

Caracterització farmacològica de moduladors gabaèrgics per al tractament de l'insomni primari

Irma Buirà Morell

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.tdx.cat) 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.tdx.cat) 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.tdx.cat) 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.

**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES I BIOTECNOLOGIA
CENTRE DE RECERCA I DESENVOLUPAMENT
FERRER INTERNACIONAL**

**CARACTERITZACIÓ FARMACOLÒGICA
DE MODULADORS GABAÈRGICS
PER AL TRACTAMENT DE
L'INSOMNI PRIMARI**

IRMA BUIRA MORELL

Barcelona, Novembre de 2010

“Hi ha una força motriu més
poderosa que el vapor,
l’electricitat i l’energia atòmica:
la voluntat”.

Albert Einstein (1875-1955)
Premi Nobel de Física 1921

Al David.
Als meus pares.
Al meu germà.

AGRAÏMENTS

En aquest moment estar escrivint aquesta pàgina és per a mi una gran satisfacció, perquè significa que després de molt d'esforç finalment he pogut culminar aquest projecte. Realitzar la Tesi Doctoral a l'empresa farmacèutica ha estat una experiència gratificant i vull aprofitar aquestes línies per mostrar el meu agraïment a les moltes persones sense l'ajut de les quals això no hagués estat possible.

Primerament vull agrair al Director del Centre d'R+D de Ferrer Internacional, el Dr. Antonio Guglietta, l'haver-me permès realitzar aquesta Tesi Doctoral.

Als meus directors de Tesi, la Marta Nicolás i l'Andrés Fernández, per la seva implicació, dedicació i suport. Per a mi ha estat tot un plaer poder aprendre de vosaltres. Moltes gràcies per haver fet possible que aquest projecte arribés a bon port. També vull recordar al Jose Terencio, el meu Cap al Departament de Bioquímica on vaig començar les meves passes a Ferrer i primer director d'aquest projecte. Al Josep Lluís Falcó que va prendre el relleu durant un temps en la direcció de la Tesi, pel seu ajut, entusiasme i positivisme.

A l'Hugo Caro i a la Fabiana D'Aniello pel seu interès, consells i suport.

Vull expressar el meu agraïment a totes les persones de Ferrer Internacional que han participat en aquest projecte. Especialment al Departament de Farmacocinètica i Metabolisme i a la Secció de Farmacologia d'SNC del Departament de Ciències Biològiques i Biotecnologia que m'han facilitat les dades de l'annex que complementen aquest treball. També vull donar les gràcies a tots els meus companys del Departament: a l'Anna, la Cristina P. i el Peter per resoldre els meus dubtes sobre l'apassionant món dels test de conducta *in vivo* i l'EEG. A la Josefina amb la qual ha estat un plaer treballar conjuntament. A la Teresa per aclarir-me alguns conceptes de biologia molecular. A la Núria M. per les dades de l'Spot test. A les meves companyes d'esmorzars i dinars (sempre que l'experimental ho permet) la Cristina V., la Núria LL., la Wilmar, la Marta M., la Cristina M., la Vanessa i la Clara pels seus ànims i les bones estones compartides.

A altres companys del Centre, com l'Antònia i el Frederic que amablement han atès i respost les meves consultes.

Gràcies també al Miquel Llobera per acceptar ser tutor d'aquesta tesi, pels seus ànims i consells.

A nivell personal, també vull agrair el suport dels meus amics de Lleida i en particular a la Mari per l'amistat que ens uneix des de fa molts anys. Als amics de la facultat el Josep M^a (desitjo que aviat Dr. Lanau) i el Xavi, i altres amics de dins i fora de l'àmbit de la recerca: Gemma & Cesc, Javier, Mònica, Andrea, Marta P. Marta M. i Mercè, moltes gràcies a tots per fer-me costat i estar sempre allà.

Al David, el meu *ying*, per infinitat de coses, però sobretot per animar-me i recolzar-me en tot moment, per la seva compressió i paciència al llarg de tot aquest temps que he hagut de dedicar a la Tesi.

A la meva família, per ser el refugi on recuperar forces. Especialment als meus pares pels valors que m'han transmès, per ensenyar-me a superar-me constantment i per haver-me fet costat sempre en totes les iniciatives. Als padrins pel seu suport moral i en particular a la Mercè per vetllar sempre pel meu estat nutricional. Al meu germà perquè com veus mai és massa tard per iniciar un projecte. Com deia Goethe: “Qualsevol cosa que vulguis o que somiïs que pots fer comença-la... La determinació té geni, poder, màgia. Comença ara...”.

I. ÍNDEX GENERAL

INTRODUCCIÓ	1
1. Neurofisiologia del son	3
2. Fases del son	3
3. El ritme circadià dels cicles son/vigília	5
4. Circuits neuronals implicats en el son i la vigília	6
4.1. El sistema activador reticular ascendent.....	6
4.2. L'àrea ventrolateral preòptica.....	8
4.3. L'interruptor <i>flip-flop</i> i el paper estabilitzador de les orexines.....	8
5. Sistemes implicats en la regulació del son	10
6. Trastorns del son	11
6.1. Classificació.....	11
6.2. Diagnòstic.....	15
6.3. Epidemiologia.....	15
7. Etiopatogènia de l'insomni	17
7.1. Factors implicats en l'etiopatogènia de l'insomni.....	17
7.2. Influència genètica en el son i el seu ritme circadià.....	20
8. L'àcid gamma aminobutíric	21
8.1. Metabolisme.....	21
8.2. Receptors del GABA: Estructura i tipus.....	23
8.2.1. Receptor $GABA_A$	23
8.2.2. Receptor $GABA_C$	24
8.2.3. Receptor $GABA_B$	25
8.3. Moduladors dels receptors GABA.....	27
8.3.1. Moduladors de $GABA_A$	27
8.3.2. Moduladors de $GABA_C$	28
8.3.3. Moduladors de $GABA_B$	29
8.4. Farmaco-fisiologia del receptor $GABA_A$	30
9. Tractament farmacològic de l'insomni	33
9.1. Hipnòtics que actuen sobre el receptor $GABA_A$	33
9.1.1. Els barbitúrics.....	34
9.1.2. Les benzodiazepines.....	34
9.1.3. Els fàrmacs Z.....	35
9.1.4. Altres fàrmacs amb efecte sobre el receptor $GABA_A$	38
9.2. Hipnòtics que actuen sobre altres receptors.....	39

9.2.1. Moduladors dels receptors de melatonina.....	39
9.2.2. Moduladors dels receptors d'orexina.....	42
9.2.3. Moduladors dels receptors d'histamina.....	43
9.2.4. Moduladors dels receptors de serotonina.....	45
9.2.5. Altres receptors.....	47
OBJECTIUS.....	49
MATERIALS I MÈTODES.....	53
1. Animals i condicions d'establució.....	55
2. Sacrifici i extracció de mostres.....	55
3. Homogeneïtzació dels teixits.....	56
3.1. Assaigs d'unió amb radiolligand <i>in vitro</i>	56
3.2. Assaigs d'unió amb radiolligand <i>ex-vivo</i>	56
4. Quantificació de proteïna pel mètode Coomassie o mètode àcid.....	57
4.1. Fonament del mètode.....	57
4.2. Reactius.....	57
4.3. Protocol.....	57
4.4. Quantificació.....	58
5. Assaigs d'unió amb radiolligand <i>in vitro</i>.....	58
5.1. Fonament del mètode.....	58
5.2. Sistemes de filtració i estació robotitzada.....	59
5.2.1. Col·lector de mostres Brandel.....	59
5.2.2. Sistema d'assaig en placa Multiscreen _{HTS} (Millipore TM).....	60
5.2.3. Estació robotitzada Multiprobe II HT Ex (Perkin Elmer).....	60
5.3. Reactius.....	62
5.4. Protocol general dels assaigs d'unió amb radiolligand <i>in vitro</i>	62
5.4.1. Assaigs en tub.....	62
5.4.2. Assaigs amb el sistema de placa Multiscreen _{HTS}	63
5.5. Assaig de cinètica d'associació.....	64
5.5.1. Fonament del mètode.....	64
5.5.2. Protocol.....	65
5.6. Assaig de càrrega de proteïna.....	65
5.6.1. Protocol.....	65
5.7. Assaig de saturació.....	65
5.7.1. Fonament del mètode.....	65

5.7.2. Protocol.....	66
5.8. Assaig d'inhibició o competició.....	66
5.8.1. Fonament del mètode.....	66
5.8.2. Protocol.....	66
5.9. Quantificació.....	67
6. Assaigs d'unió amb radiolligand <i>ex-vivo</i>	68
6.1. Fonament del mètode.....	68
6.2. Reactius.....	68
6.3. Grups experimentals.....	68
6.4. Protocol general dels assaigs d'unió amb radiolligand <i>ex-vivo</i>	70
6.5. Assaig de cinètica d'associació <i>ex-vivo</i>	71
6.6. Assaig de càrrega de proteïna <i>ex-vivo</i>	71
6.7. Assaig per determinar la variació d'ocupació en funció del temps.....	71
6.8. Corbes dosi-resposta dels assaigs <i>ex-vivo</i>	71
6.9. Quantificació.....	71
7. Assaigs de citotoxicitat	72
7.1. Fonament del mètode.....	72
7.2. Reactius.....	72
7.3. Línies cel·lulars.....	73
7.3.1. CHO-K1 (CCL-61, ATCC).....	73
7.3.2. HepG2 (HB-8065, ATCC).....	73
7.3.3. SH-SY5Y (94030304, Sigma).....	74
7.4. Protocol.....	74
7.5. Quantificació.....	76
8. Estadística	76
RESULTATS	79
1. Assaigs d'unió amb radiolligand <i>in vitro</i>	81
1.1. Posada al punt en tub i amb el sistema de filtració Brandel.....	81
1.1.1. Cinètica d'associació.....	81
1.1.2. Determinació de la quantitat de proteïna.....	82
1.1.3. Assaigs de saturació.....	83
1.1.4. Assaigs de competició.....	86
1.1.5. Qualitat dels assaigs en tub.....	88
1.2. Posada al punt amb el sistema de plaques Multiscreen _{HTS} (Millipore TM).....	89
1.2.1. Determinació de la quantitat de proteïna.....	89

1.2.2. Assaigs de saturació.....	90
1.2.3. Assaigs de competició.....	93
1.2.4. Qualitat dels assaigs en placa realitzats manualment.....	97
1.3. Automatització de l'assaig en placa Multiscreen _{HTS}	97
1.3.1. Optimització dels modes de dispensació.....	98
1.3.2. Assaigs de competició.....	101
1.3.3. Qualitat dels assaigs en placa realitzats amb el robot.....	103
2. Cribratge dels compostos amb els assaigs d'unió amb radiolligand <i>in vitro</i>	104
3. Nivells d'ocupació del receptor GABA_A	109
3.1. Posada al punt en còrtex de rata i el sistema de filtració per a tubs Brandel.....	109
3.1.1. Cinètica d'associació.....	109
3.1.2. Variació de l'ocupació en funció del temps d'incubació.....	109
3.1.3. Determinació de la quantitat de mostra.....	110
3.2. Posada al punt en ratolí i el sistema de plaques Multiscreen _{HTS} (Millipore TM).....	111
3.2.1. Determinació de la quantitat de mostra a còrtex, cerebel i medul·la.....	111
3.3. Ocupació del receptor GABA _A pels compostos a ratolí.....	113
4. Citotoxicitat	118
DISCUSSIÓ	119
1. Posada al punt dels assaigs d'unió amb radiolligand <i>in vitro</i>	121
1.1. Posada al punt en tub i amb el sistema de filtració Brandel.....	121
1.2. Adaptació de l'assaig al sistema de plaques Multiscreen _{HTS} (Millipore TM).....	123
1.3. Automatització de l'assaig en placa.....	125
2. Cribratge <i>in vitro</i> dels compostos	127
3. Nivells d'ocupació del receptor GABA_A	129
3.1. Posada al punt de l'assaig <i>ex-vivo</i> en còrtex de rata.....	129
3.2. Adaptació de l'assaig <i>ex-vivo</i> a ratolí i el sistema de plaques.....	131
3.3. Correlació entre les taxes d'ocupació <i>ex-vivo</i> i la conducta <i>in vivo</i>	132
4. Citotoxicitat	138
CONCLUSIONS	141
ANNEX	145
1. Test de conducta <i>in vivo</i>	147
1.1. Inhibició de l'activitat motora espontània.....	147
1.1.1. Fonament.....	147
1.1.2. Protocol.....	147

1.2. Pèrdua de la força muscular.....	149
1.2.1. Fonament.....	149
1.2.2. Protocol.....	149
2. Estabilitat metabòlica i absorció <i>in vitro</i>.....	151
3. Estudis farmacocinètics i de metabolització en ratolí.....	152
BIBLIOGRAFIA.....	153

II. ÍNDEX DE FIGURES I TAULES

A. FIGURES

Figura 1. Registres de l'EEG durant la vigília i les diferents fases del son.....	4
Figura 2. Components del sistema fotoneuroendocrí que regulen la síntesi de melatonina.....	5
Figura 3. Circuits neuronals implicats en el son i la vigília.....	6
Figura 4. Model d'interruptor <i>flip-flop</i>	9
Figura 5. Classificació dels trastorns del son segons el DSM-IV.....	14
Figura 6. Retroalimentació negativa del cortisol sobre l'eix HPA.....	18
Figura 7. Relació entre el metabolisme del GABA i la glucòlisi i el cicle de Krebs.....	22
Figura 8. Estructura del receptor GABA _A i lloc d'interacció de diferents lligands.....	23
Figura 9. Estructura del receptor GABA _C	24
Figura 10. Estructura del receptor GABA _B i el seu complex de senyalització.....	25
Figura 11. Estructura química general dels barbitúrics.....	33
Figura 12. Estructura química general de les BDZ.....	33
Figura 13. Estructura química dels principals fàrmacs Z.....	36
Figura 14. Estructura química del gaboxadol i la tiagabina.....	39
Figura 15. Estructura química dels agonistes dels receptors MT ₁ i MT ₂ de melatonina.....	40
Figura 16. Estructura química de l'almorexant.....	43
Figura 17. Estructura química de la doxepina.....	44
Figura 18. Estructura química dels antagonistes i agonistes inversos dels receptors 5HT _{2A} i 5HT _{2C}	46
Figura 19. Estratègia de cribratge per a seleccionar el compost més adequat per a la fase preclínica	51
Figura 20. Col·lector de mostres Brandel (model M-48-R).....	59
Figura 21. Esquema de la placa i el sistema d'assaig Multiscreen _{HTS} (Millipore TM).....	60
Figura 22. Estació robotitzada Multiprobe II HT Ex (Perkin Elmer).....	61
Figura 23. Posicions de dispensació del Multiprobe.....	62
Figura 24. Grups experimentals i esquema dels principals passos de l'assaig <i>ex-vivo</i>	69
Figura 25. Reacció catalitzada per la luciferasa del reactiu CellTiter-Glo [®] en presència d'ATP de les cèl·lules vives.....	72
Figura 26. Cèl·lules CHO-K1, HepG2 i SH-SY5Y.....	74
Figura 27. Esquema de la preparació dels compostos.....	75
Figura 28. Representació d'un assaig robust.....	77

Figura 29. Cinètica d'associació realitzada en tub del $^3\text{H-Ro15-1788}$ en homogenats de cerebel de rata.....	81
Figura 30. Determinació del rang lineal de proteïna en homogenats de cerebel de rata per l'assaig d'unió amb $^3\text{H-Ro15-1788}$ en tub.....	82
Figura 31. Determinació del rang lineal de proteïna en homogenats de medul·la de rata per l'assaig d'unió amb $^3\text{H-Ro15-1788}$ en tub.....	83
Figura 32. Corba de saturació de la unió específica del $^3\text{H-Ro15-1788}$ en homogenats de cerebel de rata.....	83
Figura 33. Corba de saturació de la unió específica del $^3\text{H-Ro15-1788}$ a membranes d'homogenat de medul·la espinal de rata.....	85
Figura 34. Corbes de competició dels estàndards a cerebel realitzades en tub.....	86
Figura 35. Corbes de competició dels estàndards a medul·la espinal realitzades en tub.....	88
Figura 36. Representació del senyal total i inespecífic d'un assaig de competició representatiu dels realitzats en tub a cerebel.....	88
Figura 37. Rang lineal de proteïna dels homogenats de cerebel de rata per l'assaig d'unió amb $^3\text{H-Ro15-1788}$ a placa Multiscreen _{HTS}	89
Figura 38. Rang lineal de proteïna dels homogenats de medul·la de rata per l'assaig d'unió amb $^3\text{H-Ro15-1788}$ a placa Multiscreen _{HTS}	90
Figura 39. Corba dels assaigs de saturació del $^3\text{H-Ro15-1788}$ en homogenat de cerebel de rata.....	91
Figura 40. Corba dels assaigs de saturació del $^3\text{H-Ro15-1788}$ en homogenat de medul·la de rata.....	92
Figura 41. Corbes de competició dels estàndards realitzades a cerebel en placa Multiscreen _{HTS} manualment.....	94
Figura 42. Corbes de competició dels estàndards realitzades a medul·la en placa Multiscreen _{HTS} manualment.....	96
Figura 43. Representació del senyal total i inespecífic d'un assaig de competició representatiu dels realitzats en placa manualment a cerebel.....	97
Figura 44. Gràfiques de la dispensació amb puntes fixes d'aigua destil·lada al 65% de l'alçada del pou.....	99
Figura 45. Corbes de competició dels estàndards a placa Multiscreen _{HTS} processada amb el Multiprobe II HT Ex.....	102
Figura 46. Representació del senyal total i inespecífic d'un assaig de competició a cerebel representatiu dels processats amb el robot en placa.....	103
Figura 47. Estructura química i model farmacofòric del zolpidem.....	104

Figura 48. Estructura química de les famílies patentades sintetitzades a partir del model farmacofòric del zolpidem.....	104
Figura 49. Estratègia de cribratge per a seleccionar el compost més adequat per a la fase preclínica.....	107
Figura 50. Corbes de competició a cerebel i medul·la espinal dels tres compostos seleccionats: GF-016783-00, GF-015621-00 i GF-016641-00.....	108
Figura 51. Cinètica d'associació realitzada en tub del ^3H -Ro15-1788 en homogenats de còrtex de rata.....	109
Figura 52. Efecte del temps d'incubació sobre l'ocupació dels receptors GABA_A de còrtex de rata pel flumazenil.....	110
Figura 53. Determinació del rang lineal de proteïna pels assaigs <i>ex-vivo</i> a còrtex de rata amb ^3H -Ro15-1788.....	111
Figura 54. Determinació del rang lineal de proteïna pels assaigs <i>ex-vivo</i> a còrtex, cerebel i medul·la espinal de ratolí amb ^3H -Ro15-1788.....	112
Figura 55. Corbes dosi-resposta de l'ocupació dels estàndards a còrtex, cerebel i medul·la de ratolí.....	114
Figura 56. Corbes dosi-resposta de l'ocupació a còrtex, cerebel i medul·la de ratolí del GF-015621-00, GF-016641-00 i GF-016783-00.....	115
Figura 57. Imatge de l'Smart System (<i>Panlab</i>).....	149
Figura 58. Imatge del Grip Strength Meter (<i>Bioseb</i>).....	150

B. TAULES

Taula 1. Activitat dels diferents grups de neurones implicats en les fases de vigília i son REM.....	7
Taula 2. Tipus d'insomni en funció de les diferents classificacions.....	13
Taula 3. Lligands dels diferents receptors del GABA.....	27
Taula 4. Distribució dels principals subtipus de receptor GABA_A a cervell de rata.....	30
Taula 5. Potencials activitats farmacològiques de les diferents subunitats α del receptor GABA_A	32
Taula 6. Condicions dels assaigs per determinar l'ocupació dels receptors GABA_A en diferents teixits de rata i ratolí.....	70
Taula 7. Valors del factor Z' i relació amb la qualitat de l'assaig.....	77
Taula 8. Condicions finals de l'assaig de ^3H -Ro15-1788 a cerebel de rata amb tub.....	84
Taula 9. Constant de dissociació (K_d) i del nombre màxim de llocs d'unió (B_{max}) a cerebel dels assaigs de saturació realitzats en tub.....	84

Taula 10. Condicions finals de l'assaig de $^3\text{H-Ro15-1788}$ a medul·la espinal de rata amb tub.....	85
Taula 11. Constant de dissociació (K_d) i nombre màxim de llocs d'unió (B_{max}) a medul·la obtinguts als assaigs de saturació realitzats en tub.....	85
Taula 12. Concentració inhibidora 50 (IC_{50}) i constant d'inhibició (K_i) dels assaig de competició realitzats amb els estàndards a cerebel en tub.....	87
Taula 13. Concentració inhibidora 50 (IC_{50}) i constant d'inhibició (K_i) dels assaigs de competició realitzats amb els estàndards a medul·la espinal en tub.....	87
Taula 14. Constant de dissociació (K_d) i nombre màxim de llocs d'unió (B_{max}) dels tres assaigs de saturació realitzats a cerebel en placa i tub.....	91
Taula 15. Condicions establertes per l'assaig del $^3\text{H-Ro15-1788}$ a cerebel amb placa Multiscreen _{HTS}	92
Taula 16. Constant de dissociació (K_d) i nombre màxim de llocs d'unió (B_{max}) dels tres assaigs de saturació realitzats a medul·la en placa i tub.....	92
Taula 17. Condicions fixades per l'assaig de $^3\text{H-Ro15-1788}$ a medul·la espinal amb placa Multiscreen _{HTS}	93
Taula 18. Concentració inhibidora 50 (IC_{50}) i constant d'inhibició (K_i) dels assaigs de competició realitzats amb els estàndards a cerebel en placa manual i tub.....	93
Taula 19. Concentració inhibidora 50 (IC_{50}) i constant d'inhibició (K_i) dels assaigs de competició realitzats amb els estàndards a medul·la espinal en placa manual i tub.....	95
Taula 20. Volums dispensats pel robot amb puntes fixes, % Inacc i CV en les diferents condicions de dispensació i valors de les especificacions tècniques de l'equip.....	98
Taula 21. Volums dispensats pel robot amb les puntes d'un sol ús (DT), % Inacc, CV i valors de les especificacions tècniques de l'equip.....	100
Taula 22. Concentració inhibidora 50 (IC_{50}) i constant d'inhibició (K_i) dels assaigs de competició a cerebel realitzats amb els estàndards en placa manual i automatitzada.....	101
Taula 23. Quantitat de compostos cribrats de les respectives famílies químiques.....	105
Taula 24. Percentatges d'inhibició a cerebel i medul·la dels estàndards i dels compostos representatius de cada família.....	106
Taula 25. Constant d'inhibició (K_i) a cerebel i medul·la dels estàndards i dels compostos seleccionats.....	107
Taula 26. Variació de l'ocupació del flumazenil sobre els receptors GABA_A de còrtex de rata en funció del temps d'assaig.....	110

Taula 27. Ocupació del receptor GABA _A a còrtex, cerebel i medul·la de ratolí dels estàndards i compostos.....	117
Taula 28. Valors de la IC ₅₀ dels assaigs de citotoxicitat en les diferents línies cel·lular i marge terapèutic.....	118
Taula 29. Capacitat diària de cribratge dels assaigs de competició en placa realitzats manualment o amb el robot.....	126
Taula 30. Valors de la K _i obtinguda en els assaigs <i>in vitro</i> , conjuntament amb la ID ₅₀ dels assaigs <i>in vivo</i> i l'Occup ₅₀ dels <i>ex vivo</i>	133
Taula 31. Percentatge d'ocupació dels receptors GABA _A a la ID ₅₀ de l'SMA i el GS.....	134
Taula 32. Resum de l'activitat i afinitat dels compostos per les subunitats α_1 , α_2 i α_3 del receptor GABA _A	138
Taula 33. Percentatges d'inhibició de l'activitat motora espontània en ratolí dels compostos amb bona afinitat <i>in vitro</i>	148
Taula 34. Dosi inhibidora 50 (ID ₅₀) dels tests de conducta <i>in vivo</i> en ratolí.....	150
Taula 35. Dades qualitatives d'absorció i estabilitat metabòlica dels compostos representatius de les diferents famílies patentades.....	151
Taula 36. Dades d'aclariment (CI) en microsomes hepàtics humans, de ratolí i rata, dels compostos d'estudi i de l'estàndard zolpidem.....	152
Taula 37. Paràmetres farmacocinètics en ratolí dels compostos d'estudi i els estàndards .	152

III. ABREVIATURES

AC	adenilat <u>c</u> iclasa
ACAC	àcid <u>c</u> is-4- <u>a</u> minocrotònic
ACh	acetilcolina (<i>Acetylcholine</i>)
ACTH	hormona alliberadora de adenocorticotropina (<i>Adrenocorticotropin Releasing Hormone</i>)
ASPS	fase del son avançada (<i>Advanced Sleep Phase Syndrome</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adenosina 5'-trifosfat (<i>Adenosine 5'-triphosphate</i>)
AUC	àrea sota la corba (<i>Area Under the Curve</i>)
BDZ	<u>b</u> enzodiazepines
BF	proscèfal basal (<i>Basal Forebrain</i>)
B_{max}	densitat màxima de receptors
BSA	albúmina sèrica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BST	nucli de l'estria terminal (<i>Bed Nucleus of the Stria Terminalis</i>)
(+)-CAMP	àcid (+)- <u>c</u> is-2- <u>a</u> minometilciclopropà carboxílic
cAMP	monofosfat d'adenosina cíclic (<i>cyclic Adenosine Monophosphate</i>)
cDNA	DNA complementari (<i>complementary DNA</i>)
Cl	aclariment en sang (<i>Clearance</i>)
C_{max}	concentració màxima
CRF	factor d'alliberament de corticotropina (<i>Corticotropin-releasing Factor</i>)
CRH	hormona alliberadora de corticotropina (<i>Corticotropin Releasing Hormone</i>)
CRSD	trastorns del son del ritme circadià (<i>Circadian Rhythm Sleep Disorders</i>)
CV	<u>c</u> oeficient de <u>v</u> ariació
DA	<u>d</u> opamina
DMH	nucli dorsomedial de l'hipotàlem (<i>Dorsomedial Hypothalamic Nucleus</i>)
DMSO	<u>d</u> imetil <u>s</u> ulfòxid
DR	nucli dorsal del rafe (<i>dorsal raphe nucleus</i>)
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV</i>
DT	puntes d'un sol ús (<i>Disposable Tips</i>)
EEG	<u>e</u> lectroencefalograma
EMA	Agència Europea del Medicament (<i>European Medicines Agency</i>)
F	biodisponibilitat

FDA	Administració Americana d'Alimentació i Fàrmacs (<i>Food and Drug Administration</i>)
GABA	àcid gamma aminobutíric (<i>Gamma-Amino Butyric Acid</i>)
GABA-T	GABA- α -oxoglutarat transaminasa (<i>GABA-α-oxoglutarate Transaminase</i>)
GAD	àcid glutàmic descarboxilasa (<i>Glutamic Acid Decarboxylase</i>)
GHB	gamma hidroxibutirat (<i>Gamma Hidroxi Butyrate</i>)
Glu	àcid glutàmic (<i>Glutamic Acid</i>)
GPCR	receptor acoblat a proteïna G (<i>G protein-coupled Receptor</i>)
GS	test de mesura de la força muscular (<i>Grip Strength test</i>)
HBA	acceptors de pont d'hidrogen (<i>Hydrogen Bound Acceptors</i>)
His	histamina
HPA	eix hipotàlem-pituïtària-adrenal (<i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis</i>)
5HT	5-hidroxitriptamina o serotonina
HTS	assaigs d'alt rendiment (<i>High Throughput Screening</i>)
% Inacc	percentatge d'inexactitud (<i>% Inaccuracy</i>)
i.p.	administració via intraperitoneal
IC₅₀	concentració inhibidora 50 (<i>Inhibitory Concentration 50</i>)
ICD-10	<i>International Classification of Diseases-10</i>
ICSD-2	<i>International Classification of Sleep Disorders-2</i>
ID₅₀	dosi inhibidora 50 (<i>Inhibitory Dose 50</i>)
K_d	constant de dissociació a l'equilibri
K_i	constant d'inhibició
k_{off}	constant de l'índex de dissociació
k_{on}	constant de l'índex d'associació
L	l·ligand o radiol·ligand
LC	locus coeruleus
LC/MS	cromatografia líquida/ espectrometria de masses (<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>)
LDT	nucli tegmental laterodorsal (<i>Laterodorsal Tegmental Nucleus</i>)
LH	hipotàlem lateral posterior (<i>Posterior Lateral Hypothalamus</i>)
MA	monoamines
MT	receptor melatonina
NA	noradrenalina
NADH	nicotinamida adenina dinucleòtid (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>)

NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NPS	neuropèptid S (<i>Neuropeptide S</i>)
NPSR1	receptor del neuropèptid S 1 (<i>Neuropeptide S Receptor 1</i>)
nREM	fase del son sense moviments ràpids dels ulls (<i>non-Rapid Eye Movement</i>)
NSB	unió inespecífica (<i>Non Specific Binding</i>)
NSQ	nucli supraquiasmàtic
O/N	incubació tota la nit (<i>overnight</i>)
Occup₅₀	dosi que ocupa el 50% dels receptors (<i>Occupancy 50</i>)
ORX/Hcrt	orexines/hipocreïnes
ORX	receptor d'orexina (<i>Orexin Receptor</i>)
p.o	administració via oral
PDE4D	fosfodiesterasa 4D (<i>Phosphodiesterase 4D</i>)
PEI	poliètilenimina
PER2	gen de <i>period 2</i>
PET	Tomografia d'Emissió de Positrons (<i>Positron Emission Tomography</i>)
PPT	nucli tegmental pedunculopontí (<i>Pedunculopontine Tegmental Nucleus</i>)
PVN	nucli paraventricular hipotalàmic (<i>Hypothalamic Paraventricular Nucleus</i>)
R	receptor
REM	fase del son amb moviments ràpids dels ulls (<i>Rapid Eye Movement</i>)
RHT	tracte retinohipotalàmic (<i>Retinohypothalamic Tract</i>)
RL	complex lligand-receptor
RSRR	domini de retenció a reticle endoplasmàtic (<i>Retention Signal to Rough Endoplasmic Reticulum</i>)
SAR	relació estructura química i activitat (<i>Structure Activity Relationship</i>)
SB	unió específica (<i>Specific Binding</i>)
SEM	error estàndard de la mitjana (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SMA	test d'inhibició de l'activitat motora espontània (<i>Spontaneous Motor Activity test</i>)
SNC	sistema nerviós central
SNP	polimorfisme d'un únic nucleòtid (<i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>)
SPA	<i>Scintillation Proximity Assay</i>
SPET	Tomografia Computeritzada d'Emissió de Fotó Únic (<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>)
SPZ	zona subparaventricular (<i>Subparaventricular Zone</i>)

SSADH	semialdehid succínic deshidrogenasa (<i>Succinic Semialdehyde Dehydrogenase</i>)
SWS	son d'ones lentes (<i>Slow Wave Sleep</i>)
T	unió total (<i>Total Binding</i>)
TMN	nucli tuberomamilar (<i>Tuberomammillary Nucleus</i>)
TST	Duració del son (<i>Total Sleep Time</i>)
VFTM	domini <i>Venus flytrap</i> (<i>Venus flytrap motif</i>)
VLPO	àrea ventrolateral preòptica (<i>Ventrolateral Preoptic area</i>)
vPAG	matèria gris periaqueductal ventral (<i>ventral Periaqueductal Gray Matter</i>)
WASO	despertar-se després haver iniciat el son (<i>Wake After Sleep Onset</i>)
WHO	Organització Mundial de la Salut (<i>World Health Organization</i>)

Introducció

1. NEUROFISIOLOGIA DEL SON

El son és un estat fisiològic immediatament reversible, en el qual hi ha una disminució de l'activitat motora i una menor resposta i interacció amb l'entorn (Bear, 2007). Els humans dormim aproximadament una tercera part de les nostres vides. També dormen la resta dels mamífers, les aus i els rèptils encara que la durada i la forma del son varia molt filogenèticament (Squiere, 2003).

Donat que els animals són vulnerables quan dormen, el son ha de tenir algun avantatge evolutiu perquè aquest comportament s'hagi conservat. De les funcions que se li atribueixen, destaquen la restauradora i la de conservació de l'energia, recuperant els nivells encefàlics de glicogen que disminueixen durant la vigília i disminuint la temperatura corporal i el consum d'oxigen. A nivell adaptatiu, als humans i als altres animals diürns, molt dependents de la informació visual tant per buscar aliments com per evitar depredadors, el son els obligaria a amagar-se quan són més vulnerables (Purves, 2008). Altres funcions atribuïdes al son serien ajudar a la maduració nerviosa en els nadons i consolidar l'aprenentatge i la memòria en els adults (Kandel, 2001).

Independentment de la raó per la qual dormim, en els mamífers és evident que la seva funció és crítica per a la supervivència. La privació prolongada del son pot causar problemes psíquics i fisiològics greus. Les rates privades de son perden pes malgrat incrementar la ingesta d'aliment, deixen de regular progressivament la temperatura corporal i acaben morint al cap de 2-3 setmanes. En humans la manca de son provoca un deteriorament de la memòria i una reducció de les capacitats cognitives, arribant a generar canvis d'estat d'ànim i al·lucinacions si persisteix. En pacients amb la malaltia genètica anomenada insomni familiar fatal, es produeix la mort a les poques setmanes d'haver-se iniciat l'insomni (Purves, 2008).

2. FASES DEL SON

L'estudi de l'activitat cortical mitjançant l'electroencefalografia (EEG), va evidenciar la presència de diferents fases del son que s'alternen durant la nit en cicles d'aproximadament 90 minuts (Figura 1). Aquestes fases són: l'**nREM** (de l'anglès *non-rapid eye movement*) també anomenada son sincronitzat i la **REM** (de l'anglès *rapid eye movement*) o fase del son desincronitzada (Fuller, 2006).

Habitualment el son en els humans s'inicia amb la fase nREM en la qual l'activitat neuronal és escassa i la temperatura cerebral, la freqüència cardíaca i la pressió arterial disminueixen. En funció de la freqüència i amplitud de les ones registrades a l'EEG el son nREM es subdivideix alhora en quatre fases:

- La **fase I**, representa la transició de la vigília a l'inici del son i sol durar pocs minuts. Es caracteritza per la presència d'ones theta de baixa freqüència i de major amplitud que les ones beta que s'observen a la vigília.
- A mesura que s'aprofundeix en el son es passa a la **fase II**, en la qual la disminució de la freqüència i l'augment d'amplitud de les ones és major que l'observada en la fase I i s'alterna amb grups d'ones d'alta freqüència anomenats complexos K i fusos del son.
- Finalment les **fases III i IV** (també conegudes com a son d'ones lentes o SWS de l'anglès *slow wave sleep*) presenten ones delta de molt baixa freqüència i gran amplitud. A la fase IV l'activitat d'aquestes ones incrementa i domina pràcticament el registre EEG. El son d'ones lentes es considera l'estadi més profund del son, donat que és molt difícil despertar una persona en aquesta fase. Un cop finalitzada aquesta etapa, les fases del son s'inverteixen abans d'iniciar el son REM.

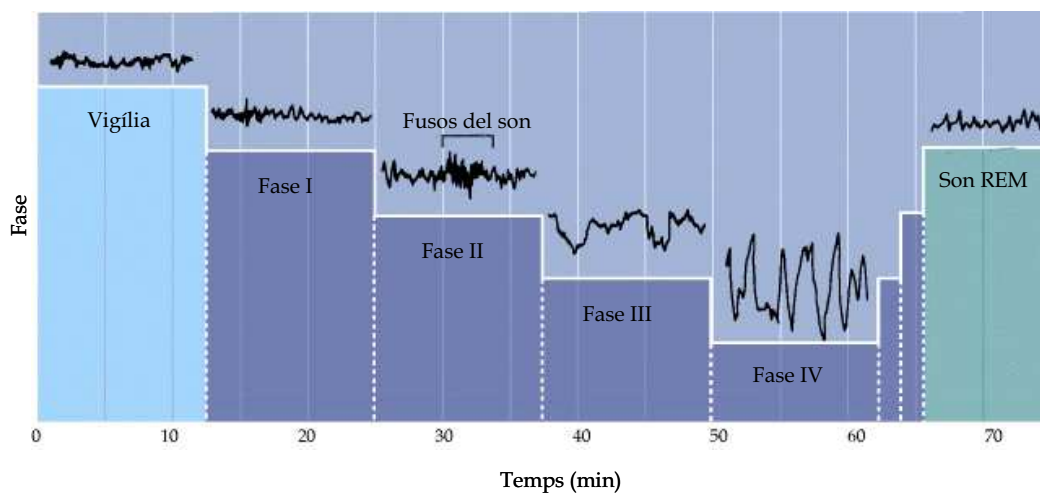


Figura 1. Registres de l'EEG durant la vigília i les diferents fases del son (adaptat de Purves, 2008).

En el son REM l'activitat de l'EEG és similar a la de la vigília amb ones de baix voltatge i alta freqüència. És la fase del son en la qual es produeixen els somnis i es caracteritza pel moviment ràpid dels ulls, l'hipotonia muscular i l'augment de la freqüència cardíaca i

respiratòria. La durada de la fase REM és d'aproximadament 10 minuts encara que pot augmentar al llarg dels quatre períodes que es donen durant la nit.

3. EL RITME CIRCADIÀ DELS CICLES SON/VIGÍLIA

El son i la vigília, com moltes altres conductes i activitats fisiològiques, tenen una periodicitat circadiana d'aproximadament 24h. Aquest ritme es genera fins i tot en absència d'informació externa, de manera que és endogen. En humans el rellotge intern o l'estructura que marca aquesta cadència és el nucli supraquiasmàtic (NSQ) localitzat a l'hipotàlem. En algunes aus i rèptils la glàndula pineal encara conserva aquesta funció que evolutivament s'ha perdut en els mamífers (Karolczak, 2005).

En els humans els senyals socials i l'activitat motora sincronitzen els processos fisiològics amb el cicle dia/nit. Tanmateix el principal encarrilador del nostre ritme circadià amb l'entorn és l'alternança dels cicles llum/fosc ambiental. L'NSQ capta la disminució de la quantitat de llum mitjançant les cèl·lules ganglionars de la retina que transmeten la informació a través del tracte retinohipotalàmic (RHT). L'activació de l'NSQ provoca l'alliberament de noradrenalina (NA) dels ganglis cervicals superiors que projecten a la glàndula pineal, iniciant-se la síntesi de melatonina (Figura 2).

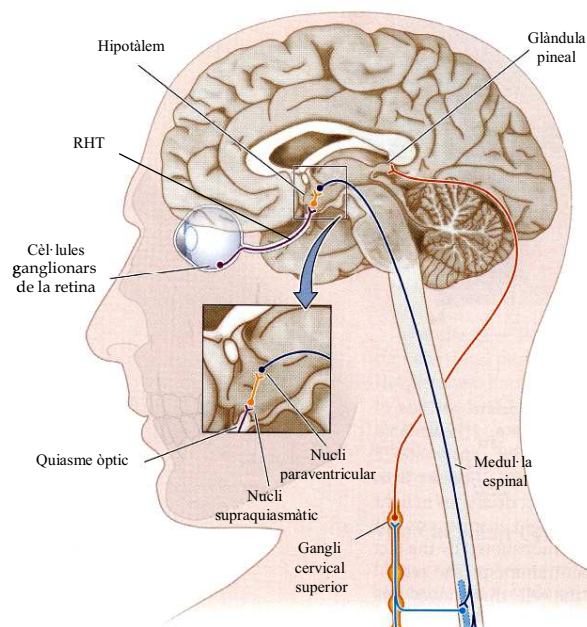


Figura 2. Components del sistema fotoneuroendocrí que regulen la síntesi de melatonina a la glàndula pineal (adaptat de Purves, 2008).

La melatonina, participa en l'inici del son a través dels seus receptors MT₁ i MT₂, implicats en la disminució de l'activitat neuronal i els canvis de fase del ritme circadià, respectivament. La síntesi de melatonina augmenta a mesura que disminueix la llum ambiental i assoleix el nivell màxim entre les 2-4h de la matinada. En la fase de llum, s'inhibeix la síntesi de melatonina. (Karolczak, 2005; Purves, 2008). Encara que l'NSQ regula l'horari dels cicles son/vigília no es considera crucial perquè es donin les diferents fases del son, sinó que depèn de l'equilibri de diversos circuits neuronals i de la seva coordinació.

4. CIRCUITS NEURONALS IMPLICATS EN EL SON I LA VIGÍLIA

4.1. El sistema activador reticular ascendent

A finals de la dècada dels quaranta, es va demostrar que el sistema activador reticular ascendent era l'estructura responsable de mantenir el cervell despert a la vigília (Moruzzi, 1949). Aquesta via ascendent amb origen a la part anterior del pont i amb projeccions a la formació reticular del mesencèfal, està formada principalment per dues branques (Figura 3A).

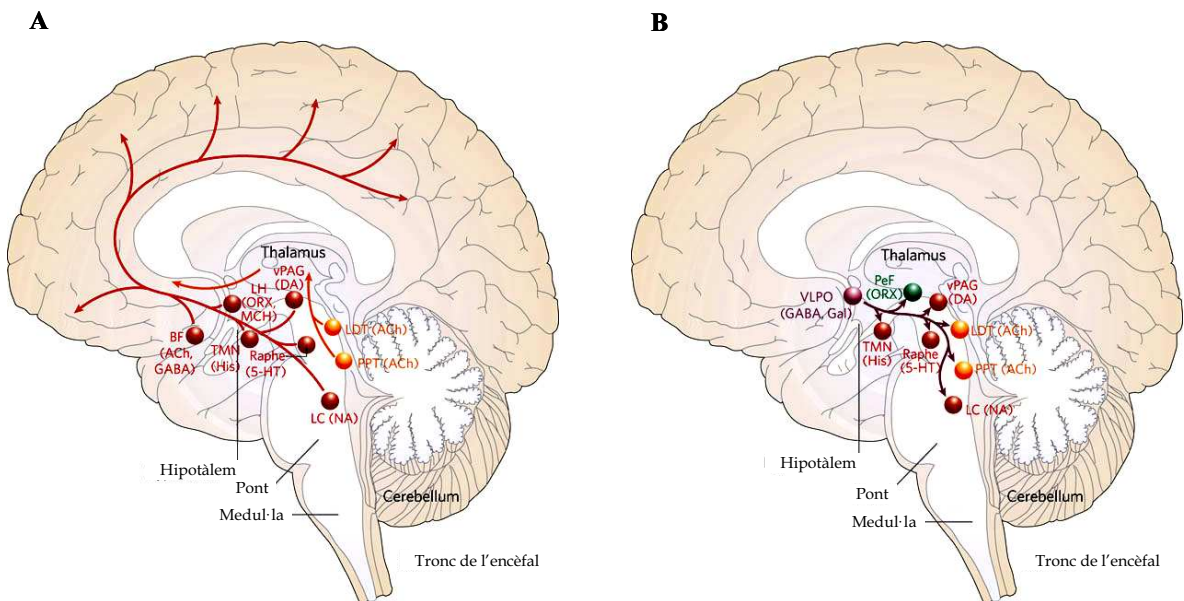


Figura 3. Circuits neuronals implicats en el son i la vigília. A. Principals components del sistema activador reticular ascendent actius durant la vigília. En groc els nuclis de neurones colinèrgiques que faciliten la transmissió talamocortical. En vermell els nuclis de neurones monoaminèrgiques (LC, Rafé, vPAG i TMN) que activen l'escorça cortical i que reben la contribució de les neurones de l'hipotàlem lateral posterior (LH) i del prosencèfal basal (BF). **B.** Projeccions inhibidores del nucli ventrolateral preòptic (VLPO) als principals components del sistema activador de la vigília i a les neurones orexinèrgiques perifornicals (PeF) de l'hipotàlem lateral posterior. (Adaptat de Saper, 2005).

D'una banda, està constituïda per **neurones colinèrgiques** (ACh) dels nuclis tegmental pedunculopontí (PPT) i tegmental laterodorsal (LDT) localitzats al tronc de l'encèfal. Aquest grup de neurones té projeccions ascendents al tàlem, activant el nucli reticular talàmic i les neurones de relleu que tenen un paper crucial en la transmissió d'informació al còrtex durant la vigília.

D'altra banda, el sistema activador reticular ascendent està format per un conjunt de **neurones monoaminèrgiques** com són les noradrenèrgiques (NA) del locus coeruleus (LC), les serotoninèrgiques (5HT) del nucli dorsal i medial del rafe (DR), les dopaminèrgiques (DA) de la matèria gris periaqüeductal ventral (vPAG) i les histaminèrgiques (His) del nucli tuberomamilar (TMN). Aquestes neurones activen directament l'escorça cerebral donant lloc a determinants aspectes de la vigília com l'aprenentatge i la memòria (Cid-Pellitero, 2007), i de manera indirecta a través de l'activació de l'hipotàlem lateral posterior (conté neurones orexinèrgiques) i del prosencèfal basal (conté neurones colinèrgiques i gabaèrgiques) (Saper, 2005). Les neurones noradrenèrgiques del LC tenen a més projeccions a les regions sensorials del tronc de l'encèfal i de la medul·la espinal així com a estructures corticals involucrades en la integració. Aquest patró de distribució suggereix que el LC podria tenir un paper de regulació de l'activitat cortical en funció dels estímuls sensorials.

Les neurones monoaminèrgiques del sistema activador reticular ascendent també anomenades *REM off*, tenen una activitat elevada durant la vigília, que disminueix durant la fase del son nREM i acaba sent pràcticament nul·la al son REM (Taula 1). Les neurones colinèrgiques tant del prosencèfal basal com dels nuclis PPT/LDT, anomenades també *REM on*, estan actives a la vigília i a la fase del son REM, en els quals l'activitat cortical és més elevada (Jones, 2005).

Taula 1. Activitat dels diferents grups de neurones implicats en les fases de vigília i son REM (adaptat de Cid-Pellitero, 2007).

	Vigília	REM
ORX	++++	-
DR (5-HT)/ LC (NA)/ TMN (His)	++++	-
vPAG (DA)	+++	-
BF (ACh)	+++	+++
LDT/ PPT (ACh)	++	++++

++++: molt intensa, +++: intensa, ++: moderada, -: silenciada

Les neurones colinèrgiques del prosencèfal basal tenen d'altra banda projeccions a estructures del sistema límbic, el que podria explicar el component emocional que tenen els somnis que es desenvolupen durant la fase REM del son (Bear, 2007).

4.2. L'àrea ventrolateral preòptica

L'àrea ventrolateral preòptica (VLPO), situada a la part anterior de l'hipotàlem, està constituïda per neurones gabaèrgiques i galaninèrgiques que estan principalment actives durant el son. Aquest conjunt de neurones inhibidores té projeccions a tots els grups de cèl·lules de l'hipotàlem i del tronc de l'encèfal que participen en la vigília (Figura 3B). El nucli del VLPO format per un grup més dens de neurones inhibeix principalment el TMN, involucrat en la transició de la vigília al son nREM, mentre que les neurones de la part més difosa projecten al LC i el DR.

Tanmateix, aquesta connexió és recíproca i el VLPO rep alhora projeccions aferents del LC, el nucli dorsal del rafe i el TMN que l'inhibeixen a la vigília (Saper, 2005).

4.3. L'interruptor *flip-flop* i el paper estabilitzador de les orexines

L'interruptor *flip-flop* és un circuit que conté elements que s'inhibeixen mútuament, de manera que quan una de les parts comença a sobreposar-se a l'altra i disminueix la inhibició que rep, passa a ser activa. Les connexions inhibidores recíproques entre els dos sistemes implicats en el son i la vigília actuen d'aquesta manera (Figura 4). Durant la vigília, les neurones monoaminèrgiques inhibeixen el VLPO alliberant-se de la inhibició que aquest exerceix sobre elles i sobre les neurones de l'hipotàlem lateral posterior i dels nuclis PPT/LDT, mentre que durant el son passa justament a la inversa i el VLPO inhibeix els sistemes implicats en la vigília. Aquest mecanisme permet el pas ràpid d'un estat a l'altre evitant períodes de transició, però alhora és molt inestable. L'estabilització de l'interruptor *flip-flop* és necessària per al manteniment prolongat de la vigília i la inhibició del son. En aquest punt tenen un paper important les orexines (Saper, 2001).

Les orexines (ORX) conegudes també com a hipocretines (Hcr) (Sakurai, 1998; De Lecea, 1998) són uns neuropèptids sintetitzats per un petit grup de neurones de l'hipotàlem lateral posterior. Aquestes neurones són principalment actives a la vigília i especialment durant l'activitat motora. Les neurones orexinèrgiques emeten projeccions excitatòries ascendents al còrtex i descendents a tots els nuclis monoaminèrgics i colinèrgics del sistema activador

reticular ascendent (Cid-Pellitero, 2007). També existeixen projeccions mútues amb el VLPO, encara que aquest últim no té receptors per orexina. Per tant el paper de l'orexina serviria per reforçar el to monoaminèrgic més que no pas inhibir directament el VLPO. De fet les neurones monoaminèrgiques envien projeccions inhibidores sobre les neurones que alliberen ORX. Aquest circuit retroactiu, mantindria l'activitat de les neurones monoaminèrgiques, perquè quan petites perturbacions disminuïssin l'activitat d'aquestes, allora disminuirien l'activitat inhibidora que exerceixen sobre les neurones ORX i aquestes augmentarien l'estímul sobre elles (Ohno, 2008).

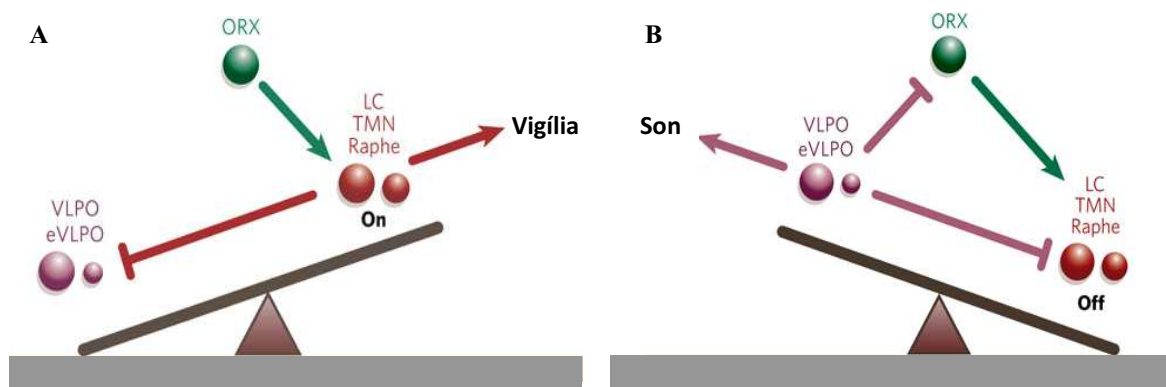


Figura 4. Model d'interruptor *flip-flop*. **A.** Durant la vigília les neurones monoaminèrgiques inhibeixen el VLPO. Les neurones orexinèrgiques (ORX) contribueixen a l'estabilització de la vigília. **B.** Durant el son l'activitat del VLPO inhibeix les neurones monoaminèrgiques i les ORX per prevenir que aquestes puguin interrompre el son. (Adaptat de Saper, 2005).

També s'ha descrit que el 90% dels individus que pateixen narcolèpsia, tenen disminuïts els nivells d'orexina al líquid cefaloraquídi ja sigui per una neurodegeneració de les neurones orexinèrgiques o una disminució en la producció d'aquests neuropèptids (Ohno, 2008). Alguns dels símptomes que pateixen els pacients de narcolèpsia, són l'excessiva somnolència diürna, reducció del temps d'inici del son REM (a vegades directament des de l'estat de vigília), i en alguns casos cataplexia (pèrdua del to muscular amb preservació de la consciència). Aquests símptomes s'atribueixen a una incapacitat de regular el son REM (Zeitzer, 2006). Per tant, les neurones orexinèrgiques de l'hipotàlem lateral posterior, tindrien una funció estabilitzadora de "l'interruptor *flip-flop*" que permetria el manteniment prolongat de la vigília i la inhibició del son.

