

TESE DE DOUTORAMENTO

**IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS
ACTIVOS EN EL RECEPTOR GPR35.
UN RECEPTOR HUÉRFANO IMPLICADO EN
PROCESOS INFLAMATORIOS.**

Alejandro González García

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN NEUROCIENCIA E PSICOLOXÍA CLÍNICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018



DECLARACIÓN DO AUTOR/A DA TESE

Identificación de nuevos compuestos activos en el receptor GPR35. Un receptor huérfano implicado en procesos inflamatorios.

D./Dna. ALEJANDRO GONZÁLEZ GARCÍA

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

En Santiago de Compostela, 02 de Xullo de 2018



AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TITOR DA TESE

**Identificación de nuevos compuestos activos en el
receptor GPR35. Un receptor huérfano implicado en
procesos inflamatorios.**

Dra. María Isabel Loza García
Dr. José Manuel Brea Floriani

INFORMAN:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D. Alejandro González García baixo a miña dirección, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En Santiago de Compostela, 02 de Xullo de 2018

Asdo. María Isabel Loza
García

Asdo. Jose Manuel Brea
Floriani





El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

La presente memoria ha sido realizada gracias a la financiación otorgada por la Xunta de Galicia (10CSA203006PR; CN2011/050; GRC2014/011; R2014/025) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); al proyecto Innopharma (PI12/00742) financiado por el Fondo Tecnológico de la Unión Europea a través del Ministerio de Economía y Competitividad con el apoyo de la Xunta de Galicia; y al International Rare Diseases Research Consortium (IRDiRC) (IR11/DRUGS4 RARE) financiado a través del Instituto de Salud Carlos III.





No temas a las dificultades: lo mejor surge de ellas.

Rita Levi-Montalcini



Agradecimientos

A medida que esta tesis llega a su fin, los momentos relevantes y dignos de ser recordados se precipitan y pasan sin ningún tipo de anuncio ni celebración. Suceden sin más. Y en algún momento habré hecho el último ensayo, la última corrección, el último trámite. Sin pensar en ello. Por eso es importante, antes de que todo esto termine, recordar a las personas que me ayudaron a conseguirlo y no agradecí en su momento. Se que me voy a olvidar de mucha gente y espero que me disculpen y acepten mis agradecimientos.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis: la Doctora María Isabel Loza García y el Doctor José Manuel Brea Floriani, que me acogieron como estudiante de máster y me ofrecieron la oportunidad de participar, a lo largo de estos siete años, en proyectos de investigación y gestión.

A la profesora Maribel Cadavid le guardo un cariño especial y una gratitud que difícilmente puedo expresar. A ella le debo casi todo lo que se de farmacología; y le tengo que agradecer sus clases particulares y continuas, día tras día. ¡Es algo de lo que me encanta presumir!

Al Doctor Eduardo Domínguez por hacer de gurú científico y estar siempre dispuesto a ayudarme y aconsejarme.

A todos los miembros del grupo BioFarma, los que se fueron, los que siguen y los nuevos que a lo largo de estos años me han ayudado a realizar esta tesis.

Al equipo Odioso, gracias por los eventos, las crisis infinitas, las excursiones y las exclusivas, el idioma inventado, las risas contagiosas y conseguir que comer de tupper sea como la mejor comida en un restaurante. Gracias a los veteranos, a los emigrados y a los pollos revolucionados. Convertís un día cualquiera en un gran día. Oscar, Lucy, Patri, Ailim, Buceta, Lauriña, Andrea, Marta, Elia... ¡Gracias Amigos!

Gracias Ampe por tantos momentos geniales compartidos desde el inicio de los tiempos, pocos saben que contigo me senté por primera vez para hacer un experimento de verdad.

A Alba, por convertirte a lo largo de los años en una persona indispensable en mi vida. No puedo imaginarme a alguien mejor con quien hacer equipo aquí o donde sea y para lo que sea.

Gracias Cris, por ser mi maestra jedi y porque durante estos siete años, cada vez que necesito ayuda solo tengo que gritar tu nombre. Carlos, gracias por contagiarnos con tu alegría y tu diversión, todo el trabajo difícil es llevadero cuando estás tú.

A mi joven padawan Laura, porque esta tesis también te pertenece a ti. Porque trabajaste como si fuera tuya, me alegraste un año que parecía terrible y te hiciste mi amiga.

A mis amigos José, Carlos, María, Celia, Patri, Ana y Elena que os preocupasteis, me apoyasteis y alguno intentó saber de qué iba esto.

Gracias a Felipe, el mejor hermano del mundo y mi mejor amigo literalmente desde el día 0.

Gracias a mi familia. A mis padres, gracias por vuestro apoyo infinito, paciencia y vuestro cariño y por animarme a seguir estudiando y formándome. A mi hermano Alberto por animarme y escucharme cuando me quiero desahogar. ¡Sois los mejores! Gracias a Miguel por quererme como a un hijo y a Cris por dejarte querer como una hermanita, la bióloga lista de la familia.

Por último, tengo que dar las gracias a las dos personas más importantes de mi vida. A Paula, mi mujer, mi mejor amiga; gracias por pasar literalmente media vida haciendo que consiga ser una persona mejor, por tanto amor y apoyo constante. A Gabriel que revolucionaste nuestras vidas y lo hiciste todo un poco más difícil pero infinitamente más bonito. Los dos sois mi motivación para todo lo bueno que me proponga hacer. Os quiero.

A Paula y Gabriel

A mi familia





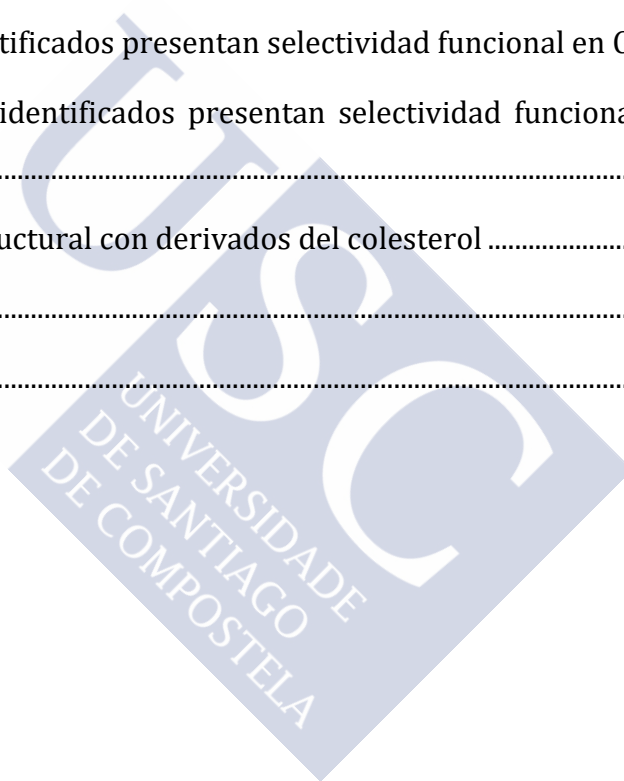
Índice

1. Introducción.....	25
1.1 Receptores acoplados a proteínas G.....	25
1.1.1 Características generales.....	25
1.1.2 Clasificación de GPCRs.....	26
1.1.3 Señalización intracelular dependiente de proteínas G.....	30
1.1.4 Señalización independiente de proteínas G.....	33
1.1.5 Selectividad funcional.....	33
1.3 GPCRs huérfanos.....	36
1.4 Receptor GPR35.....	37
1.4.1 Farmacología de GPR35.....	37
1.4.2 Estudios de homología de receptores y diferencias en el bolsillo de unión de GPR35 humano y de rata.....	43
1.4.3 Señalización intracelular mediada por GPR35.....	46
1.4.4 GPR35 como diana terapéutica.....	49
1.5 Métodos utilizados para la identificación de ligandos de GPR35.....	56
1.5.1 Transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET).....	56
1.5.2 Otras técnicas basadas en el reclutamiento de β -arrestina-2.....	59
1.5.3 Unión de nucleótidos de guanina.....	59
1.5.4 Movilización de calcio.....	60
1.5.5 Métodos basados en la utilización de levaduras.....	61
1.5.6 Fosforilación de la MAP quinasa ERK 1/2.....	61
1.5.7 Estudios de internalización de receptor.....	62
1.5.8 Redistribución dinámica de masas (DMR).....	62
2. Justificación, hipótesis y objetivos.....	69
2.1 Justificación.....	69
2.2 Hipótesis.....	71

2.3 Objetivos	71
3. Material y métodos.....	75
3.1 Líneas celulares y medios de cultivo.....	75
3.2 Estudio de translocación de β -arrestina mediante transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (<i>BRET</i>).....	75
3.2.1 Generación de construcciones plasmídicas del receptor GPR35.....	75
3.2.2 Transfección de plásmidos <i>Flag-humanGPR35-eYFP-pcDNA3</i> y <i>Flag-ratGPR35-eYFP-pcDNA3</i> en HEK293T/17 (ATCC® CRL-11268™) para ensayos de <i>BRET</i>	76
3.2.3 Identificación de ligandos de GPR35 en la quimioteca <i>Prestwick Chemical Library</i> ® mediante cribado de alto rendimiento basado en <i>BRET</i>	77
3.2.4 Estudio mecanístico del antagonismo.....	78
3.3 Ensayo de redistribución dinámica de masas (DMR).....	78
3.3.1 Puesta a punto del estudio de compuestos activos frente a hGPR35 mediante ensayo de DMR.....	78
3.3.2 Puesta a punto del estudio de compuestos activos frente a rGPR35 mediante ensayo de DMR.....	80
3.3.3 Automatización del ensayo de DMR para cribados de alto rendimiento.....	81
3.3.4 Identificación de ligandos de hGPR35 en la quimioteca <i>Prestwick Chemical Library</i> ® en un cribado de alto rendimiento mediante DMR.	81
3.3.5 Identificación de ligandos de rGPR35 en la quimioteca <i>Prestwick Chemical Library</i> ® en un cribado de alto rendimiento mediante DMR.	83
3.3.6 Estudio mecanístico del antagonista	85
3.4 Análisis y procesamiento de datos.....	85
4. Resultados.....	91
4.1 Identificación de ligandos activos sobre GPR35 mediante ensayo de translocación de β -arrestina basado en transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (<i>BRET</i>)	91
4.1.1 Estudios de <i>BRET</i> en hGPR35.....	91

