axioma del antagonismo dopaminérgico sobre la familia de receptores dopamina D<sub>2</sub> como condición necesaria para ejercer eficacia antipsicótica. La pimavanserina posee importante afinidad por receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> y su ficha técnica la presenta como un agonista inverso del receptor 5-HT<sub>2A</sub>. Esta última afirmación ha levantado polémica ya que se basa en estudios celulares desarrollados sobre sistemas reconstituidos que sobreexpresan el receptor y la proteína G<sub>q</sub>, pero no existían datos funcionales *in vivo*, y mucho menos en humanos, que permitieran refrendar esa afirmación (Nutt et al., 2017).

En tejido cortical humano pudimos comprobar que la pimavanserina era capaz de inhibir la actividad basal del acople entre el receptor 5-HT<sub>2A</sub> y la proteína G<sub>i1</sub> mientras que se mostraba ineficaz en el acople del receptor a proteína G<sub>q</sub> (Muneta-Arrate et al., 2020a). El efecto era sensible a un antagonista neutro como MDL-11939 y desaparecía en ratones “knock-out” del receptor. Así pues, se confirmaba la existencia de una actividad constitutiva basal en la vía pro-alucinógena y se demostraban, por vez primera, las propiedades

como agonista inverso sesgado del fármaco pimavanserina. Complementariamente era necesario buscar y evaluar otros agonistas inversos, sesgados o no, para conocer el estado funcional de la vía canónica del receptor 5-HT<sub>2A</sub>. La volinanserina parecía cumplir el requisito de comportarse como un agonista inverso, aunque con baja eficacia negativa, del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la inhibición del acople del mismo a las diferentes proteínas G; adicionalmente no parecía presentar selectividad funcional entre proteínas G inhibitorias y proteínas G<sub>q/11</sub> (Muneta-Arrate et al., 2020b).

Una vez establecidas las condiciones metodológicas para evaluar la potencialidad de pimavanserina y volinanserina sobre la inhibición de la actividad constitutiva basal del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en cerebro humano *postmortem*, era el momento de contrastar si la hiperactividad hacia la vía pro-alucinógena anteriormente observada en esquizofrenia iba acompañada de un incremento de la actividad constitutiva del receptor sobre esta vía y si era reversible por los agonistas inversos. Los hallazgos más recientes del grupo (Muneta-Arrate et al., 2022, en preparación) indican que: a) la pimavanserina y la volinanserina presentan una mayor eficacia como agonistas inversos de la vía G<sub>i1</sub> en esquizofrenia respecto a controles; b) la volinanserina ofrece similar eficacia como agonista inverso de



la vía  $G_q$  en esquizofrenia comparado con controles; c) los hallazgos no son consecuencia de cambios en la expresión basal de las proteínas G sino que representan cambios en el acople entre el receptor 5-HT<sub>2A</sub> y la correspondiente proteína G. Por lo tanto, tenemos la confirmación de que, en corteza prefrontal de sujetos con esquizofrenia, el receptor 5-HT<sub>2A</sub> presenta una actividad funcional incrementada y selectiva en su acople con proteínas  $G_{11}$ . Este hallazgo es concordante con los estudios desarrollados *in vivo* mediante PET e *in vitro* mediante radioligandos. Las razones que llevan a que el receptor 5-HT<sub>2A</sub> esté hiperactivo en la corteza cerebral de sujetos con esquizofrenia siguen siendo desconocidas. Cuando esta situación de actividad constitutiva exacerbada se ha observado en otros GPCRs, las razones suelen estar en mutaciones puntuales que determinan una ganancia funcional, por ejemplo, en el receptor de la hormona luteinizante LH (Shenker et al., 1993). En el caso del receptor 5-HT<sub>2A</sub> no hay variantes genéticas claramente asociadas a la esquizofrenia, a pesar de los múltiples estudios realizados al respecto. Caben otras explicaciones alternativas como, por ejemplo, la influencia de otras proteínas con las que el receptor 5-HT<sub>2A</sub> forma complejos postsinápticos (Calebiro et al., 2021).