5. SISTEMES IMPLICATS EN LA REGULACIÓ DEL SON

A mitjans de la dècada dels vuitanta es va proposar un model de regulació del son influenciat per fenòmens homeostàtics i circadians (Borbely, 1985).

La **influència homeostàtica** sobre el son seria deguda a una substància endògena que s'acumularia progressivament durant la vigília i accentuaria la necessitat de dormir. Quantes més hores portem desperts, major propensió al son. Inicialment, es va pensar que aquesta substància podria tenir relació amb el sistema immune, donada la somnolència que habitualment es manifesta en malalties infeccioses com la grip o el refredat (Bear, 2007). Actualment, s'ha suggerit l'adenosina com a acumulador homeostàtic de la necessitat de dormir. Durant períodes prolongats de vigília, els sistemes productors d'energia del cervell disminueixen, s'exhaureixen les reserves de glicogen i disminueixen els nivells d'ATP. L'ATP es degrada a ADP, AMP i ocasionalment a adenosina que incrementaria els seus nivells en determinades zones del cervell, com per exemple el prosencèfal basal. L'adenosina també podria actuar desinhibint les neurones gabaèrgiques del VLPO desencadenant l'inici del son (Saper, 2005). Un cop s'inicia el son, els nivells d'adenosina descendeixen lentament fins que ens tornem a despertar i comença el cicle de nou.

Pel que fa a les **influències circadianes**, tal com hem comentat anteriorment, l'NSQ estableix el ritme circadià del cicle son/vigília. L'NSQ té poques projeccions sobre el VLPO o les neurones orexinèrgiques de l'hipotàlem lateral posterior, de manera que actua indirectament sobre aquestes estructures. L'NSQ envia connexions aferents a estructures adjacents com la zona subparaventricular (SPZ) i el nucli dorsomedial de l'hipotàlem (DMH). La part ventral de l'SPZ, situada sobre l'NSQ, està implicada en el manteniment del ritme son/vigília i l'activitat motora, mentre la part dorsal regula el ritme circadià de la temperatura corporal. La principal diana de les neurones de l'SPZ és el DMH. El DMH per una banda envia projeccions glutamatèrgiques a l'hipotàlem lateral posterior (implicat en la vigília però també centre del control de la ingesta) i per l'altra gabaèrgiques al VLPO, de manera que afavoriria la vigília (Saper, 2005).

Tant en les espècies diürnes com en les nocturnes, a pesar de tenir un ritme de comportament oposat, l'NSQ és actiu durant el fotoperíode mentre que el VLPO és actiu durant el son. Aquest sistema de regulació circadià multisinàptic, permetria al DMH la integració de la informació de l'NSQ amb altres com la disponibilitat de menjar, la temperatura o el

comportament social, donant flexibilitat als animals per adaptar els seus cicles fisiològics i de comportament amb l'entorn i incrementar la seva supervivència (Fuller, 2006).

En un entorn complex i contínuament canviant, aquests fenòmens de regulació del son poden ser modificats per influències externes com la disponibilitat de menjar o la temperatura. Les fluctuacions dels sistemes fisiològics del cos en funció de les demandes externes constituïrien la **regulació al·lostèrica del son**. Recentment, s'ha plantejat que les neurones orexinèrgiques estan regulades pel sistema límbic i el sensorial visceral. La connexió amb el sistema límbic seria important per a l'increment de l'alerta davant estímuls emocionals que ho requerissin, per exemple situacions de perill que impliquen respostes defensives del tipus lluitar o fugir (*fight or flight*). Alhora, alguns factors metabòlics i hormonals com la glucosa i la leptina, inhibeixen l'activitat de les neurones orexinèrgiques. En situacions de restricció d'aliments o d'hipoglucèmia, on els nivells d'aquests factors estan disminuïts, les neurones orexinèrgiques estarien actives, incrementant la vigília i afavorint la capacitat de trobar aliments a la natura en el cas dels animals (Saper, 2005).

6. TRASTORNS DEL SON

L'insomni és un trastorn caracteritzat per la insatisfacció en la qualitat i/ o quantitat del son, que persisteix durant un considerable període de temps, i que inclou la dificultat per iniciar o mantenir el son, així com despertar-se abans de l'hora desitjada amb incapacitat per tornar a dormir (World Health Organization, icd10online).

6.1. Classificació

L'insomni es pot classificar en funció de diferents factors com la **severitat** (lleu, moderada, severa), la **manera en que es presenta** (insomni d'inici o conciliació del son, insomni de manteniment, insomni de final del son) o la **comorbilitat**, és a dir, si l'insomni es presenta associat a una altra patologia. Aquest insomni s'anomena insomni secundari perquè es considera el símptoma d'un altre trastorn, mentre que l'insomni primari és aquell on no hi ha una altra patologia que el causi. Per últim, en funció de la **durada**, es pot classificar en: transitori o agut (si és inferior a 4 setmanes), de curt termini (més de 4 setmanes però inferior als 3-6 mesos) i crònic (més de 3-6 mesos) (Estivill, 2003). Encara que les últimes tendències consideren l'insomni crònic a partir de més de 30 dies (National Institute of Health, 2005).

De les diferents classificacions que existeixen per l'insomni, les més representatives són:

- DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) de l'associació americana de psiquiatria (APA).
- ICSD-2 (*International Classification of Sleep Disorders*) de l'acadèmia americana de medicina del son (AASM).
- ICD-10 (*International Classification of Diseases*) de l'organització mundial de la salut (WHO).

La ICD determina els codis utilitzats per classificar les diferents malalties, i inclou una àmplia varietat dels signes, símptomes i altres informacions relacionades amb les malalties. S'utilitza a nivell internacional amb finalitats estadístiques relacionades amb la morbiditat i la mortalitat. Aquest sistema de codis de la WHO permet que la recollida de dades estadístiques, el processament, la classificació i la presentació siguin comparables entre els diferents països.

El DSM-IV és un manual que té com a principals objectius establir unes directrius per al diagnòstic clínic i la investigació, alhora de ser una eina educativa (American Psychiatric Association, 1994).

La ICSD agrupa tots els trastorns del son en 12 categories, basant-se principalment en que tinguin: una dolença comuna (insomni, hipersomni), que presumiblement tinguin una etiologia bàsica (ex. alteracions del rellotge intern), i a partir de l'òrgan o sistema on s'origina el problema (ex. trastorns associats a problemes respiratoris).

Les últimes edicions dels manuals tant DSM-IV com ICSD-2, s'han desenvolupat realitzant consultes mútues amb els diferents òrgans que participen en l'edició de la classificació ICD per tal d'incrementar la compatibilitat dels diferents sistemes i harmonitzar els criteris per al diagnòstic dels diferents trastorns del son (American Psychiatric Association, 1994) (American Academy of Sleep Medicine, 2005).

En relació amb la ICD-10, els criteris que proposa el DSM-IV per al diagnòstic de l'insomni primari són pràcticament iguals, exceptuant que la ICD-10 requereix que la freqüència d'aparició dels símptomes sigui com a mínim de tres cops a la setmana, almenys durant un mes. En comparació amb la ICSD, el manual DSM-IV classifica com a insomni primari diferents subtipus d'insomni de l'altra, com són: l'insomni psicofisiològic, la mala percepció de l'estat del son, l'insomni idiopàtic i alguns casos de mala higiene del son (American Psychiatric Association, 1994) (Taula 2).

Taula 2. Tipus d'insomni en funció de les diferents classificacions (adaptat d'Estivill, 2003).

ICSD		ICD-9		ICD-10		DSM-IV	
Nom	Codi	Nom	Codi	Nom	Codi	Nom	Codi
Trastorn d'ajust del son	307.41-0	Trastorn transitori d'inici o manteniment del son	307.41	Insomni no orgànic	F51.0		
Insomni psicofisiològic	307.42-0	Trastorn persistent d'inici o manteniment del son	307.42	Insomni no orgànic	F51.0	Insomni primari	307.4
		Altres insomnis	780.52	Trastorn d'inici o manteniment del son	G47.0		
Síndrome de l'apnea del son central	780.51-0	Insomni amb apnea del son	780.53	Apnea del son	G47.3	Trastorn del son relacionat amb la respiració	780.5
Síndrome d'hipoventilació alveolar central	780.51-1						
Insomni d'altitud	289	Insomni d'altitud	289	Altres efectes de l'altitud elevada	T20,2		
Dormidor curt	307.49.0						
Insomni fatal familiar	337.9	Insomni fatal familiar	337.9	Altres malalties neurodegeneratives	G31	Insomni degut a...	780.X
Insomni idiopàtic	780.52.7	Altres insomnis	780.52	Trastorn d'inici i manteniment del son	G47.0	Insomni primari	307.4

Aquests sistemes de classificació són dinàmics i es revisen a mesura que incrementa el coneixement sobre l'etiopatogènia del son, i els nous tractaments. Actualment l'APA està treballant en la cinquena edició del sistema de classificació DSM que està previst es publiqui el maig de 2013. La nova edició incorporarà més informació sobre les bases fisiològiques i genètiques del son i simplificarà el sistema de classificació, amb l'objectiu de facilitar el diagnòstic dels trastorns del son als metges de medicina general i als psiquiatres per tal de millorar el tractament de l'insomni associat a altres malalties (Reynolds, 2010).

Aquesta Tesi Doctoral s'ha basat en el manual DSM-IV donat que és el més utilitzat des del punt de vista clínic i de diagnòstic, alhora que l'etiologia del trastorn és fonamental per determinar el tractament (Roth, 1999).

Segons el manual DSM-IV, els trastorns del son estan dividits en quatre grans grups segons la seva possible etiologia (Figura 5):

- Els **trastorns primaris del son**, són aquells que la seva etiologia no és deguda a una malaltia mental, mèdica ni a cap substància. Aquest tipus de trastorns solen ser conseqüència d'alteracions endògenes en els mecanismes de son/vigília, que de vegades es veuen agreujats pel condicionament negatiu que suposa el fet d'haver patit insomni.

- Els **trastorns del son relacionats amb un altre trastorn mental** són aquells en que l'insomni és degut a un trastorn mental diagnosticable i suficientment greu com per merèixer atenció clínica independent.
- Els **trastorns del son relacionats amb una malaltia mèdica** són com el seu nom indica conseqüència directa dels efectes fisiològics d'una malaltia mèdica sobre el sistema son/vigília.
- Les alteracions del son degudes tant al consum d'una substància en particular (inclosos els fàrmacs) com pel fet de deixar de consumir-la, s'anomenen **trastorns del son induïts per substàncies**.

Els trastorns primaris del son, es divideixen a la vegada en **parassòmnia** (caracteritzades per fets i conductes anormals durant el son o en la fase de transició son/vigília) i **dissòmnia** (caracteritzades per trastorns de la quantitat, qualitat i horari del son). Aquestes últimes inclouen: l'insomni primari, la hipersòmnia primària, la narcolèpsia, els trastorns del son relacionats amb la respiració, els trastorns del ritme circadià i la dissòmia no especificada.

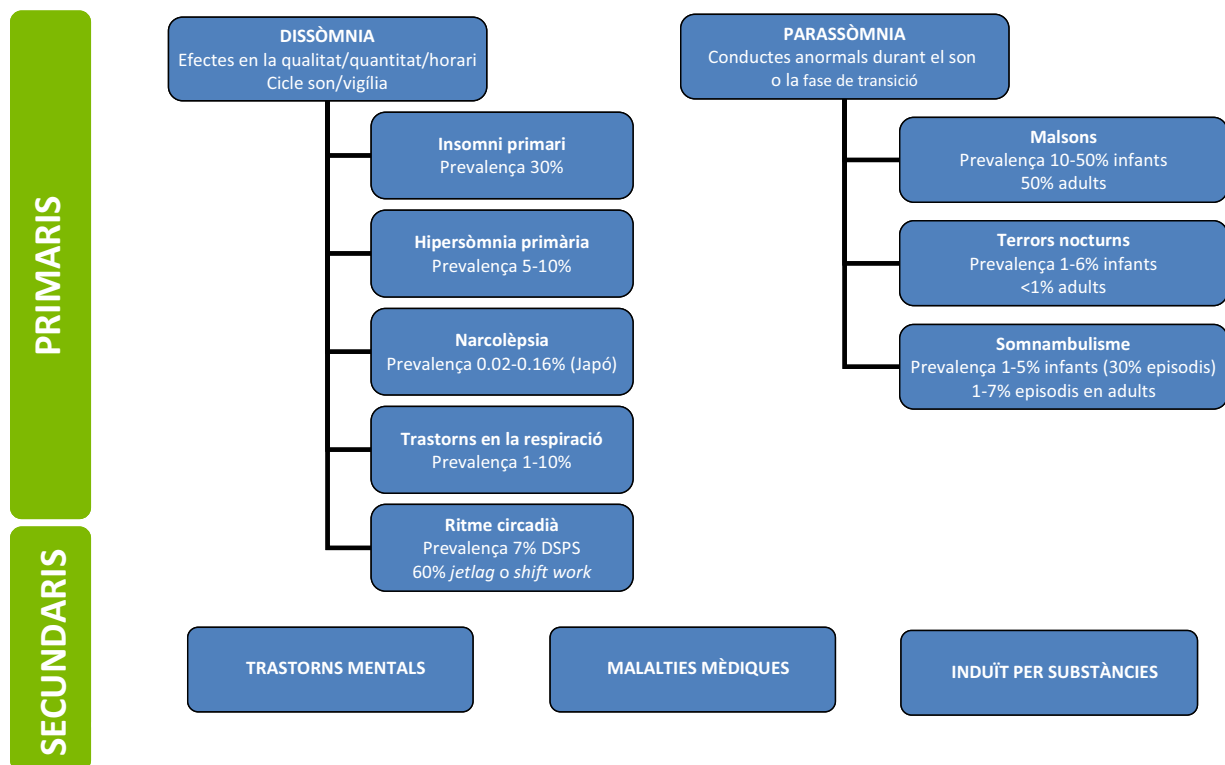


Figura 5. Classificació dels trastorns del son segons el DSM-IV

La present Tesi Doctoral s'ha centrat en l'**insomni primari** que té com a característiques essencials la dificultat per iniciar i/o mantenir el son, així com la sensació de son no restaurador. Aquesta alteració provoca malestar, fatiga, irritabilitat o manca de concentració que afecten a l'activitat laboral i social de l'individu. D'altra banda, aquest trastorn sol estar associat amb un augment del nivell d'alerta fisiològica i psicològica durant la nit, juntament amb un condicionament negatiu per dormir. La intensa preocupació i el malestar davant la impossibilitat de conciliar el son, poden acabar generant un cercle viciós.

6.2. Diagnòstic

El **diagnòstic** dels trastorns del son es basa en uns requeriments bàsics com són: l'historial clínic del pacient, l'historial del son i l'exploració física. Si el metge ho considera necessari, opcionalment es poden requerir qüestionaris i agendes del son, EEG, test de latències múltiples del son o consulta a un metge especialista en el tema.

Per diagnosticar insomni s'ha de constatar almenys que l'individu tingui dificultat per iniciar o mantenir el son i que aquestes alteracions afectin significativament el seu funcionament durant la vigília. També és important avaluar la presència de malalties concomitants que puguin ser la causa de l'insomni, l'existència d'altres tractaments farmacològics o hàbits de consum de substàncies d'abús.

L'historial del son també ajuda en el diagnòstic i ha de comprendre paràmetres com el temps que triga el pacient en adormir-se (temps de latència), el nombre de cops que es desperta durant la nit, la freqüència dels símptomes i la higiene del son (si fa migdiades, l'hora d'anar a dormir i de llevar-se en dies laborals i festius...) (Estivill, 2003; Bastien, 2005).

6.3. Epidemiologia

Malgrat la importància mèdica del son, aquest trastorn està infradiagnosticat. Només un 5% dels afectats consulten al seu metge i la majoria no l'informa mai del seu trastorn. A dia d'avui en els estudis epidemiològics no hi ha consens de com definir l'insomni i com mesurar-lo. Conseqüentment, les dades obtingudes varien en funció dels paràmetres avaluats. Hi ha nombrosos estudis epidemiològics realitzats a diversos països del món, en els quals s'ha avaluat la prevalença de l'insomni conjuntament amb diferents paràmetres associats a aquest, com poden ser la freqüència i severitat dels símptomes, les repercussions diürnes o el grau d'insatisfacció amb el son. Altres estudis analitzen la relació entre els diferents factors

sociodemogràfics i l'insomni. Una revisió d'aquests temes es recull en les publicacions realitzades per Ohayon (2006a i 2006b).

En estudis epidemiològics en els quals només s'ha tingut en compte la presència dels símptomes, sense valorar la freqüència, l'índex de prevalença de l'insomni està al voltant del 33%, essent la dificultat per mantenir el son el símptoma més present. En els estudis on s'ha considerat que la freqüència dels símptomes fos com a mínim de tres nits a la setmana, la prevalença disminueix fins al voltant del 16-21%.

Altres estudis en els quals es contempla la severitat dels símptomes o les repercussions en les activitats diürnes, la prevalença de l'insomni ronda entre un 16-28% i un 10% respectivament.

Una altra qüestió que es sol plantejar en els estudis epidemiològics és respecte a la insatisfacció amb la qualitat o quantitat del son. Entre un 20-42% de la població general, considera que no dorm suficient, d'un 2.8-9.5% considera que dorm massa i entre un 8-18.5% es sent insatisfet amb la qualitat del son.

A la major part d'estudis realitzats no hi ha dades sobre la durada del problema, les poques dades que hi ha indiquen que a la majoria dels casos l'insomni resulta ser crònic. Només en un 4% dels casos la duració del problema és inferior a les quatre setmanes, entre un 5-6% la durada és de 1-6 mesos o de 6-12 mesos, mentre en un 85% dels casos supera l'any.

Quan es tenen en compte els **factors sociodemogràfics**, pel que fa al gènere, es diagnostiquen més casos d'insomni en dones que en homes, amb una proporció 1,4 que incrementa fins a 1,7 amb l'edat i que podria ser deguda en part a la menopausa.

Tots els estudis epidemiològics coincideixen amb un increment de la prevalença dels símptomes de l'insomni amb l'edat. Alguns estudis recullen que gairebé un 50% dels individus majors de 65 anys pateixen algun símptoma d'insomni, mentre que en d'altres el percentatge és inferior. En algun d'aquests casos en els quals no es descriu insatisfacció amb el son, l'insomni podria estar relacionat amb trastorns mentals o malalties físiques.

Una altra dada important és que més de la meitat dels individus que pateixen insomni, tenen problemes de salut, essent els més freqüents les malalties de les vies respiratòries altes, reumatisme, dolor crònic o malalties cardiovasculars. Però el grup més important d'insomnes, amb una prevalença del 30-40% és el que està associat a trastorns mentals com depressió major, trastorns d'ansietat o trastorns psicòtics.

Un últim factor a tenir en compte és l'estil de vida. Les persones sotmeses a un nivell d'estrès elevat, les persones que no tenen feina, els treballadors amb jornades de canvi de torn de treball o el fet de dormir en una habitació amb la temperatura no apropiada són condicionants que comporten un alt risc de patir insomni.

7. ETIOPATOGENIA DE L'INSOMNI

7.1. Factors implicats en l'etiopatogènia de l'insomni

En l'**insomni agut**, on la durada del trastorn és curta, la causa sol estar associada a estímuls estressants transitoris de tipus social o ambiental, com per exemple la mort d'un familiar, viatjar a zones amb diferent franja horària o canvis de torn de treball. En l'**insomni crònic**, el 75% del casos estan associats a malalties físiques o psiquiàtriques (insomni secundari), sent les més freqüents el dolor crònic i la depressió, i només el 25% dels casos es deuen a l'insomni primari (Teegarden, 2008).

Tradicionalment s'ha plantejat que l'**insomni secundari** és conseqüència d'un trastorn primari. Actualment, alguns estudis han demostrat que episodis d'insomni són predictius de nous casos de depressió o de casos recurrents en individus que n'havien patit. També s'ha observat que algunes vegades són un indicador estadísticament significatiu d'incidències coronàries i per tant, almenys en determinades ocasions, l'insomni pot ser la causa en comptes de la conseqüència d'un altre trastorn mèdic o psiquiàtric. D'altra banda, no tots els individus que pateixen una determinada malaltia acaben desenvolupant insomni, de manera que altres factors a part del trastorn primari, haurien de contribuir a l'insomni.

Per tant s'ha hipotetitzat que l'**etiologia de l'insomni és multifactorial**. Els diferents factors que el causen s'han classificat, en funció del seu paper en la generació de l'insomni, com a factors de predisposició, precipitació i perpetuació (Stepanski, 2006).

Aquest model multifactorial permet entendre com diferents factors interactuen per generar l'insomni i com aquest pot esdevenir crònic. Segons aquest model tots els individus tenim un cert grau de predisposició a l'insomni que es desenvolupa amb l'exposició a factors de precipitació. A la llarga aquests factors van desapareixent, i són reemplaçats per altres de perpetuació que mantenen l'insomni.

La presència de **factores de predisposició** explica perquè només un determinat nombre d'individus que pateixen un trastorn primari acaben desenvolupant insomni. Cada individu té

un llindar diferent a l'hora de desenvolupar-lo. Per exemple, algunes persones poden experimentar dificultats per conciliar el son si es prenen un cafè després de dinar, mentre d'altres en poden prendre més d'un, sense que aparentment això els afecti.

Encara que no s'han definit els mecanismes específics que predisposen a l'insomni, s'ha suggerit que podria tractar-se d'un estat fisiològic i cognitiu d'excés d'alerta (*Physiological and cognitive hyperarousal*) (Stepanski, 2006).

A nivell cognitiu, la preocupació que genera l'estímul estressant, provoca la pertorbació del son, creant episodis aguts d'insomni, principalment d'inici i de reconciliació del son un cop ens despertem.

A nivell fisiològic els pacients amb insomni primari presenten marcadors que suggereixen la hiperactivitat del sistema nerviós simpàtic, com elevats nivells de catecolamines circulants, increment del metabolisme basal i de la temperatura corporal, variabilitat de la freqüència cardíaca i activació crònica del sistema de resposta a l'estrès.

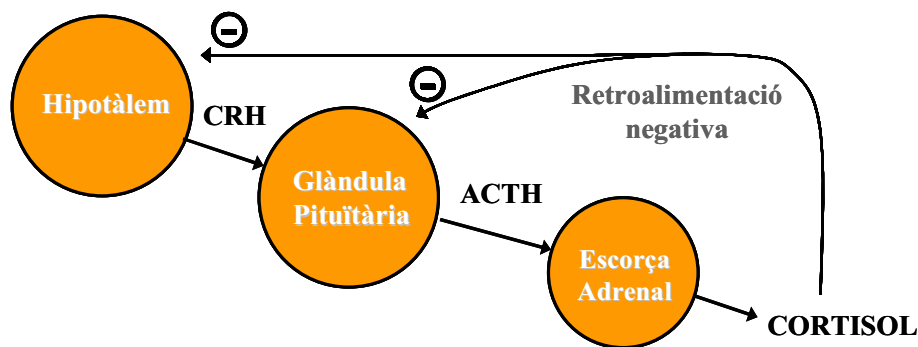


Figura 6. Retroalimentació negativa del cortisol sobre l'eix HPA.

Les dades suggereixen que en l'insomni hi ha una **sobreactivació de l'eix hipotàlem-pituïtària-adrenal (HPA)** (Figura 6), un dels principals components del sistema de resposta a l'estrès del nostre organisme (Tsigos, 2002). Els pacients amb insomni primari tenen incrementats els nivells de cortisol en plasma durant la tarda i nit, i el període de quiescència de la secreció circadiana de cortisol està reduït comparat amb el grup control. La disminució de la retroalimentació negativa sobre les neurones CRH (de l'anglès *corticotropin releasing hormone*) que inhibeixen la secreció de cortisol, perpetua els nivells elevats de cortisol en

plasma (Rodenbeck, 2001). Aquest fet també s'observa en l'envelliment i en pacients amb depressió, ambdós fenòmens fortament associats amb l'insomni, de manera que s'ha hipotetitzat que puguin tenir un origen comú (Young, 1994). Aquesta disminució de la retroalimentació negativa podria ser deguda a fenòmens d'habitució a l'estrès i/o a la desensibilització dels receptors (Jafari, 2007; Patel, 2008). L'insomni primari crònic també està associat amb l'increment dels nivells en plasma de cortisol i d'ACTH (de l'anglès *adrenocorticotropin releasing hormone*) (Roth, 2007a; Roth, 2007b). En aquests pacients també s'ha observat una disminució dels nivells nocturns de melatonina, possiblement atribuïbles a la disminució de la retroalimentació negativa del sistema HPA i a l'increment crònic dels nivells de CRH.

Els tractaments farmacològics actuals que tenen com a diana terapèutica el receptor GABA_A, afecten indirectament l'eix HPA (vegeu apartats 9.1.2 i 9.1.3).

Un altre possible factor que predisposaria a l'insomni seria la **disminució dels mecanismes homeostàtics i circadians del son** que en dificultarien l'inici i el manteniment, i al interactuar amb factors de precipitació generarien insomni crònic. Aquest fet podria donar-se en la gent gran i conjuntament amb l'increment de malalties físiques i mentals explicaria l'augment de l'insomni en aquest grup poblacional.

D'altra banda, els **factors de precipitació** són aquells trastorns o condicions que típicament s'ha suggerit com a causes de l'insomni secundari. Els més comuns són **trastorns mèdics o psiquiàtrics**, com el dolor crònic, problemes respiratoris, malalties neurodegeneratives, insuficiència renal i hipertiroïdisme. Els **efectes de diverses medicacions**, com els antidepressius estimulants, els esteroides, els betabloquejants, els broncodilatadors i els descongestionants també hi contribueixen.

Altres factors que precipiten l'insomni són els **estímuls estressants aguts** (exàmens, conflictes laborals, problemes familiars...), **canvis puntuals de l'entorn** (soroll excessiu o massa llum al dormitori, dormir en un altre llit...) o **canvis en l'horari habitual del son** (*jet-lag*, canvi de torn de treball).

Finalment, els **factors que perpetuen** l'insomni són **canvis cognitius o de comportament** per tal d'aconseguir dormir més i descansar, que es donen un cop l'individu ha experimentat deficiències en el son durant un període de temps.

Alguns canvis en el comportament són per exemple mantenir un horari de son/vigília irregular, passar excessiva estona al llit per intentar dormir més, fer migdiades o activitats estimulants al capvespre. Encara que a curt termini aquests canvis milloren els símptomes de l'insomni, a la llarga promouen la seva continuïtat, produint una incapacitat per conciliar el son a l'hora adequada.

D'altra banda a nivell cognitiu, l'insomni crea un increment de la preocupació durant el dia tant per la possibilitat de no dormir bé al vespre, com per les conseqüències diürnes que això comporta. Aquests canvis produeixen un increment de la tensió en el moment que l'individu va a dormir i durant la nit si l'individu es desperta.

En conjunt aquests factors contribueixen al manteniment de l'insomni crònic i explicarien com un trastorn primari pot inicialment desencadenar l'insomni però no necessàriament continuar-lo.

7.2. Influència genètica en el son i el seu ritme circadià

Diversos estudis suggereixen la influència genètica en alguns paràmetres relacionats amb la somnolència o el ritme circadià, com pot ser l'hora d'anar a dormir i la durada del son. Aquests estudis han analitzat aquests fenotips i han identificat polimorfismes autosòmics (SNP, de l'anglès *single-nucleotide polymorphism*) que difereixen respecte el grup d'individus amb fenotip normal. D'aquests polimorfismes alguns es localitzen en regions pròximes a gens relacionats amb el son.

S'ha identificat un SNP a la regió codificadora rs324981 del gen del receptor 1 del neuropèptid S (NPSR1). En ratolí el neuropèptid S (NPS) es localitza en una petita àrea adjacent al locus coeruleus, i és un potent promotor de la vigília (Xu, 2004). Aquesta mutació no-sinònima provoca un canvi d'aminoàcid (Asn¹⁰⁷→Ile¹⁰⁷) al lloc d'unió del neuropèptid al receptor que provoca un retard en l'hora d'anar a dormir de 15 minuts en els individus heterozigots i de 30 en els homozigots respecte els control (Gottlieb, 2007).

Un altre SNP com el localitzat a l'intró del gen que codifica la fosfodiesterasa 4D (PDE4D), malgrat no estar localitzat en cap regió codificadora, té una forta associació amb la somnolència. La fosfodiesterasa 4 és específica de cAMP i presenta múltiples variants derivades de la transcripció alternativa, sent la PDE4D una de les que s'expressa més àmpliament a cervell humà. Tot i que mutacions en la PDE4D s'han associat amb un augment

del risc d'infart cerebral, possiblement degut al seu paper en la modulació de la inflamació, també s'han observat variacions en els nivells cerebrals intracel·lulars de cAMP o extracel·lulars d'adenosina que poden influir en la somnolència (Gottlieb, 2007).

També s'han identificat polimorfismes al gen que codifica l'adenosina deaminasa, associats amb un increment del son d'ones lentes (SWS) (Retey, 2005). En pacients amb hipersomnolència idiopàtica, s'ha observat un polimorfisme en el gen que codifica el receptor 2 d'orexina (Thompson, 2004). Es sap que la narcolèpsia canina està causada per un polimorfisme en el gen que codifica aquest receptor, però de moment es desconeix el paper que tenen aquests polimorfismes en la narcolèpsia humana. Polimorfismes en els gens humans de *period 2* (PER2) i caseïna quinasa 1d, elements del rellotge circadià molecular, s'han associat amb el síndrome de la fase del son avançada (ASPS) (Toh, 2001; Xu, 2005).

8. L'ÀCID GAMMA AMINOBUTÍRIC (GABA)

Encara que ja es coneixia anteriorment com a producte del metabolisme de plantes i bacteries, no és fins al 1950 que el GABA s'identifica com a constituent del sistema nerviós central (SNC) dels mamífers.

El GABA és el principal neurotransmissor inhibitori al cervell. S'estima que participa entre un 20 i un 50% de les sinapsis de l'SNC, depenent de la regió, i té un paper crucial en la regulació de la seva excitabilitat. Tant l'excés com la manca d'inhibició, poden tenir un paper clau en algunes patologies com l'epilèpsia, l'ansietat o l'insomni (Whiting, 2003).

Com en el cas de les monoamines (MA), el GABA té una distribució discreta a l'SNC dels mamífers. Principalment es localitza al cervell, la medul·la espinal i la retina en quantitats de milimol/gram, mentre les MA solen trobar-se en concentracions inferiors de l'ordre de nanomol/gram. Als teixits perifèrics la presència del GABA és baixa o pràcticament nul·la (Cooper, 2003).

8.1. Metabolisme

El metabolisme del GABA està relacionat amb la glucòlisi i el cicle de Krebs (Figura 7). Per una banda, tant la glucosa com l'àcid pirúvic són precursors de la síntesi del GABA, i per l'altra la transaminació de l'àcid α -oxoglutarat (intermediari del cicle de Krebs) dona lloc a l'àcid glutàmic (Glu), també precursor del neurotransmissor. El Glu també es pot sintetitzar a partir de la glutamina que es sintetitza a les cèl·lules de la glia.

La descarboxilació del Glu per formar GABA, està catalitzada per l'àcid glutàmic descarboxilasa (GAD). Mentre que la GABA- α -oxoglutarat transaminasa (GABA-T) catalitza la transaminació del GABA amb l' α -oxoglutarat, donant lloc al succinat semialdehid i regenerant el Glu. Finalment, el succinat semialdehid és oxidat per la succinat semialdehid deshidrogenasa (SSADH) a succinat, que torna a entrar al cicle de Krebs. Encara que aquesta és la principal via metabòlica del GABA, altres vies alternatives poden, per exemple, convertir el succinat semialdehid en γ -hidroxibutirat (GHB). Alguns estudis han demostrat que el GHB administrat a concentracions fisiològiques, es podria convertir en GABA, encara que es desconeix les implicacions que això podria tenir (Cooper, 2003).

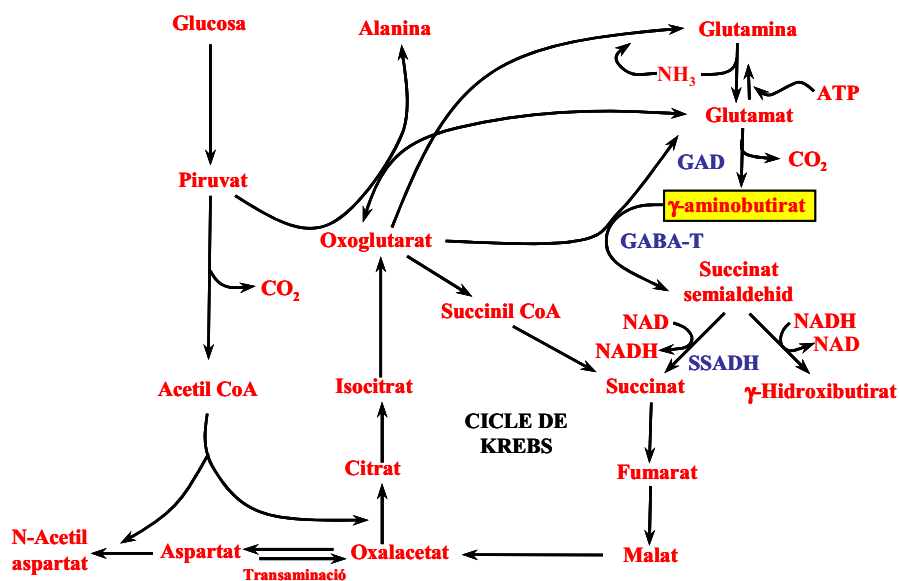


Figura 7. Relació entre el metabolisme del GABA, la glucòlisi i el cicle de Krebs (adaptat de Cooper, 2003).

Els enzims del metabolisme del GABA, GAD i GABA-T, es distribueixen de manera diferent. La GAD es localitza principalment a l'SNC i la retina de mamífers, el que implica que el GABA només es sintetitzi aquí, mentre GABA-T té una distribució més àmplia que explicaria la ràpida metabolització que es dona quan s'administra GABA exogen. A nivell cel·lular GAD està associada a la fracció sinaptosomal, mentre que GABA-T a la mitocondria.

Un cop sintetitzat el GABA, s'emmagatzema a les vesícules dels terminals presinàptics mitjançant el transportador vesicular del GABA (GAT). GAT no és un transportador específic de GABA sinó que es creu que també transporta a l'interior de les vesícules altres neurotransmissors aminoàcids inhibitoris.

L'arribada d'un potencial elèctric despolaritza el terminal presinàptic gabaèrgic, provocant l'alliberament de GABA a l'espai sinàptic i la seva posterior unió als receptors pre i postsinàptics. L'efecte del neurotransmissor s'acaba amb la seva recaptació de l'espai sinàptic a través de diversos transportadors de membrana, com GAT, tant per neurones gabaèrgiques com per cèl·lules de la glia. La captació del GABA per cèl·lules de la glia, implicaria la seva utilització com a intermediari metabòlic i evitaria la seva reutilització en altres alliberaments, provocant per tant la seva síntesi *de novo*.

8.2. Receptors del GABA: Estructura i tipus

El GABA exerceix la seva acció a través de tres tipus de receptors, dos ianotròpics ($GABA_A$ i $GABA_C$) que formen un canal iònic que permet el flux d'anions Cl^- , i un metabotròpic ($GABA_B$) acoblat a proteïna G que regula canals de Ca^{2+} i K^{+} a través de segons missatgers (Cooper, 2003).

Aquests receptors s'expressen tant en membranes presinàptiques com postsinàptiques, i en vertebrats es troben a la majoria de neurones de l'SNC, als astròcits i a les neurones del sistema nerviós autònom.

8.2.1. Receptor $GABA_A$

El receptor $GABA_A$ pertany a la superfamília de canals iònics dependents de lligand, sent el més representatiu el receptor nicotínic.

Estructuralment està format per 5 subunitats proteïques (d'aproximadament 43-67 KDa), que s'agrupen al voltant d'un porus central constituint el canal iònic (Figura 8).

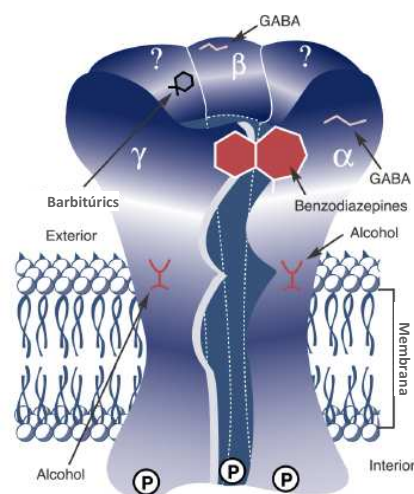


Figura 8. Estructura del receptor $GABA_A$ i lloc d'interacció de diferents lligands (adaptat de Mihic, 1997).

Cada subunitat té un extrem N-terminal extracel·lular seguit de quatre segments transmembrana (TM1-TM4) i un extrem C-terminal extracel·lular. A l'extrem N-terminal hi ha el lloc d'unió dels lligands i entre els segments TM3-TM4 hi ha un bucle intracel·lular, que conté una diana de fosforilació per part de proteïnes quinasa, necessària en l'agrupament dels receptors postsinàptics. Mentre el segment TM2 constituïria la paret del canal (Johnston, 2005).

Actualment estan descrites 7 tipus de subunitats amb les seves corresponents isoformes: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ i ρ_{1-5} . La combinació de les diferents subunitats dependrà en part del seu lloc d'expressió, i determinarà tant la farmacologia com el grau de resposta del receptor al lligand.

8.2.2. Receptor $GABA_C$

Aquests receptors es localitzen principalment a la retina i al sistema òptic, encara que hi ha evidències de receptors funcionals a la medul·la espinal, el colícul superior, la glàndula pituïtària i el tracte gastrointestinal. Les implicacions fisiològiques de l'activació del receptor $GABA_C$ encara no es coneixen del tot, però podria estar implicat en el processament visual, la regulació dels cicles son/vigília, la percepció del dolor, els processos cognitius i la secreció gastrointestinal (Chebib, 2004).

Estructuralment són similars als receptors $GABA_A$ i formen canals iònics depenents de lligand. Es diferencien per ser homopentàmers i per estar constituïts només per les diferents isoformes de la subunitat ρ . La unió del lligand a l'extrem N-terminal de la subunitat provoca l'obertura del canal de Cl^- (Enz, 1998; Johnston, 2003) (Figura 9).

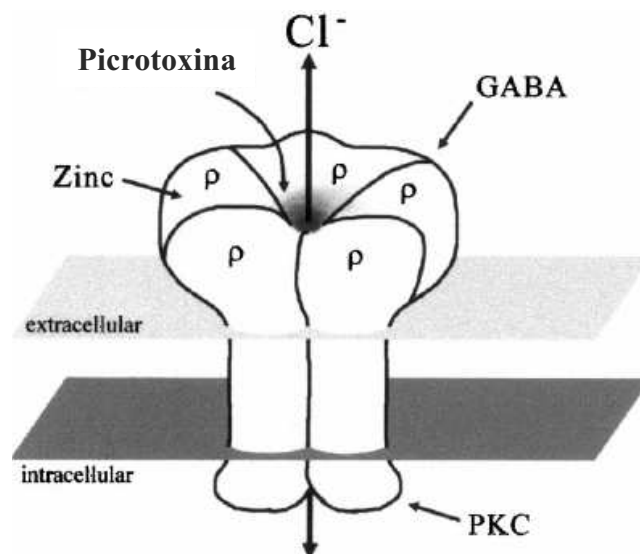


Figura 9. Estructura del receptor $GABA_C$ (adaptat d'Enz, 1998).

Estructuralment les subunitats $GABA_{B(1)}$ i $GABA_{B(2)}$ (Figura 10) tenen un llarg domini N-terminal extracel·lular, set dominis transmembrana (7TM) i un extrem C-terminal intracel·lular. La subunitat $GABA_{B(1)}$ té a l'extrem C-terminal un domini de retenció a reticle endoplasmàtic (RSRR). La interacció amb l'extrem C-terminal de la subunitat $GABA_{B(2)}$ (*coiled-coil domain*) emmascara aquest domini RSRR i permet el trànsit del receptor funcional cap a la superfície de membrana (Pin, 2009). A l'extrem N-terminal la subunitat $GABA_{B(1)}$ té els dominis *sushi* que li permeten unir-se a proteïnes de la matriu extracel·lular i el domini VFTM (*Venus flytrap motif*) on s'uneix el lligand. El domini VFTM està format per dos lòbuls glomerulars separats entre sí. La unió del lligand provoca el tancament dels dos lòbuls i un canvi conformacional que resulta en l'activació de la proteïna G_i/G_o a través de la subunitat $GABA_{B(2)}$.

Les subunitats $\beta\gamma$ de la proteïna G activarien per una banda receptors $GABA_B$ presinàptics inhibidors de canals de Ca^{2+} dependents de voltatge (de tipus N o P/Q) i per l'altra receptors $GABA_B$ postsinàptics, associats a canals de K^+ tipus Kir3 i GIRK. L'activació dels receptors presinàptics atenua l'alliberament del propi GABA (autoreceptors), com d'altres neurotransmissors (heteroreceptors), mentre que els postsinàptics generen potencials postsinàptics inhibitoris lents (*late IPSC*) (Bettler, 2004).

A més de la modulació de canals iònics, el receptor $GABA_B$ inhibeix i activa l'adenilat ciclase (AC) a través de les subunitats α ($G_i\alpha/G_o\alpha$) i $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$) de la proteïna G respectivament.

Al teixit neuronal s'expressen 9 isoformes d'AC la majoria de les quals s'inhibeixen per $G_i\alpha/G_o\alpha$. L'estimulació d'AC per subunitats $G\beta\gamma$ dependria de la presència pròxima d'una altra subunitat α ($G_s\alpha$), de manera que l'efecte de l'activació del receptor $GABA_B$ sobre els nivells de cAMP dependrà de la isoforma d'AC que s'expressi i de la presència de la subunitat $G_s\alpha$ d'un altre GPCR conjuntament amb el receptor $GABA_B$ (Bettler, 2004).

L'activitat dels receptors $GABA_B$ sobre l'AC es creu que tindria una funció neuronal moduladora a llarg termini, que podria estar implicada en la plasticitat sinàptica.

La desensibilització del receptor s'iniciaria amb la fosforilació a través de quinases intracel·lulars i la interacció amb proteïnes citoplasmàtiques, β -arrestines, que interfereixen en l'acoblament del receptor a la proteïna G i promourien l'endocitosi.

8.3. Moduladors dels receptors GABA

8.3.1. Moduladors de $GABA_A$

Els principals agonistes del receptor $GABA_A$ són el muscimol i l'isoguvacina que s'uneixen, a l'igual que el lligand endogen, a la subunitat β del receptor provocant l'obertura del canal de Cl^- . Aquest efecte és antagonitzat de manera competitiva per l'acció de la bicuculina i de manera no competitiva per la picrotoxina i el TBPS (Cooper, 2003) (Taula 3).

Altres fàrmacs rellevants des del punt de vista clínic, com són les benzodiazepines (BDZ), els fàrmacs Z, els barbitúrics, i els esteroides neuroactius s'uneix al receptor $GABA_A$ modulant-lo al·lostèricament.

Taula 3. Lligands dels diferents receptors del GABA

	$GABA_A$	$GABA_B$	$GABA_C$
AGONISTES	Muscimol Isoguvacina	Baclofen	(+)-CAMP
MODULADORS AL·LOSTÈRICS POSITIU	Barbitúrics* BDZ Fàrmacs Z Neuroesteroides*		
AGONISTES PARCIALS	THIP (Gaboxadol)		Muscimol Isoguvacina ACAC
ANTAGONISTES	Bicuculina (COMPETITIU) Picrotoxina TBPS (NO COMPETITIU)	Faclofen CGP-54626	THIP (Gaboxadol) TPMPA (COMPETITIU) Picrotoxina (NO COMPETITIU)

* A altes concentracions es comporten com agonistes

Les BDZ tenen una estructura química general composta per un anell benzènic unit a un heterocicle anomenat diazepina (vegeu l'estructura química a la Figura 12 de la pàgina 34), i s'uneixen entre les subunitats α i γ del receptor $GABA_A$. Els receptors que contenen les subunitats α_1 , α_2 , α_3 i α_5 en combinació amb la subunitat γ_2 i qualsevol β són sensibles a la modulació per BDZ. En canvi, la mutació puntual que resulta en el canvi d'un aminoàcid histidina per un d'arginina, fa que les subunitats α_4 i α_6 siguin insensibles a BDZ (Charney, 2006; Möhler, 2006).

Els fàrmacs Z són molècules de famílies químiques diferents a les BDZ que s'uneixen al mateix centre actiu, entre les subunitats α i γ del receptor $GABA_A$, però tenen més selectivitat pels receptors que contenen la subunitat α_1 (Mitler, 2000).

En canvi els barbitúrics tenen un nivell de selectivitat baix, de manera que exerceixen la seva acció sobre el receptor GABA_A unint-se a les diferents isoformes de les subunitats α i β (Charney, 2006).

Els neuroesteroides s'uneixen al porus central del receptor GABA_A (Purves, 2008). Es desconeixen exactament les subunitats a les quals s'uneixen, però s'ha observat que en absència de la subunitat γ , són capaços d'activar el receptor (Charney, 2006).

Els agonistes del lloc d'unió de les BDZ, potencien l'acció del GABA sobre el receptor GABA_A a través de l'increment de la freqüència d'obertura del canal de Cl⁻. Els barbitúrics en canvi, n'augmenten el temps d'obertura, mentre els esteroides neuroactius incrementen ambdues coses (Lancel, 1999).

A diferència de les BDZ i els fàrmacs Z que en absència de GABA no tenen efecte sobre el receptor, tant els barbitúrics com els esteroides neuroactius, són capaços d'activar directament el receptor a altes concentracions. La depressió generalitzada de l'SNC, com a conseqüència de l'efecte hiperpolaritzant directe d'aquests compostos, seria responsable del seu efecte anestèsic (Sieghart, 1995; Möhler, 2002).

Agonistes i moduladors al·lostèrics del receptor GABA_A, mimetitzen i potencien l'acció del GABA respectivament, el que explicaria que tots ells tinguin propietats hipnòtiques en comú, encara que no presenten els mateixos efectes sobre el son.

Les diferències entre aquests compostos es podrien explicar per una banda pel fet que activen diferents subtipus de receptors. Mentre els agonistes activen tots els receptors GABA_A funcionals, la resposta dels moduladors depèn de la composició precisa d'aquests. D'altra banda, els processos relacionats amb el son, estan regulats per l'alliberament de GABA en àrees específiques del cervell. Els moduladors actuen potenciant l'acció del GABA endogen alliberat, mantenint l'especificitat fisiològica, mentre els agonistes estimulen de manera no selectiva a través de tot l'SNC.

8.3.2. Moduladors de GABA_C

El GABA té aproximadament 10 vegades més afinitat pel receptor GABA_C que pel GABA_A. El receptor GABA_C a l'activar-se crea corrents de Cl⁻ més petits però de més durada ja que es desensibilitza més lentament.

L'àcid cis-4-aminocrotònic (ACAC), és un agonista parcial del receptor GABA_C però també activa lleugerament els receptors GABA_A que contenen la subunitat α_6 . En canvi, l'àcid (+)-cis-2-aminometilciclopropà carboxílic ((+)-CAMP) és un agonista selectiu del receptor GABA_C sense activitat sobre GABA_A. El TPMPA és un antagonista competitiu cent vegades més potent sobre el receptor GABA_C que el GABA_A, mentre la picrotoxina, antagonista no competitiu, bloqueja ambdós receptors amb una potència similar. El receptor GABA_C també es diferencia del GABA_A per no estar modulats per barbitúrics o BDZ, ni ser antagonitzat per la bicuculina (Cooper, 2003) (Taula 3).

Els receptors GABA_C són menys abundants i tenen una menor distribució a l'SNC que els GABA_A, de manera que podrien ser dianes més selectives. Les principals indicacions dels compostos que actuen sobre el receptor GABA_C podrien ser el tractament de disfuncions de la retina o trastorns cognitius i del son.

El fàrmac més prometedor és el THIP (gaboxadol) que actua com a agonista parcial del receptor GABA_A i antagonista del GABA_C i s'està avaluant pel tractament de l'insomni. Mentre que el compost CGP36742, antagonista dels receptors GABA_B i GABA_C, millora les propietats cognitives i podria tenir aplicacions tant per l'Alzheimer com per l'esquizofrènia, en les quals hi ha trastorns de la memòria (Johnston, 2003).

8.3.3. Moduladors de GABA_B

Des del punt de vista farmacològic, el receptor GABA_B es distingeix del receptor GABA_A per la seva afinitat selectiva per l'agonista baclofen i la manca d'afinitat per muscimol i bicuculina, agonista i antagonista competitiu del receptor GABA_A respectivament. Tampoc presenta modulació per BDZ i barbitúrics (Cooper, 2003) (Taula 3).

Clínicament, l'únic fàrmac al mercat que actua sobre el receptor GABA_B, és el baclofen (Lioresal[®]) que es prescriu com a relaxant muscular per disminuir els espasmes i la rigidesa muscular en diversos trastorns neurològics. Altres observacions clíniques suggereixen que els agonistes del receptor, podrien ser útils en el tractament del dolor, trastorns intestinals i pulmonars i fins i tot alleujar els símptomes d'abstinència d'algunes drogues. La informació sobre l'ús d'antagonistes és més limitada, però sembla que podrien afavorir processos cognitius, i també ser responsables dels atacs epilèptics (Bowery, 2000). El baclofen presenta efectes laterals com sedació, tolerància o alteracions motores. S'ha plantejat que els

moduladors al·lostèrics positius podrien evitar aquests efectes, ja que a diferència dels agonistes, només activarien els receptors GABA_B on hi hagués GABA endogen.

8.4. Farmaco-fisiologia del receptor GABA_A

La purificació i clonació de les 7 subunitats del receptor GABA_A ha permès identificar diferents isoformes (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ i ρ_{1-5}) que permetrien múltiples combinacions, i per tant una gran diversitat de respostes fisiològiques i farmacològiques. Malgrat aquesta diversitat, la majoria de receptors GABA_A a cervell contenen les subunitats α , β i γ en una proporció estequiomètrica 2:2:1 (Atack, 2005a).

De les diferents subunitats α , l' α_1 s'expressa en moltes regions del cervell, sent còrtex, cerebel i hipocamp les àrees amb major densitat de receptors que contenen aquesta subunitat (McKernan, 1996; Sullivan, 2004) (Taula 4).

Taula 4. Distribució dels principals subtipus de receptor GABA_A a cervell de rata.

SUBTIPUS	% RECEPTORS GABA _A	LOCALITZACIÓ
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	43 (1)/ 60 (2)	La majoria d'àrees del cervell, amb major densitat a còrtex, cerebel i hipocamp.
$\alpha_2\beta_{2/3}\gamma_2$	18 (1)/ 15-20 (2)	Motoneurons de la medulla espinal i cèl·lules piramidals de l'hipocamp.
$\alpha_3\beta_n\gamma_{2/3}$	17 (1)/ 10-15 (2)	Neurons colinèrgiques i monoaminèrgiques del còrtex.
$\alpha_2\beta_n\gamma_1$	8 (1)	Nuclis del sistema límbic.
$\alpha_5\beta_3\gamma_{2/3}$	4 (1)/ < 5 (2)	Cèl·lules piramidals de l'hipocamp.
$\alpha_6\beta\gamma_2$	2 (1)/ < 5 (2)	Cèl·lules granulars del cerebel.
$\alpha_6\beta\delta$	2 (1)	Cèl·lules granulars del cerebel.
$\alpha_4\beta\delta$	3 (1)/ < 5 (2)	Tàlem i gir dentat.

(1) McKernan, 1996 (2) Möhler, 2002.

La combinació més freqüent és la formada per $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ (43-60% dels receptors GABA_A) (McKernan, 1996; Möhler, 2002). A diferència del còrtex i l'hipocamp en els quals s'hi expressen varies subunitats α (principalment α_3 i α_5 respectivament) (Araujo, 1996; Sur, 1998), cerebel està constituït principalment per dues subunitats, l' α_1 i l' α_6 (Atack, 1999, Pirker, 2000). L'expressió de la subunitat α_6 és minoritària, i restringida pràcticament a les

cèl·lules granulars del cerebel, on representa aproximadament el 30% dels receptors GABA_A presents en aquest teixit (Möhler, 2002).