4.1.2 Estudios de BRET en rGPR35	100
4.2 Puesta a punto de un ensayo de distribución dinámica de masas para el estudio de la actividad del receptor GPR35.....	108
4.2.1 Puesta a punto de un ensayo para el estudio de la actividad de hGPR35 de expresión endógena en la línea HT-29 mediante redistribución dinámica de masas.....	108
4.2.2 Puesta a punto de un ensayo para el estudio de la actividad de rGPR35 de expresión endógena en la línea IEC-6 mediante redistribución dinámica de masas.....	110
4.3 Identificación de ligandos de GPR35 mediante ensayo de redistribución dinámica de masas (DMR).....	111
4.3.1 Estudios de DMR en hGPR35	112
4.3.2 Estudios de DMR en rGPR35.....	121
4.4 Los antagonistas identificados mostraron diferencias atribuibles a selectividad funcional e interespecie.....	127
4.4.1 La digitonina se confirmó en un ensayo de DMR como el antagonista más activo de hGPR35.	127
4.4.2 El hidrocloreuro de pronetanolol y la proscilaridina A se confirmaron en un ensayo de BRET como los antagonistas más activos de hGPR35.	128
4.4.3 La tomatina se confirmó en un ensayo de DMR como el antagonista más activo de rGPR35.....	131
4.5 Los antagonistas mostraron un comportamiento compatible con el de moduladores alostéricos negativos de GPR35	133
4.5.1 Estudio mecanístico del antagonismo de los <i>hits</i> identificados en los cribados de hGPR35 y rGPR35 mediante BRET.....	133
4.5.2 Estudio mecanístico del antagonismo para los hits identificados en el cribado de hGPR35 mediante DMR.....	138
4.5.3 Estudio mecanístico del antagonismo de los hits identificados en el cribado de rGPR35 mediante DMR.....	143

4.6 Ampliación estructural para el descubrimiento de nuevos compuestos antagonistas del receptor GPR35.	145
4.6.1 El β -estradiol, la estrona y la hidrocortisona fueron los antagonistas más activos de hGPR35.	145
4.6.2 El β -Estradiol y la progesterona fueron los antagonistas más activos de rGPR35.	149
4.6.3 Estudio mecanístico del antagonismo de los derivados humanos de esterol.	152
5. Discusión.	161
5.1 Los agonistas identificados presentan selectividad funcional en GPR35.	165
5.2 Los antagonistas identificados presentan selectividad funcional en GPR35.	169
5.3 Ampliación estructural con derivados del colesterol	177
6. Conclusiones	183
7. Bibliografía.	189



Abreviaturas.

7TMR: 7 transmembrane receptors (receptores con 7 dominios transmembrana).

AC: Adenilato ciclasa.

AKT: serine/threonine-specific protein kinase (kinasa serina/treonina).

AMPC: 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (adenosin monofosfato 3',5'-cíclico).

ARNhc: ácido ribonucleico de horquillado corto.

BRET: bioluminescence resonance energy transfer (transferencia de energía de resonancia bioluminiscente).

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico complementario).

DAG: diacylglycerol (diacilglicerol).

DHICA: 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico.

DMEM: medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DMR: dynamic mass redistribution (redistribución dinámica de masas).

DMSO: dimetil sulfóxido.

DREADDs: designer receptors exclusively activated by designer drugs (receptores de diseño activados exclusivamente por fármacos de diseño).

EC50: half maximal effective concentration (mitad de la concentración eficaz máxima).

ECL: extracellular loop (bucle extracelular).

EII: enfermedad inflamatoria intestinal.

E_{max}: maximal response (respuesta máxima).

ERK: extracellular signalregulated kinases (quinasas reguladas por señales extracelulares).

FBS: fetal bovine serum (suero bovino fetal).

FSH: Follicle-stimulating hormone (hormona estimuladora de folículo).

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GDP: guanosine 5'-diphosphate (guanosina 5'-difosfato).

GEF: guanine nucleotide exchange factor (factor intercambiador de nucleótidos de guanina).

GMPc: guanosina monofosfato cíclico.

GPCRs: G protein coupled receptors (receptores acoplados a proteínas G).

GRK: G protein-coupled receptor kinases (quinasas de receptores acoplados a proteína G).

GTP: guanosine 5'-triphosphate (guanosina 5'-trifosfato).

HBSS: Hank's Balanced Salt Serum (solución salina equilibrada de Hank).

HCA: hydroxy-carboxylic acid (ácido hidrocarboxílico).

HTS: High throughput screening (cribado de alto rendimiento).

IC50: half maximal inhibitory concentration (mitad de la concentración inhibitoria máxima).

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleucina.

iNKT: invariant natural killer T (células T natural killer invariantes).

IP3: inositol 1,4,5-triphosphate (inositol 1,4,5-trifosfato).

IP3K: inositol 1,4,5-triphosphate kinase (inositol trifosfato kinasa).

IUPHAR: International Union of Pharmacology (Unión Internacional de Farmacología).

JNK: c-Jun N-terminal kinase (cinasa del amino-terminal de c-Jun).

Kd: equilibrium dissociation constant (constante de disociación en equilibrio).

LH: Luteinizing hormone (hormona luteinizante).

LPA: lysophosphatidic acid (ácido lisofosfatídico).

LRP: Low density lipoprotein receptor (receptor de lipoproteínas de baja densidad).

NF: Nuclear factor (factor nuclear).

PAR1: Protease-activated receptor 1 (receptor activado por proteasa 1).

PEI: polietilenimina.

PLC: phospholipase C (fosfolipasa C).

Rluc: Renilla luciferase (Renilla luciferasa).

ROCK: Rho-associated protein kinase (proteína cinasa asociada a Rho).

RWG: resonant waveguide grating (rejilla de guía de onda resonante).

SD: standard deviation (desviación estándar de la media).

SNC: sistema nervioso central.

SNP: single nucleotide polymorphism (polimorfismo de un solo nucleótido).

T3: triiodotironina.

TASRs: Taste receptors (receptores de gusto).

TM: transmembrane (transmembrana).

TMH: Transmembrane helix (hélice transmembrana).

TSH: Thyroid-stimulating hormone (tirotropina).

VIP: vasoactive intestinal peptide (péptido intestinal vasoactivo).

YFP: yellow fluorescence protein (proteína fluorescente amarilla).

λ : longitud de onda.





1. Introducción



1. Introducción

1.1 Receptores acoplados a proteínas G

1.1.1 Características generales

El receptoroma, que comprende al menos el 5% del genoma humano, es la parte del proteoma que engloba las moléculas que median las respuestas fisiológicas, patológicas y terapéuticas de un gran número de ligandos endógenos y exógenos. Más de la mitad de este conjunto corresponde a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Por ello, no es de extrañar que la mayoría de los medicamentos aprobados hoy en día (40–50% de los fármacos comercializados actualmente) ejerzan su efecto sobre esta superfamilia de receptores; debido a su implicación en diversas patologías del sistema nervioso central, cáncer, enfermedades cardíacas y enfermedades metabólicas entre otras (1).

La superfamilia de GPCRs también es conocida como 7TMR (receptores con 7 dominios transmembrana) ya que todos comparten esta característica estructural. Son precisamente las dos características que determinan su nomenclatura los requisitos para que un receptor se clasifique dentro de esta superfamilia:

Los GPCRs están constituidos por una única cadena polipeptídica que se estructura formando 7 dominios transmembrana de 25–35 aminoácidos con alto grado de hidrofobicidad, adoptando una estructura de 7 hélices α (TMH1–7) integradas en la membrana formando una especie de barril, orientado perpendicularmente al plano de la membrana y en sentido antihorario. Las hélices α están conectadas por tres bucles extracelulares (ECL1–3) y tres bucles intracelulares (ICL1–3), un extremo amino-terminal extracelular y un extremo carboxi-terminal citoplasmático (2,3). La estructura de un GPCR depende de dos estados de plegamiento; en el primero, las hélices α que se disponen a través de la bicapa lipídica y el plegamiento de la proteína depende de los efectos hidrofóbicos. Los dominios transmembrana adoptan la posición en la que la superficie polar expuesta al ambiente lipídico sea mínima; como resultado, los aminoácidos hidrofóbicos se orientan hacia la bicapa lipídica y los aminoácidos hidrofílicos

hacia la hendidura generada por el empaquetamiento de los dominios transmembrana. En un segundo plegamiento se forma una estructura terciaria por interacciones específicas entre las hélices y por interacciones entre los dominios extracelulares y citoplasmáticos. Todos los GPCRs (a excepción de los receptores para sabor amargo TASRs) contienen dos residuos de cisteína altamente conservados en los bucles ECL1 y ECL2, que forman un puente disulfuro que estabiliza la estructura del receptor (4–6).

Inicialmente se describió la señalización a través de GPCRs como un mecanismo dependiente de la interacción con proteínas G heterotriméricas, que transducen la señal desde el receptor hasta los sistemas efectores. Hoy en día, se sabe que los GPCRs pueden actuar de forma independiente a las proteínas G en procesos de señalización dependientes de arrestinas o quinasas; por ello, se ha propuesto nombrarlos como 7TMR (2).

1.1.2 Clasificación de GPCRs

Existen varios sistemas de clasificación de GPCRs que se basan en el sitio de unión del ligando, características fisiológicas, estructurales, genéticas o filogenéticas. El sistema clásico de Kolakowski (7) agrupa a todos los GPCRs de vertebrados e invertebrados en 6 clases (A-F). Este sistema es el empleado por la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) con la excepción de los *Frizzled receptors*. Otra clasificación basada en las características estructurales implicadas en la unión ligando-receptor agrupa a todos los GPCRs en cuatro clases (A, B, C y F) (**figura 1.1**). La subfamilia 1 de la clase A, se caracteriza por una región de interacción con el ligando localizada en una zona profunda de los dominios transmembrana; esta subfamilia incluye la mayoría de los receptores de moléculas pequeñas como neurotransmisores, mediadores lipídicos y odorantes. Los miembros de la subfamilia 2 son activados por ligandos proteicos como las quimokinas o el ligando activador de PAR1, resultante de la escisión de un fragmento del extremo N-terminal (8); en esta subfamilia el ligando interacciona con el extremo amino-terminal, los bucles extracelulares y los dominios transmembrana. La subfamilia 3 posee un dominio extracelular largo, que se une a la hormona luteinizante (LH), la tirotrópina (TSH) o la hormona estimulante de folículo (FSH). Esta subfamilia también incluye receptores implicados en la especificación y función de células

madre adultas, LGR5, LGR6, LGR7. Los receptores de clase B se activan mediante hormonas de alto peso molecular (por ejemplo, glucagón, secretina y péptido intestinal vasoactivo (VIP)) que se unen al sitio de unión del ligando dentro de la región amino-terminal larga, así como a los bucles extracelulares. Mientras que los GPCRs de clase C se caracterizan por poseer un extremo amino-terminal muy largo que comparte similitudes de secuencia con las proteínas bacterianas periplasmáticas; incluyen receptores metabotrópicos de glutamato, receptores de calcio, receptores de GABA y receptores para compuestos de sabor. Aunque muchos GPCRs de clase A y B pueden formar homodímeros y heterodímeros, la formación de dímeros es imperativa para los de clase C. La clase F o familia de receptores Frizzled comprende las subfamilias Frizzled y Smoothened, que son estructuralmente distintas y tienen mecanismos complejos de activación. En el caso de Frizzled, la activación se produce por la unión del agonista Wnt que actúa mediante una interacción con una región amino terminal rica en cisteína, mientras que la proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP5) o proteínas transmembrana únicas (LRP6) actúa como un correceptor. En la activación de los receptores de la subfamilia Smoothened participan dos proteínas reguladoras: *patched* produce un efecto regulador negativo sobre el receptor que es bloqueado por la actividad de la proteína *hedgehog*, permitiendo que el receptor regule tanto las señales dependientes de la proteína G como las independientes (9).