Vistos los hallazgos experimentales anteriores, es lógico pensar que una manera de revertir la hiperactividad sesgada del receptor 5-HT<sub>2A</sub> hacia la vía pro-alucinógena podría ser el uso de fármacos actuando como agonistas inversos sesgados sobre esta vía (Figura 3). Cuanto más selectivos hacia la vía de señalización mediada por proteínas  $G_{11}$  sean estos potenciales fármacos, menos potenciales efectos colaterales asociados a la vía canónica podrían derivarse. Por otro lado, ante un exceso de actividad constitutiva como el aquí observado, una eficacia negativa, propiedad asociada al agonismo inverso, podría incrementar la potencialidad terapéutica respecto al puro antagonismo sobre el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, mecanismo hasta ahora propuesto como el adecuado para lograr actividad antipsicótica. Esta consideración obliga a realizar dos reflexiones con la información científica disponible hasta el momento: a) la primera es preguntarse si la pimavanserina ha mostrado eficacia antipsicótica en el tratamiento de la esquizofrenia superior a los tratamientos establecidos; b) la segunda es cuestionarse si los antipsicóticos con afinidad por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> son

realmente antagonistas o podrían poseer propiedades como agonistas inversos de este receptor, aunque no se haya comprobado fehacientemente hasta ahora.

La primera cuestión tiene una respuesta parcial hasta el momento. Una búsqueda de ensayos clínicos de pimavanserina en esquizofrenia parece sugerir ausencia de eficacia en estudios fase II y fase III. Sin embargo, la mayor parte de los estudios han evaluado la pimavanserina como fármaco añadido al tratamiento antipsicótico habitual. Si, como se ha sugerido, los antipsicóticos más habituales se comportan como antagonistas del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, de la adición de pimavanserina a estos fármacos no se esperaría *a priori* ningún efecto farmacológico sobreañadido. El antagonista impediría la visualización de la eficacia como agonista inverso sesgado de la pimavanserina. Por lo tanto, el diseño experimental de este tipo de estudios debiera plantearse desde otra perspectiva.

### **¿Son los antipsicóticos con afinidad por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> antagonistas o agonistas inversos del mismo? ¿Presentan eficacia negativa sesgada hacia la vía pro-alucinógena mediada por proteínas $G_{11}$ ?**

La segunda cuestión arriba planteada nos llevó a rediseñar nuevos experimentos en tejido cerebral humano destinados a responder este otro reto de interés farmacológico. La literatura previa disponible ha llegado a sugerir que fármacos como la clozapina, la risperidona y la olanzapina podrían comportarse como agonistas inversos de la señalización canónica de los receptores 5-HT<sub>2A/C</sub>, aunque, de nuevo, estos datos proceden mayoritariamente de estudios en modelos recombinantes donde se ha sobreexpresado el receptor (Sullivan et al., 2015).

Los antipsicóticos de segunda generación, denominados así por su elevada afinidad por los receptores de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, junto a su potencial como antagonistas dopaminérgicos, poseen además importante afinidad por otros GPCRs tales como los colinérgicos muscarínicos, los adrenoceptores, los receptores histaminérgicos, etc. Por lo tanto, un estudio detallado de las propiedades farmacológicas (antagonistas, agonistas inversos, agonistas parciales en algún caso) sobre la señalización mediada por proteí-

nas G precisaría de modelos celulares recombinantes sobre los que explorar una a una cada diana de interés. Sin embargo, tal y como se ha ido mostrando más arriba, esta aproximación se aleja de la realidad del tejido nativo donde los diferentes GPCRs conviven, interaccionan entre ellos y, como sabemos, llegan a conformar homo- y hetero-oligómeros cuya actividad funcional difiere de la primitiva de cada receptor contribuyendo al complejo oligomérico. Por ello, decidimos realizar un abordaje, tal vez más primitivo, pero que nos ofreciera una imagen global de la actividad de los antipsicóticos sobre cada una de las proteínas G. Se estableció el efecto agonista, agonista inverso o neutro de cada uno de los antipsicóticos más habitualmente utilizados sobre la actividad de las proteínas G en corteza prefrontal humana. Posteriormente, esas acciones fueron analizadas en presencia de antagonistas selectivos de cada uno de los GPCRs reconocidos por los antipsicóticos. El ensayo se realizó también utilizando corteza cerebral de animales knock-out para el receptor 5-HT<sub>2A</sub> a fin de comprobar la desaparición de las acciones mediadas por el mismo.

Los resultados de esta parte del estudio son todavía preliminares, pero podemos aventurarnos con algunas conclusiones de gran interés para la línea de trabajo aquí descrita:

a) la clozapina, la risperidona, la paliperidona y la olanzapina poseen actividad como agonistas inversos del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en su acople a la vía “pro-alucinógena”, dependiente de proteínas G<sub>i1</sub>.

b) los efectos de estos antipsicóticos sobre la proteína G<sub>q/11</sub> son más variables y pueden implicar estimulaciones mediadas por receptores muscarínicos (clozapina), inhibiciones mediadas por adrenoceptores  $\alpha_1$  (risperidona) y habitualmente nula actividad en lo que respecta al receptor 5-HT<sub>2A</sub>.