Les subunitats α_2 i α_3 són menys abundants (10-20%) i es troben majoritàriament en combinació amb β_3 i γ_2 . La subunitat α_2 s'expressa majoritàriament en aquelles àrees on la presència de la subunitat α_1 és baixa o pràcticament nul·la, com la capa de cèl·lules granulars del bulb olfatori, el nucli reticular del tàlem i les motoneurons de la medul·la espinal (Möhler, 2002). D'aquestes regions, a la medul·la espinal l'expressió de la subunitat α_2 és altament específica (Bohlhalter, 1996) i representa aproximadament el 90% del receptors anomenats BDZ tipus II (constituïts per les subunitats α_2 , α_3 , $\alpha_5/\beta/\gamma$) (Watanabe, 1985). Donat que la subunitat α_5 té una expressió molt baixa a cervell (< 5%) i en particular a medul·la espinal (Frischy, 1995), i la subunitat α_3 es troba predominantment a còrtex, podem considerar que la medul·la espinal és el teixit amb un major enriquiment d' α_2 , encara que no podem descartar la presència d'altres subunitats en menor proporció.

A còrtex tot i haver una major proporció de la subunitat α_1 , també s'hi expressen altres subunitats α (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5) (Pirker, 2000; Sullivan, 2004), encara que en menor quantitat. Les subunitats α_4 i α_5 constitueixen individualment menys del 5% dels receptors GABA_A a SNC (McKernan 1996; Möhler, 2002) (Taula 4) i es localitzen principalment a l'hipocamp (α_5) i al tàlem i gir dentat (α_4). La subunitat α_2 es distribueix majoritàriament al bulb olfatori, el nucli reticular del tàlem i les motoneurons de la medul·la espinal, mentre l' α_3 principalment a les neurones colinèrgiques i monoaminèrgiques del còrtex (McKernan 1996). Estudis en els quals s'ha immunoprecipitat membranes de còrtex amb anticossos contra les subunitats α_1 i α_3 del receptor GABA_A, mostren que el $71 \pm 5\%$ dels receptors a còrtex contenen la subunitat α_1 mentre que un $26 \pm 5\%$ l' α_3 (Araujo, 1996). En altres (Ruano, 1992) la proporció de la subunitat α_1 és del $50 \pm 11\%$. Per tant, tot i que a còrtex es localitzen diverses subunitats α , les que s'expressen majoritàriament són α_1 i α_3 (Araujo, 1996).

Pel que fa a les altres subunitats que conformen el receptor GABA_A, la subunitat β constitueix el lloc d'unió del GABA. Les seves isoformes tenen una alta homologia entre elles i es distribueixen àmpliament a cervell, encara que β_2 és la més abundant (Cooper, 2003).

D'altra banda les BDZ, que s'uneixen entre les subunitats α i γ , incrementen encara més la resposta del GABA amb l'acoblament d'una subunitat γ addicional. La isoforma γ_2 té dues

variants γ_{2L} i γ_{2S} , fruit de la transcripció alternativa del seu gen, que en alguns casos coexisteixen en un mateix receptor. Addicionalment, el grau de resposta del GABA modulada per les BDZ serà diferent en funció de la isoforma γ present. La γ_2 , la més abundant, és la que té major afinitat per les BDZ clàssiques com el diazepam (Cooper, 2003).

Les subunitats δ , ϵ , θ tenen un patró d'expressió més limitat i es creu que en alguns casos substituirien la subunitat γ .

La subunitat δ s'expressa principalment al cerebel, i està freqüentment associada amb les subunitats α_4 i α_6 , constituint majoritàriament receptors extrasinàptics. Aquests receptors que es troben fora de les sinapsis, tenen una alta afinitat pel GABA i una lenta desensibilització. Funcionalment estan implicats en la regulació del grau d'excitabilitat de la neurona (Möhler, 2002; Whiting, 2003).

Taula 5. Potencials activitats farmacològiques de les diferents subunitats α del receptor GABA_A.

SUBUNITAT	FARMACOLOGIA
α_1	Sedació/ Hipnosi/ Anticonvulsió
α_2	Relaxació muscular/ Ansietat
α_3	Ansietat
α_5	Memòria/ Aprentatge

La farmacologia del receptor GABA_A està determinada per la subunitat α que el constitueix (Taula 5). Els estudis farmacològics conjuntament amb els de genètica molecular, han permès determinar la subunitat α associada amb els diferents efectes farmacològics del receptor. De manera general s'accepta que la subunitat α_1 està implicada en els efectes sedants, hipnòtics i anticonvulsius (McKernan, 2000; Möhler, 2002), mentre l' α_2 en la relaxació muscular. Pel que fa a l'efecte ansiolític hi ha diferents punts de vista respecte la implicació d' α_2 i α_3 . D'una banda, en ratolins amb mutació a la subunitat α_2 del receptor (α_2 H101R), perden l'efecte ansiolític induït pel diazepam, mentre en els mutants d' α_3 (α_3 H126R) es manté (Löw, 2000). En canvi els estudis farmacològics realitzats en rosegadors amb el TP003 (compost de Merck), agonista selectiu dels receptors GABA_A que contenen la subunitat α_3 , s'observa un potent efecte ansiolític en els diferents test de conducta d'ansietat (Dias, 2005). En la mateixa línia, l' α_3 IA, agonista invers selectiu de la mateixa subunitat és ansiogènic (Atack, 2005b).

Malgrat que els estudis farmacològics suggereixen la implicació de la subunitat α_3 en ansietat, no podem descartar la participació d' α_2 . La subunitat α_5 té una distribució bastant específica a l'hipocamp. Donat l'important paper que té aquesta estructura en l'aprenentatge i la memòria, aquesta subunitat podria estar implicada en aquests processos cognitius. Pel que fa a l' α_4 , els resultats de diversos estudis suggereixen un paper proconvulsiu donat que l'increment de l'expressió gènica d'aquesta subunitat podria estar implicat en la inducció d'atacs epilèptics (Smith, 2001; Möhler, 2002).

9. TRACTAMENT FARMACOLÒGIC DE L'INSOMNI

El tractament farmacològic de l'insomni es basa en compostos que actuen potenciant els efectes inhibitoris del GABA, donat que com ja s'ha dit el GABA està implicat en el son, o bloquejant els receptors dels neurotransmissors que promouen la vigília. La finalitat del tractament és resoldre els problemes de conciliació o manteniment del son, respectant-ne l'arquitectura i millorant la qualitat de vida del pacient.

Amb aquestes premisses, l'hipnòtic ideal hauria de complir els següents requisits (Estivill, 2003):

- Inducció ràpida del son i una durada òptima del seu efecte (7-8h) per tal de mantenir-lo i evitar despertar-se durant la nit.
- Mecanisme d'acció específic, que generi un son fisiològic.
- Sense producció d'efectes adversos com efecte ressaca (somnialescència diürna), deteriorament cognitiu, insomni de rebot, síndrome d'abstinència o dependència.
- Sense disminució d'eficàcia amb l'administració prolongada (tolerància).
- Increment de la qualitat de vida del pacient.

9.1. Hipnòtics que actuen sobre el receptor GABA_A

El tractament farmacològic de l'insomni basat en el receptor GABA_A ha evolucionat aportant una millora en l'eficàcia i la seguretat dels hipnòtics. Principalment es poden distingir tres generacions: els barbitúrics, les benzodiazepines i els fàrmacs Z.

9.1.1. Els barbitúrics

Els primers fàrmacs que es van utilitzar a principis del segle XX, van ser els **barbitúrics** (Figura 11). Són hipnòtics eficaços ja que augmenten la propensió al son i el seu manteniment, però no indueixen un son fisiològic i generen ràpidament tolerància i dependència. Són poc segurs, ja que poden ser letals per sobredosi, especialment si es barregen amb alcohol. Actualment estan contraindicats com a hipnòtics (Lancel, 1999; Charney, 2006).

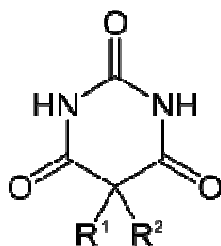


Figura 11. Estructura química general dels barbitúrics

9.1.2. Les benzodiazepines

Posteriorment a la dècada dels seixanta, van aparèixer les **benzodiazepines (BDZ)** (Figura 12), que com s'ha comentat anteriorment s'uneixen entre les subunitats α i γ del receptor GABA_A modulant-lo al·lostèricament. Alguns exemples de BDZ són el diazepam (Valium[®]), lorazepam (Orfidal[®]), clorazepat (Tranxilium[®]), triazolam (Halción[®]) o flurazepam (Dormodor[®]).

La principal característica de les BDZ és que no són selectives de la subunitat α del receptor GABA_A de manera que a part de propietats hipnòtiques són ansiolítiques, miorelaxants i anticonvulsionsants.

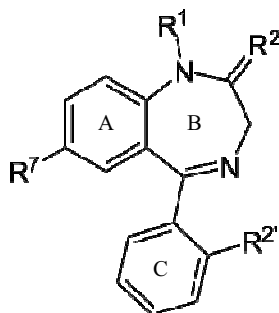


Figura 12. Estructura química general de les BDZ. **A.** Anell benzènic, **B.** Anell diazepina i **C.** Substituent 5-aryl que contenen les principals BDZ.

Encara que són eficaces augmentant el temps total de son (TST, de l'anglès *Total Sleep Time*) i reduint-ne la latència (temps que triga la persona a adormir-se), n'alteren la seva arquitectura disminuint el son REM i augmentant la fase II del son nREM en detriment de les fases III i IV (SWS) (Gottesmann, 2002, Charney, 2006).

En general tenen molts efectes no desitjats com l'efecte ressaca, que és la sedació diürna degut a que la majoria tenen una vida mitjana llarga (de 6 a més de 24h). Això disminueix el nivell d'alerta del pacient i dificulta la capacitat de realitzar les seves activitats diàries i laborals. També provoquen deteriorament cognitiu o insomni de rebot i en tractaments prolongats poden produir tolerància i dependència.

D'altra banda, com s'ha mencionat anteriorment en l'insomni primari hi ha una sobreactivació de l'eix HPA. L'efecte del tractament amb BDZ sobre l'alliberament basal de corticoesteroides és complex. Encara que s'ha estudiat extensament, les dades de la literatura són contradictòries. Aparentment, les BDZ clàssiques disminueixen l'activació de l'eix HPA, però paradoxalment en determinades condicions i a dosis elevades augmenten els nivells basals de corticosterona.

El control de les neurones CRH del nucli paraventricular hipotalàmic (PVN), depèn del balanç de les projeccions excitatòries i inhibidòries que rep. El GABA és un regulador negatiu de l'excitabilitat d'aquestes neurones, que podria modular l'eix HPA per diverses vies. D'una banda, les neurones CRH reben projeccions gabaèrgiques del BST (de l'anglès *Bed nucleus of the Stria Terminalis*) que podrien retroalimentar-les negativament. També hi ha un grup de neurones gabaèrgiques al voltant del PVN, principalment constituïdes per receptors GABA_A que contenen la subunitat α_2 , que inhibirien la secreció de CRH a partir de les projeccions cortico-límbiques que reben.

Aquests resultats porten a alguns autors (Mikkelsen, 2005 i 2008) a suggerir que les BDZ modulen l'eix HPA a través de mecanismes parcialment oposats. L'efecte net depèn de la composició de les subunitats α que componen el receptor GABA_A al qual s'uneixen.

9.1.3. Els fàrmacs Z

Des de la dècada dels vuitanta fins a l'actualitat, els fàrmacs que s'han desenvolupat per al tractament de l'insomni han estat principalment els anomenats **fàrmacs-Z**. Són agonistes del lloc d'unió de les BDZ, però estructuralment no ho són (Figura 13). Són més selectius de la subunitat α_1 , de manera que tenen un perfil farmacològic més definit, amb propietats

hipnòtiques però sense efectes miorelaxants, ansiolítics o anticonvulsius (Estivill, 2003). Alguns exemples d'aquests fàrmacs són el zopiclone (Limovan[®]), l'eszopiclone (Lunesta[®]), el zaleplon (Sonata[®]) o el zolpidem (Stilnox[®]/ Ambien[®]).

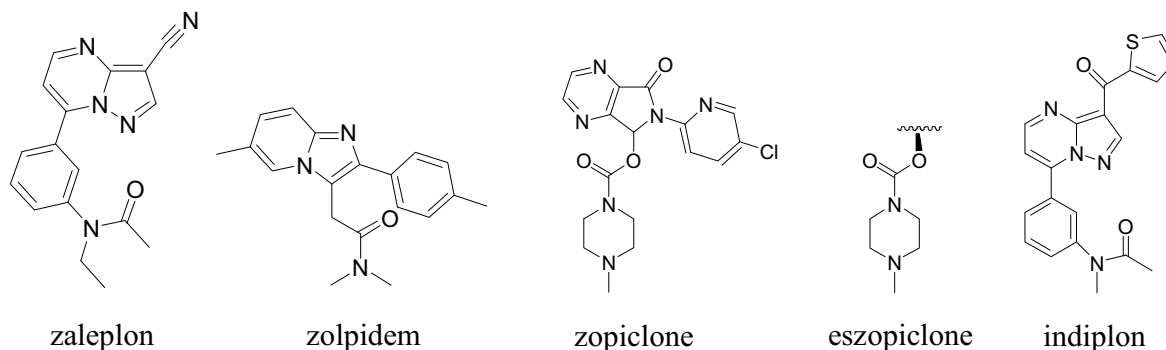


Figura 13. Estructura química dels principals fàrmacs Z.

Aquests fàrmacs respecten l'arquitectura del son, i generalment en disminueixen l'inici i n'augmenten la durada (TST). També incrementen el son nREM, disminuint la fase I de transició i augmentant-ne la fase II (Lancel, 1999). Disminueixen el nombre de cops que l'individu es desperta durant el son i augmenten les fases III i IV. Alguns disminueixen el son REM, encara que en menor grau que les BDZ, i altres no l'afecten (Estivill, 2003).

Tanmateix, encara tenen efectes no desitjats com l'insomni de rebot, l'amnèsia anterògrada, la dependència o la tolerància.

En relació amb les alteracions neuroendocrines dels pacients amb insomni primari, s'ha observat que a diferència d'algunes BDZ com el diazepam o el flunitrazepam que disminueixen la secreció nocturna de melatonina, alguns fàrmacs Z com el zopiclone i el zolpidem els preserven (Rodenbeck, 2001).

El **zolpidem** és una imidazopiridina d'absorció ràpida i vida mitjana curta (entre 1,5- 4,5h) (Estivill, 2003; Ebert, 2006) indicada pel tractament de l'insomni transitori. És selectiva del subtipus de receptors GABA_A que contenen la subunitat α_1 , pels quals té una gran afinitat, mentre que té una afinitat intermèdia o nul·la pels subtipus formats per les subunitats α_2/α_3 i α_5 respectivament.

El zolpidem disminueix significativament la latència del son i el nombre de despertaments. També augmenta el TST i a diferència de les BDZ, els estudis clínics suggereixen que no

genera tolerància. Per contra, en alguns estudis s'ha observat insomni de rebot al finalitzar el tractament, dependència i efectes cognitius (Datamonitor, 2008).

L'any 2006, als EEUU es va aprovar el zolpidem MR (*modified-release*) indicat per pacients amb problemes de manteniment del son. Aquesta nova formulació, permet que una part del fàrmac s'alliberi immediatament i la resta de manera prolongada per tal de mantenir els nivells en plasma al llarg de la nit.

El **zaleplon** també té més afinitat pel subtipus de receptors α_1 , que pels que contenen les subunitats α_2/α_3 , encara que és menys potent que el zolpidem. Aquesta pirazolopirimidina, també potencia els corrents de Cl^- a través de receptors que contenen la subunitat α_5 .

El perfil farmacocinètic del zaleplon es caracteritza per una absorció ràpida i un fort metabolisme de primer pas a fetge, que resulta en una vida mitjana d'aproximadament 1h.

En l'àmbit clínic disminueix la latència del son, encara que els efectes sobre el manteniment són menys consistents, possiblement atribuïbles a una vida mitjana curta, de manera que només està indicat per pacients amb dificultat per conciliar el son. Tanmateix, es pot prendre fins a 4h abans de llevar-se, la qual cosa podria ser útil en persones que necessitessin despertar-se després d'un breu interval de son. Encara que les dades són controvertides, alguns estudis suggereixen que zaleplon té potencial d'abús i pot generar dependència (Ebert, 2006).

En canvi, el **zopiclone** és una ciclopirrolina amb poca selectivitat pel subtipus de receptors $GABA_A$ que contenen la subunitat α_1 . També està indicat per l'insomni primari transitori, augmentant-ne el TST i disminuint significativament la latència del son i el nombre de despertaments. No s'ha apreciat insomni de rebot en els estudis clínics, però si efecte ressaca, possiblement degut a una vida mitjana llarga (3-6h). També presenta potencial d'abús i dependència.

L'**eszopiclone** és l'isòmer S del zopiclone que és farmacològicament actiu. Està indicat per a la inducció i manteniment del son tant en l'insomni transitori com crònic. Les característiques clíniques són similars a les del zopiclone, però no presenta efecte ressaca, un resultat paradoxal tenint en compte que té una vida mitjana de 6h. Tampoc presenta tolerància en estudis de més de 6 mesos. Els estudis de fase IV han demostrat que l'administració conjunta d'aquest fàrmac amb ansiolítics o antidepressius millora no només el son sinó altres

síntomes relacionats amb l'ansietat i la depressió en el cas d'insomni secundari (Sullivan, 2009).

Un altre fàrmac Z prometedor és l'**indiplon**. Estructuralment similar al zaleplon, però amb més afinitat pels receptors $GABA_A$ que contenen la subunitat α_1 i una vida mitjana lleugerament superior, d'1.5h.

S'havien desenvolupat dues formulacions, la IR (*immediate-release*) i la MR (*modified-release*) que iniciaven ràpidament el son i en el cas de la segona també el mantenia (Palomer, 2007). Els estudis clínics en fase III amb la formulació IR van demostrar que en pacients amb insomni crònic, l'indiplon reduïa significativament la latència del son, però els resultats pel que feia al TST eren estadísticament poc consistents (Datamonitor, 2008). No mostrava evidències d'efecte ressaca, tolerància o síndrome de retirada. Tanmateix, per l'aprovació del fàrmac, l'FDA (*Food and Drug Administration*) li requereix estudis clínics més objectius en gent gran, estudis dels efectes adversos comparativament amb els fàrmacs del mercat i un estudi preclínic que avaluï l'administració d'indiplon durant el primer trimestre d'embaràs (Sullivan, 2009). En el cas de la formulació MR es va interrompre el seu desenvolupament al 2009, possiblement atribuïble a problemes de seguretat o el fet que només pogués estar indicat per conciliar el son.

9.1.4. Altres fàrmacs amb efecte sobre el receptor $GABA_A$

A banda dels fàrmacs Z, també s'han investigat altres compostos que actuen sobre el receptor $GABA_A$. El **gaboxadol** (Lundbeck/Merck, Figura 14) és un agonista selectiu dels receptors $GABA_A$ extrasinàptics que solen estar constituïts per les subunitats α_4/α_6 i δ . S'uneix al mateix lloc que el lligand endogen i provoca el flux d'anions Cl^- independentment de la seva presència. Els receptors extrasinàptics tenen una distribució limitada a l'SNC però es concentren principalment a còrtex, sistema límbic i tàlem. Algunes d'aquestes zones com el tàlem estan relacionades amb el son. S'ha plantejat que el gaboxadol augmenta l'activitat de les neurones del VLPO, disminuint la inhibició que reben dels sistemes implicats en la vigília (Ebert, 2006; Sullivan, 2009).

En els estudis clínics el gaboxadol augmenta el son nREM, principalment la fase de l'SWS que va disminuint amb l'edat, millora la qualitat del son i en disminueix el nombre de despertaments. Tanmateix, al 2007, un cop finalitzats els estudis de fase III, es va interrompre

el seu desenvolupament, possiblement perquè els resultats obtinguts no justificaven el seu desenvolupament (Sullivan, 2009).

També s'han iniciat estudis clínics enfocats a l'insomni amb la **tiagabina** (Figura 14), inhibidor de la recaptació del GABA. Encara que està indicada pel tractament de l'epilèpsia, s'ha vist que incrementa significativament l'SWS (Palomer, 2007).

L'**adipiplon** (NG-2-73) és un agonista parcial del receptor GABA_A que s'ha suggerit modula preferentment els receptors que contenen la subunitat α_3 . Aquesta subunitat s'ha hipotetitzat que està associada amb la inducció del son. El desenvolupament d'aquest compost es va suspendre al 2008, tot just dos mesos després d'haver iniciat els estudis clínics de fase II/ III per l'aparició d'efectes secundaris no desitjats a les dosis administrades (Sullivan, 2009).

Finalment, un altre agonista parcial que modula al·lostèricament el receptor GABA_A i que està en fase II és l'**EVT-201**. Els resultats dels estudis clínics demostren que millora significativament el TST, disminueix la latència del son conjuntament amb el nombre de despertaments i subjectivament no genera efecte ressaca.

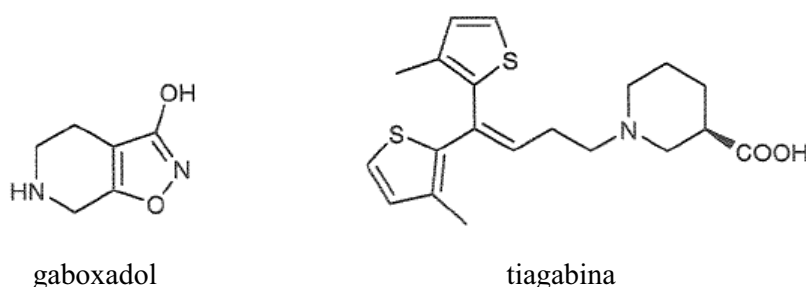


Figura 14. Estructura química del gaboxadol i la tiagabina

9.2. Hipnòtics que actuen sobre altres receptors

Tradicionalment el tractament farmacològic de l'insomni, s'ha centrat en els agonistes del receptor GABA_A, que provoquen la depressió generalitzada de l'SNC. A mesura que s'ha incrementat el coneixement de les xarxes neuronals involucrades en el son i la vigília, s'han començat a desenvolupar hipnòtics que actuen selectivament sobre altres receptors.

9.2.1. Moduladors dels receptors de melatonina

La melatonina és una hormona sintetitzada a la glàndula pineal que promou el son a través dels seus receptors acoblats a proteïna G_i, MT₁ i MT₂, molt abundants al nucli

supraquiasmàtic. La disminució de l'activitat neuronal en aquesta àrea, promoguda principalment per MT_1 , afavoreix l'inici del son. El tàlem, a pesar de tenir menor densitat de receptors MT_1 i MT_2 , també està involucrat en els efectes soporífers de la melatonina. Aquesta àrea del cervell té influències sobre l'NSQ i està implicada en la formació de fusos del son, típics del son nREM. L'hormona pineal també afavoreix el son de manera indirecta a través de l'activació de mecanismes gabaèrgics (Hardeland, 2009a; Srinivasan, 2009).

El principal inconvenient de l'ús de la melatonina, en el tractament de l'insomni primari, és la curta vida mitjana en sang (20-30 minuts), que dificulta el manteniment del son. Per solucionar aquest problema s'han plantejat dues estratègies diferents. D'una banda, el desenvolupament d'una formulació que permeti l'alliberació sostinguda de l'hormona natural (Circadin[®]), i l'altra agonistes melatoninèrgics amb una vida mitjana més llarga com el ramelteon, el tasimelteon o l'agomelatina (Figura 15).

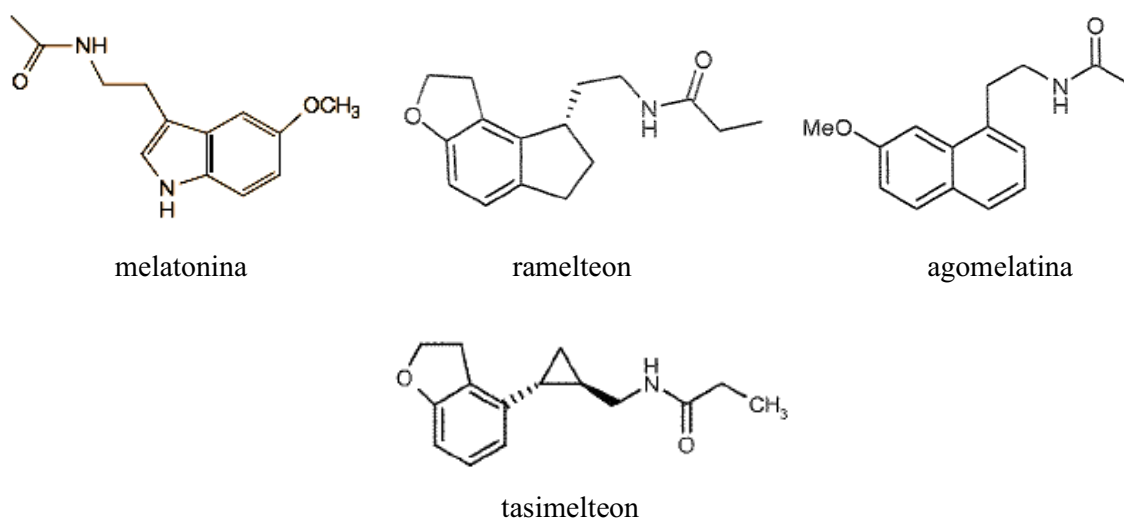


Figura 15. Estructura química de la melatonina i dels agonistes dels seus receptors MT_1 i MT_2 .

Un altre aspecte a destacar és la presència de receptors de melatonina fora de l'SCN, com al cor o als vasos sanguinis. Encara que la seva densitat és menor, no s'ha de descartar que els agonistes melatoninèrgics a part d'efectes hipnòtics puguin afectar el sistema immune, el tracte gastrointestinal, la pressió sanguínia, o els sistemes hormonal i reproductor.

Al 2007, l'Agència Europea del Medicament (EMA) va autoritzar l'ús de **melatonina d'alliberació prolongada** (Circadin[®]) pel tractament de l'insomni en pacients a partir de 55 anys d'edat. El Circadin[®] pot ser útil, en pacients que presenten una disminució de la secreció nocturna de melatonina relacionada amb l'edat. Les principals característiques d'aquest fàrmac són la disminució de la latència del son i la millora en la qualitat, sense efecte ressaca

o dependència. Els efectes sobre el manteniment del son i el TST són poc convincents (Hardeland, 2009a).

El **ramelteon** (Rozerem[®]) és un agonista amb elevada afinitat pels receptors MT₁ i MT₂ localitzats a l'NSQ. Té una vida mitjana en sang entre 1 i 2h, i un fort metabolisme de primer pas a fetge que genera 4 metabòlits principals. El metabòlit II, té 10 vegades menys afinitat pels receptors MT₁ i MT₂. En canvi es metabolitza menys, de manera que té una vida mitjana més llarga (2-5h), i assoleix concentracions de 20 a 100 vegades superiors a les del compost inicial, contribuint substancialment a la seva activitat farmacològica.

Els estudis clínics tant amb voluntaris sans com amb pacients amb insomni primari crònic, han demostrat que el ramelteon disminueix la latència del son i augmenta el TST, encara que no s'ha apreciat millores en el manteniment ni en la qualitat. Tampoc s'ha observat efecte ressaca, insomni de rebot, dependència o potencial d'abús. És per això que l'FDA només ha aprovat l'ús de ramelteon per pacients amb dificultat per conciliar el son (Datamonitor, 2008).

Un altre agonista selectiu dels receptors MT₁ i MT₂ és el **tasimelteon** (VEC-162). Té una vida mitjana més llarga que la del lligand endogen, ja que és superior a les 2-3h. Actualment encara està en estudis clínics de fase III on ha demostrat una millora estadísticament significativa en l'inici del son, el manteniment i el TST. Aquest compost podria estar indicat pel tractament dels trastorns del ritme circadià, com l'insomni transitori produït pel *jet-lag* (Sullivan, 2009; Hardeland, 2009b).

Finalment, l'**agomelatina** (Valdoxan[®]) és un agonista dels receptors MT₁ i MT₂, que a més antagonitza els receptors 5HT_{2C}. La desmetilació del compost inicial, dona lloc a la formació de N-acetilserotonina, que presenta afinitat per aquest receptor serotoninèrgic. La inhibició del receptor 5HT_{2C}, és responsable dels efectes antidepressius d'aquest fàrmac, indicat pel tractament dels episodis de depressió major en adults (MDE). Els efectes de l'agomelatina, són similars als dels fàrmacs que habitualment s'utilitzen pel tractament de l'MDE, sense efectes adversos sobre el pes, o les funcions sexuals i gastrointestinals. Encara que no estigui indicat com a hipnòtic, també millora el son en aquests pacients (Hardeland, 2008; Sullivan, 2009).

En resum, l'efecte que tenen aquests fàrmacs sobre els canvis de fase del rellotge intern, podrien ser útils pel tractament dels trastorns del son del ritme circadià (CRSD, de l'anglès *circadian rhythm sleep disorders*) en els quals hi ha un desajustament entre el cicle son/vigília

intern i l'hora adequada de dormir. Pel que fa a l'insomni primari, a excepció del tasimelton, la resta de fàrmacs melatoninèrgics tenen una baixa eficàcia en el manteniment del son, de manera que ara per ara els agonistes moduladors del GABA segueixen sent més indicats.

9.2.2. Moduladors dels receptors d'orexina

Els antagonistes orexinèrgics representen un nou abordatge pel tractament de l'insomni. Com ja s'havia mencionat anteriorment, les orexines es sintetitzen exclusivament a l'hipotàlem lateral-posterior. Aquesta àrea és l'origen d'un ampli sistema de projeccions que innerva múltiples estructures de l'SNC, algunes de les quals relacionades amb els cicles son/vigília. Aquests neuropèptids, a part de la regulació de l'homeòstasi energètica i de la secreció d'àcids gàstrics, tenen un paper important en el manteniment de la vigília (Cai, 2006; Ganjavi, 2007). La narcolèpsia és un trastorn del son, que en humans recentment s'ha associat amb mecanismes autoimmunes, que provocarien una mort de les neurones orexinèrgiques durant el període postnatal (Nishino, 2007). Aquest procés conseqüentment, genera un dèficit d'orexina que ocasiona alguns dels símptomes d'aquest pacients, com l'excessiva somnolència diürna (degut a la incapacitat per mantenir la vigília), la reducció del temps d'inici del son REM (a vegades directament des de l'estat de vigília), i en alguns casos cataplexia (pèrdua del to muscular amb preservació de la consciència).

Les orexines desencadenen la seva acció a través de la unió al seus receptors OX_1R (acoblat a proteïnes G_q) i OX_2R (acoblat a proteïnes G_q i $G_{i/o}$). Els receptors OX_1R es localitzen principalment a l'LC, mentre els OX_2R a TMN. Actualment, hi ha dades contradictòries sobre la implicació del receptor OX_1R en el son. Per una banda, alguns articles mencionen que ratolins *knockout* del receptor OX_1R tenen poques anormalitats en el son (Willie, 2003). Altres en canvi, mostren que tant l'administració d'anticossos com d'antagonistes selectius contra OX_1R reverteixen l'efecte disruptor del son induït per orexina, implicant l'acció d'aquest receptor en la regulació de la vigília (Cai, 2006). També s'ha descrit que agonistes del receptor OX_1R tenen activitat antinociceptiva i els antagonistes reversos induïrien la ingesta. Pel que fa al receptor OX_2R , la pèrdua de funcionalitat del receptor descrita en models canins de narcolèpsia, suggereix una major implicació d'aquest receptor en la regulació del son.

En conjunt, aquests fets indiquen que els antagonistes del receptor d'orexina podrien ser útils per al tractament dels trastorns del son. Algunes companyies farmacèutiques ja han identificat

petites molècules no peptídiques (amb major poder de penetració a SNC) antagonistes del receptor. D'aquests compostos, només tres estan actualment en fase clínica: el MK-4305 (Merck), el SB-649868 (GlaxoSmithKline) i l'almorexant (ACT-078573 d'Actelion).

L'**almorexant** (Figura 16) és un potent antagonista dels dos receptors orexinèrgics. Actualment s'han desenvolupat estudis clínics de fase III amb pacients amb insomni primari crònic, per comparar els efectes amb zolpidem i avaluar el tractament a llarg termini. Encara no s'han publicat els resultats d'aquests estudis, però les dades preliminars dels estudis de fase II suggereixen que aquesta tetrahydroisoquinolina promouria el son. En adults amb insomni primari, l'administració d'almorexant en la fase activa (quan els nivells d'orexina són elevats), incrementa significativament l'eficiència del son, disminuint-ne la latència i incrementant-ne el TST i la fase del son REM. Aquest compost té una bona tolerància, amb pocs efectes adversos (deguts a la poca afinitat per altres receptors) i sense indicis de generar cataplexia. Aquest és un punt clau per al futur aprovament dels antagonistes orexinèrgics, ja que la cataplexia és un símptoma que es dona en un context on l'activitat de l'orexina està reduïda. També caldrà veure si generen efectes no desitjats, degut a la implicació dels receptors d'orexina en altres processos fisiològics, i determinar si a la nit, quan l'activitat de les neurones orexinèrgiques és més baixa, també tenen efectes sobre el son (Neubauer, 2010).

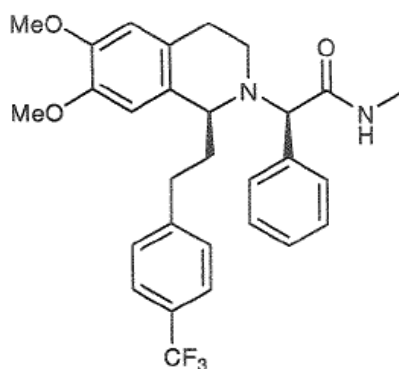


Figura 16. Estructura química de l'almorexant.

9.2.3. Moduladors dels receptors d'histamina

La histamina és el principal neurotransmissor promotor de la vigília a l'SNC. La seva síntesi està restringida en poblacions de neurones localitzades al nucli tuberomamilar (TMN) de l'hipotàlem. Aquestes neurones projecten a diverses àrees del cervell, i participen en diverses funcions com la regulació del cicle son/vigília, la secreció hormonal, el control cardiovascular, la termoregulació, la ingesta o la memòria.

Els receptors histaminèrgics (H_1 , H_2 , H_3 i H_4) pertanyen a la superfamília dels GPCRs. D'aquests, l' H_4 no sembla que es localitzi a cervell. Els antagonistes d' H_2 s'utilitzen principalment pel tractament d'úlceres gastrointestinals (inhibint la secreció d'àcid gàstric), encara que aquest receptor també es localitza a cervell i s'ha suggerit que la seva inhibició incrementa el son d'ones lentes. L' H_3 és l'únic receptor presinàptic, i regula l'alliberament d'histamina i noradrenalina. El seu bloqueig incrementa els nivells d'aquests neurotransmissors afavorint la vigília i disminuint la fase del son REM i el d'ones lentes. Aquests efectes han contribuït a augmentar l'interès sobre el receptor, ja que tant els antagonistes com agonistes inversos podrien ser útils pel tractament de la narcolèpsia, caracteritzada per l'excessiva somnolència diürna (Gemkow, 2009). Finalment, el receptor H_1 és diana dels fàrmacs antihistamínics (antagonistes H_1) utilitzats pel tractament de reaccions al·lèrgiques, però la seva inhibició central provoca també disminució de l'alerta i somnolència (Stahl, 2008).

Diversos antihistamínics conjuntament amb alguns antidepressius tricíclics amb propietats antihistamíniques (amitriptilina i doxepina) s'han utilitzat àmpliament pel tractament de l'insomni. Aquests fàrmacs a les dosis actuals són poc selectius i actuen simultàniament sobre receptors muscarínics, colinèrgics o adrenèrgics generant efectes no desitjats. Recentment, s'ha descobert que els antagonistes selectius del receptor H_1 , a determinades dosis, promouen el son sense generar sedació diürna, tolerància o augment de pes.

La **doxepina** (Silenor[®]) (Figura 17) és una antidepressiu tricíclic que s'ha utilitzat durant més de 35 anys per al tractament de la depressió. Aquest fàrmac té menor afinitat (dos ordres de magnitud) pel transportador de serotonina que pel receptor H_1 , de manera que a dosis molt baixes (1-6 mg) el bloqueja selectivament. Actualment s'han finalitzat quatre estudis de fase III, alguns amb pacients amb insomni crònic on millora la qualitat del son, el TST i el manteniment (disminuint el WASO de l'anglès *wake after sleep onset*).

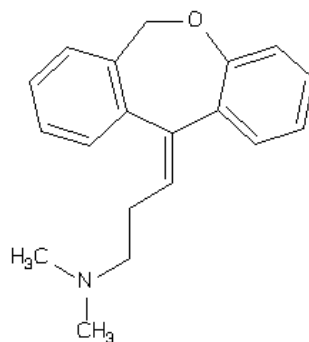


Figura 17. Estructura química de la doxepina.

Un altre antagonista selectiu d'H₁, que alhora inhibeix el receptor 5HT_{2A}, és l'**LY-2624803** (Lilly). Aquest compost encara es troba en fase II, però ha demostrat que disminueix la latència del son i en millora el manteniment sense efecte ressaca (Sullivan, 2009).

A dosis baixes, els antagonistes selectius del receptor H₁ poden ser una nova alternativa per al tractament de l'insomni, sobretot per la gent gran que de vegades requereixen llevar-se a la nit. A diferència dels hipnòtics gabaèrgics que bloquegen globalment els sistemes de vigília, els antagonistes histaminèrgics només supprimeixen aquesta via, de manera que si el pacient ho necessita seria més fàcil de despertar.

9.2.4. Moduladors dels receptors de serotonina

La serotonina (5-HT o 5-hidroxitriptamina) és un altre neurotransmissor implicat en la regulació del son. Les neurones serotoninèrgiques del nucli dorsal i medial del rafe formen part del sistema activador reticular ascendent que innerva l'escorça i regions subcorticals del prosencèfal. Aquestes neurones són actives durant la vigília i van disminuint la seva activitat a la fase del son nREM, fins a ser completament inactives durant el son REM.

Els efectes que exerceix la 5-HT a SNC estan mediatos per múltiples subtipus de receptors, classificats en 7 subfamílies (5-HT₁- 5-HT₇). A excepció dels receptors 5-HT₃, que són canals iònics depenents de lligand, la resta pertanyen a la superfamília dels GPCRs. La subfamília 5-HT₂ amb 3 subtipus de receptors (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}) està especialment implicada en el son. S'ha suggerit que els receptors 5-HT₂ modulen el son d'ones lentes (SWS). La ritanserina, antagonista del receptor 5-HT₂, promou el son i augmenta l'SWS (Sharpley, 1994; Teegarden, 2008).

L'**eplivanserina** (SR-46349 B) (Figura 18) és principalment un antagonista del receptor 5-HT_{2A}, encara que amb certa afinitat pel 5-HT_{2C} (1.3 nM i 120 nM respectivament). Inicialment, aquest fàrmac es va desenvolupar pel tractament de trastorns psiquiàtrics, donada la implicació de la serotonina en l'etiologia de nombroses malalties com la depressió, l'ansietat, les fòbies o l'esquizofrènia. Actualment, s'han completat 3 estudis de fase III per al tractament de l'insomni en els quals l'eplivanserina millora la qualitat i el manteniment del son, disminuint significativament el WASO i el nombre de cops que es desperta el pacient durant el son.

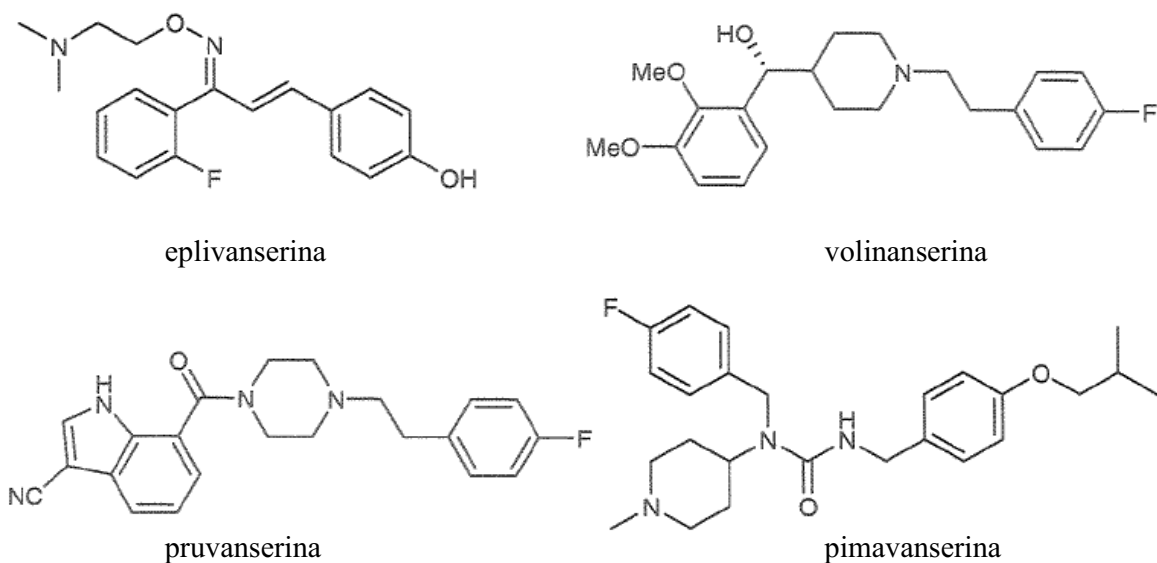


Figura 18. Estructura química dels antagonistes i agonistes inversos dels receptors 5HT_{2A} i 5HT_{2C}.

La **volinanserina** (MDL-100907) (Figura 18) és un potent antagonista del receptor 5-HT_{2A}, que com el fàrmac anterior també presenta afinitat pel 5-HT_{2C} (0.4 nM i 30 nM respectivament). Originàriament es va desenvolupar per al tractament de l'esquizofrènia, però al 1999 es van suspendre els estudis clínics per aquesta aplicació i en l'actualitat està en estudis de fase III per al tractament de l'insomni.

Encara que estructuralment és similar a la volinanserina, la **pruvanserina** (LY-2422347) (Figura 18) és un altre antagonista més selectiu de 5-HT_{2A} que de 5-HT_{2C} (0.4 nM i 1334 nM respectivament) en estudis de fase II per determinar-ne l'eficàcia en el manteniment del son.

La mirtazapina és un fàrmac per al tractament de la depressió, que inhibeix els receptors α_2 adrenèrgics presinàptics així com els 5-HT_{2A} i 5-HT_{2C} (10 nM ambdós). El seu potent efecte sobre els receptors serotoninèrgics, ha despertat interès per la seva possible aplicació en l'insomni. Actualment, el seu isòmer S, l'**esmirtazapina** (Org-50081, Merck), està en estudis clínics de fase III per al tractament de l'insomni i dels símptomes vasomotors de la menopausa. Donat que la prevalença de l'insomni és superior en dones que en homes (incrementa en dones a la menopausa, associat en part als fogots), aquest fàrmac podria estar adreçat a aquest sector de la població (Datamonitor, 2008).

La **paliperidona** i l'**ITI-722** són antagonistes del receptor 5-HT₂ que alhora actuen sobre els receptors dopaminèrgics. Aquest doble efecte podria ser útil en pacients esquizofrènics amb

insomni. De moment, la paliperidona en estudis clínics amb aquest grup de pacients ha demostrat una disminució de la latència del son, un augment del TST, el son REM i la fase II del son nREM. D'altra banda, els estudis amb ITI-722 amb pacients amb insomni de manteniment, demostren també un augment del TST, l'SWS i una disminució del WASO.

Altres fàrmacs en fase clínica, que s'estan avaluant pel tractament de l'insomni, són els agonistes inversos del receptor 5-HT_{2A}, com l'**ADP125** o la **pimavanserina** (ACP-103) (Figura 18). Els agonistes inversos s'uneixen al mateix lloc que l'agonista però reverteixen l'activitat constitutiva del receptor. Ambdós compostos augmenten l'SWS i disminueixen el WASO i el nombre de cops que es desperta el pacient durant el son. En el cas de l'ADP-125 els últims estudis de fase II amb pacients amb insomni primari, no han demostrat una millora significativa d'aquests paràmetres respecte el grup de pacients control (Rosenberg, 2008).

Exceptuant la paliperidona (que també té afinitat sobre els receptors 5-HT₇), en general els antagonistes i agonistes inversos del receptor 5-HT_{2A} no tenen efectes sobre la latència del son, encara que milloren significativament els paràmetres relacionats amb el manteniment (WASO, SWS). L'SWS té un paper crucial en la funció restauradora del son. Aquests compostos podrien estar indicats en pacients amb insomni de manteniment o insomni secundari associat a depressió o esquizofrènia, donada la implicació de la serotonina en aquest tipus de trastorns psiquiàtrics.

D'altra banda, encara que els receptors 5HT₇ s'expressen en diversos teixits humans, al tàlem i l'hipotàlem és on hi ha una major densitat. També són abundants a l'hipocamp i en menor quantitat en regions límbiques i corticals (Hedlund, 2004). En rosegadors també s'han localitzat a l'NSQ i encara que els resultats no són concloents, s'ha suggerit que podria estar implicat en els canvis de fase de l'activitat neuronal mediat per serotonina (Gannon, 2001). Els estudis farmacològics i la distribució dels seus receptors suggereixen la implicació del receptor 5HT₇ en el son, el ritme circadià, la termoregulació, la memòria, l'aprenentatge i la regulació de l'estat anímic. Encara que els estudis amb antagonistes dels receptor 5HT₇ estan en fase preclínica, l'administració en rata d'SB269970-A abans de l'inici del son, redueix el son REM (Hagan, 2000).

9.2.5. *Altres receptors*

Finalment, l'oleamida, els moduladors d'adenosina, el CRF (de l'anglès *Corticotropin-releasing Factor*), el neuropèptid Y, el neuropèptid S o les proteïnes rellotge i PER són altres

l·ligands que tenen un mecanisme d'acció diferent sobre el son. Actualment s'estan realitzant estudis preclínics per avaluar-ne la seva implicació en el son i la possible aplicació en el tractament de l'insomni.

En conclusió, l'heterogeneïtat en l'origen i els diferents tipus d'insomni fa necessari el desenvolupament de nous hipnòtics. Els fàrmacs amb nous mecanismes d'acció, obren un nou ventall de possibilitats per fer front als diferents símptomes d'aquest trastorn. El tractament farmacològic a escollir dependrà en cada cas de la seva etiologia (Sullivan, 2009).

Objectius

Històricament el tractament farmacològic de l'insomni ha tingut com a principal diana el receptor GABA_A. L'evolució dels hipnòtics que actuen sobre aquest receptor, ha aportat una millora en la seva eficàcia i seguretat. Tot i així, encara tenen efectes no desitjats com l'insomni de rebot, la dependència, l'amnèsia anterògrada o la tolerància.

Al centre d'R+D de Ferrer Internacional ens hem plantejat trobar un compost que **millori els inconvenients dels hipnòtics actuals**. Seguint una estratègia de cribratge (Figura 19), seleccionarem un compost amb: 1) major selectivitat *in vitro* per la diana terapèutica, la subunitat α_1 del receptor GABA_A, 2) activitat hipnòtica *in vivo* que no alteri l'arquitectura del son i 3) una absorció oral ràpida i vida mitjana adequada.

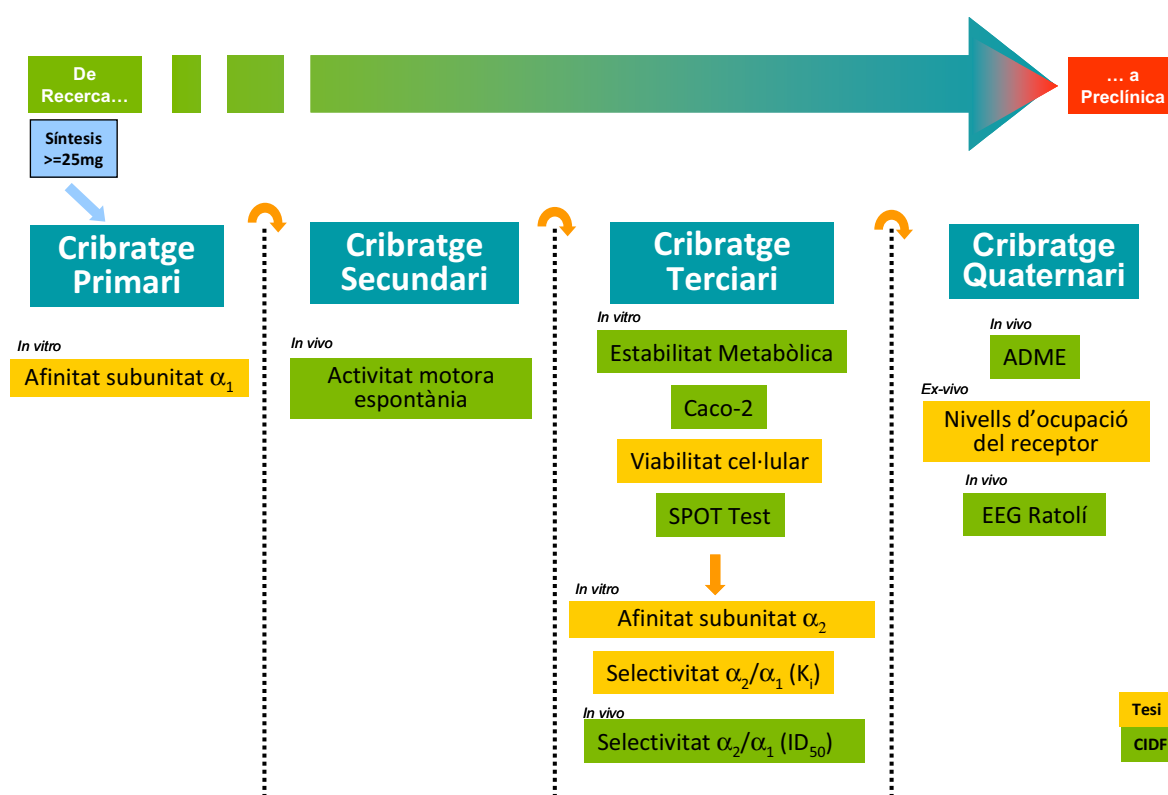


Figura 19. Estratègia de cribratge per a seleccionar el compost més adequat per a la fase preclínica. En groc els assaigs que formen part d'aquesta Tesi Doctoral i en verd els que han desenvolupat altres departaments del centre d'R+D de Ferrer Internacional.

En aquest context, l'objectiu de la present Tesi Doctoral serà, dins la fase de recerca de nous fàrmacs, **seleccionar un candidat adequat** que arribat a la fase preclínica, suposi una millora respecte als compostos de referència que actualment es troben al mercat.

Per assolir aquest objectiu haurem de:

- Posar al punt els assaigs d'unió amb radiol·ligand *in vitro*, que ens permetin identificar compostos amb gran afinitat per la subunitat α_1 i baixa afinitat per l' α_2 del receptor GABA_A.
- Determinar els nivells d'ocupació del receptor GABA_A per part dels compostos en estudi, en diferents àrees del cervell (on predominen determinades subunitats α del receptor) i relacionar-ho amb l'efecte observat en els assaigs de comportament *in vivo*.
- Avaluar la citotoxicitat dels compostos per determinar-ne el marge terapèutic *in vitro*.

Materials i mètodes

1. ANIMALS I CONDICIONS D'ESTABULACIÓ

Pels assaigs d'unió amb radiolligand *in vitro*, es van utilitzar rates mascle de la soca albina Sprague-Dawley OFA (*Harlan Interfauna Ibérica S.A.; Barcelona*) amb un pes corporal d'arribada entre els 200 g i 225 g.

Pels assaigs d'ocupació del receptor, la posada al punt del mètode es va realitzar inicialment amb aquesta espècie, però posteriorment es va canviar i es van utilitzar ratolins mascle albins de la soca Swiss CD-1 (*Charles River S.A., Barcelona*) amb un pes corporal d'arribada entre 12 g i 14 g.