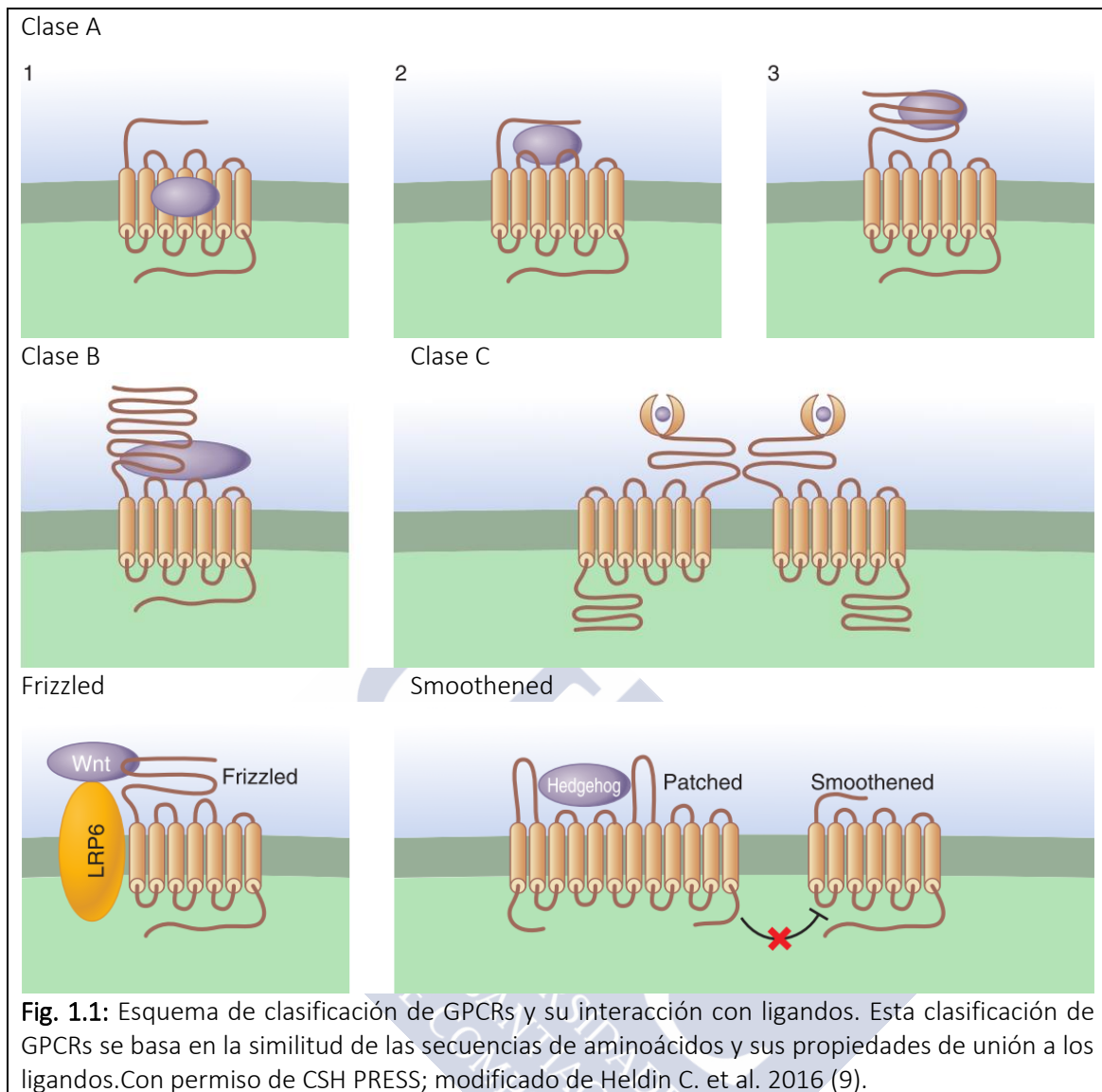


Fig. 1.1: Esquema de clasificación de GPCRs y su interacción con ligandos. Esta clasificación de GPCRs se basa en la similitud de las secuencias de aminoácidos y sus propiedades de unión a los ligandos. Con permiso de CSH PRESS; modificado de Heldin C. et al. 2016 (9).

Recientemente, derivado de la conclusión del Proyecto Genoma Humano, se llevó a cabo un estudio filogenético de toda la superfamilia de GPCRs humanos, dando lugar a un nuevo sistema de clasificación, el sistema GRAFS (2), donde todos los GPCRs humanos se clasifican en 5 familias (**figura 1.2**):

Glutamato: presentan un extremo amino-terminal largo que forma dos lóbulos. A esta familia pertenecen los receptores metabotrópicos de glutamato (mGLU) así como dos receptores metabotrópicos de GABA, un receptor sensible a calcio (CaSR) y cinco receptores del sabor de tipo 1 (TSAR1R).

Rodopsina: es la familia más extensa, los GPCRs pertenecientes a ella presentan características comunes, como un motivo NSxxNPxxY en TM7 y el motivo DRY o

D(E)-R-Y(F) en la unión de TMH3 con el segundo bucle intracelular. La mayoría de los ligandos de estos receptores se unen a una cavidad entre las regiones transmembrana, aunque con excepciones, como los receptores de glicoproteínas (LH, FSH, etc) cuyo sitio de unión se encuentra en el extremo amino-terminal del receptor (10). Esta familia se organiza en 4 grupos: α , β , γ y δ . Al grupo α pertenecen los receptores de adenosina, serotonina, dopamina, las opsinas (grupo de GPCRs que responden a fotones) o los receptores muscarínicos, entre otros. El grupo β engloba 36 receptores para ligandos peptídicos, entre ellos los receptores de taquicinas, coleocistoquinina, oxitocina y neuropéptido Y. EL grupo γ a su vez se divide en tres subgrupos: receptores SOG (somatostatina-opioides-galanina), de MHC (hormona concentradora de melanina) y de quimiokinas. EL grupo γ también incluye los receptores de angiotensina. En el grupo δ se encuentran los receptores del oncogen MAS1 y receptores de nucleótidos (P2Y).

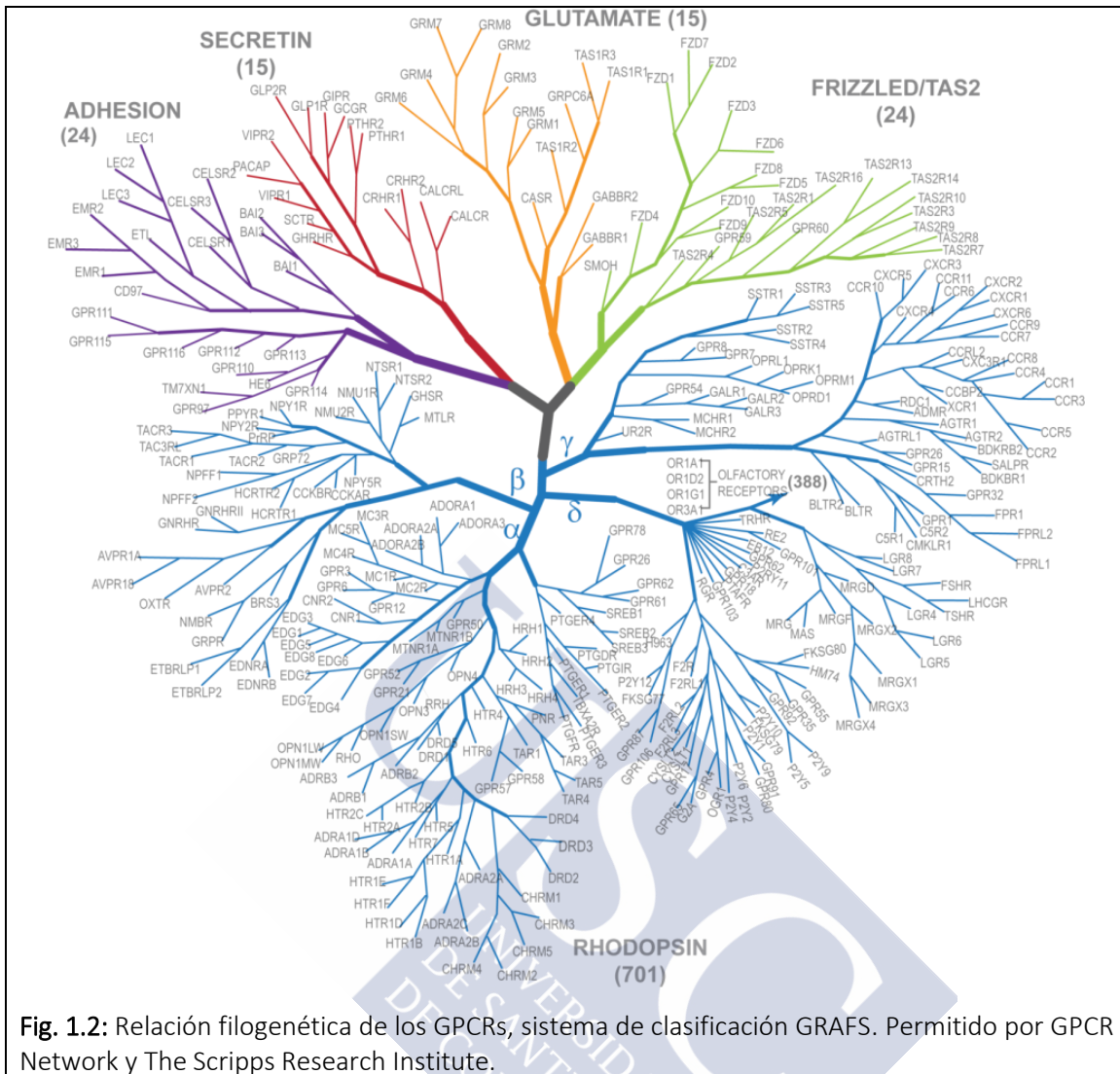
Adhesión: los GPCRs de esta familia se caracterizan por presentar uno o varios dominios funcionales con motivos de adhesión en el extremo amino-terminal de longitud variable (200-2800 aminoácidos) y rico en sitios de glicosilación y residuos de prolina. Están implicados en el proceso de adhesión celular.