## Conclusiones

El presente artículo describe un resumen de las actividades desarrolladas en relación al estudio del estado del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la corteza prefrontal de pacientes con esquizofrenia. El trabajo demuestra que este receptor presenta una sobreactividad funcional muy selectiva hacia una vía de señalización del mis-

mo poco conocida, como es la dependiente del acople a proteínas G inhibitorias, en concreto el subtipo G<sub>i1</sub>. Se describe cómo el conocimiento de conceptos farmacológicos clave como son el agonismo sesgado (“biased agonism”), la selectividad funcional o el agonismo inverso han permitido demostrar la existencia de alteraciones conformacionales del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la esquizofrenia, que afectan notablemente a su funcionalidad.

Como consecuencia de los hallazgos obtenidos en esquizofrenia, una reevaluación de los fármacos antipsicóticos con afinidad por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> demuestra que, en contra de su consideración habitual como fármacos antagonistas de ese receptor, la actividad como agonistas inversos sobre la vía de señalización dependiente de proteínas G<sub>i1</sub> podría representar un mecanismo de acción crítico en su eficacia terapéutica frente a la sintomatología psicótica.

Una última lección aprendida del desarrollo de esta línea de trabajo indica que no debemos aceptar resignadamente propiedades farmacológicas descritas o desechadas mediante ensayos de cribado en modelos de células aisladas y preparadas *ad hoc* para este tipo de evaluaciones “high-throughput”. El ensayo en tejido biológico nativo, con su heterogeneidad celular y molecular, continúa siendo un paso imprescindible y crítico en los procesos de desarrollo de fármacos para el SNC. Del estudio en tejido nativo pueden derivarse hallazgos inesperados pero que, adecuadamente interpretados, pueden contribuir a incrementar las posibilidades de éxito en el desarrollo de nuevas moléculas con potencial terapéutico.