En arribar a l'estabulari del centre d'R+D de Ferrer Internacional, els animals van ser distribuïts en gàbies transparents de 48 x 27 x 21 cm per parelles en el cas de les rates o en grups de 8 els ratolins. Cada gàbia contenia un llit d'encenalls de fusta i disposava d'un cilindre de plàstic vermell com a enriquiment ambiental dels animals durant el període d'estabulació. Les gàbies estaven cobertes per una reixeta d'acer inoxidable sobre la qual s'hi dipositava el pinso i el biberó amb aigua.

Els animals es mantenien en condicions controlades de llum (alternant cicles de 12 hores de claror de les 8h a les 20h, amb 12 hores de foscor), temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) i humitat ambiental (45-55%). Els animals disposaven d'aigua i pinso estàndard (A04C, *Panlab*) *ad libitum*. Passada la quarantena (5 dies) els animals podien utilitzar-se per fer els experiments.

Tots els procediments en els quals va ser necessari l'ús d'animals van ser aprovats pel Comitè Ètic i d'Experimentació Animal del centre i pel Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya.

2. SACRIFICI I EXTRACCIÓ DE MOSTRES

La majoria d'anestèsics i relaxants musculars actuen sobre el receptor GABA_A (Westphalen, 2006; Topf, 2003). Per tal que aquests no interferissin en els nostres experiments, els animals eren sacrificats sense anestèsia prèvia, per decapitació en el cas de la rata o dislocació cervical el ratolí.

Ràpidament es procedia a l'extracció de cerebel, medul·la espinal i còrtex (aquest últim només pels assaigs *ex-vivo*) i immediatament es congelaven en N₂ líquid. Posteriorment, els teixits eren guardats a -80°C fins al moment de la seva utilització.

3. HOMOGENEÏTZACIÓ DELS TEIXITS

3.1. Assaigs d'unió amb radiolligand *in vitro*

Pels assaigs d'unió amb radiolligand *in vitro*, els teixits eren homogeneïtzats segons els protocols de J. Lameh (Lameh, 2000) i H. Noguchi (Noguchi, 2002) lleugerament modificats.

Un cop pesats, els cerebels es submergien en tampó fred (4°C) Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 en una proporció 1:40 (pes:volum). S'homogeneïtzaven amb el disruptor tipus politró (*T25 basic IKA, Labortechnik*) durant 1 minut a 8000 rpm i es centrifugaven a 20000 x g durant 10 minuts a 4°C (*Centrifugadora Sorval RC 28S amb rotor adaptat a tubs de 50 mL, DuPont Instruments*). Seguidament es descartava el sobrenedant i el precipitat es resuspensia de nou en el volum inicial, amb el mateix tampó fred, i tornava a centrifugar-se a 20000 x g durant 10 minuts a 4°C. Aquest procés, es repetia un cop més abans de resuspendre el precipitat en 1 mL de tampó i congelar-lo a -80°C O/N. La congelació a -80°C juntament amb els successius rentats tenen la finalitat d'eliminar qualsevol substància soluble que pugui interferir posteriorment en els assaigs d'unió amb radiolligand com poden ser els neurotransmissors endògens (Chiu, 1979).

El protocol de medul·la variava lleugerament. Un cop pesada es submergia en sacarosa 0.32 M en una proporció 1:40 (pes:volum) i s'homogeneïtzava amb el politró en les mateixes condicions que cerebel. La primera centrifugació es realitzava a 1000 x g i es recollia el sobrenedant. Posteriorment, el sobrenedant es centrifugava a 20000 x g i es resuspensia dos cops més en les mateixes condicions descrites per cerebel.

L'endemà es descongelaven les mostres, tant de cerebel com de medul·la, i es repetia un parell de cops més la resuspensió i centrifugació. Finalment, el precipitat es resuspensia en tampó Tris-HCl 50 mM pH 7.4, en una proporció 1:10 o 1:5 (pes inicial de teixit:volum) en el cas de cerebel o medul·la respectivament. Les mostres es guardaven a -80°C fins al moment de la seva utilització.

3.2. Assaigs d'unió amb radiolligand *ex-vivo*

En els assaigs *ex-vivo* (apartat 6, pàgina 68), la dilució del teixit amb el tampó d'homogeneïtzació, afavoreix la dissociació del compost administrat que s'hagi unit al receptor. Per evitar-ho vam simplificar el protocol d'homogeneïtzació i tots els passos es realitzaven en fred, a una temperatura de 4°C aproximadament.

El còrtex i el cerebel un cop pesats es submergien en tampó Tris-HCl 50 mM pH 7.4 fred (4°C), en una proporció 1:20 (pes:volum). S'homogeneïtzaven amb el disruptor tipus politró (*T25 basic IKA, Labortechnik*) durant 1 minut a 8000 rpm i es guardaven a -80°C fins al moment de la seva utilització.

En canvi la medul·la, un cop pesada es submergia en sacarosa 0.32 M en una proporció 1:20 (pes:volum) i s'homogeneïtzava amb el politró en les mateixes condicions que còrtex i cerebel. Seguidament, es realitzava una primera centrifugació a 1000 x g i es recollia el sobrenedant. Posteriorment, el sobrenedant es centrifugava a 20000 x g i es resuspenia en tampó Tris-HCl 50 mM pH 7.4, en una proporció 1:10 (pes inicial de teixit:volum). Les mostres es guardaven a -80°C fins al moment de la seva utilització.

4. QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNA PEL MÈTODE COOMASSIE O MÈTODE ÀCID

4.1. Fonament del mètode

La valoració de proteïna es va realitzar utilitzant el reactiu comercial *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* que es basa en el mètode de Bradford (1976).

El reactiu conté metanol, àcid fosfòric i el colorant *Coomassie Brilliant Blue G-250* que s'uneix a les proteïnes de la mostra en medi àcid, formant un complex acolorit que es pot quantificar mesurant-ne l'absorbància a 590 nm.

4.2. Reactius

- *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad)*
- Albúmina sèrica bovina (BSA) (*Bio-Rad*) 1 µg/mL

4.3. Protocol

La valoració es fa en plaques de 96 pous. El reactiu *Bio-Rad* es dilueix prèviament (1/5) en aigua MilliQ. Les mostres dels homogenats de teixit es dilueixen també en aigua MilliQ, en proporció (1/10) pels assaigs *in vitro*. Pels assaigs *ex-vivo* el còrtex es dilueix (1/20), el cerebel (1/15) i la medul·la (1/5).

Es carreguen per duplicat 10 µL de la mostra o de la patró de BSA a la placa, i a continuació 190 µL del reactiu *Bio-Rad* prediluit. S'incuba durant 5 minuts a temperatura ambient, en un agitador a 500 rpm. Passat aquest temps es mesura l'absorbància en un lector de plaques (*Multiskan Ascent, Thermo*) a 590 nm.

4.4. Quantificació

La quantificació de la proteïna en les mostres, es fa extrapolant en la recta patró la concentració de proteïna de les mostres en funció de la seva absorbància, i tenint en compte la dilució que s'ha fet prèviament. L'expressió dels resultats obtinguts es donen en µg/mL de teixit.

5. ASSAIGS D'UNIÓ AMB RADIOLLIGAND *IN VITRO*

Els assaigs d'unió amb radiolligand *in vitro*, són àmpliament utilitzats en farmacologia per a l'estudi de receptors. Aquests assaigs permeten analitzar la interacció del receptor amb el seu lligand o fàrmacs, caracteritzar canvis en la regulació del nombre de receptors, identificar-ne la distribució subcel·lular i les funcions fisiològiques. Els experiments bàsics amb aquesta tècnica són: assaigs de cinètica d'associació (apartat 5.5) i dissociació, assaigs de càrrega de proteïna (apartat 5.6), assaigs de saturació (apartat 5.7) i assaigs d'inhibició o competició (apartat 5.8).

5.1. Fonament del mètode

Els assaigs es basen en la incubació del receptor d'interès, amb un lligand marcat radioactivament i la posterior determinació de la radioactivitat unida al receptor (Bylund, 1993).

A la majoria de casos es pot analitzar la unió del radiolligand al receptor seguint un model senzill, anomenat **lei d'acció de masses**, molt similar a l'equació de Michaelis-Menten per a la cinètica de les reaccions enzimàtiques (Crawley, 1997):



L: lligand o radiolligand

R: receptor

RL: complex lligand-receptor

k_{on} : constant de l'índex d'associació ($M^{-1} \text{ min}^{-1}$)

k_{off} : constant de l'índex de dissociació (min^{-1})

En els assaigs d'unió amb radiolligand la quantitat total de compost marcat radioactivament que s'uneix s'anomena **unió total (T)**. No tot el radiolligand que s'uneix ho fa al receptor d'interès que anomenarem **unió específica (SB)**, de l'anglès *specific binding*, sinó que una part pot també unir-se, per exemple, als filtres de fibra de vidre que s'utilitzen per aturar la reacció i separar el radiolligand lliure de l'unit. Aquesta **unió inespecífica (NSB)**, de l'anglès *non specific binding* es pot determinar mesurant la quantitat de radiolligand que s'uneix en presència d'un compost químicament similar o igual, no radioactiu i en excés, de manera que bloquegi completament el receptor que ens interessa i el radiolligand només pugui unir-s'hi de forma inespecífica. La diferència entre la unió total i la inespecífica ens permet calcular la unió específica ($SB = T - NSB$).

La unió total i la inespecífica, a diferència de l'SB, no es saturen a concentracions creixents de radiolligand. Es considera que un assaig és bo quan l'NSB és inferior al 30% i excel·lent si no supera el 10% (Bylund, 1990).

5.2. Sistemes de filtració i estació robotitzada per incrementar el rendiment de l'assaig

Un cop finalitzada la incubació, la filtració és un sistema ràpid per separar el radiolligand unit del lliure, i evitar la dissociació del complex radiolligand-receptor que és el que volem mesurar.

5.2.1. Col·lector de mostres Brandel (model M-48-R)

El col·lector de mostres Brandel (Figura 20) és un aparell de filtració dissenyat per treballar amb tubs, que permet incubar volums grans i processar com a màxim 48 tubs a la vegada.

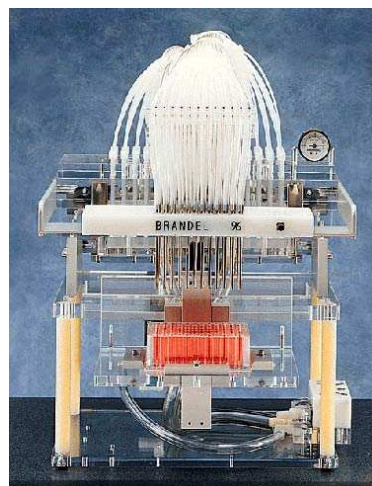


Figura 20. Col·lector de mostres Brandel (model M-48-R)

Consta bàsicament d'un capçal amb 48 puntes metàl·liques que mitjançant un sistema de buit, aspiren els reactius dels tubs i fan que travessin la membrana de fibra de vidre, compresa entre dues peces de metacrilat, per retenir el complex RL.

5.2.2. Sistema d'assaig en placa *Multiscreen_{HTS}* (Millipore)

El sistema *Multiscreen_{HTS}* es basa en una placa de 96 pous amb una membrana de fibra de vidre ($\phi_{\text{porus}} = 1\mu\text{m}$) individual al fons de cada pou, més un suport de plàstic (*underdrain*) que recobreix tota la placa per sota (*Multiscreen_{HTS}*, Millipore) (Figura 21A).

En aplicar el buit per sota la placa, amb el col·lector per a plaques (Figura 21B) els reactius es filtren i es recullen en un *kitasato* quedant-se retinguts al filtre de la placa aquelles partícules amb una mida superior al diàmetre del porus.

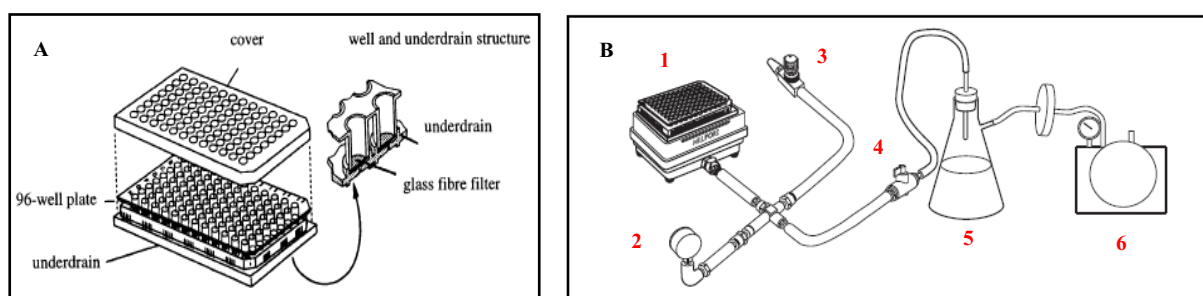


Figura 21 A. Esquema de la placa *Multiscreen_{HTS}*. B. Esquema sistema d'assaig *Multiscreen_{HTS}*. 1. Col·lector i placa 2. Baròmetre 3. Vàlvula reguladora de pressió 4. Clau de pas 5. *Kitasato* 6. Bomba de buit.

Les principals avantatges d'aquest sistema respecte l'anterior, són que permet la incubació, filtració i comptatge de l'assaig a la mateixa placa. També es disminueix el volum de reactius i per tant el cost de l'assaig, n'augmenta el rendiment (cribratge de més nombre de compostos en menys temps) i es pot integrar en una estació robotitzada per automatitzar l'assaig.

5.2.3. Estació robotitzada *Multiprobe II HT Ex* (Perkin Elmer)

El *Multiprobe II HT Ex* (Figura 22) és una estació robotitzada equipada amb un **sistema de transferència de líquids** (*Liquid Handling*) format per 8 puntes fixes i independents (*Versatips Plus Adapters*) que li permeten aspirar diferents volums de posicions diferents. Aquestes puntes disposen d'uns adaptadors que els permeten acoblar-se a puntes d'un sol ús (DT, de l'anglès *disposable tips*) dins un mateix protocol i evitar la contaminació de les puntes fixes.

Ambdues tipus de puntes tenen dos modes d'aspiració: *waste* i *blowout* que es diferencien per l'aspiració d'un volum de líquid o d'aire prèviament a l'aspiració del volum de líquid seleccionat. L'últim mode és l'indicat per aspirar volums menors a 25 µL.

L'estació compta també amb un **agitador orbital** (*Micromix 5, DPC*) i **incubadors per a plaques i reactius** amb regulació de temperatura a través de banys termostatitzats (*Polystat cc3, Huber*).



Figura 22. Estació robotitzada Multiprobe II HT Ex (Perkin Elmer). 1. Sistema Multiscreen 2. Reservoiris per reactius termostatitzat 3. Incubadors per a plaques termostatitzats 4. Agitador orbital

La taula de treball de l'equip té uns eixos de coordenades amb unes guies per fixar els suports on es col·locaran les plaques i els reservoris de reactius, i que alhora permeten al programa informàtic de l'equip saber-ne la localització.

El programa informàtic (*WinPrep*) permet la configuració del protocol i l'edició de les dimensions del material fungible que necessitem utilitzar a la taula de treball. També té incorporats els arxius (*Performance file*) amb els paràmetres que controlen els processos d'aspiració i dispensació (velocitats, volum en excés, bombolla de transport).

Per a l'optimització de les condicions de dispensació són importants principalment dos variables: la velocitat d'aspiració/dispensació (*performance file*) i la posició d'aspiració/dispensació (Figura 23).

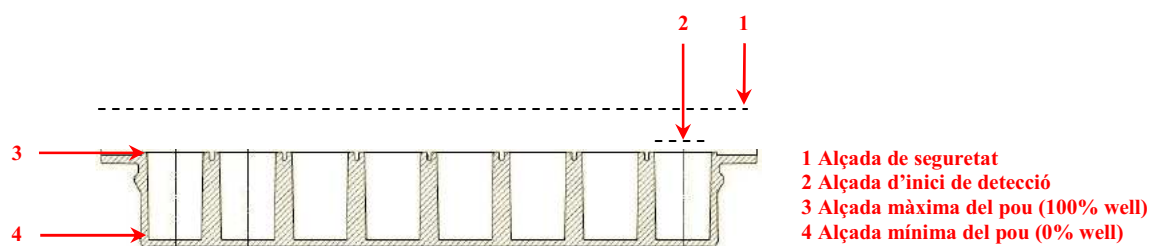


Figura 23. Posicions de dispensació del Multiprobe. 1. Alçada que permet a les puntes desplaçar-se horitzontalment amb seguretat, sense perill de topar-se amb la placa. 2. Alçada a la qual les puntes inicien la detecció de líquid. 3. Cap del pou o 100% de l'alçada. 4. Fons del pou o 0% de l'alçada.

Els paràmetres utilitzats per avaluar si les condicions de dispensació eren acceptables van ser: el **coeficient de variació** ($CV = (\text{desviació estàndard}/\text{mitjana}) \cdot 100$) i el **percentatge d'inexactitud** ($\% \text{Inacc} = ((V_{\text{olum teòric}} - V_{\text{olum real}}) / V_{\text{olum teòric}}) \cdot 100$) indicadors de la precisió i la inexactitud respectivament.

5.3. Reactius

- Polietilenimina (PEI) (*Sigma*) 0.5% (p/v)
- Tampó Tris-HCl, pH 7.4 50 mM
- Flumazenil (*Tocris*) 20 μM
- ^3H -Ro15-1788 (*Perkin Elmer*) 1 Ci/mL
- Compostos quimioteca del centre d'R+D de Ferrer 10 mM
- Líquid de cintil·lació (*Biogreen 3, Scharlau*)

5.4. Protocol general dels assaigs d'unió amb radiolligand *in vitro*

5.4.1. Assaigs en tub

En els assaigs en tub, s'incubava el filtre de fibra de vidre amb una solució de PEI al 0.5% durant 2h a temperatura ambient (RT). El PEI canvia les càrregues de la fibra de vidre del filtre de negatives a positives, disminuint la unió inespecífica del radiolligand.

Seguidament es carrega als tubs el tampó Tris-HCl 50 mM pH 7.4, i un volum d'homogenat corresponent a 125 μg de proteïna en el cas de cerebel o a 150 μg per medul·la, en un volum total d'assaig de 500 μL .

Paral·lelament en altres tubs es determinava l'NSB, afegint a la barreja anterior, flumazenil no marcat a concentració saturant.

La reacció s'iniciava amb l'adició del radiolligand ^3H -Ro15-1788 (flumazenil tritiat, antagonista inespecífic del receptor GABA_A). La concentració final a l'assaig era d'1 nM, exceptuant els assaigs de saturació.

Els tubs s'incubaven durant 60 minuts, en un bany d'aigua a 4°C amb agitació horitzontal. La reacció s'atura ràpidament per filtració a través dels filtres de fibra de vidre mitjançant el col·lector per a mostres Brandel. Un cop filtrades les mostres, els filtres es rentaven tres cops amb tampó fred Tris-HCl 50 mM pH 7.4, per assegurar-nos que únicament quedava retinguda la radioactivitat unida als receptors.

Els filtres es deixaven assecar de 2 a 3h a RT abans d'incubar-los O/N amb el líquid de cintil·lació (*Biogreen 3, Scharlau*). Finalment, es mesurava la radioactivitat retinguda als filtres amb un comptador de cintil·lació líquida (*Tricarb 1900 TR, Packard*).

Les condicions finals dels assaigs en format tub, per determinar l'afinitat dels compostos per les subunitats α_1 i α_2 del receptor GABA_A estan recollides a les Taules 15 i 17 de les pàgines 92 i 93.

5.4.2. Assaigs amb el sistema de placa Multiscreen_{HTS}

Als assaigs amb el sistema Multiscreen_{HTS}, la placa s'incubava O/N a 4°C amb 200 μL de PEI al 0.5% per pou. L'endemà s'eliminava la solució de PEI aplicant el buit a la placa i realitzant tres rentats de 200 μL amb tampó Tris-HCl 50 mM pH 7.4, per eliminar qualsevol resta del polímer.

El recobriment de plàstic de la part inferior de la placa Multiscreen_{HTS}, dificultava assolir la temperatura d'incubació a 4°C. Es va decidir realitzar la incubació de l'assaig en una placa de 96 pous de polipropilè amb fons en U (*Greiner*) que s'adaptava millor als incubadors d'alumini refrigerats per a plaques. Aquests incubadors estaven col·locats sobre un agitador (*Micromix 5, DPC*) de manera que permetien l'agitació conjuntament amb la refrigeració.

Amb una pipeta multicanal electrònica (*Finnpipette, Thermolabsystem*) es dispensava a la placa Greiner el tampó Tris-HCl 50 mM pH 7.4, i un volum d'homogenat corresponent a 65 μg de proteïna en el cas de cerebel o a 100 μg per medul·la, en un volum total d'assaig de

230 μL . En els pous on es va determinar l'NSB, es va afegir també 23 μL de flumazenil no marcat a concentració 20 μM .

A l'igual que a l'assaig en tub, la reacció s'iniciava afegint el radiolligand $^3\text{H-Ro15-1788}$ a una concentració final d'1 nM, exceptuant els assaigs de saturació.

Passats 60 minuts, es transferien 200 μL de la reacció a la placa Multiscreen_{HTS} i s'aturava la reacció per filtració, aplicant el buit a la placa. Seguidament es realitzava tres rentats de 200 μL amb tampó fred Tris-HCl 50 mM pH 7.4, per tal d'eliminar les restes de radiolligand no unides al receptor. S'eixugava la part inferior de la placa i s'enretirava el suport de plàstic de sota.

Finalment, es deixava assecar la placa de 2 a 3 hores a RT, abans de col·locar-la al casset de lectura (*1450-106 Perkin Elmer*) i afegir amb la multicanal 30 μL de líquid de cintil·lació (*Biogreen 3, Scharlau*).

Les plaques es deixaven en agitació horitzontal O/N per tal que el filtre quedés totalment impregnat amb el líquid de cintil·lació. L'endemà es realitzava el comptatge de la placa al comptador per a plaques Microbeta Trilux (*Perkin Elmer*).

Les condicions finals dels assaigs en format placa, per determinar l'afinitat dels compostos per les subunitats α_1 i α_2 del receptor GABA_A, estan recollides a les Taules 15 i 17 de les pàgines 92 i 93.

5.5. Assaig de cinètica d'associació

5.5.1. Fonament del mètode

En els assaigs de cinètica d'associació, s'incuba durant diferents temps una concentració fixa de receptors i radiolligand per determinar quan s'assoleix l'estat d'equilibri. Aquest temps depèn bàsicament de dos factors: la concentració del radiolligand i la temperatura.

L'**estat d'equilibri** s'assoleix quan la quantitat que es forma del complex RL és igual a la que es dissocia. La constant de dissociació a l'equilibri (K_d) és la concentració de lligand que ocupa la meitat dels receptors a l'equilibri. Si la K_d és baixa, vol dir que el lligand té una gran afinitat pel receptor. Per contra una K_d elevada indica una baixa afinitat entre lligand i receptor.

5.5.2. Protocol

El procediment general és el mateix descrit a l'apartat anterior 5.4, però es van realitzar diferents temps d'incubació entre 0 i 120 minuts. Cada temps s'analitzava per triplicat amb el seu corresponent NSB.

5.6. Assaig de càrrega de proteïna

La quantitat de proteïna que es va seleccionar i utilitzar en els assaigs de saturació i competició havia de complir dues condicions: d'una banda, havia d'estar en el rang lineal amb el nombre de comptes per minut (cpm) i per l'altra la quantitat de radiolligand que s'hi unia havia de ser inferior al 10% (Kenakin, 1993).

5.6.1. Protocol

Per determinar la quantitat òptima de proteïna pels assaigs amb radiolligand, vam seguir el protocol anteriorment descrit a l'apartat 5.4., testant quantitats creixents de proteïna. Pels assaigs en tub es van provar un rang de 30 a 400 µg de proteïna, mentre per placa de 25 a 200 µg en els 230 µL de reacció. Cada concentració s'assajava per triplicat amb el seu corresponent NSB.

5.7. Assaig de saturació

5.7.1. Fonament del mètode

En aquest tipus d'assaig, s'incuben concentracions creixents de radiolligand amb una concentració fixa de proteïna durant un temps que haurem fixat amb la cinètica d'associació, en el qual ja s'haurà assolit l'estat d'equilibri.

Els assaigs de saturació ens permeten determinar l'afinitat del radiolligand pel receptor (K_d o constant de dissociació) i el nombre màxim de llocs d'unió (B_{max}). També ens permeten fixar la concentració de radiolligand a utilitzar en els posteriors assaigs de competició. Generalment, s'utilitzen concentracions iguals o inferiors a la K_d .

Els resultats dels assaigs de saturació es representen posant la quantitat de radiolligand unit (B) a l'eix de les ordenades i el lliure (F) a les abscisses. Aquesta representació és hiperbòlica de manera que dificulta la determinació de la K_d i la B_{max} si no és mitjançant un programa informàtic. La representació de Rosenthal o Scatchard fa una transformació lineal de les dades

de manera que representa la relació B/F enfront la B. D'aquesta manera la K_d es pot calcular com la inversa del pendent de la recta i la B_{max} és el valor de la intercepció de la recta amb l'eix de les x.

5.7.2. Protocol

El procediment general era el mateix que a l'apartat 5.4, però es provaven concentracions creixents de radiolligand: 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 i 40 nM pels assaigs de cerebel i 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 i 80 nM pels de medul·la. Cada concentració s'assajava per triplicat amb el seu corresponent NSB.

5.8. Assaig d'inhibició o competició

5.8.1. Fonament del mètode

Per estudiar l'afinitat dels compostos per la subunitat α_1 (present majoritàriament a cerebel) i α_2 (present majoritàriament a medul·la) del receptor GABA_A, vam basar-nos en els mètodes descrits per S. Arbilla (1986) i Y. Wu (1995).

En els assaigs d'inhibició el temps d'incubació ha de ser suficient per assolir l'estat d'equilibri. La concentració de receptors i radiolligand són constants, mentre que la del compost inhibidor (no marcat radioactivament) és variable.

El mètode es basa en la competició pel lloc d'unió al receptor que s'estableix entre el compost i el radiolligand. A mesura que la concentració del compost inhibidor incrementa, la quantitat de receptor lliure i del complex radiolligand-receptor disminuiran.

Aquests assaigs ens permeten determinar la concentració inhibidora 50 (IC₅₀), que és la concentració del compost inhibidor que desplaça el 50% de la unió específica (SB).

5.8.2. Protocol

El protocol és el descrit a l'apartat 5.4, afegint concentracions creixents del nostre compost d'interès, abans d'iniciar la reacció amb l'addició del radiolligand. Paral·lelament en altres tubs, o pous si l'assaig es fa en placa, es determinava l'NSB.

Es realitzaven 2 tipus de cribratge: primari i secundari. Al primari es testaven per triplicat dues concentracions de cada compost (100 nM i 10 μ M) i es calculava el percentatge

d'inhibició per tenir una idea de la potència del compost. Al secundari s'assajaven set concentracions per duplicat, seleccionades en funció de la potència del compost, entre un rang de 1 pM a 1 µM i es calculava la IC₅₀.

5.9. Quantificació

Pels assaigs de competició primaris, es va calcular el percentatge d'unió específica (SB) per ambdues concentracions del compost estudiat. El percentatge d'inhibició (quantitat de radiolligand que no s'uneix en presència de compost) s'obtenia restant a 100 (percentatge màxim d'unió del radiolligand) el % SB obtingut.

$$\% \text{ SB} = (X - \text{NSB} / T - \text{NSB}) \times 100$$

$$\% \text{ Inhibició} = 100 - \% \text{ SB}$$

on,

X: quantitat de radiolligand unit per a cada concentració de compost (cpm).

T: total, quantitat màxima de radiolligand que s'uneix en absència de compost (cpm).

NSB: inespecífic, quantitat de radiolligand que s'uneix de manera inespecífica independentment del receptor.

Pels assaigs de competició secundaris, on es testaven varies concentracions de cada compost, es calculava el % SB i es representava enfront de la concentració de compost. Aquests valors s'ajustaven mitjançant un programa informàtic (*SigmaPlot*, *SPSS Inc.*) a una equació per assaigs de competició, calculant-ne la IC₅₀.

La IC₅₀ depèn de la concentració de radiolligand que s'utilitza a l'assaig, de manera que en la majoria dels casos els valors d'inhibició d'un compost s'expressen amb la K_i (constant d'inhibició o afinitat de l'inhibidor pel receptor). L'equació de Cheng-Prussoff relaciona la IC₅₀ amb la K_i, donant un valor que ens permet comparar els resultats amb altres assaigs ja que ajusta el valor a la concentració de radiolligand utilitzada i a la K_d.

$$K_i = IC_{50} / [1 + (F / K_d)]$$

on,

IC₅₀: concentració del compost inhibidor que desplaça el 50% de l'SB.

F: concentració de radiolligand.

K_d: constant d'afinitat o de dissociació.

6. ASSAIGS D'UNIÓ AMB RADIOLLIGAND *EX-VIVO*

6.1. Fonament del mètode

El fonament dels assaigs d'unió amb radiolligand *ex-vivo* és similar al dels assaigs *in vitro*. La principal diferència és que el compost que es vol estudiar, s'administra a l'animal un temps abans del seu sacrifici. Posteriorment, s'extreuen els teixits que contenen el receptor d'interès on s'haurà unit el compost, s'homogeneïtzen i s'incuben amb el radiolligand. La quantitat de lligand marcat radioactivament que s'uneix al receptor és inversament proporcional a la quantitat de compost que està ocupant el receptor.

Aquests assaigs ens permeten analitzar si el compost arriba al teixit diana en l'animal, el nombre de receptors que ocupa i la seva correlació amb la resposta biològica.

L'efecte d'un fàrmac depèn d'una banda de la seva eficàcia intrínseca, és a dir, de la capacitat per induir un canvi de conformació en el receptor necessari per produir una resposta fisiològica, i per l'altra, del nombre de receptors als que s'uneix (Ruffolo, 1982).

L'ocupació dels receptors a SNC dependrà de la farmacocinètica i de factors tals com la unió a proteïnes plasmàtiques, el pas de la barrera hematoencefàlica i de la biodisponibilitat al lloc d'unió en el cervell.

6.2. Reactius

- Bretazenil (*Sigma*)
- Methocel[®] K100M 0.5%
- Compostos quimioteca del centre d'R+D de Ferrer 10 mM
- Polietilenimina (PEI) (*Sigma*) 0.5% (p/v)
- Tampó Tris-HCl, pH 7.4 50 mM
- ³H-Ro15-1788 (*Perkin Elmer*) 1 Ci/ mL
- Líquid de cintil·lació (*Biogreen 3, Scharlau*)

6.3. Grups experimentals

Inicialment es van posar al punt els assaigs amb rates mascle albinas de la soca Sprague-Dawley OFA, donat que era l'espècie emprada en els assaigs *in vitro* i el model animal millor

descriu a la bibliografia. Amb aquesta espècie es van posar al punt per a còrtex els assaigs de cinètica d'associació, la càrrega de proteïna, la variació d'ocupació en funció del temps i el percentatge d'ocupació de flumazenil a la dosi de 3 mg/kg, 30 minuts després de la seva administració oral.

Paral·lelament a la posada al punt dels assaigs *ex-vivo* en rata, el departament de Farmacocinètica i Metabolisme del centre d'R+D de Ferrer Internacional va determinar que la metabolització dels fàrmacs sota estudi, era més similar a l'home en ratolí que no pas en rata (Taula 36, pàgina 152). Per tant vàrem tornar a adaptar els assaigs *ex-vivo*, aquest cop en ratolí.

El mateix dia de l'administració, els animals es pesàvem i se'ls assignava un grup experimental. Per tal de determinar els nivells d'ocupació dels compostos a còrtex, cerebel i medul·la, vam dissenyar tres grups experimentals (Figura 24):

Grup control (rata n=10, ratolí n=40): animals administrats 30 minuts abans del seu sacrifici amb el vehicle amb el qual es prepara la dissolució dels compostos (Methocel[®] K100M al 0.5%). El volum administrat via oral (p.o.) era de 10 mL/kg en el cas del ratolí i d'1 mL/kg en el cas de la rata.

Grup inespecífic (rata n=10, ratolí n=40): animals administrats 30 minuts abans del seu sacrifici amb bretazenil (agonista parcial del receptor GABA_A) a la dosi de 5 mg/kg en el cas de la rata o de 30 mg/kg el ratolí. A aquestes dosis el bretazenil ocupa pràcticament tots els receptors GABA_A del teixit, de manera que el radiolligand només pot unir-se de manera inespecífica. El volum de compost per pes corporal que s'administrava intraperitonealment (i.p.), era el mateix que el del vehicle al grup control.

Grup tractament (n=5-6/ dosi de compost): els animals eren distribuïts en grups de cinc o sis per gàbia.

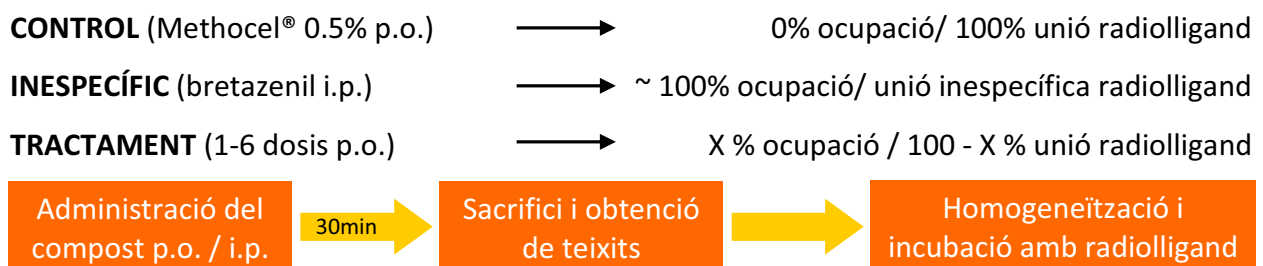


Figura 24. Grups experimentals i esquema dels principals passos de l'assaig *ex-vivo*.

En rata, per la posada al punt del mètode, es va administrar només flumazenil (antagonista no selectiu del receptor GABA_A) a una única dosi de 3 mg/kg.

En ratolí es van assajar les dosis de 0.1, 1, 3, 10, 30 i 100 mg/kg dels següents compostos: diazepam, zolpidem, i compostos de Ferrer Internacional GF-015621-00, GF-016641-00 i GF-016783-00.

Tots els compostos eren administrats (p.o.) 30 minuts abans del sacrifici, al mateix volum per pes d'animal que el grup control.

6.4. Protocol general dels assaigs d'unió amb radiolligand *ex-vivo*

La posada al punt dels assaigs d'unió amb radiolligand *ex-vivo* es va realitzar amb còrtex de rata i el sistema de filtració Brandel per a tubs.

En ratolí els assaigs es van realitzar amb el sistema de plaques Multiscreen_{HTS} i els teixits en els quals es va mirar l'ocupació van ser còrtex, cerebel i medul·la.

El protocol general d'aquests assaigs segueix els mateixos passos descrits a l'apartat 5.4 dels assaigs *in vitro*, amb lleugeres modificacions:

Es va canviar l'ordre d'addició dels reactius, donat que durant la incubació la dilució del teixit amb el tampó d'assaig afavoreix la dissociació del complex lligand-receptor. Així doncs s'afegia el tampó d'assaig amb el radiolligand (³H-Ro15-1788) a una concentració final de 1.8 nM i la reacció s'iniciava amb la dispensació de l'homogenat de teixit.

Els volums d'homogenat que s'afegien a l'assaig es resumeixen a la Taula 6, i variaven en funció del teixit i del sistema d'assaig (tub o placa).

Taula 6. Condicions dels assaigs d'ocupació dels receptors GABA_A en diferents teixits de rata i ratolí.

	RATA		RATOLÍ		
	TUB		PLACA		
Teixit	Còrtex		Còrtex	Cerebel	Medul·la
Volum d'assaig (µL)	500		200	200	200
Volum de proteïna (µL)	35 (100- 110 µg)		16 (55- 65 µg)	50 (190- 210 µg)	100 (115- 140 µg)
³ H-Ro15-1788 (nM)	1.8		1.8	1.8	1.8
NSB (Bretazenil mg/kg)	5		30	30	30
Temperatura (°C)	0-4		4-7	4-7	4-7
Temps d'incubació (min)	2		2	2	2

El temps d'incubació era de 2 minuts a 4-7°C, exceptuant els assaigs per determinar la variació d'ocupació en funció del temps i els de cinètica d'associació.

6.5. Assaig de cinètica d'associació *ex-vivo*

Els assaigs de cinètica d'associació *ex-vivo* es van realitzar en còrtex de rata i ratolí. Els temps d'incubació van ser de: 0, 1, 2, 3, 5, 10, 30 i 60 minuts. Els grups experimentals que es van utilitzar van ser el control i l'inespecífic. Per calcular la unió específica a cada temps, es va restar a les comptes del grup control les comptes obtingudes amb els homogenats del grup inespecífic.

6.6. Assaig de càrrega de proteïna *ex-vivo*

Per determinar la quantitat òptima de proteïna pels assaigs de còrtex, cerebel i medul·la es van testar volums diferents d'homogenat corresponents a quantitats creixents de proteïna. Pels assaigs en tub es van provar un rang de 30 a 700 µg de proteïna, mentre per placa de 20 a 300 µg. Els grups experimentals que es van utilitzar van ser el control i l'inespecífic.

6.7. Assaig per determinar la variació d'ocupació en funció del temps

Per comprovar la variació de l'ocupació en funció del temps d'assaig, vam utilitzar com a referència el treball de Li J. i col. (2006). Els temps d'incubació van ser de: 2, 5, 10, 30 i 60 minuts. Aquest assaig es va realitzar amb còrtex de rata dels grups experimentals control, inespecífic i tractament (flumazenil 3 mg/kg).

6.8. Corbes dosi-resposta dels assaigs *ex-vivo*

Un cop definides les condicions òptimes dels assaigs *ex-vivo*, es va determinar l'ocupació per a cada dosi de compost a còrtex, cerebel i medul·la dels ratolins del grup experimental tractament. La unió específica es calculava restant a les comptes dels grups experimentals control i tractament, les comptes obtingudes amb els homogenats del grup inespecífic.

6.9. Quantificació

L'ocupació per a cada dosi de compost es calculava com la disminució de la quantitat de radiolligand unit respecte al grup experimental control. A més ocupació del compost, menys radiolligand unit al receptor.

El percentatge d'ocupació es representava enfront de la concentració de compost. Aquests valors s'ajustaven mitjançant un programa informàtic (*Sigma Plot, SPSS Inc.*) a una equació sigmoïdal dosi-resposta, calculant-ne la ID_{50} .

7. ASSAIGS DE CITOTOXICITAT

Els assaigs de citotoxicitat són mètodes que permeten avaluar la possible toxicitat de les noves estructures químiques, en les etapes inicials de la recerca de nous fàrmacs. Aquesta informació permet dissenyar fàrmacs més segurs i evitar el risc, les pèrdues econòmiques, que suposaria interrompre el desenvolupament d'un nou compost en les darreres etapes, durant els estudis de seguretat preclínic o els estudis clínics en humans (McKim, 2005; Riss, 2004).

7.1. Fonament del mètode

Els assaigs de citotoxicitat es basen en la incubació dels compostos amb una línia cel·lular durant un temps determinat, i la posterior mesura de paràmetres marcadors de viabilitat o mort cel·lular.

La determinació del nombre de cèl·lules viables es va realitzar amb el reactiu comercial CellTiter-Glo[®] *Luminescent Cell Viability Assay* que conté luciferina, Mg^{2+} i luciferasa. En presència de l'ATP produït per les cèl·lules metabòlicament actives, la luciferasa oxida la luciferina a oxiluciferina que genera un senyal luminescent proporcional a la quantitat d'ATP present a la mostra (Figura 25). Els nivells d'ATP són directament proporcionals al nombre de cèl·lules vives.

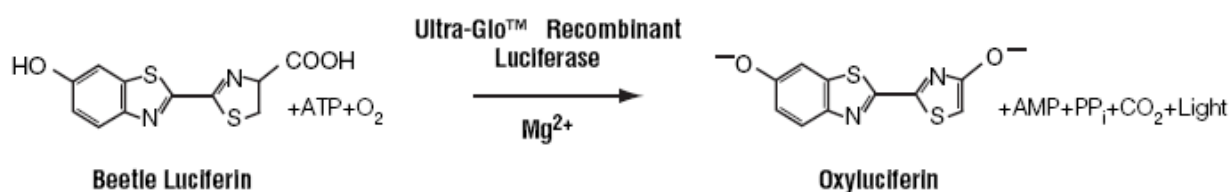


Figura 25. Reacció catalitzada per la luciferasa del reactiu CellTiter-Glo[®] en presència d'ATP de les cèl·lules vives.

7.2. Reactius

- CellTiter-Glo[®] *Luminescent Cell Viability Assay* (Promega)
 - Tampó de lisi
 - Substrat liofilitzat (luciferina, Mg^{2+} , inhibidors d'ATPases i luciferasa)

- Medi Ham's F12 (*Gibco*)
- Medi MEM (*Gibco*)
- L-glutamina (*Gibco*) 200 mM
- Penicil·lina (*Gibco*) 10000 U/mL
- Estreptomina (*Gibco*) 10000 µg/mL
- Piruvat sòdic (*Gibco*) 100 mM
- Aminoàcids no essencials (*Gibco*)
- Sèrum fetal boví (*Gibco*)

7.3. Línies cel·lulars

Es van seleccionar les HepG2 perquè són una línia cel·lular de fetge, òrgan en el qual es metabolitzen majoritàriament els fàrmacs, i les CHO-K1 perquè s'utilitzen àmpliament en els estudis de citotoxicitat. També vam seleccionar una línia cel·lular de cervell, com és l'SH-SY5Y donat que aquest és el teixit diana dels nostres compostos.

7.3.1. CHO-K1 (CCL-61, ATCC)

Les CHO-K1 (Figura 26A) són cèl·lules epitelials que deriven d'ovari de hamster xinès (*Cricetulus griseus*) i van ser obtingudes de l'*American Type Culture Collection (ATCC)*. Les CHO-K1 es mantenen en cultiu amb medi Ham's F-12 (*Gibco*) que contenia 1 mM de Glutamax[®] i es suplementava amb 1 mM d'L-glutamina, 100 U/L de penicil·lina, 100 µg/L d'estreptomina i un 10% de sèrum fetal boví. Fins al moment de l'assaig, les cèl·lules es mantenen en plaques de cultiu en un incubador (*ThermoForma, Thermo*) a 37°C i un 5% de CO₂.

7.3.2. HepG2 (HB-8065, ATCC)

Les HepG2 (Figura 26B) són cèl·lules epitelials d'hepatocarcinoma humà també obtingudes de l'*American Type Culture Collection (ATCC)*. Les HepG2 es cultivaven amb medi MEM (*Gibco*) que contenia una solució de les sals d'Earl i 1.87 mM de Glutamax[®]. El medi es suplementava amb 1 mM de piruvat sòdic, 0.1 mM d'aminoàcids no essencials, 100 U/L de penicil·lina, 100 µg/L d'estreptomina i un 10% de sèrum fetal boví. Fins al moment de

l'assaig, les cèl·lules es mantienien en plaques de cultiu en un incubador (*ThermoForma, Thermo*) a 37°C i un 5% de CO₂.

7.3.3. SH-SY5Y (94030304, Sigma)

Les SH-SY5Y (Figura 26C) són cèl·lules de cervell humà que deriven de la metastasi del moll de l'òs. Les SH-SY5Y van ser obtingudes de *Sigma* i es mantienien en cultiu amb una barreja al 50% de medi Ham's F-12 (*Gibco*) amb un 1 mM de Glutamax[®] i de medi MEM (*Gibco*). El medi es suplementava amb 1.5 mM d'L-glutamina, 0.1 mM d'aminoàcids no essencials, 100 U/L de penicil·lina, 100 µg/L d'estreptomicina i un 10% de sèrum fetal boví. Fins al moment de l'assaig, les cèl·lules es mantienien en plaques de cultiu en un incubador (*ThermoForma, Thermo*) a 37°C i un 5% de CO₂.

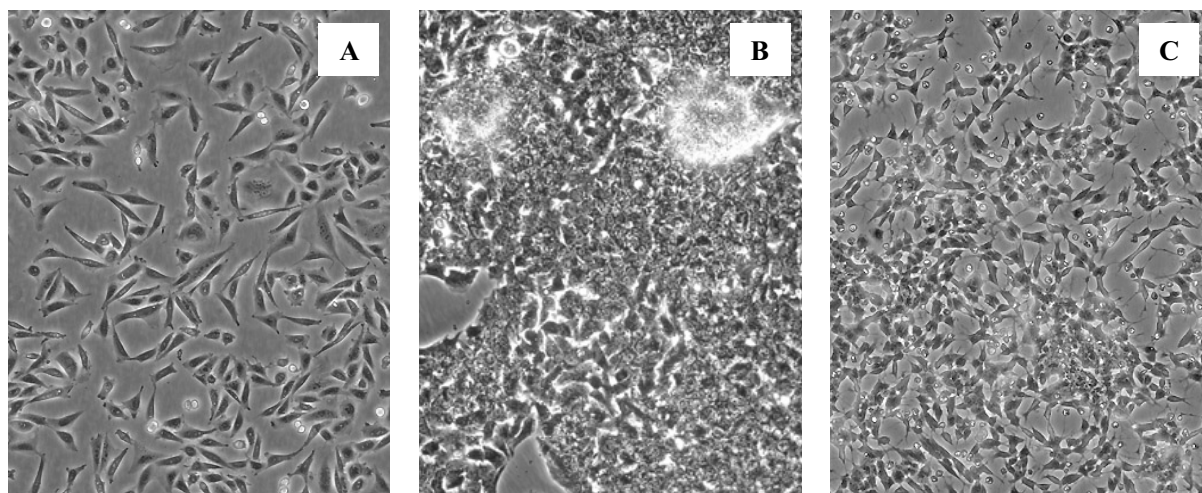


Figura 26. A. Cèl·lules CHO-K1, B. Cèl·lules HepG2 i C. Cèl·lules SH-SY5Y. (Imatges obtingudes de la pàgina web de l'ATCC www.atcc.org).

7.4. Protocol

Dia 1 (tarda):

Les cèl·lules es desadherien de la placa de cultiu amb una solució de tripsina 0.25% (p/v) i EDTA 0.53 mM, es recollien amb el seu medi de manteniment i es comptaven amb una cambra de Neubauer. Mitjançant un dispensador de líquid automàtic (*Multidrop[®], Thermo*), es sembrava cada línia cel·lular en una placa blanca de 96 pous amb fons transparent (*Matrix*). A cada pou es dispensava 5000 cèl·lules en 90 µL de medi de cultiu, exceptuant la primera

columna de la placa que s'utilitzava com a blanc i només es dispensava 90 μL de medi sense cèl·lules.

Les plaques sembrades es deixaven 15 minuts a RT abans de guardar-les a l'incubador (*ThermoForma, Thermo*) a 37°C i un 5% de CO_2 O/N.

Dia 2 (matí):

En un tub eppendorf es dissolien aproximadament 2 mg de cada compost amb DMSO (dimetil sulfòxid) al 100% quedant a una concentració final de 100 mM. Dels eppendorf es transferien 100 μL de cada compost a la columna 11 d'una placa de 96 pous amb fons en "U" (*Greiner*). A la mateixa placa amb una pipeta multicanal, es feien dilucions seriadades dels compostos amb DMSO 100%. Aquesta placa l'anomenarem placa mare (Figura 27).

De la placa mare es feia una dilució (1/100), transferint 10 μL de cada pou a una placa intermèdia de 96 pous amb 90 μL de medi (placa filla), i d'aquesta es transferien 10 μL a la placa d'assaig, sembrada el dia anterior amb 90 μL de cèl·lules. La placa d'assaig s'incubava amb els compostos aproximadament 24h a 37°C i un 5% de CO_2 (*ThermoForma, Thermo*).

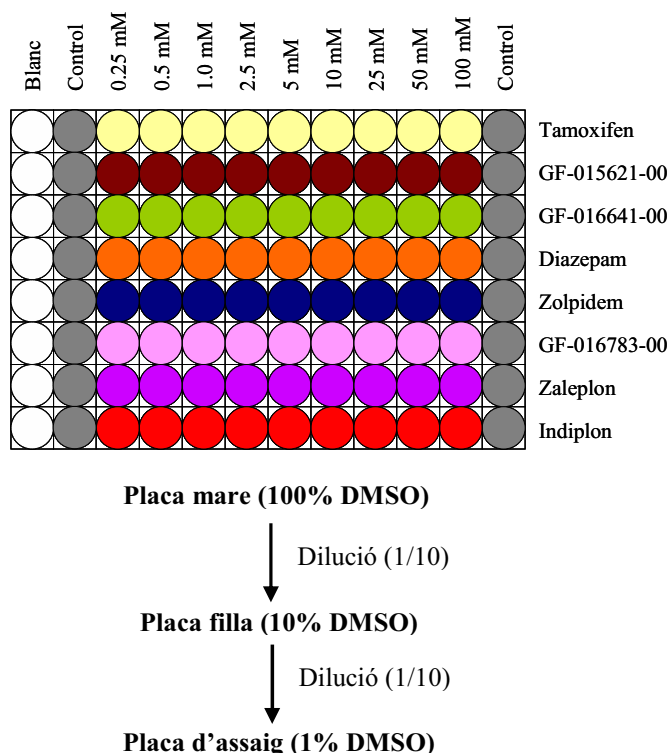


Figura 27. Esquema de la preparació dels compostos.

Dia 3 (matí):

L'endemà les plaques d'assaigs es treien de l'incubador i s'atemperaven 30 minuts a RT.

Mentrestant es preparava el reactiu CellTiter-Glo[®], afegint el tampó de lisi al substrat liofilitzat. S'agitava suaument i es deixava establitzar a RT uns 15 minuts.

Amb l'injector que disposa el lector per a plaques (*Victor³, Perkin Elmer*) es dispensava a cada pou de la placa d'assaig 50 µL del reactiu i s'agitava orbitalment la placa durant 2 minuts per afavorir la lisi cel·lular.

Les plaques s'incubaven protegides de la llum un mínim de 15 minuts a RT, per deixar establitzar el senyal luminescent.

La luminescència es mesurava amb el lector per a plaques (*Victor³, Perkin Elmer*) amb un temps de lectura de 0.1s per pou.

7.5. Quantificació

La viabilitat s'expressava com el percentatge de senyal luminescent obtingut per a cada concentració de compost, respecte la luminescència màxima obtinguda amb les cèl·lules no tractades (100% de viabilitat, columna 2) (Figura 27).

Els valors del percentatge de viabilitat es representaven enfront de la concentració de compost i s'ajustaven mitjançant un programa informàtic (*SigmaPlot, SPSS Inc.*) a una equació sigmoïdal de quatre paràmetres per calculant-ne la IC₅₀.

8. ESTADÍSTICA

El factor Z' és un paràmetre estadístic que s'utilitza per avaluar la qualitat i la robustesa dels assaigs d'alt rendiment (Zhang, 1999). Aquest paràmetre és el quocient entre la banda de separació i el rang dinàmic del senyal, que és la diferència entre la mitjana del senyal màxim i el soroll de fons.

La banda de separació, on s'identifiquen els compostos actius, és l'espai comprès entre les bandes de variació del senyal màxim i el soroll de fons. Com menys variació tingui la mesura del senyal màxim i el soroll de fons, més petita serà la seva banda de variació (es calcula

sumant o restant a la mitjana tres vegades la desviació estàndard) i per tant major serà la banda de separació (Figura 28).