Frizzled/taste 2: formada por dos subfamilias con marcadas diferencias:

Taste 2: son los TAS2R (receptores para sabor amargo tipo 2). Existen al menos 13 receptores de esta subfamilia. Presentan un extremo amino-terminal muy corto y no está confirmado que exista un dominio de unión de ligandos en el mismo.

Frizzled: es una familia de 10 receptores implicados en el control de procesos de desarrollo. Poseen un extremo amino-terminal de unos 200 aminoácidos con cisteínas conservadas.

Secretina: la mayoría de los receptores de esta familia participan en la señalización paracrina y endocrina. Sus ligandos son grandes péptidos que interactúan con los puentes disulfuro formados entre residuos conservados de cisteína en su extremo amino-terminal (con una longitud de unos 60-80 aminoácidos).

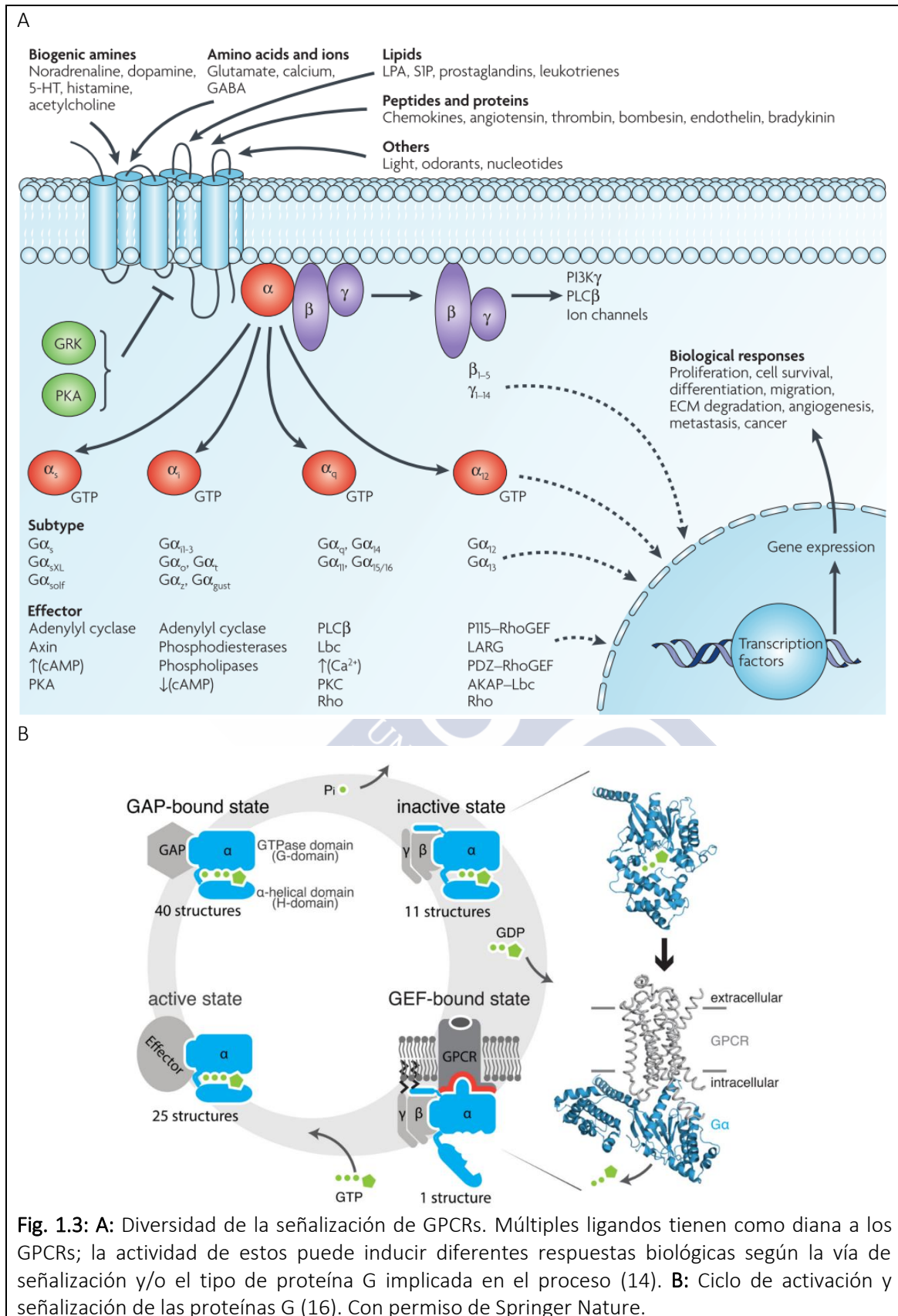


1.1.3 Señalización intracelular dependiente de proteínas G

Las proteínas G están formadas por tres subunidades: α (39-45 kDa), β (35-39 kDa) y γ (6-8 kDa); de ellas, se conocen 21 subunidades α , 6 subunidades β y 12 subunidades γ diferentes (11), lo que deriva en gran cantidad de posibles proteínas G. Según el modelo clásico, estas se clasifican en 4 grupos (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$) que determinan el tipo de efector que participa en cada ruta de señalización activada (**Figura 1.3 A**).

Los GPCRs, sea de forma constitutiva o debido a la unión con un ligando, se asocian de manera más efectiva con la proteína G heterotrimérica actuando como un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (*Guanine Nucleotide Exchange Factor*, GF) promoviendo el intercambio de guanosina 5'-difosfato (GDP) por guanosina 5'-

trifosfato (GTP) unido a la subunidad α y la separación del complejo β/γ . Una vez disociada la proteína G, puede ser la subunidad G_α o $G_{\beta\gamma}$ quien active al efector implicado; de este modo: las proteínas G_s ejercen una activación sobre la adenilato ciclasa (AC) a través de su subunidad α incrementando la producción de adenina 5'-monofosfato cíclico (AMPc). La subunidad α de las proteínas $G_{i/o}$ tiene un efecto inhibitorio sobre AC y la producción de AMPc; además, el dímero formado por $G_{\beta\gamma}$ que conforma las proteínas $G_{i/o}$, actúa de forma directa sobre seis efectores: fosfolipasa C- β (PLC- β), canales de K^+ , AC, fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K), β ARK y calmodulina, y de forma indirecta sobre la GTPasa RAS, activando la ruta de las MAP kinasas (12) (13). Las proteínas $G_{q/11}$, mediante la subunidad α , activan la PLC- β induciendo la producción de dos segundos mensajeros, inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (14). En el caso de las $G_{12/13}$, de nuevo la subunidad α está implicada en la regulación de GTPasas tipo Rho induciendo una señal vía Rho-cinasas (ROCK) (15). La subunidad G_α posee una actividad GTPasa intrínseca que, al final del ciclo de señalización, genera una hidrólisis del fosfato terminal de GTP, convirtiéndolo en GDP, favoreciendo la unión de las 3 subunidades y concluyendo la señalización (16) (**Figura 1.3 B**).



1.1.4 Señalización independiente de proteínas G

Existe una señalización independiente de proteínas G, basada en la interacción directa de los GPCRs con otros efectores; entre ellos destaca el papel de las arrestinas y de las kinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs), ambas clásicamente reconocidas como proteínas secundarias en la activación de las proteínas G en el proceso de transducción de señal. Después de la unión de un ligando al receptor y la consecuente activación de la proteína G, las GRKs fosforilan tanto los bucles intracelulares como la cola C-terminal del receptor, induciendo la unión de las β -arrestinas a este. Las β -arrestinas se describieron por primera vez como proteínas *scaffold* con una función importante en los procesos de desensibilización, internalización y finalización de la señalización de GPCRs mediados por proteínas G tras exposiciones prolongadas a agonistas (17,18). Actualmente, se sabe que los GPCRs activados pueden ser fosforilados por GRKs, localizadas constitutivamente en la membrana sin necesidad de mediación de proteínas G, al igual que ocurre con la unión de las β -arrestinas a receptores fosforilados. Como resultado, se pueden activar numerosos mediadores de señalización, incluyendo kinasas activadas por mitógeno (MAPKs), ERK, p38 JNK, kinasa serina/treonina (AKT), la tirosin kinasa SRC, RhoA, factor nuclear - κ B (NF- κ B) y fosfoinositol 3-kinasa (PI3K) (9).

Estas rutas pueden implicar cascadas de señalización similares a las mediadas por proteínas G, aunque con diferencias temporales. Recientemente se ha apreciado que los GPCRs que interactúan estrechamente con β -arrestinas mantienen una actividad catalítica GEF en los endosomas y continúan promoviendo la señalización de la proteína G después de la internalización (19).