## Referencias

1. Aloyo, VJ, Berg, KA, Spampinato, U, Clarke, WP, Harvey, JA. Current status of inverse agonism at serotonin<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2A</sub>) and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Pharmacol. Ther.* 2009; 121: 160-173.
2. Barnes, NM, Ahern, GP, Becamel, C, Bockaert, J, Camilleri, M, Chaumont-Dubel, S, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function. *Pharmacol. Rev.* 2021; 73: 310-520.
3. Calebiro, D, Koszegi, Z, Lanoiselée, Y, Miljus, T, O'Brien, S. G protein-coupled receptor-G protein interactions: a single-molecule perspective. *Physiol. Rev.* 2021; 101: 857-906.
4. Costa, T, Cotecchia, S. Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005; 26: 618-624.
5. Cummings, J, Isaacson, S, Mills, R, Williams, H, Chi-Burris, K, Corbett, A, et al. Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2014; 383: 533-540.
6. De Deurwaerdère, P, Bharatiya, R, Chagraoui, A., Di Giovanni, G. Constitutive activity of 5-HT receptors: factual analysis. *Neuropharmacology* 2020; 168: 107967.
7. Diez-Alarcia, R, Yáñez-Pérez, V, Muneta-Arrate, I, Arrasate, S, Lete, E, Meana, JJ, González-Díaz, H. Big Data Challenges Targeting Proteins in GPCR Signaling Pathways; Combining PTML-ChEMBL Models and [35S]GTPγS Binding Assays. *ACS Chem. Neurosci.* 2019; 10: 4476-4491.
8. Diez-Alarcia, R, Muguruza, C, Rivero, G, García-Bea, A, Gómez-Vallejo, V, Callado, LF, et al. Opposite alterations of 5-HT<sub>2A</sub> receptor brain density in subjects with schizophrenia: relevance of radiotracers pharmacological profile. *Transl. Psychiatry.* 2021a; 11: 302.
9. Diez-Alarcia, R, Odagaki, Y, Miranda-Azpiazu, P, Gabilondo, AM, Meana, JJ, Muneta-Arrate, I. Functional approaches to the study of G-protein-coupled receptors in postmortem brain tissue: [35S]GTPγS binding assays combined with immunoprecipitation. *Pharmacol. Rep.* 2021b; 73: 1079-1095.
10. Dragunow, M. Human Brain Neuropharmacology: A Platform for Translational Neuroscience. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41: 777-792.
11. García-Bea, A, Miranda-Azpiazu, P, Muguruza, C, Marmolejo-Martinez-Artesero, S, Diez-Alarcia, R, Gabilondo, AM, et al. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor expression and functionality in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: Selective biased agonism via G<sub>αi1</sub>-proteins. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2019; 29: 1453-1463.
12. Geyer, MA, Vollenweider, FX. Serotonin research: contributions to understanding psychoses. *Trends Pharmacol. Sci.* 2008; 29: 445-453.
13. Gillis A, Kliever, A, Kelly, E, Henderson, G, Christie, MJ, Schulz, S, Canals, M. Critical Assessment of G Protein-Biased Agonism at the μ-Opioid Receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41:947-959.
14. González-Maeso, J, Yuen, T, Ebersole, BJ, Wurm-bach, E, Lira, A, Zhou, M, et al. Transcriptome fingerprints distinguish hallucinogenic and non-hallucinogenic 5-hydroxytryptamine 2A receptor agonist effects in mouse somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 2003; 23: 8836-8843.
15. Holze, F, Vizeli, P, Ley, L, Müller, F, Dolder, P, Stocker, M, et al. Acute dose-dependent effects of lysergic acid diethylamide in a double-blind placebo-controlled study in healthy subjects. *Neuropsychopharmacology.* 2021; 46: 537-544.
16. Kenakin, T. Biased Receptor Signaling in Drug Discovery. *Pharmacol Rev.* 2019; 71: 267-315.
17. Kim, K, Che, T, Panova, O, DiBerto, JF, Lyu, J, Krumm, BE, et al. Structure of a Hallucinogen-Activated Gq-Coupled 5-HT<sub>2A</sub> Serotonin Receptor. *Cell.* 2020; 182: 1574-1588.
18. Manglik, A, Lin, H, Aryal, DK, McCorvy, JD, Dengler, D, Corder, G, et al. Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects. *Nature.* 2016; 537: 185-190.
19. Martí-Solano, M, Iglesias, A, de Fabritiis, G, Sanz, F, Brea, J, Loza, MI, et al. Detection of new biased agonists for the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor: modeling and experimental validation. *Mol. Pharmacol.* 2015; 87:740-746.
20. Miranda-Azpiazu, P, Diez-Alarcia, R, García-Bea, A, Gonzalez-Maeso, J, Morentin, B, Meana, JJ. Hallucinogenic and non-hallucinogenic 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonists induce distinct patterns of G protein activation of G protein coupling in postmortem human brain. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2013; 23 (Suppl. 2): S201.
21. Miyamoto, S, Duncan, GE, Marx, CE, Lieberman, JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol. Psychiatry.* 2005; 10: 79-104.
22. Muguruza, C, Moreno, JL, Umali, A, Callado, LF, Meana, JJ, González-Maeso, J. Dysregulated 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in postmortem frontal cortex of schizophrenic subjects. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2013; 23: 852-864.
23. Muneta-Arrate, I, Diez-Alarcia, R, Horrillo, I, Meana, JJ. Pimavanserin exhibits serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor inverse agonism for G<sub>αi1</sub>- and neutral antagonism for G<sub>αq/11</sub>-proteins in human brain cortex. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2020a; 36: 83-89.
24. Muneta-Arrate, I, Diez-Alarcia, R, Horrillo, I, Meana, JJ. Functional selectivity of different serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists in human post-mortem brain cortex. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2020b; 40: S11-S12.

25. Nutt, D, Stahl, S, Blier, P, Drago, F, Zohar, J, Wilson, S. Inverse agonists – What do they mean for psychiatry? *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2017; 27: 87-90.
26. Sharp, T, Barnes, NM. Central 5-HT receptors and their function; present and future. *Neuropharmacology.* 2020; 177:108155.
27. Shenker, A, Laue, L, Kosugi, S, Merendino, JJ Jr, Minegishi, T, Cutler, GB Jr. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature.* 1993; 365: 652-654.
28. Sullivan, LC, Clarke, WP, Berg, KA. Atypical antipsychotics and inverse agonism at 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Curr. Pharm. Des.* 2015; 21: 3732-3738.
29. Violin, JD, Crombie, AL, Soergel, DG, Lark, MW. Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends Pharmacol. Sci.* 2014; 35: 308-316.