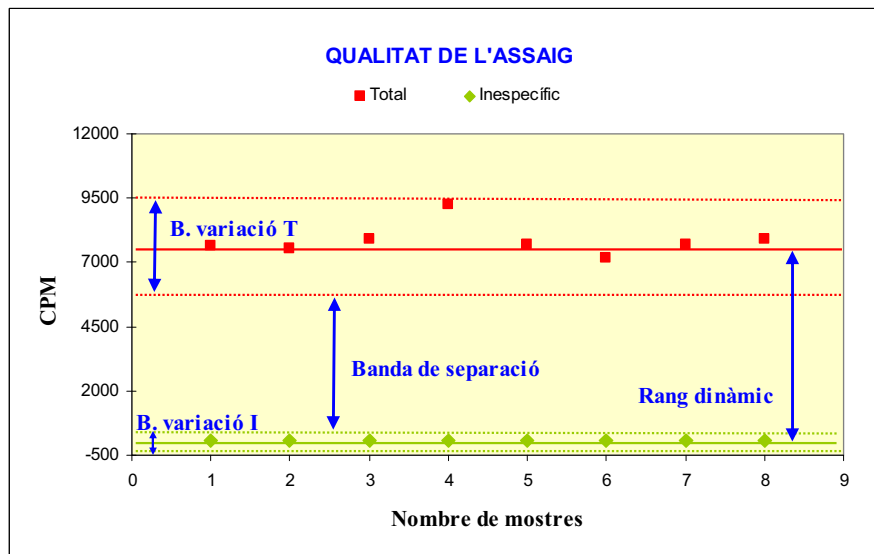


Figura 28. Representació d'un assaig robust.

Un assaig es considera de qualitat i robust quan els valors del factor Z' estan compresos entre 0.50 i 1 (Taula 7).

Taula 7. Valors del factor Z' i relació amb la qualitat de l'assaig

Valor factor Z'	Estructura de l'assaig	Qualitat
1	SD= 0 o rang dinàmic $\rightarrow \infty$	Ideal
$1 > Z' \geq 0.5$	Banda de separació àmplia	Excel·lent
$0.5 > Z' > 0$	Banda de separació estreta	Cal optimitzar

Resultats

1. ASSAIGS D'UNIÓ AMB RADIOLLIGAND *IN VITRO*

Per assolir els nostres objectius, el primer pas va ser la posada al punt dels assaigs d'unió amb radiolligand *in vitro*, que ens permetessin identificar compostos amb gran afinitat per la subunitat α_1 i baixa afinitat per l' α_2 del receptor GABA_A.

Per això vàrem seleccionar dos teixits, cerebel i medul·la espinal de rata, on predominen les subunitats α_1 i α_2 respectivament.

Inicialment es van posar al punt els assaigs en tub amb el sistema de filtració per aturar la reacció *Brandel harvester*, que permet filtrar 48 tubs a la vegada i treballar amb volums més grans que amb altres sistemes de filtratge. Posteriorment per incrementar el rendiment de l'assaig es van posar al punt els assaigs en placa de 96 pous amb el sistema Multiscreen_{HTS} (*Millipore*) i es va automatitzar l'assaig amb l'estació robotitzada Multiprobe II HT Ex (*Perkin Elmer*).

1.1. Posada al punt en tub i amb el sistema de filtració Brandel

1.1.1. Cinètica d'associació

Per tal de determinar el temps d'incubació dels assaigs *in vitro*, vàrem realitzar una cinètica d'associació incubant diferents temps entre 0 i 120 minuts el ³H-Ro15-1788 amb homogenats de cerebel de rata. Com es pot veure a la Figura 29, als 45 minuts s'assolia l'estat d'equilibri i es mantenia estable fins als 120 minuts. Vàrem seleccionar 60 minuts, com a temps d'incubació per als posteriors assaigs d'unió amb radiolligand *in vitro*.

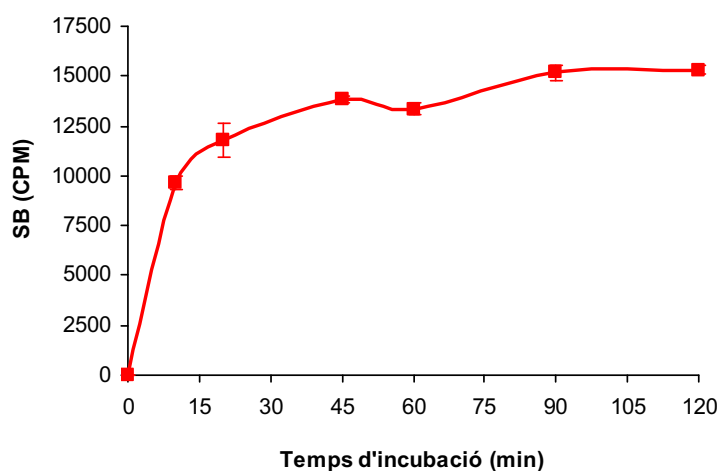


Figura 29. Cinètica d'associació realitzada en tub del ³H-Ro15-1788 en homogenats de cerebel de rata. Cada punt es va carregar per triplicat i la dada representa la mitjana \pm l'error estàndard de la mitjana (SEM).

1.1.2. Determinació de la quantitat de proteïna

Per establir la quantitat adequada de proteïna pels assaigs en tub, es van testar tant per cerebel com per medul·la, les següents quantitats de proteïna: 30, 50, 75, 100, 150, 200, 300 i 400 µg.

La quantitat de proteïna que es selecciona ha d'estar en el rang lineal de la unió específica (SB) i alhora el percentatge de radiolligand que se li uneix ha de ser inferior al 10% de la quantitat total de radiolligand afegit a l'assaig (Kenakin, 1993).

La Figura 30 mostra com l'SB a cerebel és lineal fins a 300 µg de proteïna, de manera que vam seleccionar una quantitat intermèdia de 125 µg, en la qual el percentatge de radiolligand unit no superava el 10% i el senyal que teníem, al voltant de 7500 cpm, ens donava una banda de separació prou àmplia per poder identificar en els assaigs de competició compostos que inhibissin la unió del radiolligand.

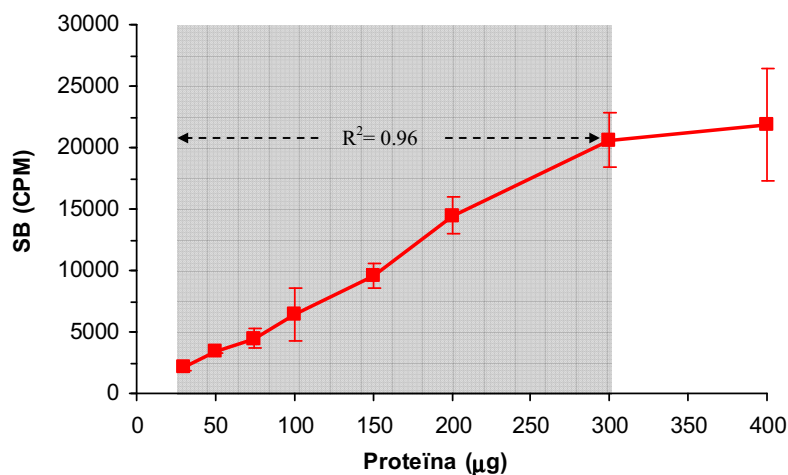


Figura 30. Determinació del rang lineal de proteïna (zona ombrejada) en homogenats de cerebel de rata per l'assaig d'unió amb $^3\text{H-Ro15-1788}$ en tub. Cada punt es va carregar per triplicat i la dada representa la mitjana \pm SEM. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals. Es mostra el coeficient de correlació al rang lineal (R^2).

A medul·la la unió específica també era lineal en el rang de 50-300 µg de proteïna (Figura 31), i el radiolligand que s'hi unia en cap de les quantitats de proteïna testades superava el 10%. Es va seleccionar la quantitat de 150 µg de proteïna pels posteriors assaigs d'unió amb radiolligand en tub.

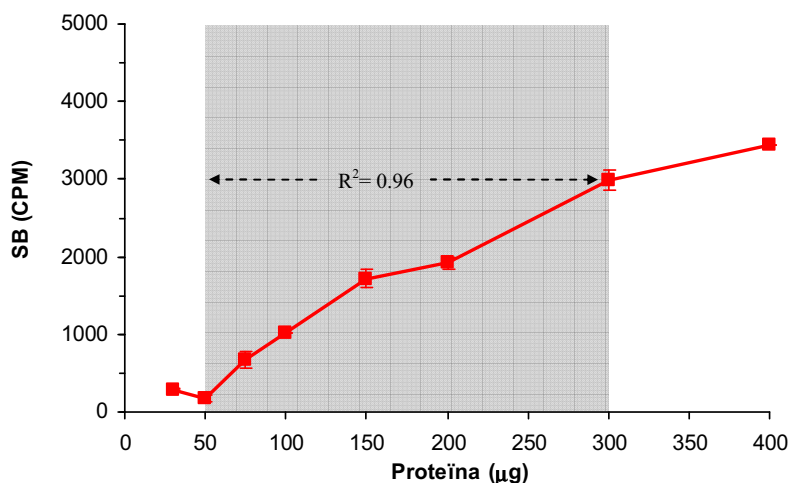


Figura 31. Determinació del rang lineal de proteïna (zona ombrejada) en homogenats de medul·la de rata per l'assaig d'unió amb $^3\text{H-Ro15-1788}$ en tub. Cada punt es va carregar per triplicat i la dada representa la mitjana \pm SEM. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals. Es mostra el coeficient de correlació (R^2) al rang lineal.

1.1.3. Assaigs de saturació

Un cop establerta la quantitat de proteïna pels assaigs en tub, vàrem realitzar els assaigs de saturació amb concentracions de radiolligand creixents de 0.1 a 40 nM per cerebel i d'1 a 80 nM per medul·la, per establir-ne la concentració idònia per realitzar els assaigs de competició i determinar la constant d'afinitat (K_d) del $^3\text{H-Ro15-1788}$ i el nombre màxim de receptors (B_{\max}) en ambdós teixits.

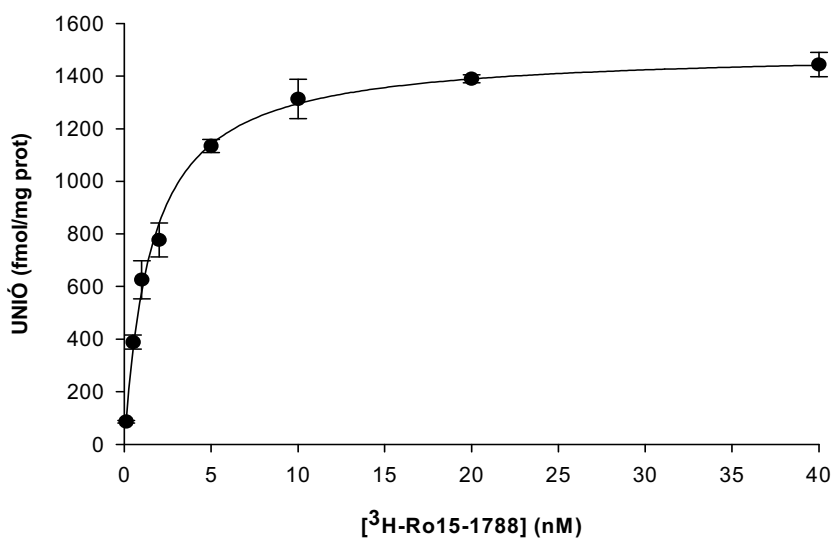


Figura 32. Corba de saturació de la unió específica del $^3\text{H-Ro15-1788}$ en homogenat de cerebel de rata. Cada punt representa la mitjana \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en tub. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals.

De les concentracions de radiolligand que es van provar per cerebel, es va seleccionar l'1 nM que estava en el rang lineal de la corba de saturació, per a la realització dels assaigs de competició (Taula 8).

Com es pot veure a la Figura 32, a mesura que incrementa la concentració del $^3\text{H-Ro15-1788}$, augmenta la quantitat de radiolligand que s'uneix a cerebel (fmol/mg proteïna), fins que a la concentració de 10 nM la reacció es satura, de manera que per més que incrementem la quantitat de lligand marcat radioactivament no es podrà unir específicament.

Taula 8. Condicions finals de l'assaig de $^3\text{H-Ro15-1788}$ a cerebel de rata amb tub.

TUB	
Teixit	Cerebel de rata
Volum d'assaig (μL)	500
Proteïna (μg)	125 (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
$^3\text{H-Ro15-1788}$ (nM)	1
NSB (μM)	2
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	0- 4
Temps d'incubació (min)	60

Els tres assaigs de saturació a cerebel que es van realitzar en tub, van donar una mitjana del valor de la B_{max} de 1498 ± 62 fmol/mg de proteïna. El $^3\text{H-Ro15-1788}$ (antagonista no selectiu del receptor GABA_A) s'uneix amb gran afinitat als receptors GABA_A presents a cerebel, amb un valor de la K_d de 1.6 ± 0.3 nM. Tant els valors de B_{max} com de K_d obtinguts, concorden amb els valors descrits a la bibliografia (Taula 9).

Taula 9. Dades de la mitjana \pm SEM de la K_d i de la B_{max} a cerebel obtinguts als assaigs de saturació realitzats en tub. (1) Massotti, 1991 i (2) Santi, 1988.

	Tub	Bibliografia
B_{max} (fmol/mg prot)	1498 ± 62	1200 ± 90 (1) 1300 ± 160 (2)
K_d (nM)	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.1 (1)
n	3	

També es va caracteritzar la unió del $^3\text{H-Ro15-1788}$ en homogenats de medul·la espinal de rata. Com es mostra a la Figura 33, la corba es satura a una concentració de radiolligand al voltant de 20 nM.

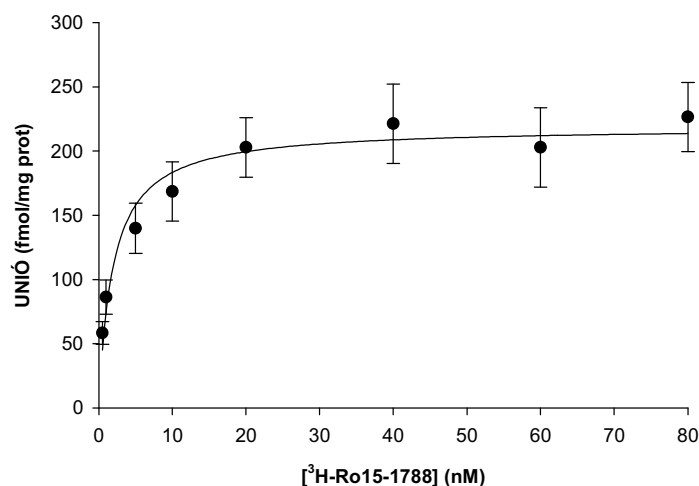


Figura 33. Corba de saturació de la unió específica del ³H-Ro15-1788 en homogenat de medul·la espinal de rata. Cada punt representa la mitjana ± SEM de tres experiments diferents realitzats en tub. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals.

Igual que a cerebel, vam escollir la concentració de radiolligand d'1 nM que estava en la part lineal de la corba de saturació, per a la realització dels assaigs de competició (Taula 10).

Taula 10. Condicions finals de l'assaig de ³H-Ro15-1788 a medul·la espinal de rata amb tub.

TUB	
Teixit	Medul·la espinal de rata
Volum d'assaig (μL)	500
Proteïna (μg)	150 (0.30 μg/μL)
³H-Ro15-1788 (nM)	1
NSB (μM)	2
Temperatura (°C)	0- 4
Temps d'incubació (min)	60

Pel que fa a l'afinitat, la mitjana de la K_d va ser de 1.9 ± 0.3 nM (similar a la de cerebel), mentre la B_{max} de 219 ± 7 fmol/mg de proteïna, ambdós valors similars als citats a la bibliografia (Taula 11).

Taula 11. Dades de la mitjana ± SEM de la K_d i de la B_{max} a medul·la obtinguts als assaigs de saturació en tub. (1) Massotti, 1991, (2) Santi, 1988 i (3) Watanabe, 1985.

	Tub	Bibliografia
B_{max} (fmol/mg prot)	219 ± 7	234 ± 27 (3) 500 ± 45 (2) 600 ± 45 (1)
K_d (nM)	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.01 (3) 2.0 ± 0.2 (2) 1.0 ± 0.1 (1)
n	3	

1.1.4. Assaigs de competició

Amb les condicions pels assaigs en tub definides, vàrem realitzar corbes de competició amb estàndards per validar l'assaig. Els estàndards escollits van ser zaleplon, zolpidem, indiplon i flumazenil.

Tots els estàndards varen inhibir la unió del $^3\text{H-Ro15-1788}$ al receptor de manera dosi dependent (Figures 34 i 35).

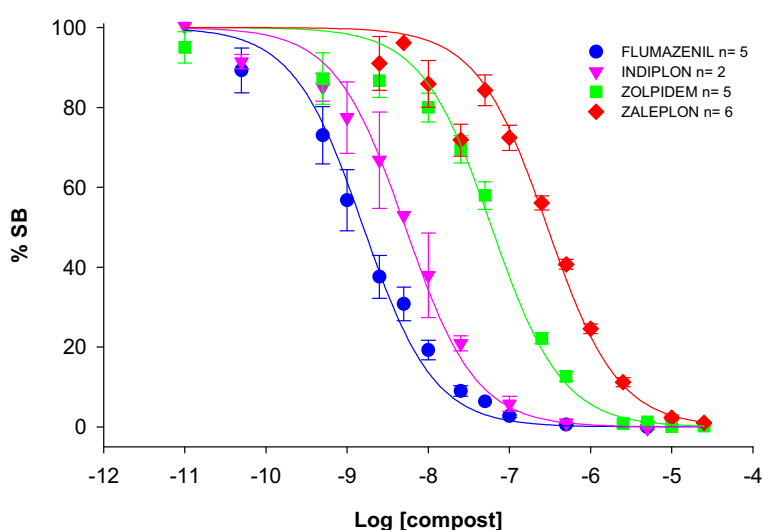


Figura 34. Corbes de competició dels estàndards a cerebel realitzades en tub. El valor de l'n representa el nombre d'assaigs de cada compost. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals. Cada punt representa la mitjana \pm SEM del duplicat.

Els valors de la IC_{50} i la K_i obtinguts a cerebel amb els estàndards als assaigs de competició realitzats en tub es recullen a la Taula 12. Les dues pirazolopirimidines, zaleplon i indiplon, van donar una mitjana de la K_i de 183 ± 22 nM i 3.7 ± 1.5 nM respectivament. La potència d'indiplon per inhibir la unió del $^3\text{H-Ro15-1788}$ a cerebel (on predomina la subunitat α_1 del receptor $GABA_A$) és aproximadament 50 vegades superior a la del zaleplon.

El zolpidem amb un promig de la K_i de 38 ± 5.7 nM presenta una afinitat 5 vegades superior a la del zaleplon, però inferior a la del flumazenil, l'estàndard més potent, amb una K_i d' 1.2 ± 0.3 nM i una afinitat aproximadament 150 vegades més gran que la del zaleplon.

Taula 12. Dades de la mitjana \pm SEM de la IC_{50} i de la K_i dels assaigs de competició realitzats amb els estàndards a cerebel en tub. (1) Massotti, 1991, (2) Noguchi, 2002, (3) Sullivan, 2004, (4) Atack, 1999 i (5) Santi, 1988.

	Tub		Bibliografia	
	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	IC_{50} (nM)	K_i (nM)
Flumazenil	1.9 \pm 0.6 (n=5)	1.2 \pm 0.3 (n=5)	1.0 \pm 0.1 (5) 2.0 \pm 0.1 (1) *	-
Indiplon	6.0 \pm 2.4 (n=2)	3.7 \pm 1.5 (n=2)	-	1.5 (3)
Zolpidem	62.5 \pm 9.3 (n=5)	38.2 \pm 5.7 (n=5)	40 \pm 0.9 (1) *	13.8 (3) 27 (4)
Zaleplon	299 \pm 35 (n=6)	183 \pm 22 (n=6)	167 (2) (136-207) 95%	50.9 (3)

* Dades obtingudes amb 3H -flunitrazepam (agonista no selectiu del receptor $GABA_A$)

A cerebel l'ordre dels estàndards segons la potència per inhibir la unió del 3H -Ro15-1788 va ser la següent: flumazenil > indiplon > zolpidem > zaleplon.

A medul·la els estàndards presenten menor afinitat pel subtipus de receptors $GABA_A$ (principalment α_2) localitzats en aquest teixit (Taula 13). El flumazenil n'és l'excepció amb una K_i (2.1 \pm 0.7 nM) similar a l'obtinguda a cerebel i una potència 620 vegades major que la de zaleplon (K_i =1303 \pm 32 nM). L'indiplon té a medul·la una K_i (44.5 nM) al voltant de 30 vegades superior a la del zaleplon, i el zolpidem (754 \pm 70 nM) d'aproximadament el doble.

Taula 13. Dades de la mitjana \pm SEM de la IC_{50} i de la K_i dels assaigs de competició realitzats amb els estàndards a medul·la espinal en tub. (1) Massotti, 1991, (2) Noguchi, 2002, (3) Atack, 1999 i (4) Santi, 1988.

	Tub			Bibliografia		
	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	α_2/α_1	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	α_2/α_1
Flumazenil	3.2 \pm 1.1 (n=2)	2.1 \pm 0.7 (n=2)	2	1.9 \pm 0.1 (1-4) *	-	2
Indiplon	67.6 (n=1)	44.5 (n=1)	12	24 (3) **	-	8
Zolpidem	1145 \pm 107 (n=3)	754 \pm 70 (n=3)	20	> 500 (1) *	-	> 9- 18
Zaleplon	1978 \pm 48 (n=3)	1303 \pm 32 (n=3)	7	2385 (2)	-	14

* Dades obtingudes amb 3H -flunitrazepam (agonista no selectiu del receptor $GABA_A$)

** Dades obtingudes amb cèl·lules transfectades amb el cDNA de la subunitat α_2

L'ordre dels estàndards segons la potència per inhibir la unió del 3H -Ro15-1788 a medul·la va ser la mateixa que a cerebel: flumazenil > indiplon > zolpidem > zaleplon.

La selectivitat per la subunitat α_1 calculada com el quocient entre la K_i obtinguda a medul·la (α_2) i la de cerebel (α_1) va ser de 2, 7, 12 i 20 vegades per flumazenil, zaleplon, indiplon i zolpidem respectivament. Aquests valors de selectivitat són comparables amb els de la bibliografia.

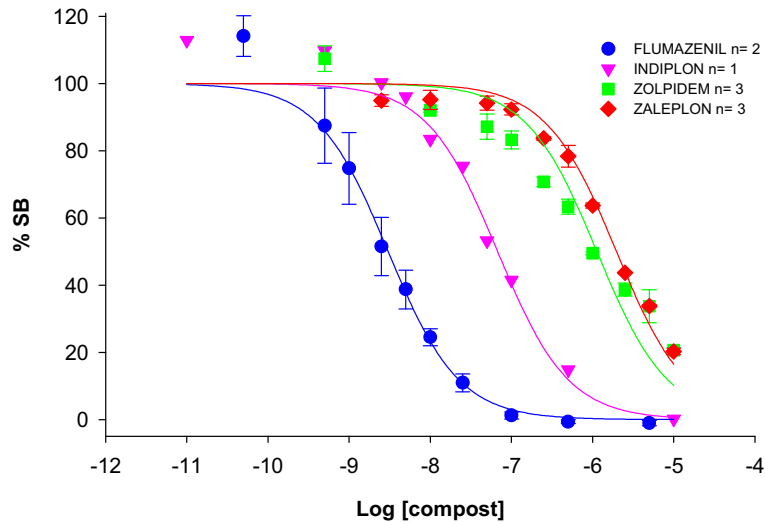


Figura 35. Corbes de competició dels estàndards a medul·la espinal realitzades en tub i amb el sistema de filtració Brandel. El valor d'n representa el nombre d'assaigs de cada compost. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals. Cada punt representa la mitjana \pm SEM del duplicat.

1.1.5. Qualitat dels assaigs en tub

Finalment vàrem avaluar la qualitat i robustesa dels assaigs en tub, calculant el factor Z' dels assaigs de competició realitzats amb els estàndards en tub a cerebel i a medul·la.

A cerebel el promig del factor Z' obtingut va ser de 0.74, i de 0.73 a medul·la.

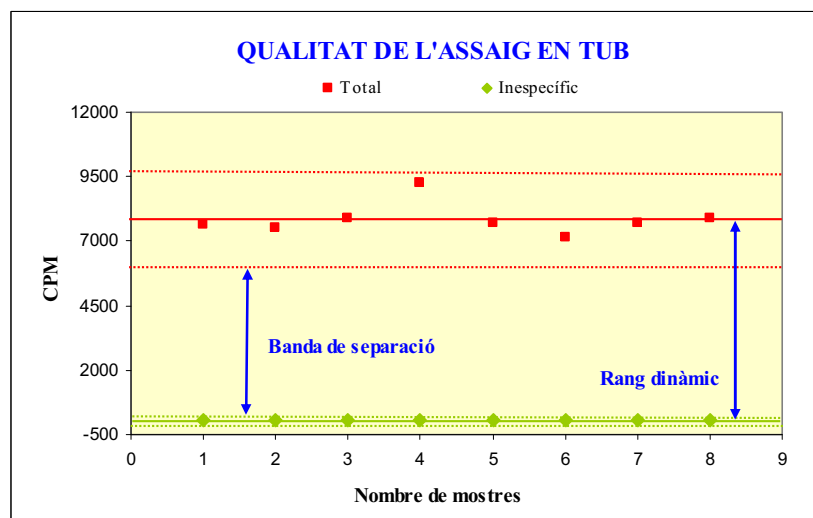


Figura 36. Representació del senyal total i inespecífic d'un assaig de competició representatiu dels realitzats en tub a cerebel.

1.2. Posada al punt amb el sistema de plaques Multiscreen_{HTS} (MilliporeTM)

1.2.1. Determinació de la quantitat de proteïna

Al passar de tub a placa i disminuir el volum d'assaig vàrem haver d'optimitzar una sèrie de paràmetres, entre ells la quantitat de proteïna.

Inicialment vam testar, tant per cerebel com per medul·la, un rang de quantitats de proteïna de 50 a 450 µg en un volum total d'assaig de 230 µL, però al traspasar els 200 µL a la placa Multiscreen_{HTS} per aplicar el buit i aturar la reacció, els pous amb quantitats més altes de proteïna (200 µg) costaven molt de filtrar i s'havia d'incrementar el temps i la pressió de buit.

El fabricant de les plaques Multiscreen_{HTS}, recomana que la càrrega màxima de proteïna a l'assaig sigui aquella que permeti que es filtri la reacció en menys de 20 segons i una pressió de buit màxima de 12'' Hg, i nosaltres necessitàvem més d'1 minut i pressions entre 15-20'' Hg per buidar les concentracions més grans de proteïna. A més a més, el procés de filtració cal que sigui ràpid per disminuir la dissociació del complex RL, el fet d'augmentar el temps i la pressió de buit pot disminuir el % SB (Jassen, 1999).

Per tant, vàrem repetir els assaigs per cerebel i medul·la reduint el rang de proteïna entre 25 i 200 µg en els 230 µL de volum d'assaig.

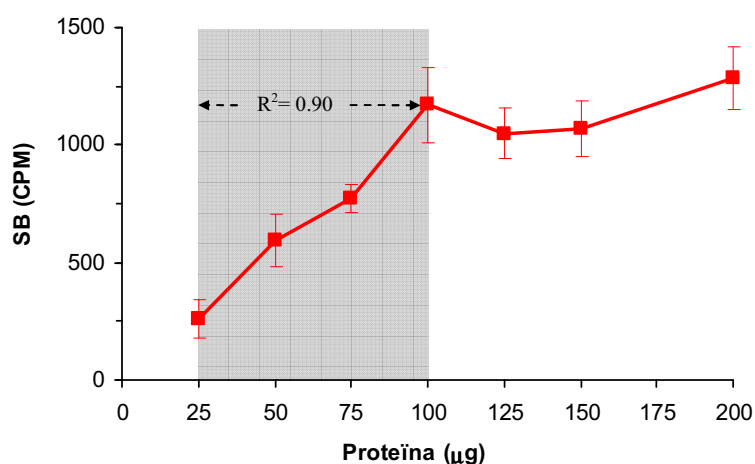


Figura 37. Determinació del rang lineal de proteïna (zona ombrejada) dels homogenats de cerebel de rata per l'assaig d'unió amb ³H-Ro15-1788 a placa Multiscreen_{HTS}. La quantitat de proteïna de l'eix de les abscisses correspon als 230 µL de volum d'assaig. Cada punt es va carregar per triplicat i la dada representa la mitjana ± SEM. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals. Es mostra el coeficient de correlació al rang lineal (R^2).

Tal i com es mostra a la Figura 37, a cerebel l'SB és lineal entre 25 i 100 µg de proteïna. Per realitzar els següents assaigs en placa, vam seleccionar la quantitat de 65 µg en un volum total d'assaig de 230 µL, que donava al voltant de 800 cpm i el percentatge de radiol·ligand unit era inferior al 6%.

La concentració final de proteïna pels assaigs de cerebel en placa (0.28 µg/µL) era equivalent a la dels assaigs de cerebel en tub (0.25 µg/µL) (Taula 15).

Pels assaigs en medul·la la quantitat de proteïna que es va escollir pels posteriors assaigs de competició en placa va ser de 100 µg en un volum d'assaig de 230 µL. Aquesta quantitat de proteïna (Figura 38) estava en el rang lineal de l'SB (de 25 a 115 µg), donava un senyal d'aproximadament 800 cpm i el percentatge de radiol·ligand unit era inferior al 10%.

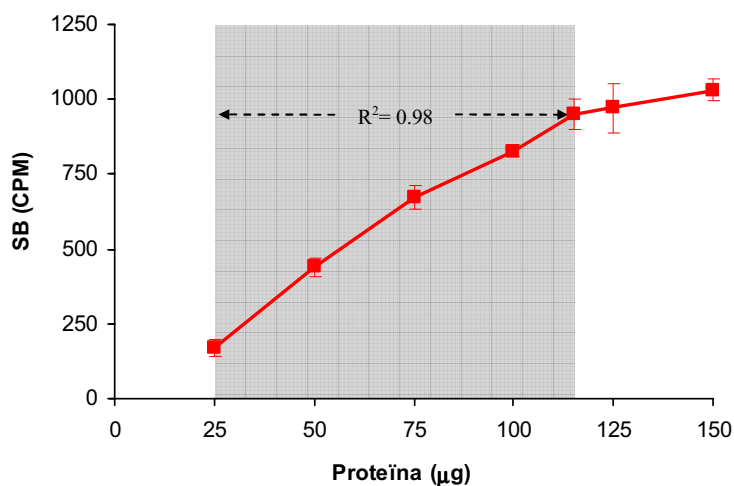


Figura 38. Determinació del rang lineal de proteïna (zona ombrejada) de medul·la de rata per l'assaig d'unió amb $^3\text{H-Ro15-1788}$ a placa Multiscreen_{HTS}. La quantitat de proteïna de l'eix de les abscisses correspon als 230 µL de volum d'assaig. Cada punt es va carregar per triplicat i la dada representa la mitjana \pm SEM. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals. Es mostra el coeficient de correlació al rang lineal (R^2).

Pels assaigs de medul·la en placa, la concentració final de proteïna (0.43 µg/µL) va ser lleugerament superior a la dels assaigs del mateix teixit en tub (0.30 µg/µL) (Taula 17).

1.2.2. Assaigs de saturació

A placa vàrem tornar a caracteritzar la unió del $^3\text{H-Ro15-1788}$ tant a cerebel com a medul·la per comprovar que les noves condicions d'assaig no afectaven els valors de B_{max} o K_d .

A cerebel (Figura 39) els tres assaigs de saturació que es van realitzar van donar una mitjana del valor de la B_{\max} de 1073 ± 102 fmol/mg de proteïna, molt similar als 1498 ± 62 fmol/mg de proteïna que prèviament havíem obtingut en els assaigs de saturació fets en tub (Taula 14).

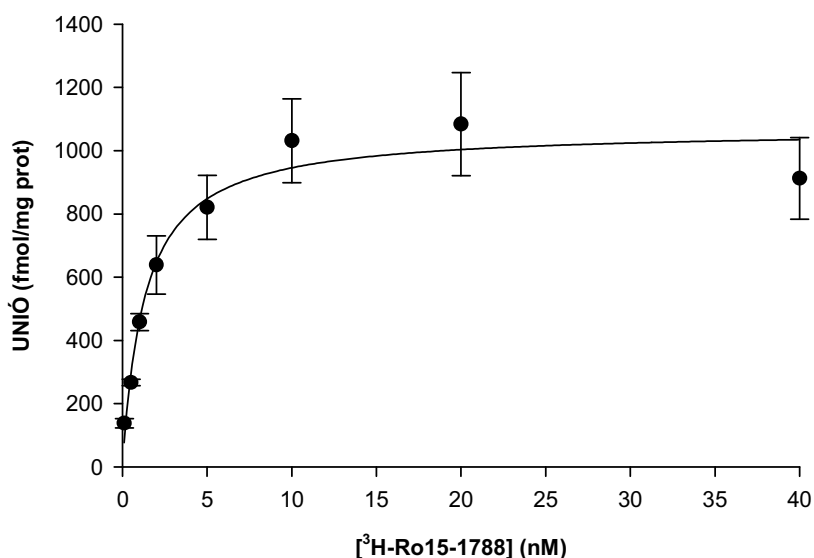


Figura 39. Corba dels assaigs de saturació del ³H-Ro15-1788 en homogenat de cerebel de rata. Cada punt representa la mitjana \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en placa. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals.

L'afinitat del ³H-Ro15-1788 pels receptors GABA_A de cerebel en l'assaig en placa va ser la mateixa que en tub, amb un promig de la K_d d'1.3 nM respecte a l'1.6 nM obtingut en tub. Tant els valors de B_{\max} com de K_d , concorden amb els valors descrits a la literatura.

Taula 14. Dades de la mitjana \pm SEM de la K_d i de la B_{\max} dels tres assaigs de saturació realitzats a cerebel en placa i tub. (1) Massotti, 1991 i (2) Santi, 1988.

	Placa manual	Tub	Bibliografia
B_{\max} (fmol/mg prot)	1073 ± 102	1498 ± 62	1200 ± 90 (1) 1300 ± 160 (2)
K_d (nM)	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.1 (1)
n	3	3	

De les concentracions de radiolligand que vam utilitzar a la corba de saturació, l'1 nM estava en el rang lineal, donava una mitjana de 1400 cpm d'SB i un NSB baix. A més a més, aquesta era la concentració dels assaigs en tub, de manera que es va seleccionar per a la realització dels assaigs de competició de cerebel en placa (Taula 15).

Taula 15. Condicions establertes per l'assaig del $^3\text{H-Ro15-1788}$ a cerebel amb placa Multiscreen_{HTS}.

	PLACA	TUB
Teixit	Cerebel de rata	Cerebel de rata
Volum d'assaig (μL)	230 (filtrats 200)	500
Proteïna (μg)	65 (0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	125 (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
$^3\text{H-Ro15-1788}$ (nM)	1	1
NSB (μM)	2	2
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	4-7	0- 4
Temps d'incubació (min)	60	60

A medul·la (Figura 40) els valors de K_d obtinguts en els assaigs en placa (1.2 ± 0.2 nM) van ser similars als de tub (1.9 ± 0.6 nM), encara que la densitat de receptors (330 ± 19 fmol/mg de proteïna) va ser lleugerament superior als valors que havíem obtingut en tub (Taula 16) però en tots dos casos equivalents als resultats descrits a la bibliografia.

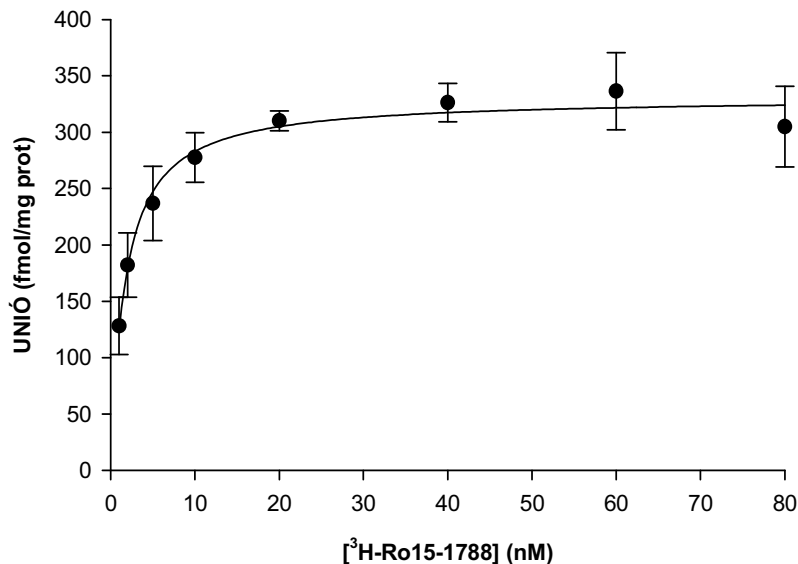


Figura 40. Corba dels assaigs de saturació del $^3\text{H-Ro15-1788}$ en homogenat de medul·la de rata. Cada punt representa la mitjana \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en placa. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals.

Taula 16. Dades de la mitjana \pm SEM de la K_d i de la B_{\max} dels tres assaigs de saturació realitzats a medul·la en placa i tub. (1) Massotti, 1991, (2) Santi, 1988 i (3) Watanabe, 1985.

	Placa manual	Tub	Bibliografia
B_{\max} (fmol/mg prot)	330 ± 19	219 ± 7	234 ± 27 (3) 500 ± 45 (2) 600 ± 45 (1)
K_d (nM)	1.2 ± 0.2	1.9 ± 0.3	1.8 ± 0.01 (3) 2.0 ± 0.2 (2) 1.0 ± 0.1 (1)
n	2	3	

De les concentracions de radiolligand que es troben en la part lineal de la corba de saturació, vam escollir l'1 nM pels assaigs de competició de medul·la en placa, donat que tenia unes 800 cpm i era la mateixa concentració que havíem seleccionat en els assaigs en tub. La Taula 17 recull les condicions finals pels assaigs de competició a medul·la espinal en placa Multiscreen_{HTS}.

Taula 17. Condicions fixades per l'assaig de ³H-Ro15-1788 a medul·la espinal amb placa Multiscreen_{HTS}.

	PLACA	TUB
Teixit	Medul·la espinal de rata	Medul·la espinal de rata
Volum d'assaig (μL)	230 (filtrats 200)	500
Proteïna (μg)	100 (0.43 μg/μL)	150 (0.30 μg/μL)
³H-Ro15-1788 (nM)	1	1
NSB (μM)	2	2
Temperatura (°C)	4-7	0-4
Temps d'incubació (min)	60	60

1.2.3. Assaigs de competició

Igual que havíem fet anteriorment en tub, un cop establertes les condicions finals pels assaigs en placa tant de cerebel com de medul·la, vàrem validar l'assaig realitzant corbes de competició amb els estàndards (Figures 41A i 42A).

La Taula 18 mostra les dades de la IC₅₀ i la K_i obtingudes als assaigs en placa i tub a cerebel, i les compara amb la bibliografia. Els valors a placa i tub són similars i comparables amb els de la literatura. Pel que fa a la potència, zopiclone, zolpidem, indiplon i flumazenil són aproximadament 2, 5, 47 i 72 vegades més potents que el zaleplon, respectivament.

Taula 18. Dades de la mitjana ± SEM de la IC₅₀ i de la K_i dels assaigs de competició realitzats amb els estàndards a cerebel en placa manual i tub. (1) Massotti, 1991, (2) Noguchi, 2002, (3) Sullivan, 2004, (4) Atack, 1999 i (5) Santi, 1988.

	Placa manual		Tub		Bibliografia	
	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	K _i (nM)
Flumazenil	3.5 (n=1)	2.0 (n=1)	1.9 ± 0.6 (n=5)	1.2 ± 0.3 (n=5)	1.0 ± 0.1 (5) 2.0 ± 0.1 (1) *	-
Indiplon	5.4 (n=1)	3.1 (n=1)	6.0 ± 2.4 (n=2)	3.7 ± 1.5 (n=2)	-	1.5 (3)
Zolpidem	51.4 ± 5.2 (n=6)	29.4 ± 3.0 (n=6)	62.5 ± 9.3 (n=5)	38.2 ± 5.7 (n=5)	40 ± 0.9 (1) *	13.8 (3) 27 (4)
Zaleplon	254 ± 23 (n=8)	145 ± 13 (n=8)	299 ± 35 (n=6)	183 ± 22 (n=6)	167 (2) (136-207) 95%	50.9 (3)
Zopiclone	144 (n=1)	82 (n=1)	-	-	113 (94-136) (2)	-

* Dades obtingudes amb ³H-flunitrazepam (agonista no selectiu del receptor GABA_A)

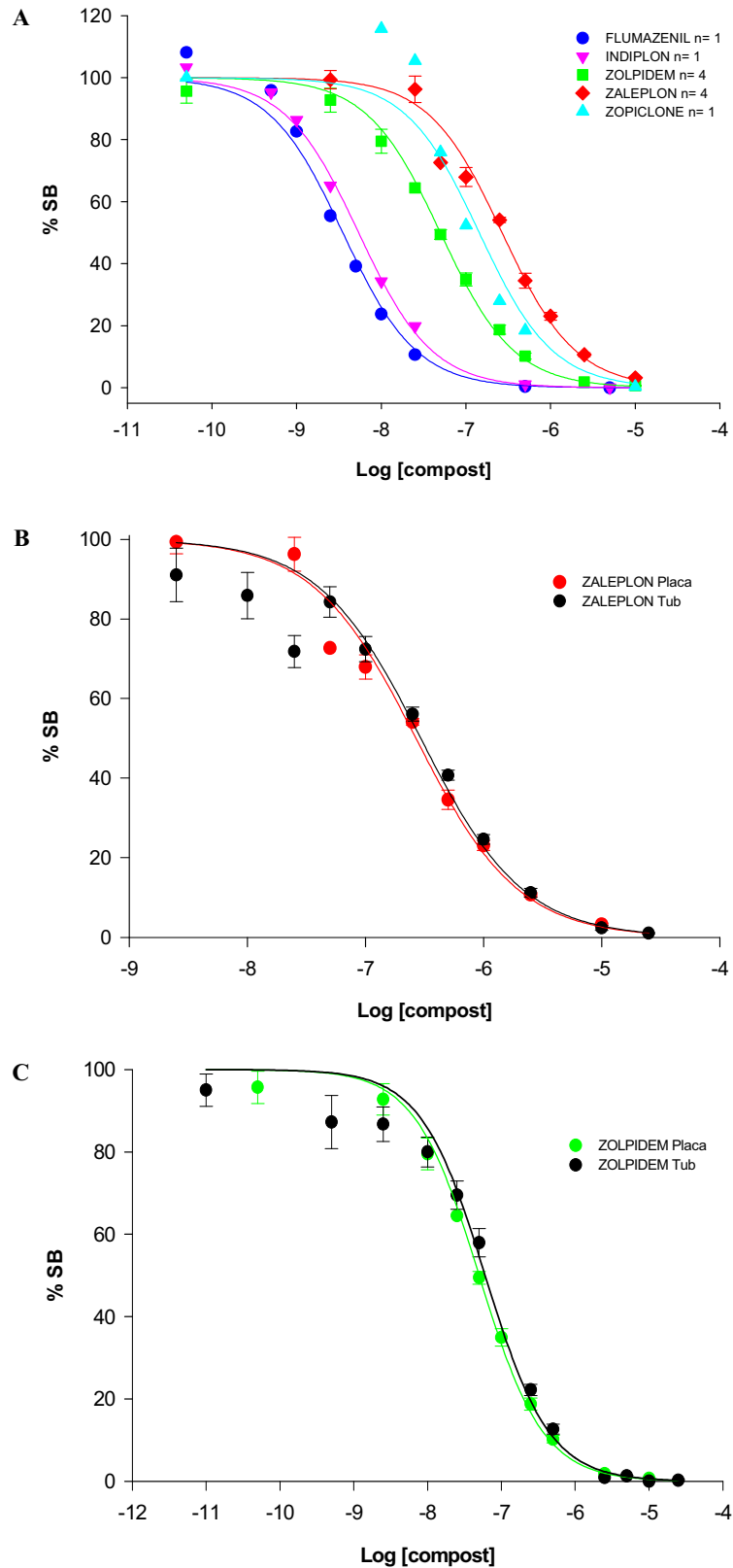


Figura 41. **A.** Corbes de competició dels estàndards realitzades a cerebel en placa Multiscreen_{HTS} manualment. **B.** Corbes dosi-resposta del zaleplon realitzades a tub i placa. **C.** Corbes dosi-resposta del zolpidem realitzades a tub i placa. Cada punt representa la mitjana \pm SEM del duplicat. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals.

A medul·la els valors de la IC_{50} i la K_i dels estàndards realitzats manualment a placa es recullen a la Taula 19, juntament amb els de tub i els de la bibliografia. Les dades a placa són similars a les obtingudes prèviament a tub i a la literatura.

Taula 19. Dades de la mitjana \pm SEM de la IC_{50} i de la K_i dels assaigs de competició realitzats amb els estàndards a medul·la espinal en placa manual i tub. (1) Massotti, 1991, (2) Noguchi, 2002, (3) Atack, 1999 i (4) Santi, 1988.

	Placa manual			Tub			Bibliografia		
	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	α_2/α_1	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	α_2/α_1	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	α_2/α_1
Flumazenil	2.4 \pm 0.3 (n=2)	1.3 \pm 0.1 (n=2)	1	3.2 \pm 1.1 (n=2)	2.1 \pm 0.7 (n=2)	2	1.9 \pm 0.1 (1-4) *	-	1- 2
Indiplon	43.8 (n=1)	23.8 (n=1)	8	67.6 (n=1)	44.5 (n=1)	12	24 (3) **	-	8
Zolpidem	1320 \pm 103 (n=3)	717 \pm 56 (n=3)	24	1145 \pm 107 (n=3)	754 \pm 70 (n=3)	20	> 500 (1) *	-	> 9- 18
Zaleplon	2563 \pm 97 (n=3)	1392 \pm 53 (n=3)	10	1978 \pm 48 (n=3)	1303 \pm 32 (n=3)	7	2385 (2)	-	14
Zopiclone	91.0 (n=1)	49.4 (n=1)	1	-	-		223 (2) 160-325	-	2

* Dades obtingudes amb 3H -flunitrazepam (agonista no selectiu del receptor $GABA_A$)

** Dades obtingudes amb cèl·lules transfectades amb el cDNA de la subunitat α_2

Zaleplon amb una K_i de 1392 \pm 53 nM és l'estàndard amb menys afinitat pels receptors $GABA_A$ presents a medul·la. Comparada amb la de zaleplon, la K_i de zolpidem, zopiclone, indiplon i flumazenil és de l'ordre de 2, 28, 58 i 1070 vegades inferior i per tant aquests estàndards són més potents inhibint la unió del radiolligand (Figura 42 A).

Si comparem la K_i obtinguda en placa a medul·la (α_2) amb la de cerebel (α_1), flumazenil i zopiclone tenen un valor similar en ambdós teixits (Taula 19). La resta d'estàndards presenten major afinitat pels receptors $GABA_A$ de cerebel amb una selectivitat de 8, 10 i 24 vegades per indiplon, zaleplon i zolpidem respectivament. Aquests valors de selectivitat són similars als calculats anteriorment a tub i comparables amb els de la bibliografia.

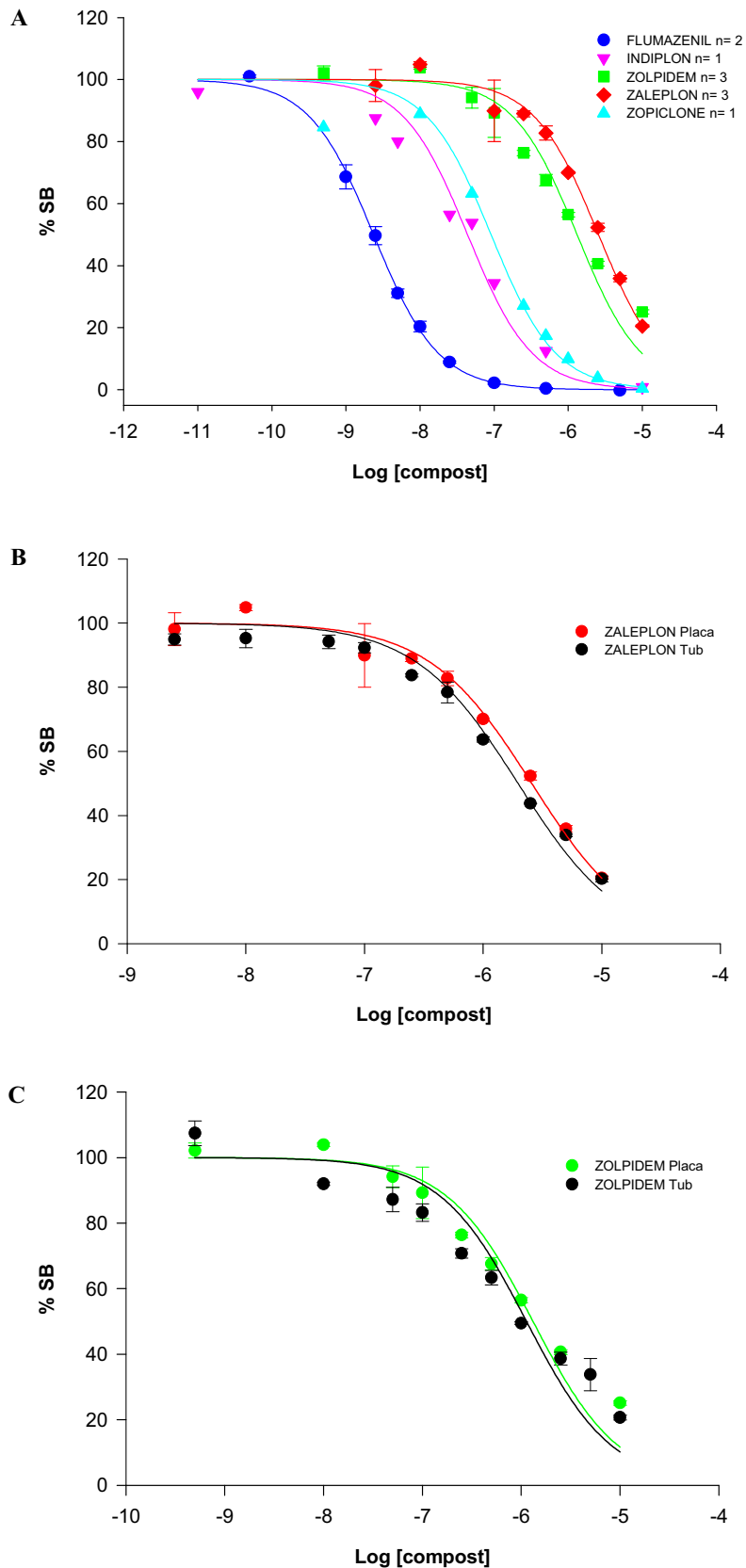


Figura 42. A. Corbes de competició dels estàndards realitzades a medul·la en placa Multiscreen_{HTS} manualment. **B.** Corbes dosi-resposta del zaleplon realitzades a tub i placa. **C.** Corbes dosi-resposta del zolpidem realitzades a tub i placa. Cada punt representa la mitjana \pm SEM del duplicat. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals.

1.2.4. Qualitat dels assaigs en placa realitzats manualment

Finalment vàrem calcular el factor Z' dels assaigs de competició realitzats manualment a placa amb cerebel o medul·la amb els estàndards.

A placa en disminuir el volum d'assaig, també ens disminueix el senyal màxim i per tant la banda de separació és més estreta. Tot i així el promig del factor Z' va ser de 0.70 en el cas de cerebel i de 0.73 a medul·la. Els valors de Z' són similars als dels assaigs en tub i superiors a 0.50.