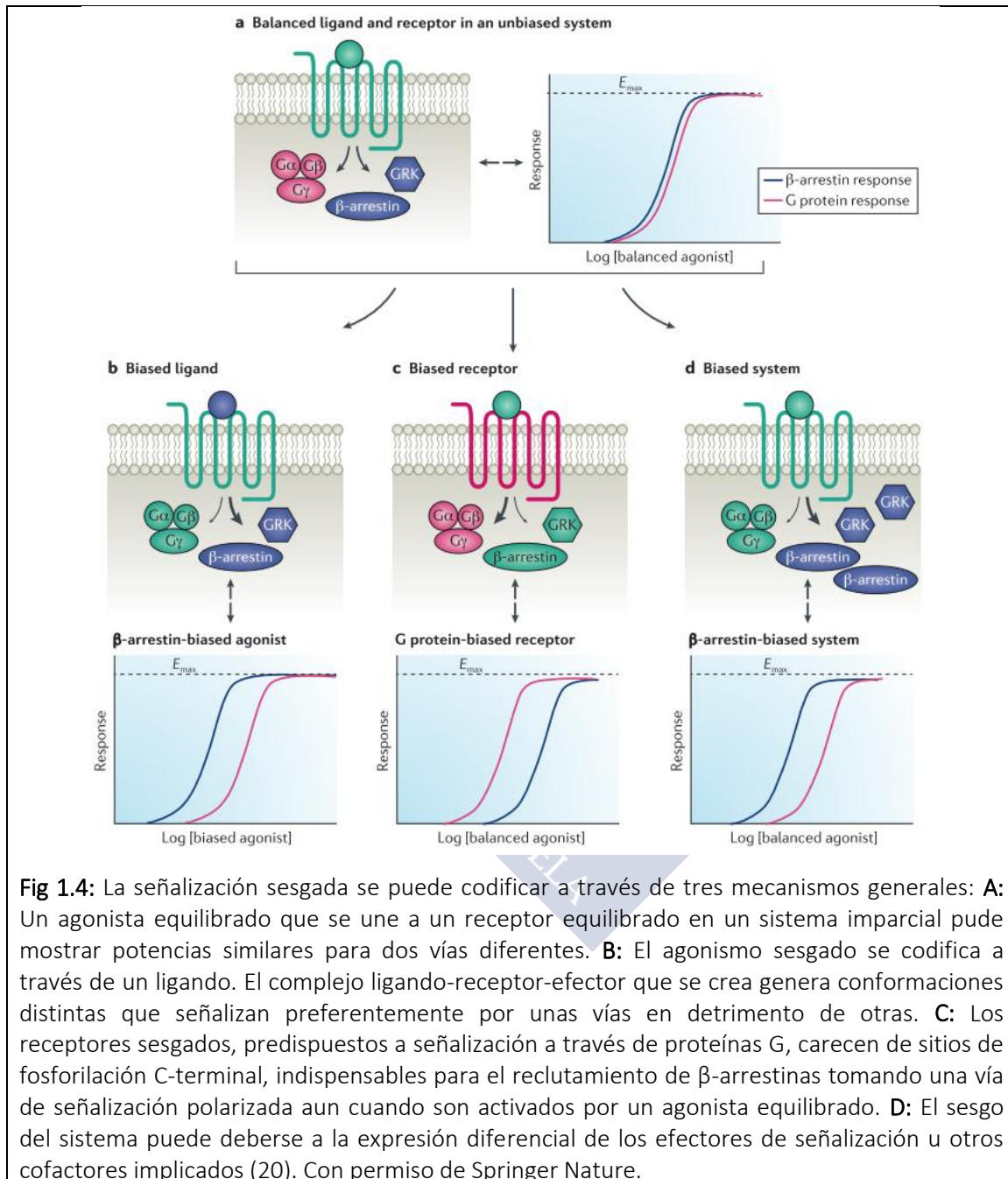
1.1.5 Selectividad funcional

La mayoría de los fármacos que activan o bloquean los GPCRs no discriminan entre diferentes vías de señalización. Así, los agonistas activan las vías de señalización tal como lo hace el agonista de referencia endógeno (agonista equilibrado o balanceado), mientras que los antagonistas bloquearían todos los sistemas de segundos mensajeros activados por el agonista. Sin embargo, hace tres décadas se observó que los agonistas o antagonistas selectivos podían dirigirse a una vía de señalización específica mediada por el receptor (**Figura 1.4**). De hecho, en las

últimas dos décadas se han descrito varios ligandos que activan selectivamente algunas vías y bloquean otras (20). Comparado con los agonistas endógenos equilibrados, estos agonistas “funcionalmente selectivos” (21) o “sesgados” pueden activar diferentes proteínas G mientras que bloquean β -arrestinas, o viceversa. Cabe la posibilidad de que todas las vías estén activas, pero con diferencias significativas en el efecto (potencia y/o eficacia) de alguna de ellas. Este comportamiento fue identificado inicialmente en un bajo número de sistemas de señalización por GPCRs, incluidos, por ejemplo, los ligandos del receptor de péptidos activadores de AC de la hipófisis, que mostraron inversiones de potencias, activando de distinta forma los diferentes tipos de proteínas G (22). El agonismo sesgado se ha convertido en un área cada vez más estudiada desde el descubrimiento de la señalización mediada por β -arrestinas, identificando una gran cantidad de ligandos sesgados para la mayoría de GPCRs estudiados (23,24).

Usando un modelo de complejo ternario para la actividad del receptor, la activación de un receptor por un agonista requiere de tres componentes principales para iniciar la señalización: un ligando, un receptor y un transductor (25). Estos tres componentes actúan de forma alostérica (26): un ligando puede incrementar la afinidad de un receptor por un transductor, como una proteína G o β -arrestina, mientras que la unión del transductor a los dominios intracelulares del receptor puede estabilizar una conformación que aumente la afinidad por un ligando específico (27,28). El alosterismo es un fenómeno biológico generalizado que describe la capacidad de que las interacciones que se producen en una región de una macromolécula modulen de forma recíproca las interacciones que están teniendo lugar en otra zona de unión de la misma macromolécula (29). En los modelos de dos estados solo hay dos condiciones para el receptor: estado inactivo, que es incapaz de señalizar y el estado activo, que es capaz de unirse y activar al transductor (27). El receptor se plantea como un interruptor, con agonistas que estabilizan el estado “encendido” y antagonistas que estabilizan el estado “apagado”. La eficacia del agonista se puede describir como la capacidad de un ligando para modificar el estado del receptor, estabilizando la conformación del receptor activo(30). El fenómeno de agonismo sesgado demuestra que los receptores no actúan como simples interruptores que codifican estados de actividad en un sistema binario, con agonistas o antagonistas que activan o inhiben

todas las vías de señalización asociadas al receptor por igual. Más bien, la unión de un ligando da lugar a la modulación, con activación y/o inhibición de múltiples efectores mediados por cada receptor. Estos efectores, a menudo se basan en las diferentes fases que se suceden en la interacción entre receptor y transductores.



En lugar de codificar señales binarias “on” y “off”, sería más apropiado hablar de un modelo en el que un GPCR actúa como un microprocesador alostérico con eficacia pluridimensional, respondiendo a diferentes moléculas con diferentes eficacias de

acoplamiento del transductor (31,32). Cualquier sitio de la superficie del receptor al que se le una un ligando puede, en teoría, estabilizar una conformación distinta del receptor e inducir un efecto farmacológico particular. Por lo tanto, la actividad fisiológica de un fármaco no necesita estar vinculada a una interacción en el sitio de unión ortostérico.

1.3 GPCRs huérfanos.

Como se ha comentado anteriormente, los receptores acoplados proteínas G son una diana biológica clásica para el descubrimiento y desarrollo de fármacos, pero a pesar de la gran cantidad de dianas terapéuticas que hay entre la superfamilia de los GPCRs, hay una porción importante de ellos (unos 100 - 140) para la que no se conoce su ligando endógeno por lo que se les denomina GPCRs huérfanos y por lo tanto no están completamente caracterizados funcionalmente. Estos GPCRs representan una fuente potencial de nuevas dianas terapéuticas para innumerables patologías. Parte de la investigación sobre GPCRs huérfanos se basa en el descubrimiento de sus ligandos endógenos y su posterior uso para la identificación de fármacos y validación de la diana, a través de un proceso denominado *farmacología inversa*. La identificación de ligandos habitualmente se lleva a cabo mediante técnicas de HTS, empleando al receptor como "cebo". En esta primera fase del proceso, sería posible la identificación de un ligando endógeno. Como consecuencia, se podría emplear tanto al GPCR como a su ligando endógeno (en caso de que haya sido identificado) para el cribado de nuevos agonistas y antagonistas selectivos útiles para definir la farmacología *in vitro* e *in vivo* del receptor (33).

En muchos casos la dificultad para ubicar un GPCR como diana terapéutica radica en el desconocimiento de su estructura e intrínsecamente de su función fisiológica. Con el auge de las técnicas de cristalografía de proteínas en 2007, se desarrolló un método que ha ido avanzando y generando múltiples variantes para la caracterización de GPCRs. Combinando técnicas de cristalografía de proteínas y modelos por homología de GPCRs se han conseguido identificar nuevas dianas terapéuticas entre este grupo de GPCRs huérfanos (34,35). El modelo por homología requiere la selección de un GPCR con estructura cristalográfica validada con secuencia aminoacídica lo más similar al GPCR huérfano de estudio (la

selección del homólogo que va a servir de plantilla es el punto crítico de este proceso) y el alineamiento de las secuencias de bases de ambos receptores; haciendo las correcciones apropiadas del modelo inicial y sus refinamientos posteriores se puede obtener un modelo de la estructura del GPCR huérfano para la comprensión de su funcionamiento e interacción con ligandos (36).

Otras estrategias para para identificar los roles fisiológicos básicos de los GPCRs huérfanos son la creación de *knockouts* para el receptor de estudio y el remplazo con GPCRs mutantes quimiogénicos, como DREADDs (*designer receptors exclusively activated by designer drugs*) (37), u opsinas quiméricas para estudios optogenéticos, como OptoXRs (38). Sin embargo, el cuello de botella para el estudio de receptores huérfanos y su posible conversión en diana terapéutica sigue siendo la falta de compuestos activos útiles para caracterizar de manera fiable la función del receptor *in vitro* e *in vivo*.

1.4 Receptor GPR35

El receptor GPR35 es un GPCR huérfano de clase A, *rodopsin-like*, poco caracterizado. Fue descubierto durante un cribado del genoma humano a finales del siglo XX. En humanos, el receptor GPR35 está localizado en el cromosoma 2q37.3 (39). Este receptor mantiene una homología de aproximadamente del 32 % con el receptor purinérgico GPR23/P2Y9 y un 30 % con el receptor nicotínico HM74, así como un 27 % con GPR55 (40). Fue descrito inicialmente por O'Dowd como un receptor de 309 aminoácidos; sin embargo, Okumura descubrió una variante de *splicing* (GPR35b) que contenía una expansión en N-terminal de 31 aminoácidos en una librería de cDNA producida a partir de células de cáncer gástrico (41).

1.4.1 Farmacología de GPR35

1.4.1.1 Ligandos endógenos de GPR35

Se han propuesto varias moléculas como agonistas endógenos de GPR35 (**figura 1.5**). Sin embargo, la mayoría de esas moléculas mostraron una potencia muy baja en este receptor y se plantea la duda de si es posible que en condiciones fisiológicas se alcance la concentración necesaria de éstas para activar el receptor. Además, algunos de los ligandos sugeridos son agonistas confirmados para otros

GPCRs y/o dianas terapéuticas reconocidas. Un ejemplo de ello es el ácido lisofosfatídico (LPA; 1-acilglicerol-3-fosfato). Se ha probado que derivados de LPA, como 2-oleico-LPA y 2-linoleico-LPA estimulan la movilización intracelular de calcio por encima de los niveles intracelulares que se alcanzan debidos a la actividad de receptores de LPA expresados de forma endógena en células HEK 293 que expresan GPR35 humano (42). Dado que no se ha demostrado que otros ligandos que activen GPR35 promuevan el acoplamiento a la vía $G_{\alpha q}$ (43–45), este estudio podría sugerir una nueva ruta para la señalización estimulada por GPR35 en la que ciertos compuestos actuarían como ligandos sesgados (24). Sin embargo, no se ha estudiado la capacidad de bloquear las variaciones de calcio intracelular mediante antagonistas del receptor, ya que no se habían identificado en ese momento, por lo que este efecto nunca se ha vinculado intrínsecamente con la activación de GPR35. Dado que LPA ejerce su efecto a través de varios receptores que forman una subfamilia de GPCRs llamada LPA 1-6, es poco probable que LPA actúe con una potencia que sea selectiva sobre GPR35 (42). Además, el LPA aparentemente no estimula el reclutamiento de β -arrestina 2 a GPR35 (46), actuando de forma distinta a la mayoría de los ligandos de GPR35, por lo tanto, se puede deber a un efecto de activación sesgada. A causa de la implicación de LPA en numerosas patologías, incluidas aterosclerosis (47), cáncer (48), obesidad, alteraciones en la homeostasis de la glucosa (49) y dolor (50), aún es necesario determinar la relevancia de la actividad de LPA sobre GPR35.

La L-kynurenina, metabolito de ácido kinurénico, puede promover la activación de GPR35 (51). Aunque es más conocido como un modulador neuroprotector que actúa mediante interacciones con varios receptores del sistema nervioso central (SNC) (45), muchos de estos estudios no tienen en consideración un papel importante de GPR35, ya que los estudios de distribución temprana sugieren que este receptor no tiene una expresión suficientemente alta en el cerebro (39,51). Sin embargo, GPR35 puede mediar los efectos de ácido kinurénico en la periferia (52), aunque los niveles de ácido kinurénico producido en el intestino no coincide con la concentración necesaria para activar GPR35, al menos en humanos (43,53). En ensayos *in vitro*, la adición de ácido kinurénico produjo la movilización de calcio intracelular tras una transfección de GPR35 junto con un coctel de proteínas $G_{\alpha q}$ quiméricas con una $EC_{50} = 39 \mu M$ en humanos, $11 \mu M$ en ratones y $7 \mu M$ en ratas

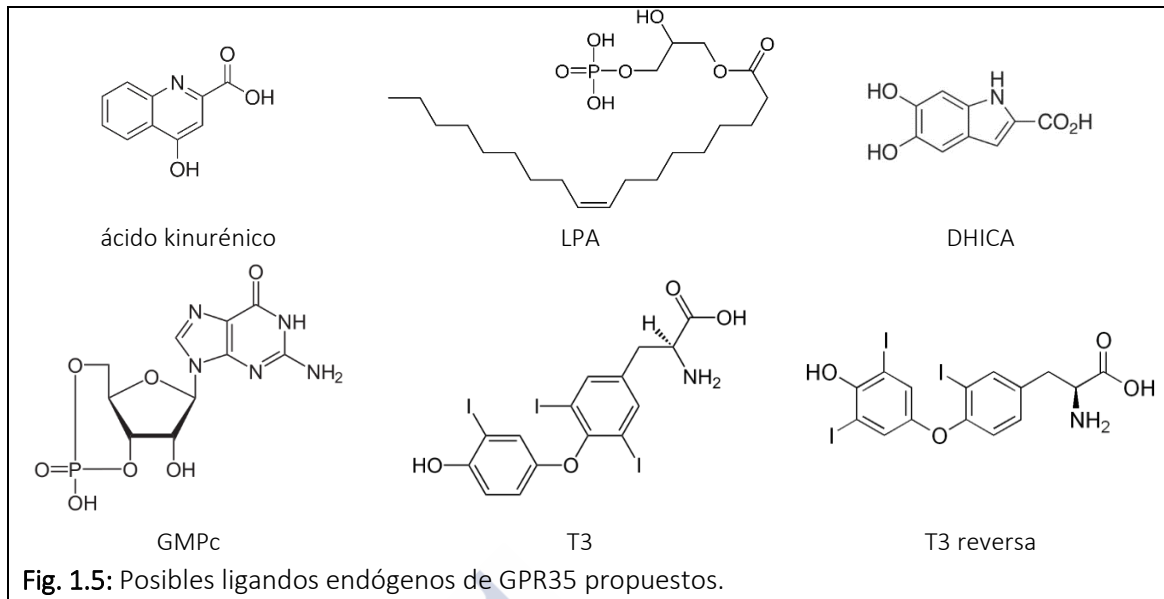
(51). Por lo tanto, se observó un grado de selectividad de especie entre los ortólogos de humano y de roedores de GPR35, con una mayor potencia en ratas que en humanos. Este perfil también se observó en un estudio independiente en el que se usaron células HEK 293 que expresaban de forma transitoria formas de GPR35 manipuladas en la cola C-terminal en el que se incluyó una molécula de YFP (proteína fluorescente amarilla) y β -arrestina 2, en el que se empleaba tecnología BRET (transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia) y se obtuvo una $EC_{50} = 66 \mu\text{M}$ para rGPR35-eYFP y una EC_{50} superior a $100 \mu\text{M}$ para el equivalente humano (43).

En un esfuerzo conjunto para deorfanizar un panel de 82 receptores huérfanos, se llevó a cabo un cribado de 10500 compuestos candidatos a ligandos endógenos mediante ensayo de reclutamiento de β -arrestina 2 (46) por científicos del *Medical Research Council Technology* y GlaxoSmithKline. En este cribado, el segundo mensajero cGMP fue identificado como posible ligando endógeno de GPR35 humano. Posteriormente, los derivados MANT cGMP (2'-O-(-N-metiln-traniloil)-cGMP) y db-cGMP (dibutiril-cGMP) también fueron identificados como agonistas de hGPR35. MANT-cGMP con una $EC_{50} = 2 \mu\text{M}$ resultó el compuesto más potente, mientras que cGMP ($EC_{50} = 130 \mu\text{M}$) fue el menos potente de los tres (46). La relevancia funcional de estos agonistas de GPR35 aún está por demostrar, incluso aunque las concentraciones de cGMP presentes *in vivo* sean suficientes para activar el receptor. No obstante, es interesante la asociación que se ha hecho de cGMP y sus vías de señalización con enfermedades cardiovasculares como hipertrofia, hipertensión, isquemia y lesiones por reperfusión (54–56), lo que puede aumentar la relevancia de la unión entre cGMP y GPR35.

Por otro lado, una evaluación de intermediarios metabólicos en la ruta de la tirosina que contiene grupos ácido catecólico y carboxílico revelan que el intermediario en la síntesis de melanina DHICA (5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico) y el intermediario en la síntesis de la hormona tiroidea T3 (3,5,3' triiodotironina) y la T3 reversa (3,3'.5 triiodotironina) promueven la respuesta de células de una línea de adenocarcinoma colorrectal humana HT-29 en ensayos de DMR. El antagonista sintético de GPR35 (CID-2745687) a una concentración fija de $64 \mu\text{M}$ redujo el desplazamiento de la longitud de onda generada por los agonistas citados

a niveles basales, indicando que su actividad se centra principalmente en la activación de GPR35, que es expresada de forma endógena por esta línea celular. Sin embargo, los ensayos de confirmación empleando una técnica de detección de reclutamiento de β -arrestina basados en *reporter* de β -lactamasa sugieren que solo DHICA actúa con una potencia similar a la obtenida mediante DMR. Esto indica que T3 y T3 reversa, actúan sobre GPR35 mostrando selectividad funcional. T3 reversa resultó ser el metabolito de tirosina más potente en ensayos de DMR con una EC_{50} = 5.9 μ M. La potencia observada en ensayos de reclutamiento de β -arrestina *Tango*[™] fue significativamente inferior (EC_{50} = 108 μ M). T3 resultó menos potente que la forma inversa, con EC_{50} = 50 μ M en DMR y EC_{50} = 513 μ M en ensayos de *Tango*[™]. Sin embargo, nuevamente, los niveles *in vivo* de estos dos compuestos no alcanzan las concentraciones necesarias para activar a GPR35 (57). Pese a estos datos, no se puede descartar completamente la acción de estos compuestos ya que se han encontrado niveles de T3 reversa aumentados y de T3 disminuidos después de infarto agudo de miocardio y en insuficiencia cardíaca avanzada y se han utilizado como indicadores para predecir ratios de supervivencia en pacientes con afecciones cardíacas (58,59). Por tanto, al igual que ocurre con el ácido kinurénico, parece que los niveles en plasma de estas moléculas se mantienen por debajo del umbral de activación de GPR35 en condiciones fisiológicas normales, aunque su acción sobre este receptor puede ser relevante cuando sus niveles en sangre se alteran a causa de alguna enfermedad.

Por último, en 2014 se identificó y sugirió un nuevo ligando endógeno para GPR35; la quimioquina CXCL17 es capaz de elevar los niveles de calcio intracelular en células HEK 293 transfectadas con hGPR35 y en la línea celular de monocitos humanos THP-1. Además, se produjeron efectos a concentraciones moderadas de esta quimioquina, siendo capaz de promover la quimiotaxis en THP-1. Los autores identificaron también similitudes entre la secuencia de GPR35 y la de algunos receptores de quimioquinas, llegando a sugerir el cambio de nombre de GPR35 a CXCLR8, asumiendo la deorfanzación del receptor (60).



1.4.1.2 Ligandos sintéticos de GPR35

Aunque no se haya llegado a un consenso sobre si GPR35 es activado de forma fisiológica por alguno de los ligandos endógenos identificados, sin embargo, sí que ha sido bastante exitosa la identificación de ligandos sintéticos. El trabajo de descubrimiento de fármacos llevado a cabo, tanto por el sector industrial como académico, ha dado lugar a una colección de compuestos con una potencia moderada-alta en GPR35 (**figura 1.6**); de hecho, hoy en día existe un número razonable de compuestos útiles para estudiar la fisiología y fisiopatología de este receptor. Es importante destacar que, al igual que ocurre con el ácido kinurénico, muchos de estos compuestos tienen una marcada selectividad entre especies. Esto hace de máxima importancia la elección de compuestos para el estudio con roedores o con humanos, ya que la mayoría de los cribados, realizados inicialmente en GPR35 humano, han identificado hits selectivos para la isoforma humana con resultados negativos en roedores.

Uno de los primeros ligandos agonistas de GPR35 identificados fue el inhibidor de fosfodiesterasas de GMPc zaprinast (2-(2-propiloxifenil)-8-azapurina-6-ona) (61). El zaprinast tiende a emplearse como agonista de referencia en GPR35 porque tiene una potencia de moderada a alta en cada uno de los ortólogos de las especies humana, ratón y rata (44,61,62) y los efectos sobre este receptor pueden diferenciarse de los derivados de su actividad sobre fosfodiesterasas (61,63,64). El

hecho de que un inhibidor de fosfodiesterasas de GMPc, como el zaprinast, tuviera capacidad de activar GPR35, fue la razón por la cual se evaluó el GMPc como posible agonista endógeno de GPR35 (46). Sin embargo, a pesar del amplio uso de zaprinast como compuesto de referencia, con una potencia descrita entre 2 y 8 μM para el ortólogo humano, se ha intentado identificar un compuesto agonista con una potencia relativamente alta y con un efecto similar tanto para humanos como para ratón y/o rata con la expectativa de ser empleado como herramienta farmacológica en el estudio del receptor GPR35.