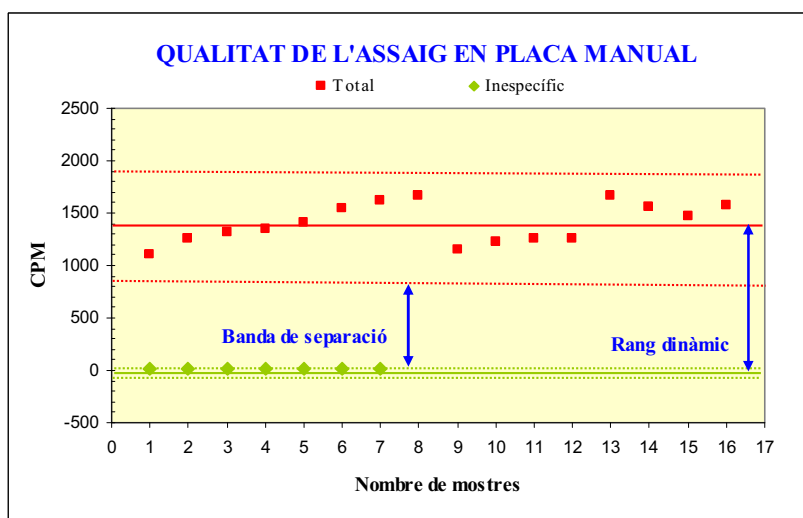


Figura 43. Representació del senyal total i inespecífic d'un assaig de competició representatiu dels realitzats en placa manualment a cerebel.

1.3. Automatització de l'assaig en placa Multiscreen_{HTS} amb el robot Multiprobe II HT Ex (Perkin Elmer)

Amb l'assaig a placa posat al punt, el següent pas per augmentar el rendiment del cribratge de compostos, va ser l'automatització de l'assaig amb l'estació robotitzada Multiprobe II HT Ex (Perkin Elmer).

L'equip disposa d'una calibració gravimètrica amb aigua destil·lada dels volums de dispensació (*Performance file*) tant amb puntes fixes com amb les d'un sol ús (DT). El següent pas era comprovar també mitjançant la calibració gravimètrica amb aigua destil·lada quin mode de dispensació era el més adequat per posar al punt el nostre protocol analitzant els valors del coeficient de variació (CV) i del percentatge d'inexactitud (% Inacc) indicadors de precisió i inexactitud respectivament.

Per tal d'agilitzar el procés les validacions inicials només es van realitzar amb una punta (n° 1) de l'equip, un cop seleccionada la millor condició que utilitzaríem per crear el protocol automatitzat vam repetir el procés amb les 8 puntes a la vegada (Figura 44).

1.3.1. Optimització dels modes de dispensació

El primer que vàrem avaluar van ser les **puntes fixes**, dispensant a diferents nivells de l'alçada del pou: *0% well* (fons del pou), *80% well* (80% de l'alçada màxima del pou) o sobre líquid. Els volums escollits van ser 10, 50, 100, 500 i 1000 µL per tal de cobrir tot el rang de volums que ens permet treballar amb les puntes fixes. En tots els volums el mode de dispensació que vam utilitzar va ser el *waste*, excepte amb el de 10 µL que vam analitzar tan amb el mode *blowout* recomanat per volums menors a 25 µL, com amb el *waste*.

Els resultats van mostrar que tot i que el mode *blowout* és el recomanat per volums petits, a 10 µL teníem millor CV i % Inacc amb el mode *waste* (Taula 20).

De les tres condicions de dispensació la que ens va donar pitjors valors de precisió i exactitud va ser la dispensació sobre líquid, principalment en els volums de 10-100 µL. A priori aquesta dispensació podia semblar més adequada que no pas la dispensació al 80% de l'alçada del pou (*80% well*) donat que la tensió superficial del líquid podria afavorir la dispensació del volum, en canvi vam tenir millors resultats dispensant sobre el fons del pou o al *80% well* (Taula 20).

Taula 20. Mitjana dels volums dispensats amb puntes fixes (n=10), % Inacc i CV en les diferents condicions de dispensació i dels valors acceptables que indiquen les especificacions tècniques de l'equip. El volum de 10 µL a *0% well* està dispensat amb el mode *blowout* mentre que al *80% well* està realitzat amb el mode *waste*.

Volum (µL)	0% well			80% well			Superfície del líquid			Especificacions tècniques	
	Volum dispensat (µL)	% Inacc	CV	Volum dispensat (µL)	% Inacc	CV	Volum dispensat (µL)	% Inacc	CV	% Inacc	CV
10	9.7	2.83	3.09	10.0	0.36	1.08	8.5	14.73	1.06	2.5	3.0
50	49.8	0.47	0.10	50.4	-0.80	0.43	48.6	2.76	0.23		
100	99.9	0.11	0.05	100.0	-0.05	0.07	98.8	1.24	0.43	2.5	1.0
500	499.2	0.16	0.04	500.7	-0.15	0.02	498.7	0.26	0.10		
1000	999.6	0.04	0.03	1001.3	-0.13	0.03	998.7	0.13	0.03		

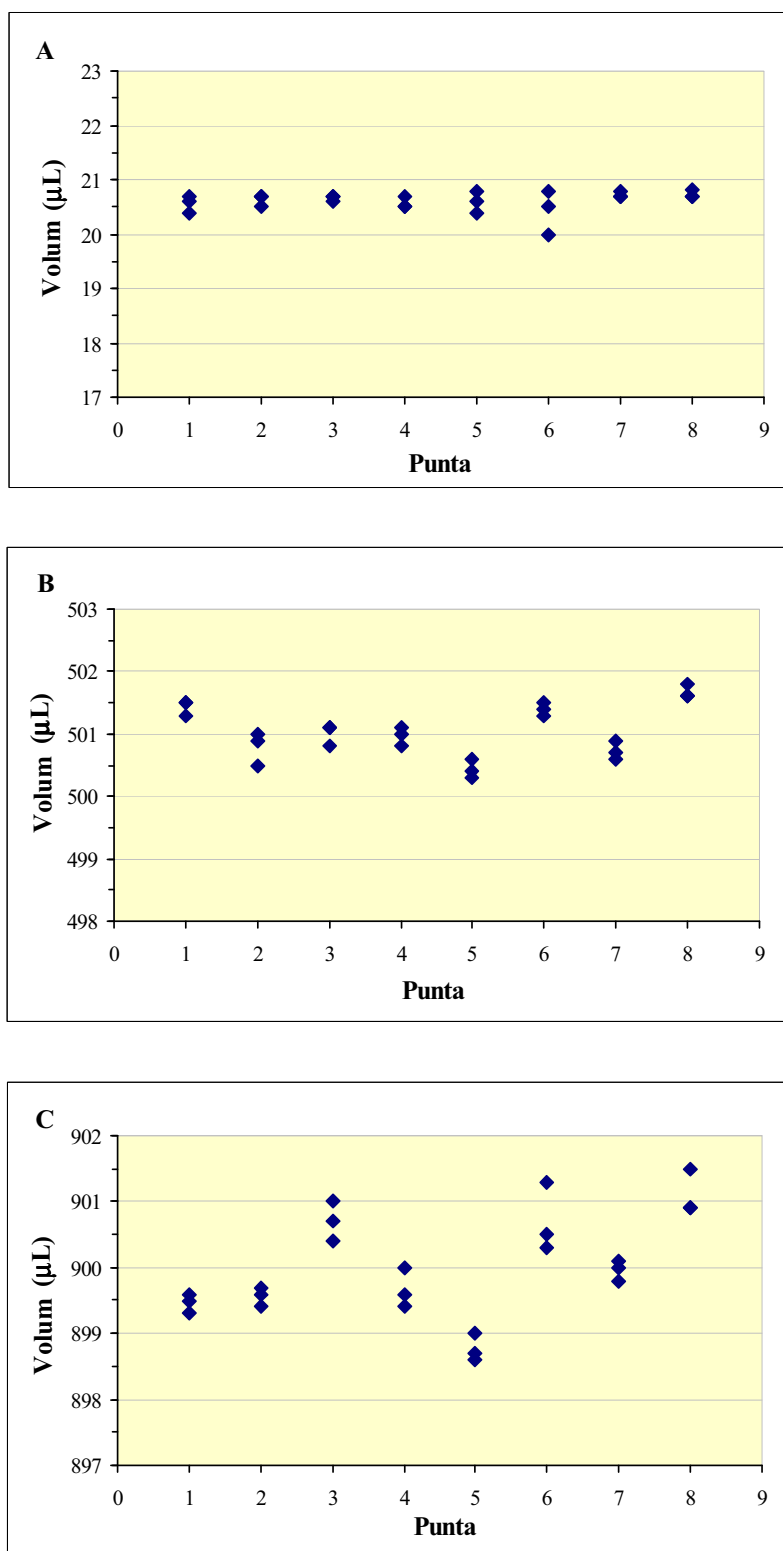


Figura 44. Gràfiques de la dispensació amb puntes fixes d'aigua destil·lada al 65% de l'alçada del pou. **A.** 20 µL. **B.** 500 µL. **C.** 900 µL.

Posteriorment vàrem avaluar les **puntes d'un sol ús (DT)** que ens interessaven sobretot per la dispensació del radiolligand i el teixit, per evitar així la contaminació de les puntes fixes. Com que ja havíem comprovat anteriorment que la dispensació en alçada donava uns valors òptims de precisió i exactitud, vàrem analitzar les puntes de 20 i 200 µL DT al 65% de l'alçada màxima del pou. Els volums que vam analitzar de 10 i 50 µL per cada una de les DT respectivament ens van donar uns valors de CV i % Inacc inferiors als indicats per les especificacions de l'equip (Taula 21).

Taula 21. Mitjana dels volums dispensats amb les puntes d'un sol ús (DT) (n=10), % Inacc, CV i valors acceptables que indiquen les especificacions tècniques de l'equip.

Volum (µL)	20 µL DT			200 µL DT			Especificacions tècniques	
	Volum dispensat (µL)	% Inacc	CV	Volum dispensat (µL)	% Inacc	CV	% Inacc	CV
10	10.23	-2.3	0.65				4.0	2.0
50				49.9	0.19	0.89	3.0	1.0

Fins ara totes les calibracions que havíem fet només s'havien realitzat amb aigua destil·lada, però els compostos estan dissolts amb DMSO i la concentració mare sempre és amb DMSO al 100%, que té una densitat superior a la de l'aigua ($d = 1.103 \text{ g/L}$). Per l'aspiració i dispensació del DMSO vàrem modificar els paràmetres de dispensació que té l'equip (*performance file*) per treballar amb líquids de la mateixa densitat que l'aigua, disminuint-ne la velocitat d'aspiració i dispensació. Els resultats amb puntes fixes per al volum de 10 µL realitzat amb les 8 puntes per triplicat ens van donar una mitjana d'11.1 mg, amb un CV de l'1.81% i un % Inacc de -0.181 totalment acceptables i que ens permetien treballar amb precisió i exactitud amb el DMSO.

Per últim, l'equip disposa d'un procediment de **multidispensació**. Com el seu nom indica, permet realitzar múltiples dispensacions a partir d'una sola aspiració el qual és més ràpid que la dispensació normal. Aquest procediment era interessant per fer més ràpids els rentats de la placa un cop aturada la reacció.

Les especificacions de l'equip recomanen no més de 4 dispensacions per aspiració. Les primeres proves que vàrem realitzar amb diferents volums mostraven en tots els casos que la primera dispensació era de menys volum que les altres tres restants. Per resoldre aquest problema aquest procediment disposa d'un paràmetre, el *dispense back*, que consisteix en

dispensar un percentatge del volum aspirat abans d'iniciar la multidispensació. En els volums que ens interessava utilitzar la multidispensació; de 50 a 1000 μL ; vam solucionar l'efecte de la primera dispensació amb un *dispense back* del 10% del volum aspirat.

1.3.2. Assaigs de competició

Un cop establerts els paràmetres d'automatització de l'assaig de competició amb el Multiprobe II HT Ex, vam validar-lo amb els estàndards (Figura 45 A.). La validació només la vam fer a cerebel, per comprovar que els assaigs realitzats amb el robot eren equiparables als de placa fets manualment.

Els valors de la IC_{50} i la K_i obtinguts amb els estàndards en els assaigs a cerebel totalment automatitzats es recullen a la Taula 22, conjuntament amb els de placa realitzada manualment i els trobats a la literatura. Els valors dels assaigs realitzats amb el Multiprobe són pràcticament iguals als dels assaigs manuals en placa i per tant la relació de la potència dels estàndards entre si i del zaleplon respecte a la resta d'estàndards es manté. En l'assaig automatitzat, el zopiclone, zolpidem, indiplon i flumazenil són al voltant de 2, 5, 40 i 50 vegades més potents que el zaleplon respectivament.

Taula 22. Dades de la mitjana \pm SEM de la IC_{50} i de la K_i dels assaigs de competició a cerebel realitzats amb els estàndards en placa manual i automatitzada. (1) Massotti, 1991, (2) Noguchi, 2002, (3) Sullivan, 2004, (4) Atack, 1999 i (5) Santi, 1988.

	Placa automatitzada		Placa manual		Bibliografia	
	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	IC_{50} (nM)	K_i (nM)	IC_{50} (nM)	K_i (nM)
Flumazenil	4.5 \pm 1.5 (n=3)	2.6 \pm 0.9 (n=3)	3.5 (n=1)	2.0 (n=1)	1.0 \pm 0.1 (5) 2.0 \pm 0.1 (1) *	-
Indiplon	6.4 \pm 0.5 (n=3)	3.6 \pm 0.3 (n=3)	5.4 (n=1)	3.1 (n=1)	-	1.5 (3)
Zolpidem	51.6 \pm 1.6 (n=3)	29.5 \pm 0.9 (n=3)	51.4 \pm 5.2 (n=6)	29.4 \pm 3.0 (n=6)	40 \pm 0.9 (1) *	13.8 (3) 27 (4)
Zaleplon	229 \pm 39 (n=3)	131 \pm 22 (n=3)	254 \pm 23 (n=8)	145 \pm 13 (n=8)	167 (2) (136-207) 95%	50.9 (3)
Zopiclone	111 \pm 11 (n=3)	63.8 \pm 6.2 (n=3)	144 (n=1)	82 (n=1)	113 (94-136) (2)	-

* Dades obtingudes amb ^3H -flunitrazepam (agonista no selectiu del receptor GABA_A)

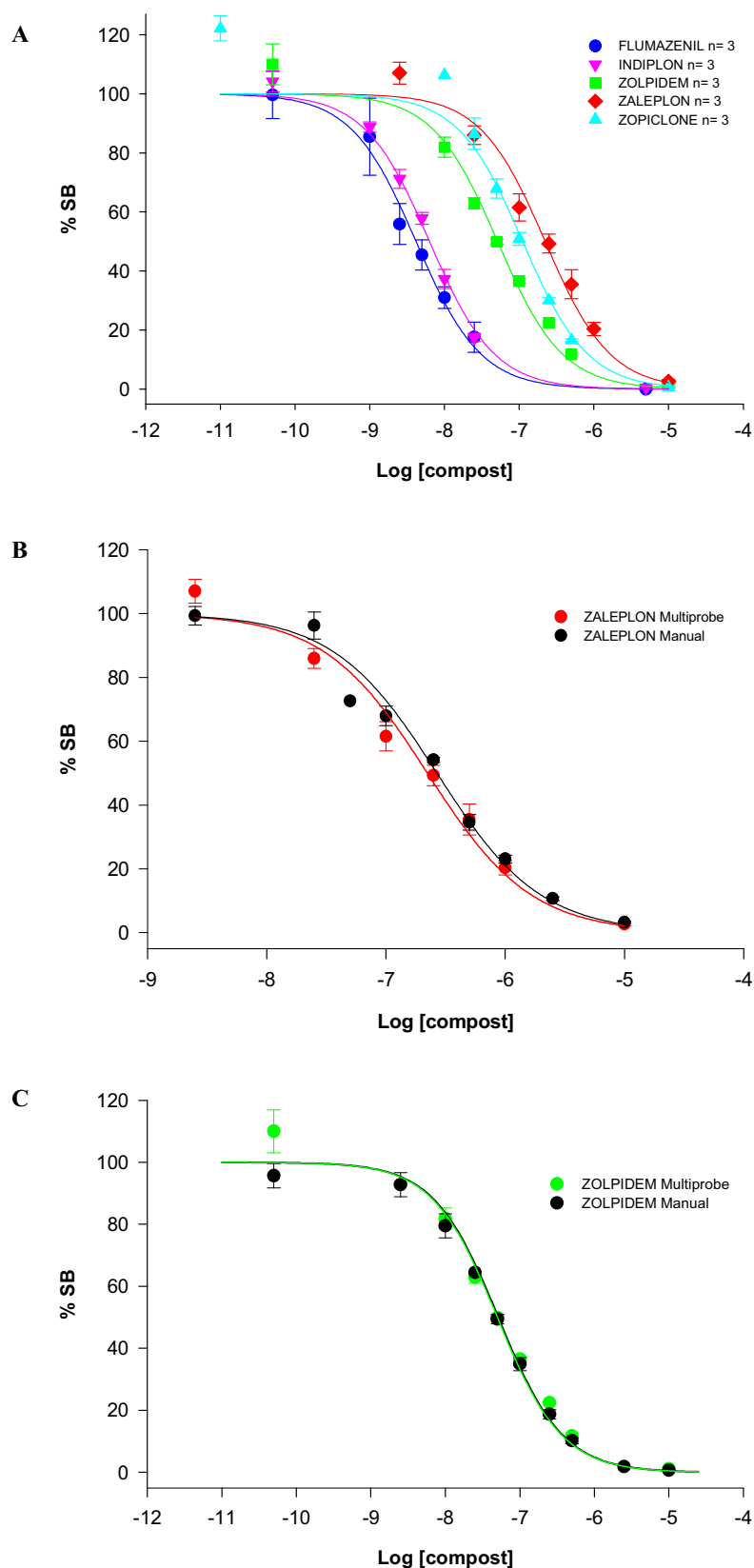


Figura 45. A. Corbes de competició dels estàndards realitzades a cerebel, en assaigs automatitzats en placa Multiscreen_{HTS}. B. Comparació de les corbes de zaleplon realitzades a placa manualment o automatitzades. C. Comparació de les corbes de zolpidem realitzades a placa manualment o automatitzades. Cada punt representa la mitjana \pm SEM del duplicat. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals.

1.3.3. Qualitat dels assaigs en placa automatitzats

Per acabar vàrem avaluar la qualitat dels assaigs de competició automatitzats (Figura 46) amb el factor Z' . La mitjana del factor Z' va ser de 0.59.

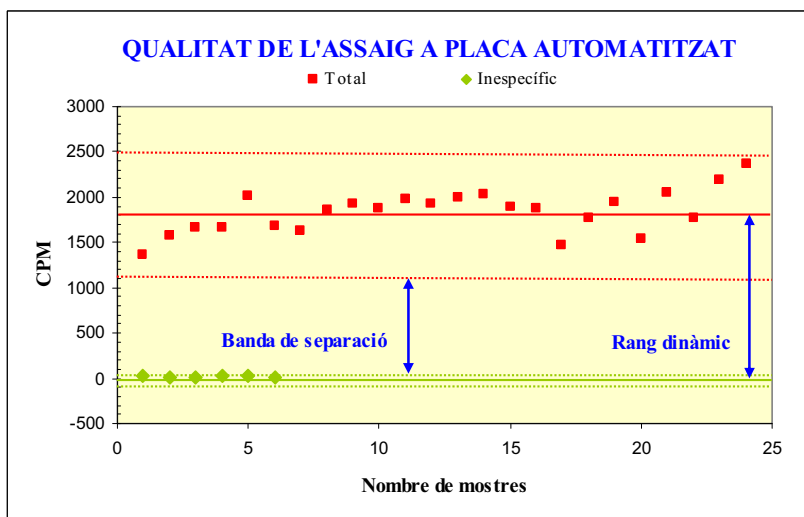


Figura 46. Representació del senyal total i inespecífic d'un assaig de competició a cerebel representatiu dels processats amb el robot en placa.

Comparativament amb els assaigs de competició en format placa realitzats manualment, amb els assaigs automatitzats el valor del factor Z' passa a ser de 0.70 a 0.59. Malgrat que la qualitat de l'assaig a disminuït, el valor del factor Z' és superior a 0.50 i per tant continua essent altament acceptable.

2. CRIBRATGE DELS COMPOSTOS AMB ELS ASSAIGS D'UNIÓ AMB RADIOLLIGAND *IN VITRO*

Donat que es desconeix l'estructura del lloc d'unió de les BDZ al receptor GABA_A, el Departament de Química Mèdica del centre d'R+D de Ferrer Internacional, es va basar en l'estructura del zolpidem per identificar les interaccions clau que el lligand ha de tenir amb el receptor per tenir afinitat (farmacòfor), i poder dissenyar estructures novedoses (Figura 47).

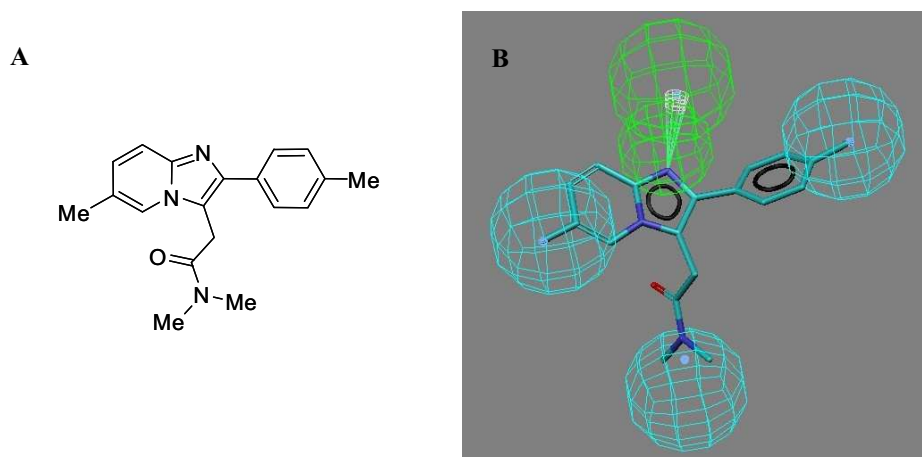


Figura 47. A. Estructura química i B. Model farmacofòric del zolpidem. En blau els punts hidrofòbics i en verd els acceptors de pont d'hidrogen (HBA).

En total es van sintetitzar i cribrar *in vitro*, 1214 noves entitats químiques agrupades en 21 famílies diferents (Taula 23), de les quals 5 estan patentades (Figura 48).

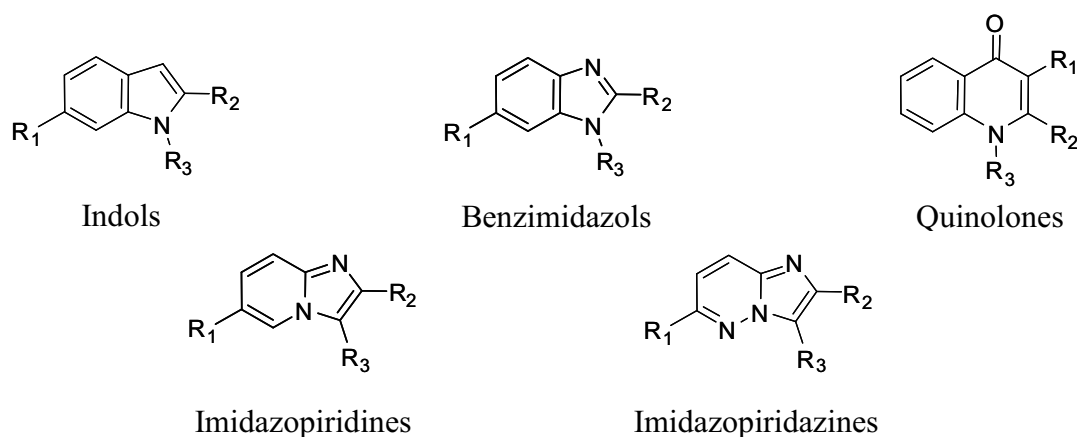


Figura 48. Estructura química de les 5 famílies patentades sintetitzades a partir del model farmacofòric del zolpidem.

Taula 23. Nombre de compostos cribrats de les respectives famílies químiques. Nombre de compostos amb percentatge d'inhibició del radiolligand a la concentració de 10^{-7} M igual o superior al 30, 50 i 90%.

FAMÍLIA QUÍMICA	Nº COMPOSTOS	% D'INHIBICIÓ A 10^{-7} M		
		≥ 30%	≥ 50%	≥ 90%
Indols	28	2	-	-
Indol invers	9	1	-	-
Imidazotriazines	24	1	-	-
Imidazotiazols	4	-	-	-
Imidazotiadiazols	18	1	-	-
Imidazopirimidines	23	1	-	-
Imidazopiridines	161	49	31	11
Imidazopiridazines	271	111	71	40
Imidazopirazolopiridines	2	-	-	-
Imidazopirazines	4	1	-	-
Imidazobenzotiazols	23	2	1	-
Imidazobenzopirazols	3	-	-	-
Imidazobenzimidazols	47	-	-	-
Benzisoxazols	4	-	-	-
Benzimidazols	38	-	-	-
Quinolones	147	37	10	2
Pirrolopirimidines	11	-	-	-
Imidazopirimidines	66	39	28	6
Indazolones	15	-	-	-
Pirrolpirazinones	3	-	-	-
Altres	333	-	-	-

Amb els assaigs de competició amb radiolligand *in vitro*, primer es calculava el percentatge d'inhibició de cada compost a cerebel (on predomina la subunitat α_1 del receptor GABA_A) a dues concentracions (100 nM i 10 μ M). La Taula 24 recull les dades obtingudes en tres compostos representatius de cadascuna d'aquestes 5 famílies conjuntament amb la dels estàndards. D'aquests compostos els que pertanyen a les famílies de les imidazopiridines, imidazopiridazines i quinolones (a excepció del GF-012009-00) tenen a cerebel un percentatge d'inhibició a 100 nM superior a la del zolpidem.

Taula 24. Percentatges d'inhibició a cerebel i medul·la de rata dels estàndards i dels compostos representatius de cada família.

	CEREBEL				MEDUL·LA				
	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁵ M	5x 10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M
Flumazenil			76.3	17.3				79.6	31.4
Zolpidem	99.4	71.2	16.7		74.8	42.0	21.6		
Zaleplon	97.2	26.1			78.7	22.9			
Zopiclone	99.6	53.8			99.6	82.6		11.1	
Indiplon			65.7	13.7	99.2	87.5	65.7		
Indols									
GF-006493-00	65.0	31.5							
GF-009383-00	73.6	37.2			12.2		0		
GF-009467-00	72.2	0,0							
Benzimidazols									
GF-006231-00	41.8	12.1							
GF-006234-00	90.6	8.3			43.9		0		
GF-009445-00	47.1	0,0							
Quinolones									
GF-012009-00	99.9	52.6							
GF-017048-00	99.9	88.0							
GF-017162-00	99.7	85.2							
Imidazopiridines									
GF-012263-00	100.4	93.4			98.8		74.1		
GF-012264-00	100.4	79.7			97.7		25.6		
GF-012971-00	100.3	88.2			98.2		54.5		
Imidazopiridazines									
GF-015621-00	100.3	97.5			97.7		45,0		
GF-016641-00	99.8	81.2			86.2		26.0		
GF-016783-00	101.3	95.5			98.7		74.4		

Seguint l'estratègia de cribratge (Figura 49), els compostos que a la concentració de 100 nM inhibien la unió del radiolligand més d'un 35%, es determinava la seva activitat hipnòtica *in vivo* mitjançant el test d'inhibició de l'activitat motora espontània (SMA) en ratolí (Taula 33, pàgina 148. Dades obtingudes per la secció de Farmacologia del Departament de Ciències Biològiques i Biotecnologia del centre d'R+D de Ferrer Internacional). En una tercera fase, els compostos amb una inhibició de l'SMA superior al 30% a la dosi de 0.98 µmol/kg, es determinava *in vitro* el percentatge d'inhibició a medul·la (on predomina la subunitat α_2 del receptor GABA_A) a 100 nM i 10 µM (Taula 24) i la seva K_i, tant a cerebel com a medul·la, per tal de calcular-ne la selectivitat (Taula 25 i Figura 50).

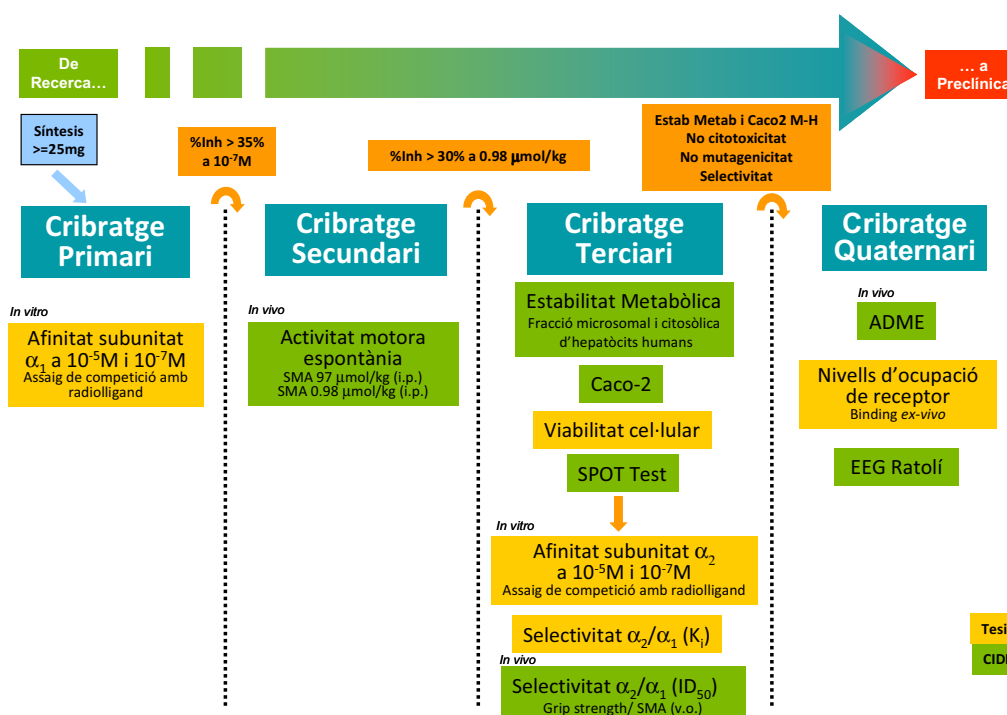


Figura 49. Estratègia de cribratge per a seleccionar el compost més adequat per a la fase preclínica.

Taula 25. Constant d'inhibició (K_i) a cerebel i medul·la dels estàndards i dels compostos seleccionats.

	CEREBEL (α_1)	MEDUL·LA (α_2)	Selectivitat
	Mitjana \pm SEM (nM)	Mitjana \pm SEM (nM)	α_2/α_1
Flumazenil	2.4 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1	1
Zolpidem	29.5 \pm 1.9	717 \pm 56	24
Zaleplon	141 \pm 11	1392 \pm 53	10
Zopiclone	68.4 \pm 6.4	49.4	1
Indiplon	3.5 \pm 0.3	23.8	7
GF-015621-00	1.9	155.5	81
GF-016641-00	5.9	1022	173
GF-016783-00	7.0	31.3	5

El quocient entre la K_i obtinguda a medul·la (α_2) i a cerebel (α_1) ens dona el valor de la selectivitat per la subunitat α_1 .

De les tres imidazopiridazines seleccionades, la GF-016783-00 té 5 vegades més afinitat per la subunitat α_1 que per l' α_2 . Els altres dos compostos, GF-015621-00 i GF-016641-00, tenen un valor de selectivitat de 81 i 173 respectivament.

Zolpidem amb una afinitat aproximadament 24 vegades superior per l' α_1 que per l' α_2 , és l'estàndard més selectiu.

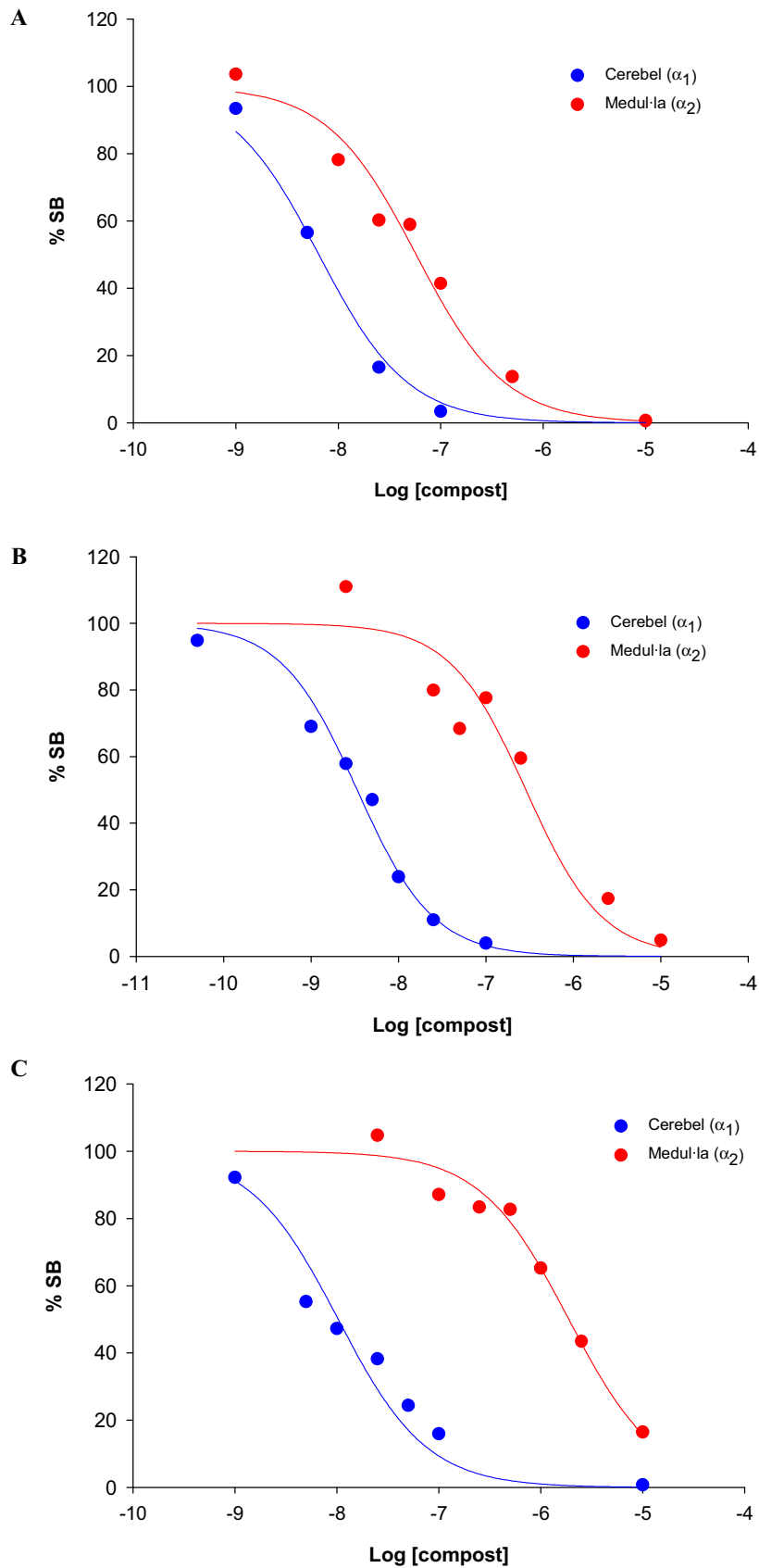


Figura 50. Corbes de competició a cerebel i medul·la de rata dels tres compostos seleccionats. **A.** GF-016783-00. **B.** GF-015621-00. **C.** GF-016641-00. Com més gran és la separació entre les dues corbes, major és la selectivitat per α_1 del compost. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals.

3. NIVELLS D'OCUPACIÓ DEL RECEPTOR GABA_A

Un cop establerta l'afinitat i selectivitat *in vitro*, vam voler determinar a diferents dosis el grau d'ocupació del receptor GABA_A per part dels compostos en estudi, en determinades àrees del cervell (on predomina una determinada subunitat del receptor) i relacionar-ho amb l'efecte observat en els assaigs de comportament *in vivo*.

Inicialment es van posar al punt els assaigs d'unió amb radiolligand *ex-vivo* amb rates mascle albines de la soca Sprague-Dawley OFA, donat que era el model experimental que es trobava millor descrit a la bibliografia. Posteriorment els assaigs es van posar al punt en ratolí, i es van determinar els nivells d'ocupació del receptor GABA_A pels tres compostos seleccionats i pels estàndards zolpidem i diazepam a còrtex, cerebel i medul·la.

3.1. Posada al punt en còrtex de rata i el sistema de filtració per a tubs Brandel

3.1.1. Cinètica d'associació

La cinètica d'associació als assaigs *ex-vivo* del ³H-Ro15-1788 en homogenats de còrtex de rata, mostra que el radiolligand té una velocitat d'associació ràpida, amb un màxim d'unió que s'assoleix als 10 minuts i que es manté estable fins al 60 minuts (Figura 51).

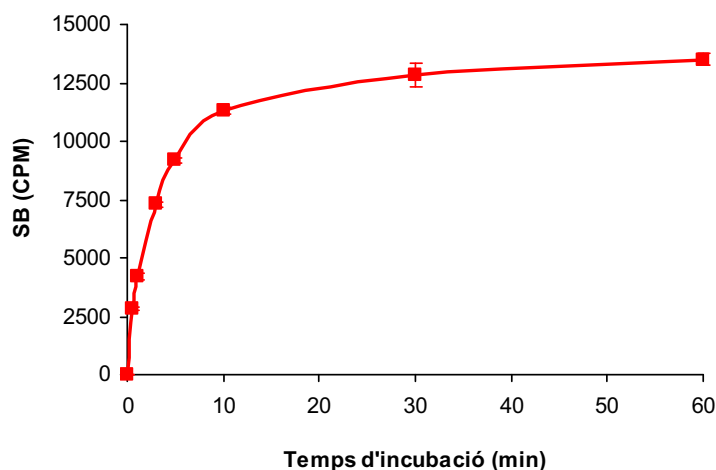


Figura 51. Cinètica d'associació realitzada en tub del ³H-Ro15-1788 en homogenats de còrtex de rata. Cada punt es va carregar per triplicat i la dada representa la mitjana ± SEM.

3.1.2. Variació de l'ocupació en funció del temps d'incubació

Per tal de no infravalorar l'ocupació en els assaigs d'unió amb radiolligand *ex-vivo*, és important evitar la dissociació del complex lligand-receptor, ja sigui degut a la dilució del teixit en l'homogeneïtzació o en la incubació amb el tampó d'assaig.

Per determinar el temps d'incubació, vàrem estudiar la variació de l'ocupació en funció del temps d'assaig en homogenats de còrtex de rata, a les quals se'ls havia administrat via oral 3 mg/kg de flumazenil 30 minuts abans del seu sacrifici. Com es pot observar a la Figura 52 i a la Taula 26, l'ocupació disminueix d'un 80% als 2 minuts a un 31% als 60 minuts.

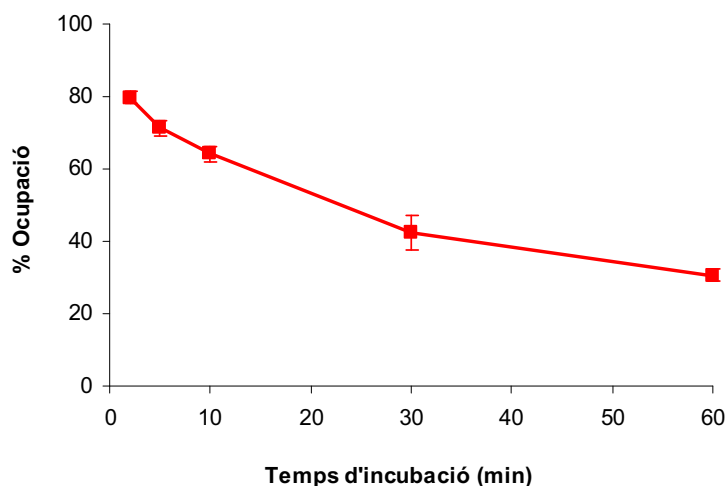


Figura 52. Efecte del temps d'incubació sobre l'ocupació dels receptors GABA_A de còrtex de rata pel flumazenil. Cada punt es va carregar per triplicat i la dada representa la mitjana \pm SEM.

Els percentatges d'ocupació del flumazenil obtinguts a diferents temps d'assaig conjuntament amb les dades referenciades a la bibliografia es recullen a la Taula 26. A la bibliografia, l'ocupació disminueix un 20% si es prolonga el temps d'incubació de 2 a 5 minuts. Amb les nostres condicions d'assaigs hem aconseguit que aquesta disminució sigui només d'un 9%. Tanmateix, vam fixar en 2 minuts el temps dels assaigs *ex-vivo*.

Taula 26. Variació de l'ocupació del flumazenil a la dosi de 3 mg/kg sobre els receptors GABA_A de còrtex de rata en funció del temps d'assaig. Dades de la mitjana \pm SEM del triplicat. La columna de la dreta correspon als valors de la bibliografia (Li, 2006).

Temps (min)	Flumazenil	
2	80 \pm 1,7	70
5	71 \pm 2,1	50
10	64 \pm 2,1	40
30	42 \pm 4,9	31
60	31 \pm 1,8	12

3.1.3. Determinació de la quantitat de mostra

A la Figura 53 es pot observar la unió específica del radiolligand respecte a volums creixents d'homogenat de còrtex de rata. La unió és lineal fins a 100 μ L de mostra, però a partir dels

40 μL el percentatge de radiolligand unit és superior al 10%. Per tant es va escollir pels assaigs *ex-vivo* de còrtex de rata en tub, un volum de 35 μL que corresponien a $105 \pm 5 \mu\text{g}$ de proteïna aproximadament, i que donaven un senyal al voltant de 7500 cpm.

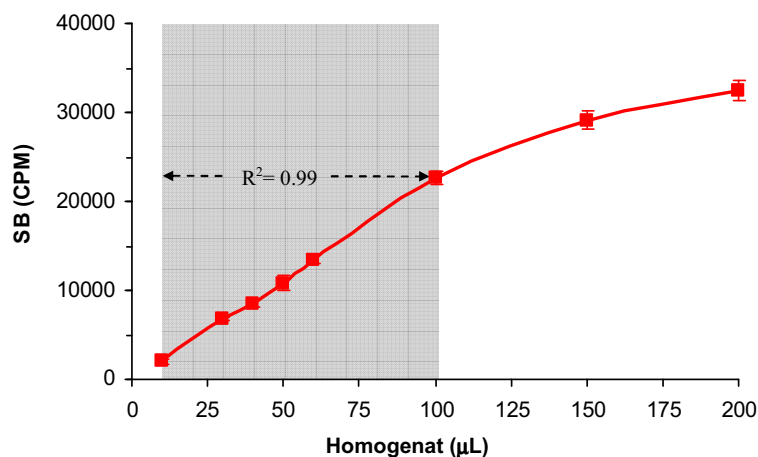


Figura 53. Determinació del rang lineal de proteïna (zona ombrada) pels assaigs *ex-vivo* amb $^3\text{H-Ro15-1788}$ a còrtex de rata. L'eix de les abscisses representa el volum d'homogenat en lloc de la quantitat de proteïna, donat que per evitar la dissociació del lligand al receptor, en les corbes dosi-resposta dels assaigs *ex-vivo* dispensàvem el mateix volum d'homogenat per a totes les mostres i posteriorment corregíem les comptes per la quantitat de proteïna. Cada punt es va carregar per triplicat i la dada representa la mitjana \pm SEM. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals. Es mostra el valor del coeficient de correlació (R^2) en el rang lineal.

La concentració final de proteïna pels assaigs *ex-vivo* de còrtex de rata realitzats a tub es troba entre 0.20- 0.22 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.2. Posada al punt en ratolí i en el sistema de plaques Multiscreen_{HTS} (MilliporeTM)

En ratolí els assaigs *ex-vivo* es van posar al punt amb el sistema de plaques Multiscreen_{HTS} en comptes de en tub. Aquest canvi de format era necessari per evitar variacions entre mostres, donat que el temps d'incubació que havíem seleccionat era de 2 minuts i la dispensació del teixit, amb la qual s'inicia la reacció, s'havia de fer el més ràpidament possible amb una pipeta multicanal.

3.2.1. Determinació de la quantitat de mostra a còrtex, cerebel i medul·la

Per determinar la quantitat òptima de mostra de cada teixit pels assaigs *ex-vivo* de ratolí, vam incubar volums creixents d'homogenats de còrtex, cerebel i medul·la amb el $^3\text{H-Ro15-1788}$.

A la Figura 54 s'observa la unió específica del radiolligand en cadascun dels teixits.

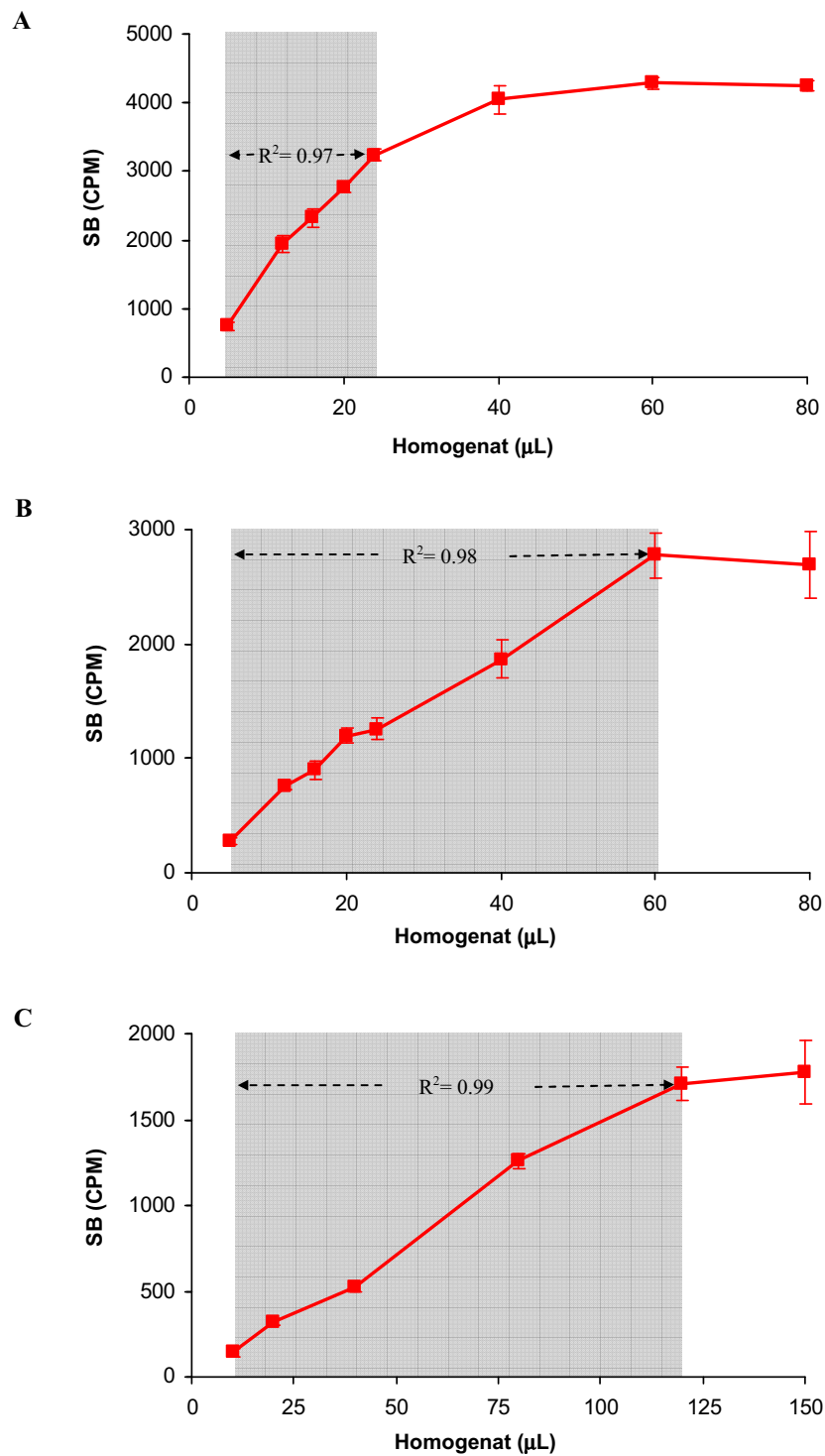


Figura 54. Determinació del rang lineal de proteïna (zona ombrejada) pels assaigs *ex-vivo* amb $^3\text{H-Ro15-1788}$ a còrtex (A), cerebel (B) i medul·la (C) de ratolí. L'eix de les abscisses representa el volum d'homogenat en lloc de la quantitat de proteïna, donat que per evitar la dissociació del lligand al receptor, a les corbes dosi-resposta dels assaigs *ex-vivo* dispensàvem el mateix volum d'homogenat per a totes les mostres i posteriorment corregíem les comptes per la quantitat de proteïna. Cada punt es va carregar per triplicat i la dada representa la mitjana \pm SEM. Les mostres provenen d'un *pool* de teixits corresponent a 12 animals. Es mostra el valor del coeficient de correlació (R^2) al rang lineal.

Per còrtex es va seleccionar un volum d'homogenat de 16 μL (corresponent a 55-65 μg de proteïna) que estava en el rang lineal (5-24 μL) i que ens donava al voltant de 2300 cpm. La concentració de proteïna es trobava entre 0.28-0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, superior a la utilitzada en els assaigs de còrtex de rata en tub (0.20-0.22 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

A cerebel la unió específica era lineal fins als 60 μL , de manera que es va escollir un volum d'homogenat de 50 μL (corresponent a 190-210 μg de proteïna) amb els qual s'assolia al voltant de 2300 cpm. Les comptes obtingudes a cerebel són igual a les obtingudes a còrtex amb una tercera part del volum utilitzat a cerebel. La concentració de proteïna pels assaigs *ex-vivo* a cerebel es trobava entre 0.95-1.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Pels assaigs en medul·la el volum d'homogenat que es va seleccionar va ser de 100 μL (corresponent a 115-140 μg de proteïna) que estava en el rang lineal i donava al voltant de 1400 cpm. La concentració de proteïna pels assaigs *ex-vivo* a medul·la es trobava entre 0.58-0.70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.3. Ocupació del receptor GABA_A pels compostos a còrtex, cerebel i medul·la de ratolí

Amb les condicions dels assaigs *ex-vivo* a còrtex, cerebel i medul·la de ratolí fixades, vàrem determinar els nivells d'ocupació del receptor GABA_A a dosis creixents (0.1-100 mg/kg) dels compostos seleccionats i dels estàndards diazepam (BDZ) i zolpidem (fàrmac-Z selectiu de la subunitat α_1).

Les Figures 55 i 56 mostren les corbes dosi-resposta dels estàndards i dels compostos en els tres teixits en els quals s'ha estudiat l'ocupació del receptor GABA_A. En tots els compostos l'ocupació incrementa de manera dosi-depenent. El diazepam, amb mateixa afinitat per les subunitats α_1 , α_2 , α_3 i α_5 del receptor GABA_A (Atack, 1999), presenta una ocupació similar en els tres teixits. La resta de compostos assoleixen a totes les dosis major ocupació en cerebel que en els altres dos teixits, el qual es reflecteix amb una menor Occup₅₀ (dosi que ocupa el 50% de receptors) en aquest teixit (Taula 27). Dels tres compostos seleccionats, a cerebel el GF-016641-00 i el GF-016783-00 van ser els que van presentar una Occup₅₀ més baixa de 0.6 i 1.7 mg/kg respectivament, inferior a la de l'estàndard zolpidem (4.6 mg/kg).