Posteriormente a zaprinast, se identificaron una serie de compuestos con potencias superiores, entre ellos, el ácido pamoico (ácido 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico), que fue identificado en dos cribados independientes de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] (65,66). Sin embargo, el ácido pamoico en los ortólogos de rata y ratón, por lo menos en el ensayo empleado para el cribado, puede considerarse inactivo para ambos casos, lo que impide el uso en el estudio de GPR35 en roedores (44,53). Este patrón de selectividad inter-especies también se observó en el "Compuesto 1" (ácido 4-{{(Z)-[(2Z)-2-(2-fluorobencilidina)-4-oxo-1,3-tiazolidina-5-ylideno]metil} benzoico) identificado por Neetoo-Iseeljee y colaboradores (67) y PSB-13253 (ácido 6bromo-8-(4-[(3H)metoxibenzamido]-4-oxo-4H-cromeno-2 carboxílico (68), ambos con una actividad sobre GPR35 humano similar a ácido pamoico y también con baja potencia y eficacia en el receptor de rata y ratón. El Compuesto 1 fue identificado a partir de un cribado de una colección de 100000 moléculas pequeñas del Consejo de Investigación Médica, empleando un ensayo enzimático DiscoverX complementado con reclutamiento de β -arrestina 2; al igual que otras cuatro moléculas químicamente distintas, agonistas de GPR35, que presentaron diferentes perfiles de selectividad entre especies (67). Mientras que PSB-13253 derivó de un programa de química médica basado en derivados de ácido cromo-4-ona-2-carboxílico (68).

El estudio de Funke y colaboradores también presentó la primera evaluación completa de la relación estructura actividad entre diversas estructuras químicas en ortólogos humanos, de ratas y ratones. Aunque se observó anteriormente en ligandos individuales (67), este estudio proporcionó una evidencia global de que

los ligandos de GPR35 actúan de forma selectiva en humanos pudiendo tener efecto o no en rata o ratón; pero sin ligandos que actúen con una potencia alta en los tres ortólogos (69). Poco después de este estudio, se descubrieron dos estabilizadores de mastocitos capaces de activar los ortólogos humano y de rata de GPR35 con potencias equipotentes, lo que los convierte en los primeros compuestos útiles para traducir de forma fiable los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* con hGPR35 a ensayos fisiológicos *in vivo* en modelos de rata para efectos fisiológicos o enfermedades (70). En el ensayo de reclutamiento de β -arrestina 2 basado en BRET, lodoxamida y bufrolina activaron hGPR35 con una EC_{50} de 3.6 nM y 12.5 nM respectivamente y rGPR35 con 12.5 nM y 10 nM respectivamente.

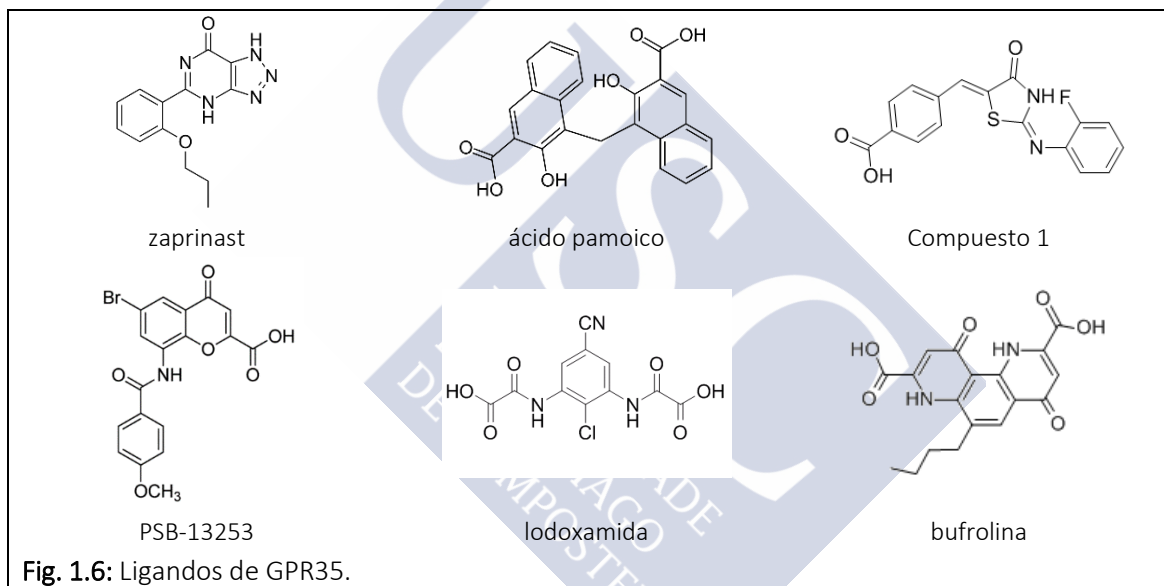


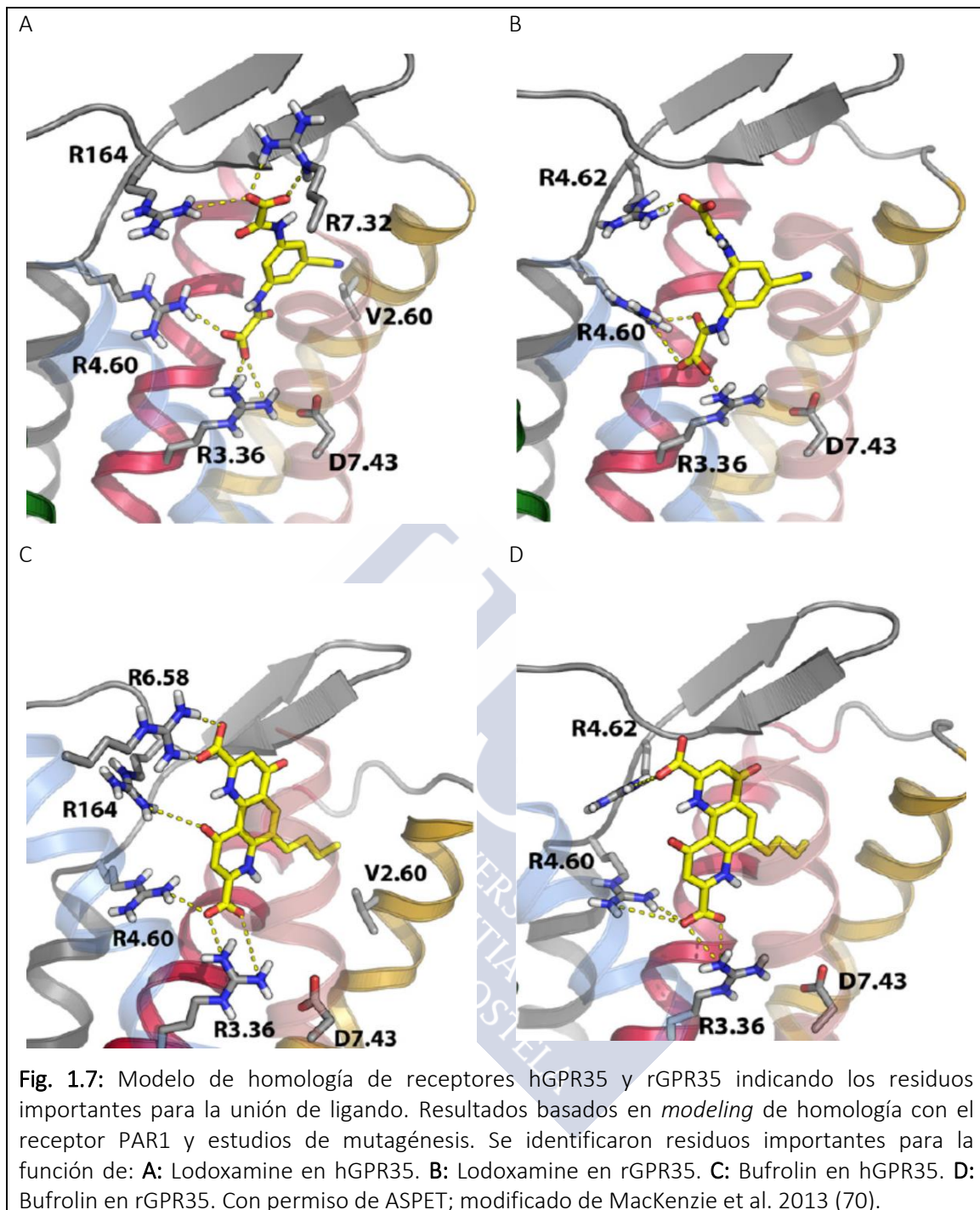
Fig. 1.6: Ligandos de GPR35.

1.4.2 Estudios de homología de receptores y diferencias en el bolsillo de unión de GPR35 humano y de rata.

Durante años, la falta de compuestos con potencia elevada y equipotentes entre especies ha obstaculizado en gran medida el estudio de la función de GPR35. Sin embargo, la evaluación de las diferencias farmacológicas entre especies ha sido muy útil para caracterizar el bolsillo de unión del ligando en GPR35. Este enfoque fue utilizado por MacKenzie y colaboradores (70), que empleó las diferencias en selectividad de especies en GPR35 para identificar los residuos implicados en la función del ligando. Basado en el hecho de que la mayoría de los ligandos

conocidos de GPR35 contienen al menos un grupo carboxilo (65,68,69,71,72), o un bioisómero de un grupo carboxilo (70), se postuló que los residuos cargados positivamente dentro del bolsillo de unión del ligando genérico de GPR35, que difieren entre humanos y ratas, podrían mediar las diferencias de potencia. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se llevaron a cabo mutaciones de “intercambio de especies” para cambiar los residuos de arginina clave situados dentro de las regiones de unión de ligandos propuestas (73) a un residuo no-arginina equivalente en ortólogos de especies opuestas. Se observó que los residuos de arginina presentes en los bucles extracelulares 2 y 3 o en la parte más cercana a la cara extracelular de los dominios TMH6 y TMH7 (R164, R6.58 y R7.32) eran importantes para el reclutamiento de β -arrestina 2 inducido por ligando en hGPR35, mientras que en rGPR35 el reclutamiento dependía del residuo conservado en esta especie R4.60 en el extremo extracelular del dominio TMH4 (70).

Los resultados de modeling por homología del receptor basados en la estructura del Receptor 1 activable por proteasa (el GPCR más similar a GPR35 del que se conoce su estructura atómica) indicaron que los ligandos equipotentes entre especies se comportaron como ligandos selectivos humanos en hGPR35 y como ligandos selectivos de rata en rGPR35 (70), es decir, que para producir una respuesta equipotente los ligandos deben unirse de forma diferente a cada ortólogo (**figura 1.7**). En un estudio independiente se identificaron varios residuos análogos entre ortólogos implicados en la unión del ligando a GPR35, en este caso se hicieron sustituciones de alanina en residuos que supuestamente estaban implicados con la unión a ligando; los ligandos resultantes se evaluaron mediante varios tipos de ensayos funcionales entre los que se incluían translocación de β -arrestina 2, fosforilación de kinasas regulada por señal extracelular y movilización de calcio (74) (**figura 1.8**). Conjuntamente con los resultados de *modeling* para homología del receptor basados en β_2 -adrenoceptor, se propuso que los residuos de arginina en las posiciones 4.60, 164, 167 y 6.58 estaban implicados en la unión y/o función de zaprinast y ácido pamoico en hGPR35 (74).