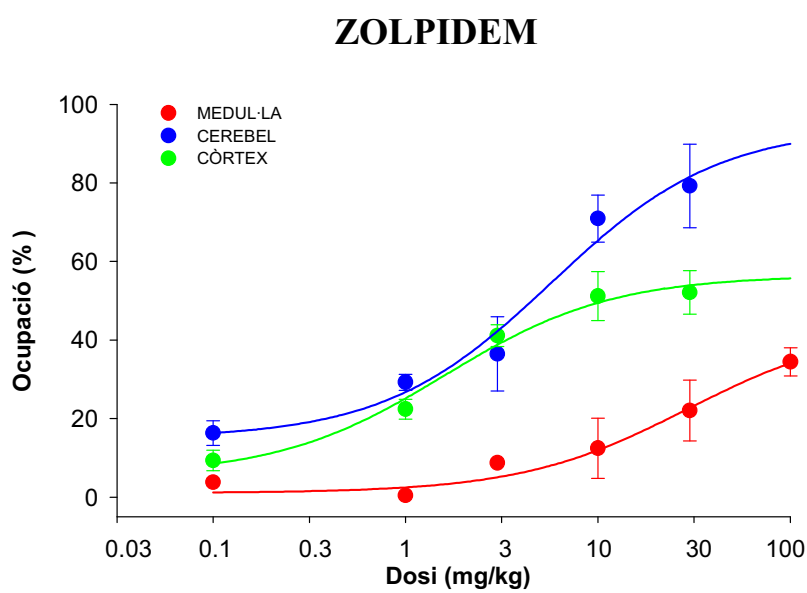
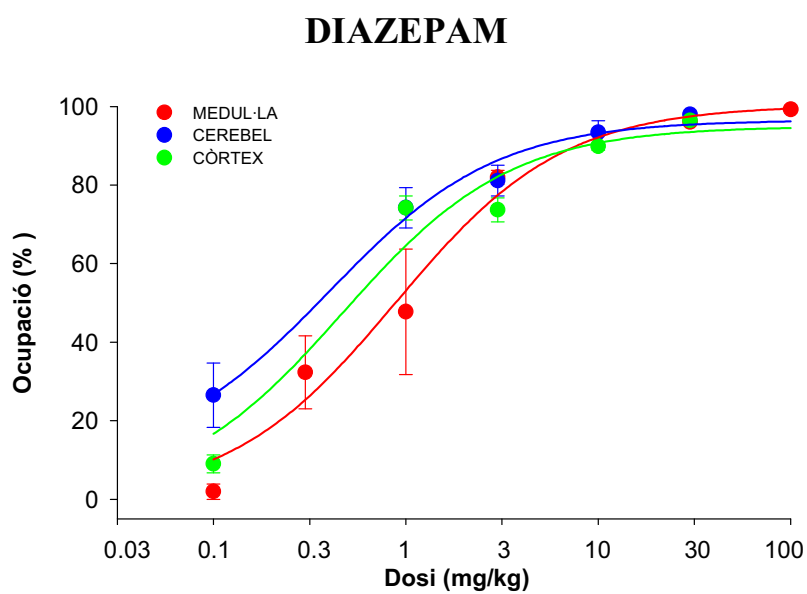


Figura 55. Corbes dosi-resposta de l'ocupació de diazepam i zolpidem a còrtex, cerebel i medul·la de ratolí. Els valors representen la mitjana \pm SEM ($n=4-6$ /dosi).

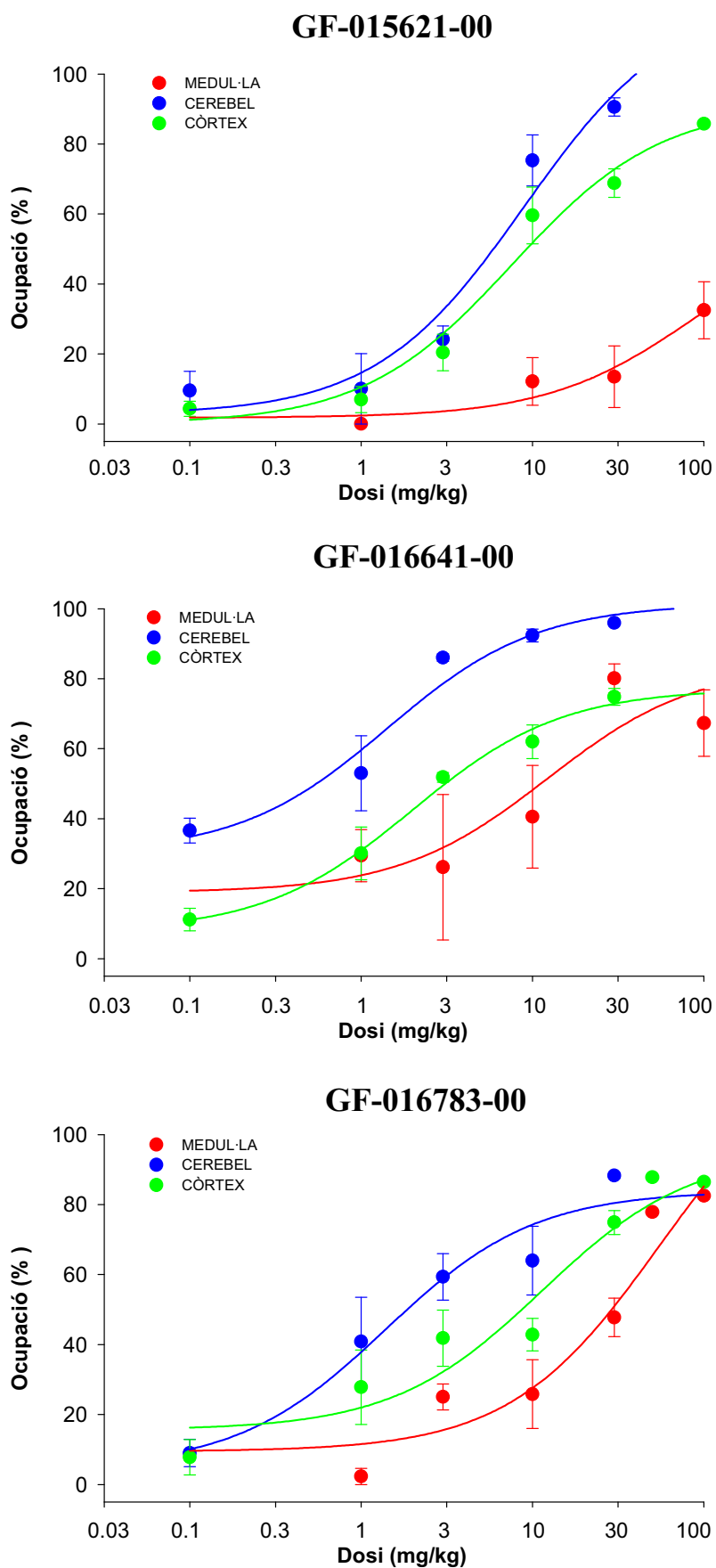


Figura 56. Corbes dosi-resposta de l'ocupació dels compostos seleccionats a còrtes, cerebel i medul·la de ratolí. Els valors representen la mitjana \pm SEM (n= 4- 6/ dosi).

La Taula 27 recull els percentatges d'ocupació a les diferents dosis testades de cada compost, conjuntament amb l'Occup₅₀ de cada teixit.

A còrtex els compostos amb menor ocupació a 10 mg/kg van ser el zolpidem amb un 51% i el GF-016783-00 amb un 43%. El GF-015621-00 i el GF-016641-00 a la mateixa dosi tenen una ocupació del 60% i 62% respectivament. A la dosi de 30 mg/kg, la màxima testada a còrtex, el zolpidem presenta una ocupació del 52% mentre en els tres compostos seleccionats l'ocupació està al voltant del 70-75%. El diazepam a la dosi de 3 mg/kg ja ha assolit una ocupació superior al 70% en tots els teixits.

A medul·la els compostos amb menor percentatge d'ocupació a la dosi de 100 mg/kg varen ser el zolpidem amb un 34% i el GF-015621-00 amb un 32%. L'Occup₅₀ per aquests compostos és superior als 100 mg/kg, mentre que la del GF-016783-00 és de 29.7 mg/kg i la del GF-016641-00 d'11.2 mg/kg. El diazepam a medul·la presenta una Occup₅₀ de 0.9 mg/kg, similar a l'obtinguda a còrtex i cerebel (0.5 i 0.4 mg/kg).

A excepció del diazepam, tots els compostos no presenten pràcticament ocupació a medul·la a la dosi que ocupen el 50% de receptors a cerebel.

Quan calculem la selectivitat com el quocient entre l'Occup₅₀ obtinguda a medul·la i la de cerebel, tots els compostos mostren una selectivitat *ex-vivo* superior a 17 a excepció del diazepam.

Taula 27. Ocupació del receptor GABA_A a còrtex, cerebel i medul·la de ratolí dels estàndards i compostos a diferents dosis. Els valors del percentatge d'ocupació estan expressats com la mitjana ± SEM (n= 4- 6/ dosi) i l'Occup₅₀ en mg/kg.

ZOLPIDEM	CÒRTEX		CEREBEL		MEDUL·LA		SELECTIVITAT
Dosis (mg/ kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Medul·la/ Cerebel
0.1	9 ± 3		16 ± 3				
1	22 ± 3		29 ± 2		0 ± 0		
3	41 ± 3	10.9	36 ± 10	4.6	9	> 100	> 22
10	51 ± 6		71 ± 6		12 ± 8		
30	52 ± 6		79 ± 11		22 ± 8		
100					34 ± 4		

DIAZEPAM	CÒRTEX		CEREBEL		MEDUL·LA		SELECTIVITAT
Dosis (mg/ kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Medul·la/ Cerebel
0.1	9 ± 2		26 ± 8		2 ± 2		
0.3					32 ± 9		
1	74 ± 3		74 ± 5		48 ± 16		
3	74 ± 3	0.5	81 ± 4	0.4	82 ± 2	0.9	2
10	90 ± 1		93 ± 3				
30	96 ± 1		98 ± 1		96 ± 0		
100					99 ± 0		

GF-016641-00	CÒRTEX		CEREBEL		MEDUL·LA		SELECTIVITAT
Dosis (mg/ kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Medul·la/ Cerebel
0.1	11 ± 3		37 ± 4				
1	30 ± 8		53 ± 11		29 ± 7		
3	52 ± 1	3.2	86 ± 1	0.6	26 ± 21	11.2	19
10	62 ± 5		92 ± 2		41 ± 15		
30	75 ± 2		96 ± 0		80 ± 4		
100					67 ± 10		

GF-015621-00	CÒRTEX		CEREBEL		MEDUL·LA		SELECTIVITAT
Dosis (mg/ kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Medul·la/ Cerebel
0.1	4 ± 2		10 ± 6				
1	7 ± 4		10 ± 10		0 ± 0		
3	20 ± 5	9.3	24 ± 4	6.0		> 100	> 17
10	60 ± 8		75 ± 7		12 ± 7		
30	69 ± 4		91 ± 3		13 ± 9		
100	86 ± 0				32 ± 8		

GF-016783-00	CÒRTEX		CEREBEL		MEDUL·LA		SELECTIVITAT
Dosis (mg/ kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Mitjana ± SEM	Occup ₅₀ (mg/kg)	Medul·la/ Cerebel
0.1	8 ± 5		9 ± 4				
1	28 ± 11		41 ± 13		1 ± 4		
3	42 ± 8		59 ± 7		25 ± 4		
10	43 ± 5	8.8	64 ± 10	1.7	26 ± 10	29.7	18
30	75 ± 3		88 ± 1		48 ± 6		
50	88				78		
100	86				82		

4. CITOTOXICITAT

Es van incubar durant 24h concentracions creixents de cada compost en diferents línies cel·lulars, per determinar la concentració que provocava una disminució del 50% de la viabilitat cel·lular (IC_{50}).

La Taula 28 recull les dades de les IC_{50} obtingudes en CHO-K1, HepG2 i SH-SY5Y. De les tres línies cel·lulars, les CHO-K1 presentaven valors de IC_{50} més baixos en tots els compostos, mentre les HepG2 els més alts.

El GF-015621-00 produïa una disminució del 50% de la viabilitat en CHO-K1 i SH-SY5Y, a una concentració similar a la del zaleplon, encara que en HepG2 tenia una IC_{50} inferior a aquest, però de l'ordre de la de l'indiplon ($> 500 \mu\text{M}$).

El GF-016783-00 tenia una IC_{50} menor que la del GF-015621-00, però igual a la del diazepam en les tres línies cel·lulars, i a l'indiplon en CHO-K1 i SH-SY5Y.

El GF-016641-00, amb una IC_{50} similar a la del zopiclone i zolpidem ($\geq 1000 \mu\text{M}$) en HepG2 i SH-SY5Y, però superior a la del zolpidem en CHO-K1, és dels tres composts seleccionats el que mostra citotoxicitat a concentracions més altes.

D'altra banda es va determinar el marge terapèutic amb el quocient entre la IC_{50} dels assaigs de citotoxicitat i la de l'afinitat *in vitro* per α_1 (cerebel). Tots els estàndards tenen més de 3 o 4 ordres de magnitud de diferència entre la concentració *in vitro* i la que causa un 50% de la mortalitat cel·lular. El GF-016641-00 i el GF-016783-00 tenen també una diferència de 4 ordres de magnitud mentre que amb el GF-015621-00 és de 5.

Taula 28. Valors de la IC_{50} dels assaigs de citotoxicitat en les diferents línies cel·lulars i marge terapèutic.

	Citotoxicitat			Afinitat α_1	Toxicitat/ Afinitat		
	CHO-K1	SH-SY5Y	HepG2	IN VITRO	CHO-K1	SH-SY5Y	HepG2
	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (nM)	Relació	Relació	Relació
Zaleplon	441	> 500	> 1000	247	1785	> 2024	> 4049
Indiplon	154	213	> 500	6.4	24063	33219	> 83333
Zolpidem	496	≥ 1000	> 1000	46.9	10576	≥ 21277	> 21277
Zopiclone	> 1000	-	> 1000	119	> 8403	-	> 8403
Diazepam	164	257	385	38*	4316	6771	10132
GF-015621-00	451	≥ 500	626	3.4	132647	≥ 147059	184118
GF-016641-00	954	1000	> 1000	10.3	92621	97087	> 97087
GF-016783-00	143	251	350	12.2	11721	20607	28689

* (Giusti, 1993)

Discussió

1. POSADA AL PUNT DELS ASSAIGS D'UNIÓ AMB RADIOLLIGAND *IN VITRO*

Els assaigs d'alt rendiment (HTS, de l'anglès *High throughput screening*) són una eina fonamental en les fases inicials del procés de descobriment de nous fàrmacs. Aquests assaigs permeten testar de forma ràpida una gran quantitat de compostos i identificar aquells que tenen activitat sobre la diana escollida. Per això cal optimitzar les condicions experimentals fins tenir un assaig de qualitat i validar-lo amb compostos amb activitat coneguda (estàndards) (Macarrón, 2002).

La diana del nostre assaig va ser la subunitat α_1 del receptor GABA_A implicada en els processos de sedació i hipnosi. Els compostos amb gran afinitat i selectivitat per aquesta subunitat, seran bons candidats a hipnòtic i tindran menys efectes no desitjats com per exemple miorelaxació associada a la subunitat α_2 .

Els assaigs d'unió amb radiolligand *in vitro* ens permeten identificar compostos amb gran afinitat per la subunitat α_1 i baixa per l' α_2 del receptor GABA_A, a partir de la competició que s'estableix entre els compostos i el radiolligand pel lloc d'unió al receptor.

Els teixits emprats en aquests assaigs van ser cerebel i medul·la en els quals s'expressen majoritàriament les subunitats α_1 i α_2 respectivament (McKernan, 1996; Bohlhalter, 1996). El radiolligand escollit va ser el ³H-Ro15-1788 (flumazenil tritiat), que s'uneix amb la mateixa elevada afinitat a les subunitats α_1 , α_2 , α_3 i α_5 del receptor GABA_A, però amb baixa afinitat per les subunitats α_4 i α_6 (Atack, 1999). Tot i ser un radiolligand no selectiu, al seleccionar dos teixits on s'expressen majoritàriament la subunitat α_1 o l' α_2 , la inhibició de la unió del radiolligand per part dels compostos, indicarà afinitat per la corresponent subunitat α de cada teixit.

1.1. Posada al punt en tub i amb el sistema de filtració Brandel

Per posar al punt l'assaig cal fixar els següents paràmetres: temps d'incubació, quantitat de proteïna i concentració de radiolligand. Posteriorment s'ha de validar amb estàndards i avaluar la qualitat i robustesa de l'assaig amb el factor Z'.

Per establir el temps d'incubació dels assaigs de competició en tub, calia determinar quan s'assolia el temps d'equilibri amb el ³H-Ro15-1788 en les nostres condicions d'assaig. A cerebel, el radiolligand l'assolia als 45 minuts i es mantenia estable fins als 120 minuts, de

manera que vàrem seleccionar un temps de 60 minuts. Aquest temps d'incubació està en el rang d'altres assaigs citats a la bibliografia, realitzats en condicions similars a les nostres (Santi, 1988; Griebel, 2001; Sullivan, 2004).

La quantitat de proteïna seleccionada pels assaigs ha de complir dues condicions, per una banda ha d'estar en el rang lineal de la relació amb el senyal (SB) i per l'altra, el percentatge de radiolligand que se li uneix ha de ser inferior al 10% de la quantitat total de radiolligand afegit a l'assaig (Kenakin, 1993; Bylund, 1990). Encara que una major concentració de proteïna suposi un augment del nombre d'unions del lligand marcat radioactivament amb el receptor i per tant, un increment de la proporció de la unió específica (SB) enfront la inespecífica (NSB), una quantitat excessiva de receptors comportaria una major unió de radiolligand al receptor (increment del complex RL), de manera que es necessitaria una major concentració de compost no marcat per desplaçar-lo. Estaríem doncs, subestimant la potència del compost per desplaçar el radiolligand. A nivell gràfic veuríem un desplaçament de les corbes de competició dels compostos cap a la dreta. En els assaigs en format tub, la quantitat de proteïna seleccionada estava en el rang lineal, el percentatge de radiolligand unit era del 8% a cerebel i del 2% a medul·la, i donava un senyal (cpm) prou alt per poder identificar els compostos que inhibien la unió del radiolligand als assaigs de competició.

Els assaigs de saturació van mostrar que el $^3\text{H-Ro15-1788}$ s'uneix amb gran afinitat als receptors GABA_A de cerebel ($K_d = 1.6 \pm 0.3 \text{ nM}$) i medul·la ($K_d = 1.9 \pm 0.3 \text{ nM}$), amb uns valors de la K_d similar als citats a la bibliografia (Taula 9 i 11, pàgines 84 i 85). Igualment, el nombre màxim de receptors en ambdós teixits, representat pel valor de B_{max} , concorda amb el descrit a la bibliografia (Taula 9 i 11, pàgines 84 i 85) per aquest compost. A medul·la la B_{max} és gairebé 7 vegades inferior a la de cerebel (85% menys de receptors), el que significa una menor proporció de receptors GABA_A per quantitat de proteïna a medul·la que a cerebel.

La concentració de radiolligand seleccionada pels següents assaigs de competició, no ha de ser saturant i es recomana que sigui igual o inferior al valor de K_d (concentració de radiolligand que ocupa la meitat de receptors a l'equilibri) (Bylund, 1993). De les concentracions de radiolligand testades, vam escollir pels assaigs de competició a cerebel i a medul·la, l'1 nM que estava en la part lineal de les respectives corbes de saturació i era inferior al valor de la K_d en tots dos teixits.

Les condicions dels assaigs en tub, es van validar realitzant corbes de competició amb els següents estàndards: zaleplon, zolpidem, indiplon i flumazenil. En ambdós teixits els valors obtinguts de la K_i , que ens indica l'afinitat del compost pel receptor, són lleugerament superiors als de la bibliografia (Taula 12 i 13, pàgina 87). Això podria ser degut a diferències metodològiques, com per exemple una major quantitat de proteïna que implicaria un major nombre de receptors i per tant major concentració de compost per inhibir la unió del radiolligand. Tanmateix quan comparem les afinitats dels estàndards entre si, la relació entre aquestes és similar als valors descrits en la bibliografia, de manera que si a cerebel el flumazenil mostra una afinitat 100 vegades superior a la del zaleplon en els nostres assaigs la proporció es manté. Per tant, l'assaig posat al punt en tub està validat i ens permet discriminar compostos amb diferent afinitat pel receptor.

Pel que fa a la selectivitat, expressada com el quocient entre la K_i de medul·la i cerebel, a excepció del flumazenil que té una afinitat equivalent per les subunitats α_1 , α_2 , α_3 i α_5 del receptor GABA_A, la resta d'estàndards són fàrmacs Z amb major afinitat per la subunitat α_1 (Sullivan, 2004; Arbilla, 1986; Noguchi, 2002). Els valors de selectivitat per a la subunitat α_1 obtinguts amb els nostres assaigs són comparables amb els de la bibliografia, sent zolpidem l'estàndard més selectiu.

La qualitat i robustesa dels assaigs en tub es va avaluar calculant el factor Z' dels assaigs de competició a cerebel i medul·la. Els valors obtinguts del factor Z' a cerebel (0.74) i medul·la (0.73) estan per sobre de 0.50.

Per tant amb les condicions que hem descrit, hem posat al punt un assaig en tub robust i de qualitat que ens permet identificar compostos amb diferent afinitat per les subunitats α_1 i α_2 .

1.2. Adaptació de l'assaig al sistema de plaques Multiscreen_{HTS} (MilliporeTM)

Per augmentar el rendiment de l'assaig i poder-lo automatitzar, cal miniaturitzar-lo i passar-lo a format de placa de 96 pous. Aquest pas ens obliga a disminuir el volum d'assaig i a optimitzar una sèrie de paràmetres, entre ells la quantitat de proteïna.

Com ja s'ha dit anteriorment, una de les regles que han de complir els assaigs d'unió amb radiolligand, és que la quantitat de radiolligand que s'uneix no superi el 10% del total emprat en l'assaig (Kenakin, 1993). Tant a cerebel (6%) com a medul·la (9%) la quantitat de proteïna seleccionada per l'assaig en placa complia aquesta condició, estava a la zona lineal de la

relació amb el senyal i en tots dos casos ens donava un senyal al voltant de les 800 cpm. Tanmateix el senyal obtingut en placa no era proporcional a l'esperat en els assaigs en tub a la mateixa quantitat de proteïna. Aquesta disminució en el nombre de cpm a placa seria atribuïble a la menor eficiència de comptatge del comptador de plaques *Microbeta Trilux* de *Perkin Elmer* (34%), respecte al de tubs *Tricarb 1900 TR* de *Packard* (61%). Tot i així, a cerebel la concentració final de proteïna a l'assaig en placa (0.28 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) era similar a la de tub (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). En canvi a medul·la on la proporció de receptors GABA_A és aproximadament un 85% inferior que a cerebel, al disminuir el volum d'assaig a placa vam haver d'incrementar lleugerament la concentració de proteïna (0.43 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) respecte a tub (0.30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) per tenir un senyal acceptable i poder veure inhibició en els assaigs de competició.

En passar el format de l'assaig a placa, vàrem tornar a caracteritzar la unió del $^3\text{H-Ro15-1788}$ per comprovar que les noves condicions d'assaig no afectaven els valors de B_{max} o K_d . Malgrat que a la bibliografia (Shrikhande, 2002) està descrit que l'automatització de l'assaig i el canvi del sistema de filtració pot provocar variacions en la B_{max} , nosaltres amb el sistema de filtració per a plaques (*Multiscreen_{HTS}*, *Millipore*) vàrem obtenir en ambdós teixits uns valors de B_{max} i K_d similars als obtinguts prèviament en tub i als descrits a la literatura (Taules 14 i 16, pàgines 91 i 92).

Al tenir una K_d similar a l'obtinguda en els assaigs en format tub, vam tornar a seleccionar la concentració de radiolligand d'1 nM pels assaigs de competició a placa, ja que continuava sent inferior al valor de la K_d obtinguda en els assaigs de saturació, i estava en la part lineal de les corbes de saturació tant de cerebel com de medul·la. A més era la mateixa concentració que s'havia utilitzat pels assaigs en tub.

Amb les condicions de l'assaig de competició en format placa fixades, vam validar-lo mitjançant corbes de competició a cerebel i medul·la amb els estàndards. Els valors de l' IC_{50} i la K_i obtinguts en ambdós teixits a placa van ser similars als de tub i equiparables als de la bibliografia (Taules 18 i 19, pàgines 93 i 95). Al comparar entre si l'afinitat dels estàndards dels assaigs en format placa, la relació entre aquestes es manté similar a l'observada en els assaigs en format tub, de manera que l'assaig posat al punt en placa també ens permet discriminar compostos amb diferent afinitat per les subunitats α_1 i α_2 , com ja passava en el format en tub. Per tant amb les condicions que hem descrit, els assaigs en placa

Multiscreen_{HTS} són equiparables als de format en tub, com demostren els resultats dels assaigs de competició amb els estàndards.

Pel que fa a la selectivitat per la subunitat α_1 , els valors obtinguts en els assaigs en format placa són similars als del format en tub i als de la bibliografia (Taula 19, pàgina 95).

Finalment, vam avaluar la qualitat de l'assaig amb el factor Z' . A placa en disminuir el volum d'assaig i la càrrega de proteïna, ens disminueix el senyal màxim i per tant la banda de separació és més estreta. Tot i així la poca variabilitat tant del senyal màxim com del soroll de fons (el que implica que les corresponents bandes de variació siguin estretes) fa que els valors del factor Z' a placa (0.70 i 0.73) siguin iguals als dels assaig en format tub i superiors al mínim requerit de 0.50. Per tant els assaigs manuals en format de placa són de qualitat i reproduïbles.

1.3. Automatització de l'assaig en placa

El següent pas per incrementar el rendiment de cribratge dels compostos, va ser automatitzar l'assaig posat al punt en format placa, amb l'estació robotitzada Multiprobe II HT Ex (*Perkin Elmer*).

L'automatització amb el robot va implicar cercar les opcions òptimes de funcionament, entre elles la dispensació dels reactius. Dels diferents modes provats, vam obtenir més exactitud i menys variabilitat dispensant els reactius a certa alçada del nivell del pou (65-80%), evitant a més la contaminació de les puntes (al no entrar en contacte amb els reactius que ja estiguessin al pou) i estalviant-nos els rentats de les puntes que alentirien el protocol.

En els assaigs automatitzats en format de placa, es va emprar la mateixa quantitat de proteïna i concentració de radiolligand que en els manuals, donat que no variava el volum d'assaig. Un cop automatitzat, l'assaig es va validar mitjançant corbes de competició amb els estàndards. Els valors de la IC_{50} i la K_i dels assaigs a cerebel realitzats amb el robot, són pràcticament iguals als dels assaigs manuals i similars als de la bibliografia (Taula 22, pàgina 101). Per tant la relació entre les afinitats dels diferents estàndards es manté, i l'assaig automatitzat és equiparable al manual, de manera que permet discriminar compostos amb diferent afinitat per les subunitats α_1 i α_2 , com ja passava en els assaigs realitzats manualment.

En avaluar la qualitat i robustesa dels assaigs automatitzats en format de placa, el valor del factor Z' passa a ser de 0.59 respecte 0.70 dels assaigs realitzats manualment en placa. Aquesta disminució del valor del factor Z' es deu a l'increment de variabilitat en el senyal màxim respecte els assaigs manuals. Una possible causa seria la utilització de les mateixes puntes DT per dispensar el teixit al llarg de tota la placa, de manera que si quedés volum de teixit remanent a l'interior de la punta, en dispensaria més a la següent dispensació i tindríem un augment de comptes. També podria ser degut a un increment de la dissociació del complex RL donat que el procés de rentat amb el robot tot i amb la multidispensació és de 6 minuts enfront el 3 o 4 minuts que trigàvem manualment.

Els assaigs d'unió amb radiolligand són de tipus heterogeni; és a dir; requereixen de filtració i rentats que incrementen la variabilitat metodològica. Aquests assaigs són més difícils d'automatitzar que no pas els homogenis on simplement s'afegeixen els reactius i es mesura el senyal (*mix and read*) com podria ser el cas dels assaigs SPA (*scintillation proximity assay*) o la fluorescència polaritzada (Inglese, 2007). Per contra, els assaigs homogenis no són vàlids per a tots els receptors de membrana, i en el cas de l'SPA al ser menys sensible degut a la baixa eficiència de comptatge, requereix més radioactivitat per tenir un senyal suficient respecte el soroll de fons (Shrikhande, 2002).

Malgrat tractar-se d'un assaig heterogeni, cal remarcar que el valor del factor Z' és superior a 0.50 i per tant la qualitat de l'assaig automatitzat en format placa continua essent excel·lent i ens ha permès augmentar el rendiment de cribratge dels compostos (Taula 29).

Taula 29. Capacitat diària de cribratge (nombre de compostos/dia) dels assaigs de competició en placa realitzats manualment o amb el robot Multiprobe II HT Ex (*Perkin Elmer*).

RENDIMENT		
	Manual	Automatitzat
Cribratge primari	24	84
Cribratge secundari	10	35

L'assaig automatitzat és també suficientment sensible, com indica el quocient $IC_{50 \text{ observada}}/IC_{50 \text{ teòrica}}$ inferior a 3 per als compostos estàndards assajats (Inglese, 2007) i robust donat que en cada una de les plaques que cribrem, introduïm un estàndard i els % d'inhibició o la IC_{50} són reproduïbles entre diferents plaques i assaigs.

2. CRIBRATGE *IN VITRO* DELS COMPOSTOS

De les 21 famílies dissenyades a partir de l'estructura del zolpidem, es van sintetitzar i cribrar *in vitro* 1214 noves entitats químiques, emprant l'assaig automatitzat posat al punt.

D'aquestes famílies, algunes com els **indols** i **benzimidazols** presentaven certa afinitat *in vitro* per la subunitat α_1 (Taula 24, pàgina 106), però en modificar els substituents per millorar-ne l'afinitat, no s'observava relació entre l'estructura química i l'activitat (no SAR, de l'anglès *Structure activity relationship*).

En el cas de la família de les **quinolones**, malgrat tenir compostos amb una bona afinitat *in vitro* per la subunitat α_1 (Taula 24, pàgina 106), amb percentatges d'inhibició a la concentració de 100 nM superiors a la del zolpidem, l'activitat hipnòtica observada *in vivo* (mitjançant el test SMA) era baixa (Taula 33, pàgina 148). D'aquests compostos el GF-017162-00 mostrava una estabilitat metabòlica elevada quan s'incubava durant 120 minuts amb microsomes hepàtics humans, i tenia una bona absorció en els assaigs amb cèl·lules intestinals Caco-2 (Taula 35, pàgina 151). Per tant, la poca activitat hipnòtica *in vivo* dels compostos, no seria atribuïble a la metabolització o a la baixa absorció gastrointestinal. Una possible causa seria que no travessessin bé la barrera hematoencefàlica i per tant tinguessin dificultats per arribar als receptors GABA_A d'SNC.

La família de les **imidazopiridines** presentaven una molt bona afinitat *in vitro* per la subunitat α_1 (Taula 24, pàgina 106), però de les dues dosis en que s'avaluava l'SMA *in vivo*, a la inferior de 0.98 $\mu\text{mol/kg}$ la inhibició de l'activitat era baixa (Taula 33, pàgina 148), possiblement degut a la baixa estabilitat metabòlica dels compostos (Taula 35, pàgina 151) de manera que també es va descartar.

Finalment, la família de les **imidazopiridazines**, mostraven una molt bona afinitat *in vitro* per la subunitat α_1 (Taula 24, pàgina 106), alhora que una bona inhibició de l'activitat motora espontània tant a la dosi de 97 com 0.98 $\mu\text{mol/kg}$, millorant fins i tot la d'alguns estàndards (Taula 33, pàgina 148). Aquests compostos tenien a més una elevada estabilitat metabòlica (Taula 35, pàgina 151), així que es va seleccionar aquesta família com la millor candidata a obtenir un compost amb millor activitat hipnòtica i menys efectes no desitjats que els compostos de referència que actualment es troben al mercat.

Posteriorment, per calcular la selectivitat *in vitro* per la subunitat α_1 , implicada en sedació i hipnosi, es va determinar a cerebel (α_1) i a medul·la espinal (α_2) la K_i dels tres compostos representatius de la família de les imidazopiridazines: GF-015621-00, GF-016641-00 i GF-016783-00. Tots tres compostos van mostrar a cerebel un valor de K_i (1.9, 5.9 i 7.0 nM respectivament) més baix que el de zolpidem (29.5 nM), zaleplon (141 nM) i zopiclone (68.4 nM), i per tant una major afinitat per la subunitat α_1 (Taula 25, pàgina 107). A excepció del compost GF-015621-00, aquesta major afinitat *in vitro* respecte als estàndards, es correlaciona amb una menor dosi per induir sedació *in vivo* (ID_{50} en l'SMA) (Taula 34, pàgina 150). El GF-015621-00 tot i ser el compost amb més afinitat per la subunitat α_1 , *in vivo* presenta una ID_{50} (4.2 mg/kg) superior a la de les altres dues imidazopiridazines (GF-016641-00 ID_{50} = 0.9 mg/kg i GF-016783-00 ID_{50} = 2.0 mg/kg). Aquest compost, quan se n'estudia la farmacocinètica en ratolí, presenta un major aclariment en sang que el GF-016783-00 i el GF-016641-00 (Taula 37, pàgina 152) el que explicaria la menor potència *in vivo*. El GF-016783-00 tot i tenir una K_i *in vitro* superior a la del zaleplon, la ID_{50} *in vivo* és similar en tots dos compostos (GF-016783-00 ID_{50} = 2.0 mg/kg i zaleplon ID_{50} = 1.6 mg/kg) possiblement atribuïble a una major biodisponibilitat de l'estàndard respecte al compost (Taula 37, pàgina 152). Igualment, a medul·la on predomina la subunitat α_2 implicada en miorelaxació, els compostos amb menor K_i i per tant major afinitat per aquesta subunitat, van requerir *in vivo* una dosi menor per disminuir un 50% la força muscular (ID_{50} del GS, de l'anglès *Grip strength*) (Taula 34, pàgina 150).

Pel que fa a la selectivitat per la subunitat α_1 , al calcular el quocient entre la K_i obtinguda a medul·la (α_2) i a cerebel (α_1), de les tres imidazopiridazines seleccionades, el GF-016783-00 va mostrar 5 vegades més afinitat per la subunitat α_1 que per l' α_2 . Els altres dos compostos, el GF-015621-00 i el GF-016641-00, amb un valor de selectivitat de 81 i 173 respectivament superen la del zolpidem, l'estàndard més selectiu, amb una afinitat aproximadament 24 vegades superior per l' α_1 que per l' α_2 . Per tant, dels tres compostos seleccionats, en dos hem aconseguit millorar la selectivitat enfront la subunitat α_1 respecte als compostos de referència, essent el GF-016641-00 el compost més selectiu dels estudiats. Aquesta selectivitat *in vitro* es correlaciona amb la selectivitat *in vivo*. El GF-016783-00 fins i tot millora la seva selectivitat *in vivo*, de manera que tant ell com el GF-016641-00 (el GF-015621-00 està pendent de resintetitzar-ne i per tant actualment no tenim dades) la dosi a la qual provoquen sedació és molt inferior a la dosi que produïrien miorelaxació (ID_{50} al GS) (Taula 30).

3. NIVELLS D'OCUPACIÓ DEL RECEPTOR GABA_A

L'efecte d'un fàrmac depèn d'una banda de la seva eficàcia intrínseca, és a dir, de la capacitat per induir un canvi de conformació en el receptor necessari per produir una resposta fisiològica, i per l'altra, del nombre de receptors als que s'uneix (Ruffolo, 1982).

A SNC l'ocupació dels receptors per part d'un compost dependrà de la seva farmacocinètica (Miller, 1987; Scott-Stevens, 2005), i de factors tals com la unió a proteïnes plasmàtiques, el pas de la barrera hematoencefàlica (Pike, 2007) i de la biodisponibilitat al lloc d'unió en el cervell (Li, 2006). Alguns compostos poden ser segrestats en un compartiment (per exemple membranes) de manera que no poden accedir a la seva diana, malgrat que la farmacocinètica indiqui presència de compost a cervell (Li, 2006).

La Tomografia d'Emissió de Positrons (PET) i la Tomografia Computeritzada d'Emissió de Fotó Únic (SPET) són tècniques d'anàlisi d'imatge que permeten determinar a SNC el grau d'ocupació que té un fàrmac de la seva diana. Aquestes tècniques no invasives, s'utilitzen més àmpliament en humans i en primats per visualitzar i quantificar *in vivo* els llocs d'unió del radiolligand.

Per animals petits com els rosegadors, els assaigs d'unió amb radiolligand *in vivo* en els quals s'administra el lligand conjuntament amb el radiolligand a l'animal viu i posteriorment es quantifica *postmortem* la radioactivitat en el teixit, són comparables amb el PET i l'SPET. Aquests assaigs requereixen l'ús de radiolligands que travessin la barrera hematoencefàlica.

Als assaigs *ex-vivo* s'administra el lligand a l'animal viu i un cop extret el teixit s'incuba amb el radiolligand. D'aquesta manera s'evita l'inconvenient del pas de barrera hematoencefàlica, i és un assaig comparable als *in vivo* si es realitza temps d'incubació curts (Li, 2006). D'altra banda, comparat amb el PET i l'SPET, al no administrar el radiolligand conjuntament amb el compost, s'eviten problemes d'interferència en el metabolisme deguts a l'administració simultània de dos compostos químicament similars i alhora resulta més econòmic.

Per tant, la finalitat dels assaigs d'unió amb radiolligand *ex-vivo*, és analitzar en l'animal l'arriba del compost al teixit diana, determinar el nombre de receptors que ocupa i la seva correlació amb la resposta biològica.

3.1. Posada al punt de l'assaig *ex-vivo* en còrtex de rata

Per a la posada al punt dels assaig d'unió amb radiolligand *ex-vivo* vam utilitzar com a referència el treball de Li J. i col. (2006) fet en rata. En el nostre assaig, la cinètica

d'associació a còrtex de rata del $^3\text{H-Ro15-1788}$ assolia el temps d'equilibri als 10 minuts i es mantenia estable fins al 60 minuts, de manera similar al treball de referència on el radiolligand assolia la màxima unió als 5 minuts i també era estable fins al 60 minuts.

En els assaigs *ex-vivo* per tal de no infravalorar l'ocupació, és important evitar la dissociació del complex lligand-receptor, ja sigui degut a la dilució del teixit en l'homogeneïtzació o en la incubació amb el tampó d'assaig (Li, 2006). Per determinar el temps d'incubació dels assaigs *ex-vivo*, vàrem avaluar la dissociació del complex lligand-receptor en funció del temps. La determinació de l'ocupació de receptors GABA_A a còrtex per flumazenil (3 mg/kg), mostra que l'ocupació del compost és dependent del temps d'assaig. A major temps d'incubació menor és l'ocupació. Evidentment aquest efecte serà més acusat en aquells compostos amb una velocitat de dissociació ràpida, com és el cas del flumazenil (Brown, 1984). Per tant, és recomanable treballar amb temps d'incubació el més curts possible.

Nosaltres vàrem fixar en 2 minuts el temps d'incubació dels assaigs *ex-vivo*, donat que temps inferiors no eren possibles amb el sistema de filtració per a tubs (Brandel) i implicaven major variabilitat entre mostres. Aquest temps és superior als 0.5 minuts establerts per Li i col. (2006) en el qual troben que els valors d'ocupació dels assaigs *ex-vivo* són comparables amb els d'ocupació *in vivo*. En les nostres condicions d'assaigs hem aconseguit disminuir la dissociació del complex lligand-receptor, possiblement atribuïble a un major control de la temperatura, de manera que als 2 minuts tenim un 10% més ocupació que l'article de referència (Taula 26, pàgina 110). Per tant, a l'escollir el temps d'assaig hem arribat a un compromís entre evitar la dissociació i infravalorar l'ocupació i el rendiment de cribratge. De manera que encara que els valors d'ocupació dels compostos puguin ser una mica inferiors als de l'ocupació *in vivo*, sempre seran comparables entre si.

D'altra banda, als 2 minuts no s'ha arribat a l'estat d'equilibri que com hem vist s'assolia als 10 minuts, encara que la unió del radiolligand és al voltant del 60% respecte la unió màxima que es dona als 10 minuts. Tanmateix en els assaigs *ex-vivo*, és més important que el radiolligand tingui una cinètica d'associació ràpida (Figura 51, pàgina 109) i una gran afinitat pel receptor (Taula 9 i 11, pàgines 84 i 85) de manera que tinguem prou senyal, que no pas que arribi a l'equilibri, donat que l'ocupació s'expressa de manera relativa respecte el grup d'animals control (0% d'ocupació) (Li, 2006).

A diferència dels assaigs d'unió amb radiolligand *in vitro* en els quals es determinava la quantitat de proteïna, als *ex-vivo* al tenir un temps d'incubació tant curt, dispensar la mateixa

quantitat de proteïna per totes les mostres implicaria afegir volums diferents d'homogenat en funció de la concentració de proteïna de cada mostra. Per tant, es va seleccionar un volum d'homogenat de còrtex que contenia una quantitat de proteïna que estava en el rang lineal amb l'SB i s'unia menys d'un 10% del radiolligand total. Aquest volum es dispensava ràpidament en tots els tubs i posteriorment un cop valorada la proteïna de l'homogenat, es corregien les comptes per la quantitat de proteïna.

3.2. Adaptació de l'assaig *ex-vivo* a ratolí i al sistema de plaques Multiscreen_{HTS} (MilliporeTM)

Paral·lelament a la posada al punt dels assaigs *ex-vivo* en rata, el Departament de Farmacocinètica i Metabolisme del centre d'R+D de Ferrer Internacional va avaluar la metabolització dels compostos en estudi, en microsomes hepàtics originaris de diferents espècies. Les dades obtingudes (Taula 36, pàgina 152) mostren que els compostos es metabolitzen molt ràpidament en rata i que en canvi el ratolí té per aquests compostos un metabolisme més similar a l'humà. Així doncs vàrem tornar a adaptar els assaig *ex-vivo*, aquest cop en ratolí i a més en format de placa Multiscreen_{HTS} donat que el temps d'incubació era de 2 minuts i calia dispensar el teixit ràpidament per evitar variacions entre mostres.

En ratolí volíem determinar l'ocupació del receptor GABA_A per part dels compostos en estudi, en diferents àrees del cervell (on predominen determinades subunitats α del receptor) i relacionar-ho amb l'efecte observat en els assaigs de comportament *in vivo*.

Els teixits seleccionats van ser cerebel i medul·la, utilitzats en els estudis d'afinitat *in vitro*, i còrtex donat que és la regió en la qual es mesura l'activitat cerebral en l'electroencefalograma.

Com s'ha mencionat anteriorment (Taula 4, pàgina 30), a cerebel s'hi expressa majoritàriament la subunitat α_1 implicada en sedació i hipnosi, mentre a medul·la hi predomina la subunitat α_2 involucrada principalment en miorelaxació (McKernan, 2000; Möhler, 2002). A còrtex, tot i l'expressió de diferents isoformes de la subunitat α ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5$) (Sullivan, 2004; Atack, 1999), les dues majoritàries són α_1 i α_3 (Ruano, 1992; Araujo, 1996). Malgrat el debat sobre quina subunitat α és responsable dels efectes ansiolítics del receptor, els estudis farmacològics dels darrers anys mostren un major paper de la subunitat α_3 , encara que no es descarta que l' α_2 també pugui estar-hi implicada (Dias, 2005; Atack, 2005b; Atack, 2010).

En tots tres teixits es va determinar la quantitat òptima de mostra pels assaigs *ex-vivo*. El volum d'homogenat seleccionat tenia una quantitat de proteïna que estava en el rang lineal amb l'SB i s'unia menys d'un 10% del radiolligand total.

3.3. Correlació entre les taxes d'ocupació *ex-vivo* dels receptors GABA_A de SNC i la conducta *in vivo*

En el cribratge *in vitro* havíem vist que com més afinitat tenen els compostos per la subunitat α_1 menys dosi requereixen *in vivo* per induir sedació (ID₅₀ en l'SMA), a excepció del compost GF-015621-00 que té un major aclariment en sang en ratolí. Igualment la menor afinitat *in vitro* per la subunitat α_2 es corresponia amb una major dosi necessària per produir relaxació muscular *in vivo* (ID₅₀ en el GS) (veure resum a Taula 30).

També hem vist que l'ordre de selectivitat dels compostos per la subunitat α_1 observat *in vitro* es mantenia *in vivo*, sent el més selectiu el GF-016641-00 que fins i tot és més selectiu que zolpidem.

Però l'efecte *in vivo* no depèn només de l'afinitat del compost pel receptor, sinó també del nombre de receptors que el compost ocupa al teixit diana i de la seva eficàcia intrínseca per activar-los i generar una resposta biològica.

En aquest sentit, els compostos amb més afinitat per la subunitat α_1 que indueixen sedació a dosi més baixa, també són els que per norma general requereixen menys dosi per assolir el 50% d'ocupació *ex-vivo* dels receptors a cerebel (Occup₅₀) (Taula 30). En canvi, el diazepam, malgrat presentar una Occup₅₀ a una dosi baixa indueix la sedació *in vivo* a una dosi proporcionalment més elevada quan es compara amb els altres compostos, de manera que a la ID₅₀ de l'SMA ocupa un 89% dels receptors GABA_A a cerebel (Taula 31). Aquest percentatge d'ocupació del diazepam és lleugerament superior al descrit a la bibliografia en assaigs d'ocupació *in vivo* (50-60%) (Facklam, 1992a), possiblement atribuïble a diferències del mètode. El diazepam es metabolitza ràpidament generant dos metabòlits actius, el metildiazepam i l'oxazepam que s'uneixen al receptor i contribueixen tant en l'ocupació com en l'activitat farmacològica del compost (Greenblatt, 1990). Tot i que els dos metabòlits del diazepam contribueixen en l'activitat del compost és possible que aquests tinguin una menor eficàcia intrínseca (Lelas, 2001) i per tant es requereixi una major dosi del compost per obtenir el mateix efecte. Això explicaria que el diazepam tot i ser un agonista total com el

zolpidem, requereixi un percentatge d'ocupació més gran per produir la mateixa resposta biològica. De fet, ja s'havia suggerit que el diazepam comparat amb altres benzodiazepines com el triazolam, tindria una menor eficàcia intrínseca (Facklam, 1992a).

Taula 30. Valors de la K_i (nM) obtinguda en els assaigs *in vitro*, conjuntament amb la ID_{50} (mg/kg) dels assaigs *in vivo*, l'Occup₅₀ (mg/kg) dels *ex-vivo* i diversos paràmetres farmacocinètics. Les dades *in vivo* i les de farmacocinètica han estat obtingudes per la Secció de Farmacologia del Departament de Ciències Biològiques i Biotecnologia, i pel Departament de Farmacocinètica i Metabolisme de Ferrer Internacional, respectivament.

	IN VITRO			IN VIVO (interval minut 5 a 30)			EX VIVO			FARMACOCINÈTICA		
	Cerebel (α_1)	Medul·la (α_2)	Selectivitat	SMA	GS	Selectivitat	Cerebel (α_1)	Medul·la (α_2)	Selectivitat	AUC (h*ng/mL)	Cl (L/h/kg)	Cmax (ng/mL)
Diazepam	38 (1)	43 (1)	1	4.2	19	4	0.4	0.9	2	-	-	-
Zolpidem	30	717	24	2.3	64	28	4.6	> 100	> 22	-	2.0	-
GF-016641-00	5.9	1022	173	0.9	> 160	> 188	0.6	11.2	19	488	0.8	644
GF-015621-00	1.9	156	81	4.2	-	-	6.0	> 100	> 17	7.0	4.2	35
GF-016783-00	7.0	31.3	5	2.0	> 40	> 20	1.7	29.7	18	167	1.7	297

(1) Giusti, 1993

Pel que fa a la relació entre la inducció de la relaxació muscular, determinada mitjançant el test GS, i l'ocupació a medul·la (Taula 30), els compostos menys afins per α_2 que requereixen una dosi més alta per induir relaxació muscular, són també els que per norma general assoleixen el 50% d'ocupació *ex-vivo* a una dosi més gran.

En el cas del GF-016641-00 tot i no induir relaxació muscular a les dosis testades *in vivo*, a medul·la ocupa el 50% dels receptors a una dosi relativament baixa en comparació amb els altres compostos (Taula 30). Aquest compost era el que mostrava *in vitro* menys afinitat pels receptors GABA_A presents a medul·la, fins i tot inferior a la del zolpidem. Això ens porta a suggerir que l'ocupació observada a medul·la podria ser deguda a un metabòlit del compost que tingués major afinitat per la subunitat α_2 que el propi compost. Aquest fet també explicaria la major variabilitat observada en les corbes d'ocupació *ex-vivo* d'aquest compost a medul·la, atribuïble a la variabilitat de la metabolització del compost en cada animal, i per tant a una diferent disponibilitat del metabòlit a medul·la. Malgrat ocupar més d'un 77% dels receptors de medul·la a la màxima dosi assajada (160 mg/kg) en el test de relaxació muscular *in vivo* (GS) (Taula 31), aquesta ocupació només produïa un 6% de la pèrdua de força muscular (dades no mostrades). La manca de relaxació muscular observada *in vivo*, ens fa pensar que el metabòlit que s'uneix *ex-vivo* a medul·la no té activitat intrínseca significativa, de manera que l'ocupació no genera una resposta biològica rellevant.

Pel que fa a la selectivitat *ex-vivo* representada pel quocient entre l'Occup₅₀ a medul·la i cerebel, el diazepam és el compost menys selectiu, mentre el zolpidem, el GF-016641-00, el GF-015621-00 i el GF-016783-00 tenen una selectivitat major de 17 (Taula 30). Els compostos més selectius *ex-vivo* també són els que *in vivo* havien mostrat major selectivitat, amb l'excepció del compost GF-016641-00. Donat que l'ocupació del GF-016641-00 a medul·la és deguda al seu metabòlit, és probable que sense aquest l'ocupació del GF-016641-00 fos inferior i per tant que aquest fos el compost més selectiu.

Aquelles zones on GABA produeix sedació i hipnosi la població majoritària de receptors GABA_A contenen la subunitat α_1 . Aquests subtipus de receptors es distribueixen àmpliament per tot el cervell, sent cerebel una de les àrees amb major densitat de receptors que contenen aquesta subunitat, conjuntament amb còrtex, encara que aquest últim en menor proporció.

Quan relacionem la dosi a la qual els compostos indueixen sedació *in vivo* amb l'ocupació de receptors a cerebel causada per aquesta dosi, observem que el GF-015621-00 és dels tres compostos en estudi el que produeix sedació (ID₅₀ de l'SMA) ocupant un menor percentatge de receptors a cerebel (41%). El zolpidem indueix la mateixa resposta ocupant un percentatge similar de receptors (38%). Aquest percentatge d'ocupació *ex-vivo* del zolpidem, és similar a l'observat en humans mitjançant PET, en el qual el promig d'ocupació del zolpidem en diferents àrees del cervell és del 29% (Abadie, 1996).

Taula 31. Percentatge d'ocupació dels receptors GABA_A a la ID₅₀ de l'SMA i el GS *in vivo*.

	<i>IN VIVO</i>		<i>EX VIVO</i>		<i>IN VIVO</i>		<i>EX VIVO</i>	
	SMA	Cerebel	Medul·la	Còrtex	GS	Medul·la		
	ID ₅₀ (mg/kg)	% Ocupació	% Ocupació	% Ocupació	ID ₅₀ (mg/kg)	% Ocupació		
Diazepam	4.2	89	83	86	19	96		
Zolpidem	2.3	38	4	36	64	30		
GF-016641-00	0.9	57	23	28	> 160	> 77		
GF-015621-00	4.2	41	4	33	-	-		
GF-016783-00	2.0	51	13	28	> 40	> 59		

Pel que fa als compostos d'estudi, el GF-016641-00 ocupa un 57% dels receptors a cerebel i el GF-016783-00 un 51%. Donat que tots els compostos tenien gran afinitat *in vitro* per la

subunitat α_1 , aquestes diferències en els percentatges d'ocupació podrien ser degudes a la diferent activitat intrínseca de cada compost, de manera que aquells compostos amb major activitat intrínseca requereixen una menor ocupació de receptors a cerebel per induir sedació.

A còrtex, on majoritàriament s'hi expressen les subunitats α_1 i α_3 del receptor GABA_A, a la dosi que els compostos indueixen sedació (ID₅₀ de l'SMA) el percentatge d'ocupació és inferior a l'observat a cerebel (Taula 31). El diazepam, que té la mateixa afinitat per les subunitats α_1 , α_2 , α_3 i α_5 del receptor GABA_A, n'és l'excepció i presenta la mateixa ocupació en tots dos teixits. En canvi el zolpidem és un fàrmac Z amb elevada afinitat per la subunitat α_1 i baixa afinitat per les subunitats α_2 i α_3 . En cèl·lules transfectades amb el cDNA de les diferents subunitats α del receptor GABA_A el zolpidem presenta una K_i entre 13 i 32 nM per la subunitat α_1 (Dämgen, 1999; Atack, 1999; Graham, 1996; Bernard, 1997), entre 130 i 160 nM per l' α_2 (Dämgen, 1999; Atack, 1999) i entre 380 i 725 nM per l' α_3 (Atack, 1999; Graham, 1996; Bernard, 1997). Encara que aquests valors poden variar en funció de les subunitats β i γ que conformin el receptor, en general zolpidem té al voltant de 5 a 12 vegades més afinitat per la subunitat α_1 que per l' α_2 , i de 12 a 55 vegades més que per l' α_3 . A cerebel, on predomina la subunitat α_1 , el zolpidem assoleix l'Occup₅₀ a una dosi inferior que en els altres dos teixits (Taula 27, pàgina 117). A la dosi de 30 mg/kg el zolpidem ocupa un 79% dels receptors a cerebel, mentre que a medul·la on predomina la subunitat α_2 , només ocupa un 34% dels receptors a la màxima dosi assajada (100 mg/kg). A còrtex on es localitza tant la subunitat α_1 com l' α_3 del receptor GABA_A, entre les dosis de 10 i 30 mg/kg el zolpidem sembla haver assolit el seu màxim d'ocupació al voltant d'un $52 \pm 6\%$. Donat que zolpidem presenta de 2 a 6 vegades més afinitat per la subunitat α_2 que per l' α_3 , i que a medul·la el zolpidem pràcticament no presenta ocupació, podríem assumir que donada la baixa afinitat que té per la subunitat α_3 , a còrtex només ocuparia els receptors constituïts per la subunitat α_1 . Tenint en compte aquest raonament, podríem deduir que a còrtex aproximadament la meitat dels receptors GABA_A contenen la subunitat α_1 ($52 \pm 6\%$) i per tant la resta serien majoritàriament α_3 . Aquesta proporció de receptors GABA_A que contenen la subunitat α_1 a còrtex concorda amb la descrita per Ruano i col. (1992), encara que en altres articles on immunoprecipiten la subunitat α_1 , la proporció d'aquesta subunitat en aquesta regió és d'un 70% (Araujo, 1996).

Donada la relació entre l'afinitat dels compostos per una determinada subunitat α i l'ocupació dels receptors *ex-vivo*, les dades d'ocupació a còrtex ens poden donar una idea de l'afinitat dels compostos en estudi per la subunitat α_3 . A còrtex, el GF-015621-00 ocupa un 69% dels receptors a la dosi de 30 mg/kg, mentre el zolpidem a aquesta mateixa dosi n'ocupa el 52% (Taula 27, pàgina 117). A medul·la a 30 mg/kg tots dos compostos pràcticament no ocupen receptors (13-22%). Si com havíem dit considerem que zolpidem a còrtex només ocupa α_1 , i que el percentatge d'ocupació (52%) correspon a la proporció de receptors GABA_A que contenen la subunitat α_1 a còrtex, llavors aquest 17% més d'ocupació del GF-015621-00 a la dosi de 30 mg/kg es podria atribuir a la unió sobre α_3 . De manera similar, el GF-016641-00 a la dosi de 30 mg/kg ocupa un 75% dels receptors a còrtex (Taula 27, pàgina 117), comparat amb zolpidem presenta un 23% més d'ocupació atribuïble a α_3 . En canvi, el GF-016783-00 mostra un perfil d'ocupació a còrtex diferent (Figura 56, pàgina 115): a les dosis d'1 a 10 mg/kg l'ocupació de receptors a còrtex és aproximadament la meitat que a cerebel; mentre que a la dosi de 30 mg/kg aquesta és similar en tots dos teixits (75% a còrtex enfront del 88% a cerebel), encara que un 23% superior a la que té zolpidem a còrtex a la mateixa dosi. Una possible explicació seria que el GF-016783-00 té poca afinitat per la subunitat α_3 comparat amb els altres dos compostos d'estudi i que només a les dosis més altes s'uniria a aquesta subunitat.

Per tant els tres compostos d'estudi a la dosi de 30 mg/kg tenen a còrtex una ocupació entre un 17 i un 23% superior a la del zolpidem. Aquesta diferència d'ocupació podria ser majoritàriament deguda a la unió dels compostos als receptors GABA_A que contenen la subunitat α_3 . S'ha descrit que els agonistes d'aquesta subunitat tenen activitat ansiolítica (Dias, 2005). El TP003, agonista parcial amb activitat intrínseca selectiva de la subunitat α_3 , indueix ansiòlisi ocupant el 75% dels receptors a cervell, mentre la clordiazepoxide, benzodiazepina amb la mateixa afinitat per les subunitats α_1 , α_2 , α_3 i α_5 del receptor GABA_A, indueix el mateix efecte amb un 25% d'ocupació (Dias, 2005). En el cas dels nostres compostos en estudi, a la dosi que indueixen sedació els percentatges d'ocupació a còrtex són inferiors als de cerebel. Donat que a còrtex hi ha una menor proporció de receptors que contenen la subunitat α_1 , aquests resultats suggereixen que a còrtex els compostos s'estarien unint preferentment a aquesta subunitat i tindrien major afinitat per α_1 que per α_3 . Tot i així si a la dosi a la que s'indueix sedació hi hagués també unió a la subunitat α_3 , i aquesta unió

induís una resposta biològica ansiolítica, aquesta podria tenir un valor afegit en els casos d'insomni provocats per situacions d'estrès.

A medul·la, on predomina la subunitat α_2 del receptor GABA_A, el zolpidem i els compostos estudiats presenten molt poca ocupació a la dosi que indueixen sedació.

La relaxació muscular està produïda per l'activació dels receptors GABA_A de medul·la que contenen la subunitat α_2 . Quan relacionem la dosi a la que s'indueix relaxació muscular *in vivo* amb l'ocupació dels compostos a medul·la, el compost que necessita una menor ocupació (30%) és el zolpidem. L'ocupació d'aquest compost a medul·la és similar a la que tenia a cerebel a la ID₅₀ de l'SMA (38%, Taula 31). Per tant, per produir els dos tipus de resposta biològica (sedació i miorelaxació) zolpidem requereix poca ocupació. Aquestes dades estarien en consonància amb el descrit en la bibliografia (Facklam, 1992a; Facklam, 1992b) referent als agonistes totals, els quals al tenir una elevada eficàcia intrínseca, requereixen una menor ocupació per produir una determinada resposta biològica.

A diferència del zolpidem, el GF-016641-00 i el GF-016783-00 a la ID₅₀ del GS, ocupen un percentatge de receptors α_2 (mesurat a medul·la) superior al d' α_1 (mesurat a cerebel) per produir sedació (Taula 31). Per tant a medul·la aquests compostos requereixen una major ocupació per generar relaxació muscular. En el cas del GF-016641-00 com hem dit anteriorment, l'ocupació observada a medul·la correspondria a un metabòlit amb baixa activitat intrínseca, per tant encara que ocupés un major nombre de receptors a medul·la possiblement no veuríem resposta biològica. En canvi, el GF-016783-00 és el compost que *in vitro* tenia major afinitat per la subunitat α_2 . A l'avaluar la relaxació muscular *in vivo* (GS) a la màxima dosi assajada (40 mg/kg) només produïa una disminució del 23% de la força muscular (dades no mostrades), ocupant a medul·la més d'un 59% de receptors. Donat que els agonistes parcials, al tenir menor eficàcia intrínseca, requereixen una major ocupació per assolir el mateix grau (no sempre l'assoleixen) de resposta biològica (Facklam, 1992a), aquestes dades ens porten a suggerir que el GF-016783-00 podria tenir activitat agonista parcial sobre els receptors que contenen la subunitat α_2 .

Aquestes dades d'ocupació corroboren la selectivitat dels compostos per la subunitat α_1 , observada tant en els assaigs *in vitro* com en els *in vivo*.

El resum del conjunt de resultats i hipòtesis desenvolupats en aquesta discussió es recullen a la Taula 32.

Taula 32. Resum de l'activitat i afinitat dels compostos per les subunitats α_1 , α_2 i α_3 del receptor GABA_A.

	Sedació/ Hipnòsi	Miorelaxació	Ansiòlisi
Zolpidem	Agonista total ↑ Afinitat	Agonista total ↓ Afinitat	Agonista total ↓ Afinitat
GF-016641-00	Agonista total ↑ Afinitat	↓ Afinitat*	Afinitat $\alpha_3 < \alpha_1$
GF-015621-00	Agonista total ↑ Afinitat	↓ Afinitat	Afinitat $\alpha_3 < \alpha_1$
GF-016783-00	Agonista total ↑ Afinitat	Agonista parcial ↑ Afinitat	Afinitat $\alpha_3 < \alpha_1$

* Amb metabòlit possiblement antagonista amb ↑ afinitat per aquesta subunitat.

4. CITOTOXICITAT

Els assaigs de citotoxicitat ens permeten avaluar la possible toxicitat de les noves estructures químiques, en les etapes inicials de la recerca de nous fàrmacs.

Aquests assaigs es van realitzar amb el reactiu comercial CellTiter-Glo[®] *Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) que determina el nombre de cèl·lules viables a partir de la quantificació dels nivells d'ATP. Tradicionalment els assaigs de citotoxicitat s'han basat amb la reducció d'una sal de tetrazolium (MTT), a través de NADH i NADPH produïts per les cèl·lules metabòlicament actives (Berridge, 1993), generant un producte colorimètric que absorbeix a 490 nm. Els assaigs en els quals es mesuren els nivells d'ATP són més sensibles que no pas els MTT, són més ràpids i no depenen d'una reacció enzimàtica intracel·lular, de manera que és menys probable la presència d'artefactes causats per la interacció dels compostos testats amb la reacció química de l'assaig.

De les tres línies cel·lulars en les quals es va estudiar la toxicitat, les CHO-K1 van ser les més sensibles, amb els valors de la IC₅₀ més baixos. Les HepG2 que són cèl·lules derivades de fetge, òrgan en el qual es metabolitzen majoritàriament els fàrmacs, van presentar menor toxicitat. En les SH-SY5Y, línia cel·lular de cervell on és localitzada els receptors GABA_A, els compostos d'estudi van donar una IC₅₀ similar a la dels compostos de referència. En aquesta línia cel·lular, dels tres compostos seleccionats el GF-016641-00 va ser el que va presentar

menor toxicitat amb un valor similar al del zolpidem. El GF-016783-00 va ser el més tòxic amb un valor d'IC₅₀ com el del diazepam i superior al de l'indiplon. Tanmateix al determinar el marge terapèutic amb el quocient entre la IC₅₀ dels assaigs de citotoxicitat i la de l'afinitat *in vitro* per α_1 (cerebel), tots els compostos tenen entre 3 i 5 ordres de magnitud de diferència entre la concentració *in vitro* i la que causa un 50% de la mortalitat cel·lular. Aquests marges són similars als dels estàndards (Taula 28, pàgina 118) i prou amplis, de manera que els compostos d'estudis es poden considerar fàrmacs segurs.

Finalment, cap dels compostos d'estudi va donar positiu en els assaigs de mutagènesi (Spot Test, realitzat a la Secció de Malalties Infeccioses del Departament de Ciències Biològiques i Biotecnologia de Ferrer Internacional) (dades no mostrades).

Conclusions

1. Partint de l'estructura química del zolpidem es van dissenyar vàries sèries químiques. Les famílies dels indols i dels benzimidazols malgrat presentar certa afinitat *in vitro* per la subunitat α_1 , no mostraven relació entre l'estructura química i l'activitat (no SAR) en modificar els substituents per millorar-ne l'afinitat.
2. La família de les quinolones tot i tenir compostos amb bona afinitat *in vitro* per la subunitat α_1 , presentaven poca activitat hipnòtica *in vivo* possiblement atribuïble a problemes de pas de la barrera hematoencefàlica, que dificultaria l'arribada dels compostos als receptors GABA_A d'SNC.
3. De les 21 sèries químiques sintetitzades, les que contenien els compostos amb major selectivitat *in vitro* per la subunitat α_1 , van ser les imidazopiridines i imidazopiridazines, sent les imidazopiridazines les que vam mostrar millor activitat hipnòtica *in vivo*.
4. Dels 1214 compostos que es van cribrar en total, el GF-015621-00 i el GF-016641-00 de la família de les imidazopiridazines, presentaven una elevada selectivitat *in vitro* per la subunitat α_1 del receptor GABA_A (81 i 173 respectivament), major que la del zolpidem (24), el fàrmac de referència més selectiu que hi ha actualment al mercat.
5. El GF-016641-00, el compost més selectiu *in vitro*, és també el més selectiu *in vivo*, de manera que a la dosi que indueix sedació no s'observa relaxació muscular, un efecte no desitjat.
6. Les dades d'ocupació *ex-vivo* a cerebel corroboren l'afinitat del GF-016641-00 per la subunitat α_1 del receptor GABA_A. Tanmateix el GF-016641-00 presenta menys selectivitat *ex-vivo* que el zolpidem, possiblement atribuïble a la presència d'un metabòlit amb major afinitat per la subunitat α_2 sense activitat intrínseca significativa per generar un resposta biològica.
7. Els fàrmacs Z assajats (zolpidem, GF-015621-00, GF-016783-00 i GF-016641-00) indueixen efectes sedants en el test de conducta *in vivo* SMA, amb una ocupació inferior a la del diazepam.
8. En base als resultats obtinguts en la present Tesi Doctoral, conjuntament amb els dels altres Departaments del centre d'R+D de Ferrer Internacional, podem concloure que hem seleccionat un candidat, el GF-016641-00, que en els estudis preclínics pugui millorar els inconvenients dels hipnòtics actuals.

Annex

1. TEST DE CONDUCTA *IN VIVO*

1.1. Inhibició de l'activitat motora espontània

El test d'inhibició de l'activitat motora espontània *in vivo* (SMA) s'utilitza per avaluar el potencial sedatiu/ hipnòtic dels compostos.

1.1.1. Fonament:

Davant un espai nou la conducta natural dels animals és explorar-lo. El test determina el recorregut dels animals administrats amb el compost, respecte als animals control administrats amb el vehicle. Els compostos amb activitat hipnòtica/sedant produiran una disminució en el recorregut dels animals, respecte als no tractats.

1.1.2. Protocol:

En el cribratge primari (Taula 33), es distribuïen ratolins albins de la soca Swiss CD1 en 2 grups de tractament, els quals rebien una dosi oral del compost (3.3 $\mu\text{mol/kg}$ o 97 $\mu\text{mol/kg}$) o intraperitoneal (0.98 $\mu\text{mol/kg}$ o 97 $\mu\text{mol/kg}$). En el cribratge secundari (Taula 34), els ratolins es distribuïen en 4 o 5 grups de tractament, cadascun dels quals era administrat via oral amb una dosi del compost en un rang de 0.1 a 100 mg/kg, en funció de la potència del compost determinada en el cribratge primari.

Un cop administrats, els ratolins es dipositaven immediatament en un cubicle negre de plexiglàs de 41 x 41 x 34 cm (Figura 57A). El cubicle estava ubicat en una habitació fosca, il·luminada amb bombetes incandescents, de manera que la llum del cubicle fos uniforme (60 lux aproximadament).

Els animals romanien 60 minuts en el cubicle, durant els quals es gravava i mesurava la distància recorreguda mitjançant l'aparell *Smart System (Panlab)* (Figura 57B). Els primers 5 minuts es consideraven d'aclimatació i eren descartats en la mesura.

El percentatge d'inhibició de l'activitat motora espontània per part del compost es calcula com el quocient entre el recorregut dels animals administrats amb el compost respecte al grup d'animals control administrats amb el vehicle (Methocel[®] K100M 0.5%). La ID_{50} es calcula mitjançant l'anàlisi de la regressió lineal.

Taula 33. Percentatges d'inhibició de l'activitat motora espontània en ratolí, durant els intervals de 5 a 30 i de 30 a 60 minuts (n= 8-10) dels compostos amb bona afinitat *in vitro*. Els compostos eren administrats via oral (p.o) i/o intraperitoneal (i.p.). Dades obtingudes per la Secció de Farmacologia del Departament de Ciències Biològiques i Biotecnologia del centre d'R+D de Ferrer Internacional.

SMA via i.p.				
	97 µmol/kg		0.98 µmol/kg	
	%Inh 5-30'	%Inh 30-60'	%Inh 5-30'	%Inh 30-60'
Diazepam	95.1		25.4	
Zolpidem	91.7		18.3	
Zaleplon	85.0		32.7	
Indiplon	88.0		70.5	
Indols				
GF-009383-00	91.6			
Benzimidazols				
GF-006234-00	85.7			
Quinolones				
GF-012009-00	38.3			
GF-017048-00	-14.6			
GF-017162-00	93.5		-52.3	
Imidazopiridines				
GF-012263-00	78.4			
GF-012264-00	90.8		8.6	
GF-012971-00	74.7		-4.3	
Imidazopiridazines				
GF-015621-00	93.7		41.2	
GF-016641-00	65.4	56.8	76.9	45.7
GF-016783-00	93.1		38.6	
SMA via p.o.				
	97 µmol/kg		3.3 µmol/kg	
	%Inh 5-30'	%Inh 30-60'	%Inh 5-30'	%Inh 30-60'
Diazepam	89.1	85.0	5.6	18.2
Zolpidem	93.0	88.5	20.4	33.0
Zaleplon	57.5	70.2	28.2	41.4
Indiplon	83.4	79.2	76.8	66.7
Imidazopiridazines				
GF-015621-00	92.0	88.3	45.7	39.3
GF-016641-00	31.2	15.9	76.4	49.0
GF-016783-00	86.2	85.3	40.1	-1.3

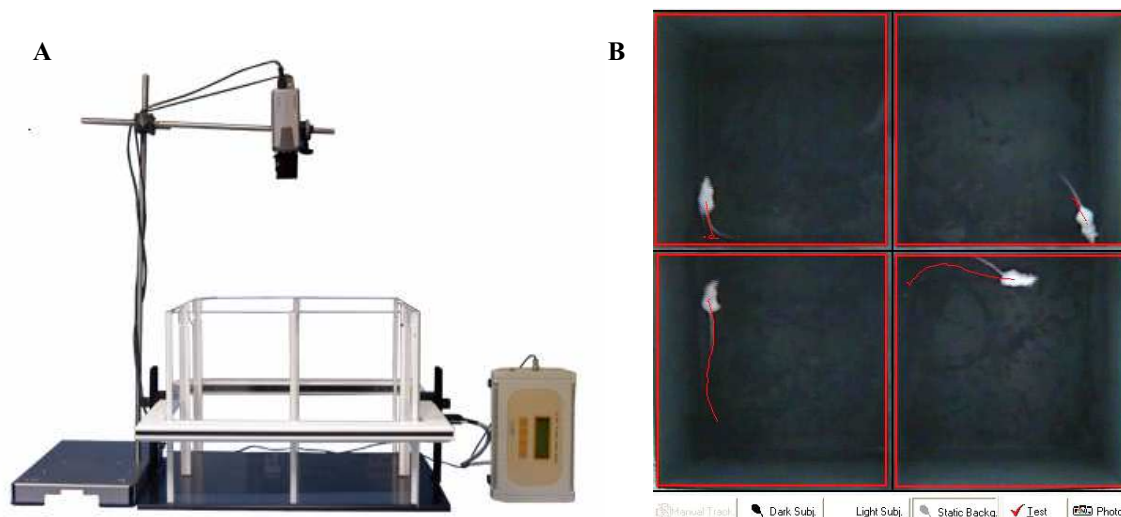


Figura 57. Imatge de l'*Smart System (Panlab)*. **A.** Cubicle de plexiglàs i càmera. **B.** Imatge del programa informàtic que mesura la distància recorreguda per cada animal.

1.2. Pèrdua de la força muscular

El test de pèrdua de la força muscular (GS, de l'anglès *Grip Strength*) s'utilitza per avaluar la relaxació muscular induïda pels compostos.

1.2.1. Fonament:

El test mesura el to muscular dels animals administrats amb el compost respecte els animals control administrats amb el vehicle. Els compostos amb efecte miorelaxant induiran en els animals una disminució de la força muscular, respecte als no tractats.

1.2.2. Protocol:

A ratolins albins de la soca Swiss CD1, se'ls distribuïa en 4 o 5 grups de tractament, cadascun dels quals rebia una dosi oral del compost en un rang de 1 a 160 mg/kg. Inmediatament els animals es sostenien per la cua i se'ls deixava subjectar amb les extremitats anteriors a la reixeta metàl·lica de l'aparell *Grip Strength Meter (Bioseb)* (Figura 58) que mesurava la força muscular dels animals. La mesura es repetia als 15, 45 i 75 minuts post-administració.

El percentatge d'inhibició de la força muscular es calcula com el quocient entre la força muscular dels animals administrats amb el compost respecte el grup control (administrats amb Methocel[®] K100M 0.5%) per un mateix període de temps. La ID₅₀ (Taula 34) es calcula mitjançant l'anàlisi de la regressió lineal.

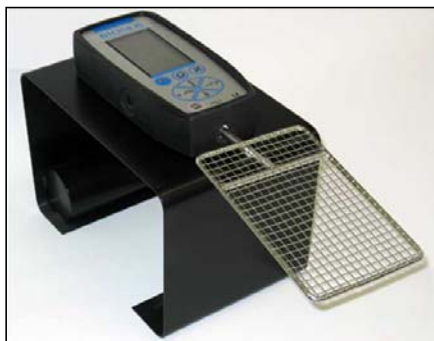


Figura 58. Imatge del *Grip Strength Meter* (Bioseb).

Taula 34. Dosi inhibidora 50 (ID_{50}) dels tests de conducta *in vivo* en ratolí (n=8-12). La selectivitat *in vivo* es calcula com el quocient entre la ID_{50} obtinguda en el GS respecte l'SMA. Les diferents dosis dels compostos es van administrar via oral (p.o). Dades obtingudes per la Secció de Farmacologia del Departament de Ciències Biològiques i Biotecnologia del centre d'R+D de Ferrer Internacional.

	5-30 min	15 min	
	SMA p.o.	Grip strength p.o.	Selectivitat
	<i>IN VIVO</i>	<i>IN VIVO</i>	<i>IN VIVO</i>
	ID_{50} (mg/kg)	ID_{50} (mg/kg)	ID_{50} (Grip Strength)/ ID_{50} (SMA)
Zolpidem	2.3	64	28
Diazepam	4.2	19	4
GF-015621-00	4.2	-	-
GF-016641-00	0.85	> 160	> 188
GF-016783-00	2.0	> 40	> 20

	30-60 min	45 min	
	SMA p.o.	Grip strength p.o.	Selectivitat
	<i>IN VIVO</i>	<i>IN VIVO</i>	<i>IN VIVO</i>
	ID_{50} (mg/kg)	ID_{50} (mg/kg)	ID_{50} (Grip Strength)/ ID_{50} (SMA)
Zolpidem	2.0	> 100	> 50
Diazepam	3.3	5.3	2
GF-015621-00	2.8	-	-
GF-016641-00	0.60	> 160	> 267
GF-016783-00	1.0	> 40	> 40

2. ESTABILITAT METABÒLICA I ABSORCIÓ *IN VITRO*

En els compostos representatius de les 5 famílies químiques patentades que havien mostrat una bona activitat hipnòtica *in vivo*, es va determinar la seva estabilitat metabòlica incubant-los durant 120 minuts amb microsomes hepàtics humans. També es va caracteritzar l'absorció amb els assaigs amb cèl·lules intestinals Caco-2. La Taula 35 recull les dades qualitatives d'estabilitat i absorció obtingudes amb aquests compostos, conjuntament amb la dels estàndards.

Taula 35. Dades qualitatives d'absorció en cèl·lules intestinals Caco-2 i estabilitat metabòlica obtinguda en microsomes hepàtics humans dels compostos representatius de les diferents famílies patentades. Dades obtingudes pel Departament de Farmacocinètica i Metabolisme del centre d'R+D de Ferrer Internacional.

	Estabilitat metabòlica	Absorció
	Microsomes humans 120'	Caco-2
Zaleplon	ALTA	ALTA
Indiplon	ALTA	ALTA
Zolpidem	ALTA	MITJA - ALTA
Quinolones		
GF-017162-00	ALTA	ALTA
Imidazopiridines		
GF-012263-00	BAIXA	ALTA
GF-012264-00	BAIXA	ALTA
GF-012971-00	BAIXA	-
Imidazopiridazines		
GF-015621-00	ALTA	ALTA
GF-016641-00	ALTA	ALTA
GF-016783-00	BAIXA	ALTA

D'altra banda, per seleccionar el model animal per a la realització dels estudis farmacocinètics, el Departament de Farmacocinètica i Metabolisme del centre d'R+D de Ferrer Internacional va avaluar la metabolització dels compostos en estudi, en microsomes hepàtics de rata i ratolí comparativament amb els humans. Les dades obtingudes (Taula 36) mostren que els compostos es metabolitzen molt ràpidament en rata i que en canvi el ratolí té per aquests compostos un metabolisme més similar a l'humà.

Taula 36. Dades d'aclariment (Cl) en microsomes hepàtics humans, de ratolí i rata, dels compostos en estudi i de l'estàndard zolpidem. Dades obtingudes pel Departament de Farmacocinètica i Metabolisme del centre d'R+D de Ferrer Internacional.

	Humà	Ratolí	Rata
	Cl	Cl	Cl
	(mL/ min/ g fetge)	(mL/ min/ g fetge)	(mL/ min/ g fetge)
Zolpidem	0.55	1.16	1.66
GF-016641-00	0.67	0.43	4.71
GF-016783-00	1.74	1.45	4.50

3. ESTUDIS FARMACOCINÈTICS I DE METABOLITZACIÓ EN RATOLÍ

A ratolins de la soca Swiss CD-1 se'ls administrava via oral 2.5 mg/kg de cada compost, i posteriorment es realitzaven extraccions de sang via retroorbital o mitjançant punció cardíaca a 5, 15, 30, 60, 120, 180, 300 i 420 minuts. Un cop centrifugada la sang, s'obtenia el plasma i es determinava la quantitat de compost mitjançant LC/MS (cromatografia líquida/espectrometria de masses). Mitjançant un programa d'anàlisi farmacocinètic es calculava l'àrea sota la corba (AUC), l'aclariment en sang (Cl), la concentració màxima de compost (C_{max}) i la biodisponibilitat (F) (Taula 37).

Taula 37. Paràmetres farmacocinètics en ratolí dels compostos en estudi i els estàndards. Dades obtingudes pel Departament de Farmacocinètica i Metabolisme del centre d'R+D de Ferrer Internacional. (AUC: àrea sota corba, Cl: aclariment, C_{max} : concentració màxima i F: biodisponibilitat).

	AUC	Cl	C_{max}	F
	h x ng/ mL	L/ h/ kg	ng/ mL	%
Zaleplon	ND	2.2	ND	57
Zolpidem	ND	2.0	ND	35
GF-015621-00	7	4.2	35	1
GF-016641-00	488	0.8	644	16
GF-016783-00	167	1.7	297	12

Bibliografia

Abadie P, Rioux P, Scatton B, Zarifian E, Barre L, Patat A and Baron JC (1996) Central benzodiazepine receptor occupancy by zolpidem in the human brain as assessed by positron emission tomography. *Eur J Pharmacol* **295**:35-44.

American Academy of Sleep Medicine (2005) *The international classification of sleep disorders* (2^a Ed.). Editors: American Academy of Sleep Medicine. Rochester, MN.

American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)* (4^a Ed.). Editors: American Psychiatric Association. Washington, DC.

Araujo F, Tan S, Ruano D, Schoemaker H, Benavides J and Vitorica J (1996) Molecular and pharmacological characterization of native cortical gamma-aminobutyric acidA receptors containing both alpha1 and alpha3 subunits. *J Biol Chem* **271**:27902-27911.

Arbilla S, Allen J, Wick A and Langer SZ (1986) High affinity [³H]zolpidem binding in the rat brain: an imidazopyridine with agonist properties at central benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* **130**:257-263.

Atack JR, Smith AJ, Emms F and McKernan RM (1999) Regional differences in the inhibition of mouse in vivo [³H]Ro 15-1788 binding reflect selectivity for alpha 1 versus alpha 2 and alpha 3 subunit-containing GABAA receptors. *Neuropsychopharmacology* **20**:255-262.

Atack JR (2005a) The benzodiazepine binding site of GABA(A) receptors as a target for the development of novel anxiolytics. *Expert Opin Investig Drugs* **14**:601-618.

Atack JR, Hutson PH, Collinson N, Marshall G, Bentley G, Moyes C, Cook SM, Collins I, Wafford K, McKernan RM and Dawson GR (2005b) Anxiogenic properties of an inverse agonist selective for alpha3 subunit-containing GABA A receptors. *Br J Pharmacol* **144**:357-366.

Atack J, Hallett DJ, Tye S, Wafford KA, Ryan C, Sanabria-Bohorquez S, Eng WS, Gibson RE, Burns HD, Dawson GR, Carling RW, Street LJ, Pike A, De Lepeleire I, Van Laere K, Bormans G, de Hoon JN, Van Hecken A, McKernan RM, Murphy MG and Hargreaves RJ (2010) Preclinical and clinical pharmacology of TPA023B, a GABAA receptor $\alpha 2/\alpha 3$ subtype-selective partial agonist. *J Psychopharmacol*. **00**:1-16. DOI: 10.1177/0269881109354928.

Bastien CH, Ouellet MC, Fortier-Brochu E and Morin CM (2005) Primary insomnia. Del llibre: *Clinical Neurophysiology of Sleep Disorders. Handbook of Clinical Neurophysiology*. Editor: Guillemainault C. Elsevier B.V. pp. 305-315.

Bear MF, Connors B and Paradiso M (2007) Los ritmos cerebrales y el sueño. Del llibre: *Neurociencia* (3^a Ed.). Williams and Wilkins. pp. 586-615.

Berridge MV and Tan AS (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* **303**:474-482.

- Besnard F, Even Y, Itier V, Granger P, Partiseti M, Avenet P, Depoortere H and Graham D (1997) Development of stable cell lines expressing different subtypes of GABAA receptors. *J Recept Signal Transduct Res* **17**:99-113.
- Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J and Gassmann M (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* **84**:835-867.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H and Fritschy JM (1996) Laminar compartmentalization of GABAA-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci* **16**:283-297.
- Borbely AA and Tobler I (1985) *Brain mechanisms of sleep*. Editor: McGinty DJ. Raven Press. NY. pp. 35-44.
- Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* **21**:16-19.
- Bowery NG and Enna SJ (2000) Gamma-aminobutyric acid(B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* **1**:2-7.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **2**:248-254.
- Brown CL and Martin IL (1984) Kinetics of [³H]Ro 15-1788 binding to membrane-bound rat brain benzodiazepine receptors. *J Neurochem* **42**:918-923.
- Bylund DB and Yamamura HI (1990) Methods for receptor binding. Del llibre: *Methods in neurotransmitter receptor analysis*. Editors: Yamamura HI, Enna SJ and Kuhar MJ. Raven Press Ltd. NY. pp 1-35.
- Bylund DB and Toews ML (1993) Radioligand binding methods: practical guide and tips. *Am J Physiol* **265**:L421-429.
- Cai J, Cooke FE and Sherborne BS (2006) Antagonists of the orexin receptors. *Expert Opin Ther Patents* **16**:631-646.
- Charney DS, Mihic SJ and Harris RA (2006) Hypnotics and sedatives. Del llibre: *Goodman and Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics* (11^a Ed.). Editor: Brunton LL. The McGraw-Hill Companies, Inc. EUA, pp 401-427.
- Chebib M (2004) GABAC receptor ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **31**:800-804.
- Chiu TH and Rosenberg HC (1979) Differential effects of triton X-100 on benzodiazepine and GABA binding in a frozen-thawed synaptosomal fraction of rat brain. *Eur J Pharmacol* **3**:335-338.
- Cid-Pellitero E and Garzon M (2007) Modulation by the hypocretinergic/orexinergic neurotransmission system in sleep-wakefulness cycle states. *Rev Neurol* **45**:482-490.
- Cooper JR, Bloom FE and Roth RH (2003) Amino acid transmitters. Del llibre: *The biochemical basis of neuropharmacology* (8^a Ed.). Oxford University Press, pp. 105-150.

- Crawley NJ, Gerfen CR, Rogawski MA, Sibley DR, Skolnick P and Wray S (1997) Analyzing radioligand binding data. *Current protocols in neuroscience*. John Wiley & sons, Inc., NY.
- Dämgen K and Lüddens H (1999) Zaleplon displays a selectivity to recombinant GABA_A receptors different from zolpidem, zopiclone and benzodiazepines. *Neurosci Res Commun* **25**:121–182.
- Datamonitor (2008) Forecast insight: Insomnia. Orexin and serotonin receptor modulators to innovate market: 1-143.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:322-327.
- Dias R, Sheppard WF, Fradley RL, Garrett EM, Stanley JL, Tye SJ, Goodacre S, Lincoln RJ, Cook SM, Conley R, Hallett D, Humphries AC, Thompson SA, Wafford KA, Street LJ, Castro JL, Whiting PJ, Rosahl TW, Atack JR, McKernan RM, Dawson GR and Reynolds DS (2005) Evidence for a significant role of alpha 3-containing GABA_A receptors in mediating the anxiolytic effects of benzodiazepines. *J Neurosci* **25**:10682-10688.
- Ebert B, Wafford KA and Deacon S (2006) Treating insomnia: Current and investigational pharmacological approaches. *Pharmacol Ther* **112**:612-629.
- Emson PC (2007) GABA(B) receptors: structure and function. *Prog Brain Res* **160**:43-57.
- Enz R and Cutting GR (1998) Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* **38**:1431-1441.
- Estivill E, Bove A, Garcia-Borreguero D, Gibert J, Paniagua J, Pin G, Puertas FJ and Cilveti R (2003) Consensus on drug treatment, definition and diagnosis for insomnia. *Clin Drug Investig* **23**:351-385.
- Facklam M, Schoch P, Bonetti EP, Jenck F, Martin JR, Moreau JL and Haefely WE (1992a) Relationship between benzodiazepine receptor occupancy and functional effects in vivo of four ligands of differing intrinsic efficacies. *J Pharmacol Exp Ther* **261**:1113-1121.
- Facklam M, Schoch P and Haefely WE (1992b) Relationship between benzodiazepine receptor occupancy and potentiation of gamma-aminobutyric acid-stimulated chloride flux in vitro of four ligands of differing intrinsic efficacies. *J Pharmacol Exp Ther* **261**:1106-1112.
- Fritschy JM and Mohler H (1995) GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol* **359**:154-194.
- Fuller PM, Gooley JJ and Saper CB (2006) Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. *J Biol Rhythms* **21**:482-493.
- Ganjavi H and Shapiro CM (2007) Hypocretin/Orexin: a molecular link between sleep, energy regulation, and pleasure. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **19**:413-419.

Gannon RL (2001) 5HT7 receptors in the rodent suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* **16**:19-24.

Gemkow MJ, Davenport AJ, Harich S, Ellenbroek BA, Cesura A and Hallett D (2009) The histamine H3 receptor as a therapeutic drug target for CNS disorders. *Drug Discov Today* **9-10**:509-515.

Giusti P, Ducić I, Puia G, Arban R, Walser A, Guidotti A and Costa E (1993) Imidazenil: a new partial positive allosteric modulator of gamma-aminobutyric acid (GABA) action at GABAA receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **2**:1018-1028.

Gottesmann C (2002) GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience* **111**:231-239.

Gottlieb DJ, O'Connor GT and Wilk JB (2007) Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Med Genet* **8 Suppl 1**:S9.

Graham D, Faure C, Besnard F and Langer SZ (1996) Pharmacological profile of benzodiazepine site ligands with recombinant GABAA receptor subtypes. *Eur Neuropsychopharmacol* **6**:119-125.

Greenblatt DJ and Sethy VH (1990) Benzodiazepine concentrations in brain directly reflect receptor occupancy: studies of diazepam, lorazepam, and oxazepam. *Psychopharmacology (Berl)* **102**:373-378.

Griebel G, Perrault G, Simiand J, Cohen C, Granger P, Decobert M, Francon D, Avenet P, Depoortere H, Tan S, Oblin A, Schoemaker H, Evanno Y, Sevrin M, George P and Scatton B (2001) SL651498: an anxiolytic compound with functional selectivity for alpha2- and alpha3-containing gamma-aminobutyric acid(A) (GABA(A)) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:753-768.

Hagan JJ, Price GW, Jeffrey P, Deeks NJ, Stean T, Piper D, Smith MI, Upton N, Medhurst AD, Middlemiss DN, Riley GJ, Lovell PJ, Bromidge SM and Thomas DR (2000) Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT(7) receptor antagonist. *Br J Pharmacol* **130**:539-548.

Hardeland R, Poeggeler B, Srinivasan V, Trakht I, Pandi-Perumal SR and Cardinali DP (2008) Melatonergic drugs in clinical practice. *Arzneimittelforschung* **58**:1-10.

Hardeland R (2009a) New approaches in the management of insomnia: weighing the advantages of prolonged-release melatonin and synthetic melatonergic agonists. *Neuropsychiatr Dis Treat* **5**:341-354.

Hardeland R (2009b) Tasimelteon, a melatonin agonist for the treatment of insomnia and circadian rhythm sleep disorders. *Curr Opin Investig Drugs* **10**:691-701.

Inglese J, Johnson RL, Simeonov A, Xia M, Zheng W, Austin CP and Auld DS (2007) High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nat Chem Biol* **3**:466-79.

Jaferi A and Bhatnagar S (2007) Corticotropin-releasing hormone receptors in the medial prefrontal cortex regulate hypothalamic-pituitary-adrenal activity and anxiety-related behavior regardless of prior stress experience. *Brain Res* **1186**:212-223.

- Janssen MJ, Ensing K and de Zeeuw RA (1999) Improved benzodiazepine radioreceptor assay using the MultiScreen Assay System. *J Pharm Biomed Anal* **20**:753-761.
- Johnston GA, Chebib M, Hanrahan JR and Mewett KN (2003) GABA(C) receptors as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **2**:260-268.
- Johnston GA (2005) GABA(A) receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Des* **15**:1867-1885.
- Jones BE (2005) From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci* **26**:578-586.
- Kandel ER, Schwartz JH and Jessell TM (2001) Sueño y ensoñación. Del llibre: *Principios de neurociencia* (4^a Ed.). McGraw-Hill Interamericana. pp. 936-947.
- Karolczak M, Korf HW and Stehle JH (2005) The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland. *Endocrine* **27**:89-100.
- Kenakin T (1993) Radioligand binding experiments. Del llibre: *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction* (2^a Ed.). Raven Press Ltd. NY. pp 385-410.
- Lameh J, Wang P, Meredith D, Shafer SL and Loew GH (2000) Characterization of benzodiazepine receptors in the cerebellum. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **24**:979-991.
- Lancel M (1999) Role of GABAA receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. *Sleep* **22**:33-42.
- Lelas S, Rowlett JK and Spealman RD (2001) Triazolam discrimination in squirrel monkeys distinguishes high-efficacy agonists from other benzodiazepines and non-benzodiazepine drugs. *Psychopharmacology* **154**:96-104.
- Li J, Fish RL, Cook SM, Tattersall FD and Atack JR (2006) Comparison of in vivo and ex vivo [³H]flumazenil binding assays to determine occupancy at the benzodiazepine binding site of rat brain GABAA receptors. *Neuropharmacology* **51**:168-172.
- Low K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Rulicke T, Bluethmann H, Mohler H and Rudolph U (2000) Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science* **290**:131-134.
- Macarrón R and Hertzberg RP (2002) Design and implementation of high throughput screening assays. *Methods in molecular biology. High throughput screening: methods and protocols*. Editor: Janzen WP. Humana Press Inc., Totowa, NJ. pp. 1-29.
- Massotti M, Schlichting JL, Antonacci MD, Giusti P, Memo M, Costa E and Guidotti A (1991) gamma-Aminobutyric acidA receptor heterogeneity in rat central nervous system: studies with clonazepam and other benzodiazepine ligands. *J Pharmacol Exp Ther* **256**:1154-1160.
- McKernan RM and Whiting PJ (1996) Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends Neurosci* **19**:139-143.

McKernan RM, Rosahl TW, Reynolds DS, Sur C, Wafford KA, Atack JR, Farrar S, Myers J, Cook G, Ferris P, Garrett L, Bristow L, Marshall G, Macaulay A, Brown N, Howell O, Moore KW, Carling RW, Street LJ, Castro JL, Ragan CI, Dawson GR and Whiting PJ (2000) Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA(A) receptor alpha1 subtype. *Nat Neurosci* **3**:587-592.

McKim JM, Wilga PC, Pregenzer JF and Petrella DK (2005) A biochemical approach to in vitro toxicity testing. *Pharmaceutical Discovery* 30-36.

Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA and Harrison NL (1997) Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* **6649**:385-389.

Mikkelsen JD, Soderman A, Kiss A and Mirza N (2005) Effects of benzodiazepines receptor agonists on the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Eur J Pharmacol* **519**:223-230.

Mikkelsen JD, Bundzikova J, Larsen MH, Hansen HH and Kiss A (2008) GABA regulates the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis via different GABA-A receptor alpha-subtypes. *Ann N Y Acad Sci* **1148**:384-392.

Miller LG, Greenblatt DJ, Paul SM and Shader RI (1987) Benzodiazepine receptor occupancy in vivo: correlation with brain concentrations and pharmacodynamic actions. *J Pharmacol Exp Ther* **240**:516-522.

Mitler MM (2000) Nonselective and selective benzodiazepine receptor agonists-where are we today? *Sleep* **23 Suppl 1**:S39-47.

Mohler H, Fritschy JM and Rudolph U (2002) A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:2-8.

Möhler, H (2006) Benzodiazepines. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & sons, Inc., NY. pp. 1-7.

Moruzzi G and Magoun RW (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroenceph Clin Neurophysiol* **1**: 455-473.

Muller WE and Stillbauer AE (1983) Benzodiazepine hypnotics: time course and potency of benzodiazepine receptor occupation after oral application. *Pharmacol Biochem Behav* **18**:545-549.

National Institute of Health (2005) Manifestations and management of chronic insomnia in adults. Del llibre: *NIH consensus and State-of-the-Science Statements*.

Neubauer DN Almorexant, a dual orexin receptor antagonist for the treatment of insomnia. *Curr Opin Investig Drugs* **11**:101-110.

Nishino S (2007) The hypocretin/orexin receptor: therapeutic prospective in sleep disorders. *Expert Opin Investig Drugs* **16**:1785-1797.

Noguchi H, Kitazumi K, Mori M and Shiba T (2002) Binding and neuropharmacological profile of zaleplon, a novel nonbenzodiazepine sedative/hypnotic. *Eur J Pharmacol* **434**:21-28.

Ohayon MM (2006a) Epidemiology of sleep disorders. Del llibre: *Clinical Neurophysiology of sleep disorders. Handbook of clinical Neurophysiology*. Editor: Guilleminault C. Elsevier B.V. pp. 139-153.

Ohayon MM and Guilleminault C (2006b) Epidemiology of sleep disorders. Del llibre: *Sleep: A comprehensive handbook*. Editor: Lee-Chiong TL. John Wiley and sons, Inc., NY. pp. 73-82.

Ohno K and Sakurai T (2008) Orexin neuronal circuitry: role in the regulation of sleep and wakefulness. *Front Neuroendocrinol* **29**:70-87.

Oki K, Sukamoto T, Ito K and Nose T (1984) In vitro and ex vivo inhibition by flutoprazepam of [³H]flunitrazepam binding to mouse brain receptors. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **269**:180-186.

Palomer A, Princep M and Guglietta A (2007) Recent advances in the treatment of insomnia. *Annu Rep Med Chem* **42**:65-84.

Patel S and Hillard CJ (2008) Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. *Eur J Neurosci* **27**:2821-2829.

Pike A, Cook SM, Watt AP, Scott-Stevens P, Rosahl TW, McKernan RM, Pym LJ, Guiblin A, Moyes C, Sohal B and Atack JR (2007) Contribution of specific binding to the central benzodiazepine site to the brain concentrations of two novel benzodiazepine site ligands. *Biopharm Drug Dispos* **28**:275-282.

Pin JP, Comps-Agrar L, Maurel D, Monnier C, Rives ML, Trinquet E, Kniazeff J, Rondard P and Prezeau L (2009) G-protein-coupled receptor oligomers: two or more for what? Lessons from mGlu and GABAB receptors. *J Physiol* **587**:5337-5344.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W and Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* **101**:815-850.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, Lamanta AS, McNamara JO and Williams SM (2008) Sueño y vigilia. Del llibre: *Neurociencia* (3^a Ed.). Médica Panaamericana S.A.

Retey JV, Adam M, Honegger E, Khatami R, Luhmann UF, Jung HH, Berger W and Landolt HP (2005) A functional genetic variation of adenosine deaminase affects the duration and intensity of deep sleep in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:15676-15681.

Reynolds CF, 3rd and Redline S The DSM-v sleep-wake disorders nosology: an update and an invitation to the sleep community. *J Clin Sleep Med* **6**:9-10.

Riss TL and Moravec RA (2004) Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol* **1**:51- 62.

Rodenbeck A and Hajak G (2001) Neuroendocrine dysregulation in primary insomnia. *Rev Neurol (Paris)* **157**:S57-61.

Rosenberg R, Seiden DJ, Hull SG, Erman M, Schwartz H, Anderson C, Prosser W, Shanahan W, Sanchez M, Chuang E and Roth T (2008) APD125, a selective serotonin 5-HT_{2A} receptor inverse agonist, significantly improves sleep maintenance in primary insomnia. *Sleep* **31**:1663-1671.

Roth T (1999) New trends in insomnia management. *J Psychopharmacol* **13**:S37-40.

Roth T, Roehrs T and Pies R (2007a) Insomnia: pathophysiology and implications for treatment. *Sleep Med Rev* **11**:71-79.

Roth T (2007b) A physiologic basis for the evolution of pharmacotherapy for insomnia. *J Clin Psychiatry* **68**: s13-18.

Ruano D, Vizueté M, Cano J, Machado A and Vitorica J (1992) Heterogeneity in the allosteric interaction between the gamma-aminobutyric acid (GABA) binding site and three different benzodiazepine binding sites of the GABA_A/benzodiazepine receptor complex in the rat nervous system. *J Neurochem* **58**:485-493.

Ruffolo RR, Jr. (1982) Review important concepts of receptor theory. *J Auton Pharmacol* **2**:277-295.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**:573-585.

Sanna E, Busonero F, Talani G, Carta M, Massa F, Peis M, Maciocco E and Biggio G (2002) Comparison of the effects of zaleplon, zolpidem, and triazolam at various GABA(A) receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* **451**:103-110.

Santi MR, Cox DH and Guidotti A (1988) Heterogeneity of gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine/beta-carboline receptor complex in rat spinal cord. *J Neurochem* **50**:1080-1086.

Saper CB, Chou TC and Scammell TE (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci* **24**:726-731.

Saper CB, Scammell TE and Lu J (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* **437**:1257-1263.

Scott-Stevens P, Atack JR, Sohal B and Worboys P (2005) Rodent pharmacokinetics and receptor occupancy of the GABA_A receptor subtype selective benzodiazepine site ligand L-838417. *Biopharm Drug Dispos* **26**:13-20.

Sharpley AL, Elliott JM, Attenburrow MJ and Cowen PJ (1994) Slow wave sleep in humans: role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Neuropharmacology* **3-4**:467-471.

Shrikhande A, Courtney C, Smith D, Melch M, McConkey M, Bergeron J and Wong SK (2002) Fully automated radioligand binding filtration assay for membrane-bound receptors. *Biotechniques* **33**:932-937.

Sieghart W (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid_A receptor subtypes. *Pharmacol Rev* **47**:181-234.

Smith TA (2001) Type A gamma-aminobutyric acid (GABAA) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *Br J Biomed Sci* **58**:111-121.

Squire, Bloom, McConnell, Roberts, Spitzer and Zigmond (2003) Sleep, dreaming and wakefulness. Del llibre: *Fundamental Neuroscience* (2^a Ed.). Elsevier Science. EUA. pp. 1085-1108.

Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Trahkt I, Spence DW, Poeggeler B, Hardeland R and Cardinali DP (2009) Melatonin and melatonergic drugs on sleep: possible mechanisms of action. *Int J Neurosci* **119**:821-846.

Stahl SM (2008) Selective histamine H1 antagonism: novel hypnotic and pharmacologic actions challenge classical notions of antihistamines. *CNS Spectr* **13**:1027-1038.

Stepanski EJ (2006) Causes of insomnia. Del llibre: *Sleep: A comprehensive handbook*. Editor: Lee-Chiong TL. John Wiley and sons, Inc., NY. pp. 99-102.

Sullivan SK, Petroski RE, Verge G, Gross RS, Foster AC and Grigoriadis DE (2004) Characterization of the interaction of indiplon, a novel pyrazolopyrimidine sedative-hypnotic, with the GABAA receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:537-546.

Sullivan SS and Guilleminault C (2009) Emerging drugs for insomnia: new frontiers for old and novel targets. *Expert Opin Emerg Drugs* **14**:411-422.

Sur C, Quirk K, Dewar D, Atack J and McKernan R (1998) Rat and human hippocampal alpha5 subunit-containing gamma-aminobutyric AcidA receptors have alpha5 beta3 gamma2 pharmacological characteristics. *Mol Pharmacol* **5**:928-933.

Teegarden BR, Al Shamma H and Xiong Y (2008) 5-HT(2A) inverse-agonists for the treatment of insomnia. *Curr Top Med Chem* **8**:969-976.

Thompson MD, Comings DE, Abu-Ghazalah R, Jereseh Y, Lin L, Wade J, Sakurai T, Tokita S, Yoshida T, Tanaka H, Yanagisawa M, Burnham WM and Moldofsky H (2004) Variants of the orexin2/hcrt2 receptor gene identified in patients with excessive daytime sleepiness and patients with Tourette's syndrome comorbidity. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **129B**:69-75.

Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ and Fu YH (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **5506**:1040-1043.

Topf N, Jenkins A, Baron N and Harrison NL (2003) Effects of isoflurane on gamma-aminobutyric acid type A receptors activated by full and partial agonists. *Anesthesiology* **2**:306-311.

Tsigos C and Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* **53**:865-871.

Watanabe Y, Khatami S, Shibuya T and Salafsky B (1985) Ontogenetic properties of benzodiazepine receptor subtypes in rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* **109**:307-309.

Westphalen RI and Hemmings HC Jr. (2006) Volatile anesthetic effects on glutamate versus GABA release from isolated rat cortical nerve terminals: basal release. *J Pharmacol Exp Ther* **1**:208-215.

Whiting PJ (2003) GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today* **8**:445-450.

Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Tokita S, Williams SC, Kisanuki YY, Marcus JN, Lee C, Elmquist JK, Kohlmeier KA, Leonard CS, Richardson JA, Hammer RE and Yanagisawa M (2003) Distinct narcolepsy syndromes in Orexin receptor-2 and Orexin null mice: molecular genetic dissection of Non-REM and REM sleep regulatory processes. *Neuron* **5**:715-730

Wingrove PB, Safo P, Wheat L, Thompson SA, Wafford KA and Whiting PJ (2002) Mechanism of alpha-subunit selectivity of benzodiazepine pharmacology at gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Eur J Pharmacol* **437**:31-39.

Wu Y, Rosenberg HC and Chiu TH (1995) Rapid down-regulation of [³H]zolpidem binding to rat brain benzodiazepine receptors during flurazepam treatment. *Eur J Pharmacol* **2**:125-132.

www.who.int/classifications/apps/icd/icd10online

Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptáček LJ and Fu YH (2005) Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* **7033**:640-644.

Xu YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, Brucher FA, Zeng J, Ly NK, Henriksen SJ, de Lecea L and Civelli O (2004) Neuropeptide S: a neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* **43**:487-497.

Young EA, Haskett RF, Grunhaus L, Pande A, Weinberg VM, Watson SJ and Akil H (1994) Increased evening activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in depressed patients. *Arch Gen Psychiatry* **51**:701-707.

Zeitler JM, Nishino S and Mignot E (2006) The neurobiology of hypocretins (orexins), narcolepsy and related therapeutic interventions. *Trends Pharmacol Sci.* **7**:368-374

Zhang JH, Chung TD, and Oldenburg KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**:67-73.