Los estudios de *docking* sugieren que el bolsillo de unión de ácido pamoico se encuentra en la región TMH3-4-5-6 del receptor donde es capaz de formar varias interacciones altamente polares con los residuos de arginina incluidos puentes salinos (R3.36) e interacciones catiónicas, además puede formar puentes de hidrógeno y principalmente interacciones de van der Waals con otros residuos aminoacídicos. Esta molécula se estabiliza mediante puentes de hidrógeno con el

residuo R(164) del *loop* extracelular 2 (ECL2). En el caso de zaprinast, que mostró una EC_{50} considerablemente superior que la de ácido pamoico, su bolsillo de unión también se ubica en la región TMH3-4-5-6 pero en una posición diferente, motivado por el hecho de que zaprinast es una molécula apolar que no forma puentes salinos, si no que crea puentes de hidrógeno con R4.60 y se une por fuerzas de van der Waals con otros residuos aminoacídicos como L3.33, L6.51 y L6.55; Y3.32 interactúa con el anillo heterocíclico de zaprinast. Los estudios realizados con mutantes para residuos de arginina en la región TMH3-4-5-6 (R4.60, R6.58, R3.36, R(164) y R(167) en el *loop* ECL2) muestran cambios en la señalización de los dos agonistas estudiados (74).

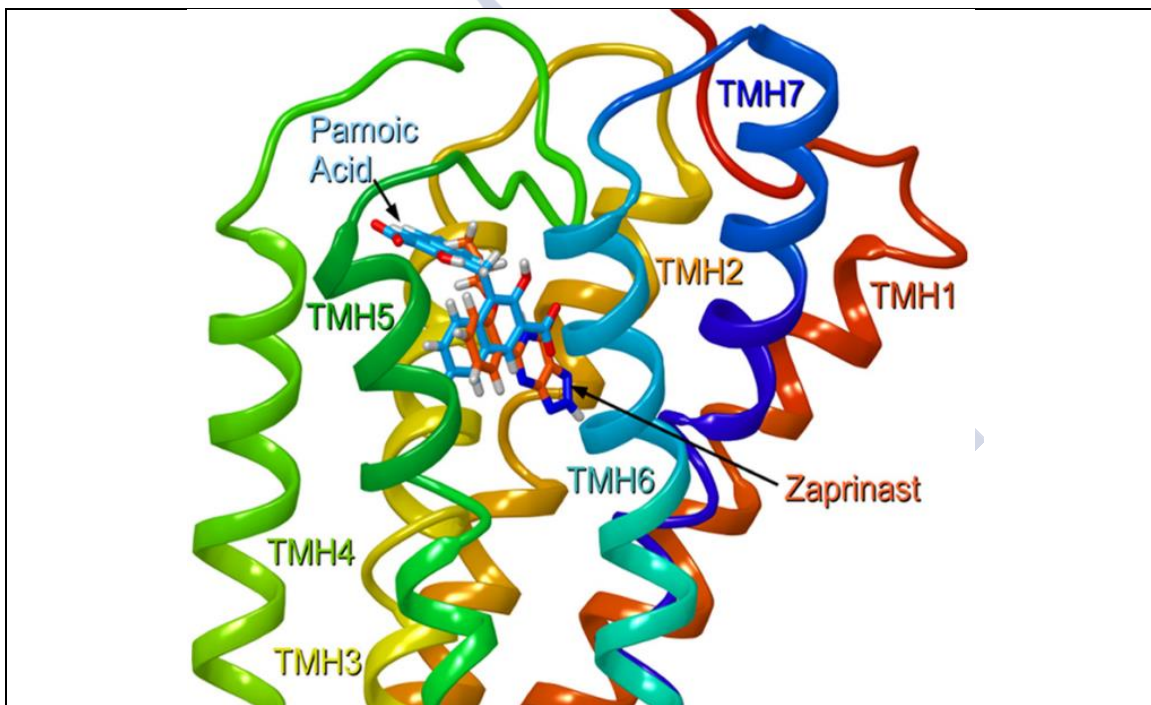


Fig. 1.8: Posiciones relativas de ácido pamoico (azul) y zaprinast (naranja) en sus conformaciones de acoplamiento determinadas por los estudios de *docking*. Desde una perspectiva entre TMH5 y TMH6 se ve claramente como los dos compuestos se unen a la misma región general (región TMH3–4–5–6); sin embargo, sus posiciones se desplazan entre sí. El ácido pamoico se desplaza más hacia el espacio extracelular más próximo a TMH4 que zaprinast (74). Con permiso de Journal of biological chemistry.

1.4.3 Señalización intracelular mediada por GPR35

Además de los esfuerzos para comprender el modo de unión de los ligandos a GPR35, se ha estudiado la señalización y las respuestas a la activación del receptor, para tratar de identificar las vías de señalización en las que está implicado y

comprender la fisiología y función del receptor. Se han identificado varios mediadores de señalización que interactúan con GPR35 y proporcionan información sobre las vías y respuestas que podrían ser objeto de su manipulación farmacológica.

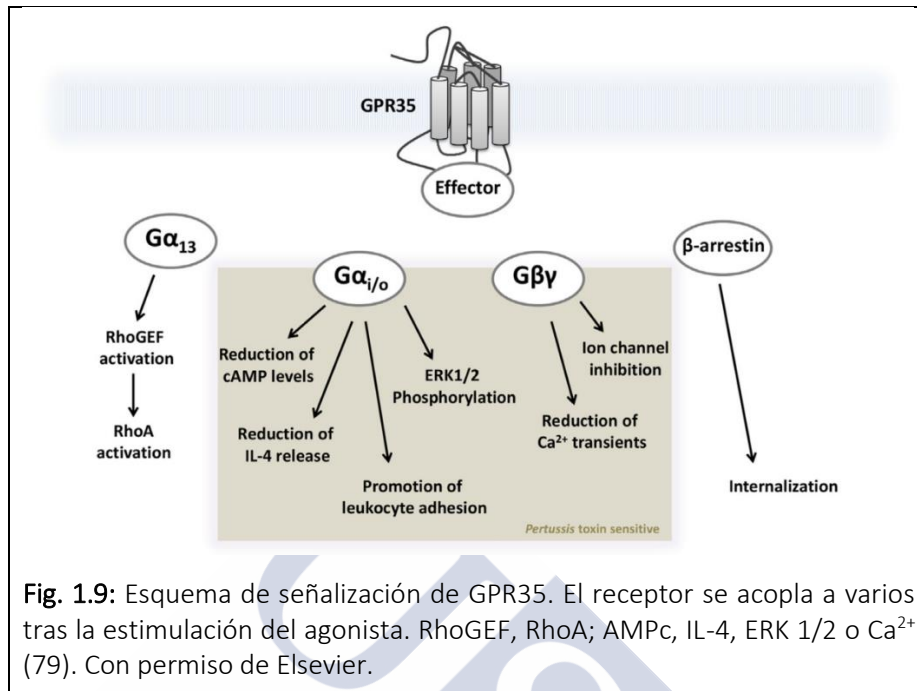
En términos de señalización clásica de GPCRs, GPR35 parece unirse a varios tipos de subunidades $G\alpha$, dependiendo del tipo celular y/o la especie a la que pertenezcan. La unión de [35 S]GTP γ S inducida por el efecto del ácido kinurénico sobre GPR35 expresado de forma heteróloga en células de ovario de hámster chino (CHO), fue inhibida empleando toxina de *Bordetella pertussis* (toxina Pertussis), que bloquea el acoplamiento entre el GPCR y las proteínas $G\alpha_{i/o}$ (51). Además se demostró que en células CHO transfectadas con el ortólogo de rata de GPR35, tanto el ácido kinurénico como el zaprinast inhibían la producción de AMPc inducida por forskolina, lo que también indica la participación de uno o más tipos de proteínas $G\alpha_{i/o}$. La activación de GPR35 mediante zaprinast y ácido kinurénico produjo la inhibición de canales de calcio tipo N en neuronas simpáticas de rata con proteínas G endógenas; nuevamente se bloqueó de forma permanente la inhibición de los canales con toxina pertussis, asumiendo la implicación de proteínas $G\alpha_{i/o}$ (75). También es interesante, en relación a estos datos, el hecho de que en el descubrimiento de CXCL17 como agonista de GPR35 tanto la quimiotaxis de células THP-1 como el aumento de las concentraciones intracelulares de calcio en células HEK 293 transfectadas con hGPR35, fueron también bloqueadas con tratamiento con toxina pertussis (60). En otros estudios anteriores sobre GPR35 empleando zaprinast y ácido kinurénico, se había observado una reducción significativa de la interleucina 4 (IL-4) liberada por células T *natural killer* invariantes humanas (iNKT) activadas por α -galactosilceramida y que esta reducción era eliminada con el pretratamiento con toxina pertussis (76).

Además de los efectos descritos; se ha observado, utilizando una línea celular humana, el acoplamiento a la subunidad $G\alpha_{13}$, que activa los factores de intercambio de nucleótidos de guanina que promueven el intercambio de GTP para activar las GTPasas de la familia Rho. Se ha demostrado que el zaprinast induce la activación de $G\alpha_{13}$ usando un anticuerpo GTP- $G\alpha_{13}$ en células HEK-293 transfectadas (43), tanto para hGPR35 como para rGPR35. El mismo estudio

demonstró la capacidad de zaprinast para producir aumentos en la concentración de calcio intracelular en células HEK-293 cotransfectadas con una subunidad quimérica $G\alpha_q/G\alpha_{13}$ de proteína G y GPR35 de humano o rata; un efecto que era específico para la quimera $G\alpha_{13}$ en comparación con $G\alpha_{12}$. Sin embargo, no se han encontrado evidencias de un acoplamiento directo a proteínas G con subunidades G_q/G_{11} , que son los transductores habituales en el aumento de concentraciones de calcio mediadas por fosfolipasa $C\beta_1$. Los hallazgos de funciones específicas para $G\alpha_{13}$ son especialmente interesantes teniendo en cuenta que GPR55, el receptor filogenéticamente más próximo a GPR35, también muestra este acoplamiento inusual (77). Por lo tanto, los efectos celulares y biológicos producidos por la activación de GPR35 parecen estar mediados por las rutas que implican la participación de $G\alpha_{i/o}$ o $G\alpha_{13}$. Sin embargo, también es posible que la efectividad en el acoplamiento de la proteína G dependa de factores adicionales que aún deben de ser explorados sistemáticamente, como la actividad de ligandos sesgados y la expresión de la subunidad $G\alpha$ (**Figura 1.9**). La posibilidad de activación mediante ligandos sesgados es particularmente interesante en el contexto de GPR35 como diana terapéutica porque, una vez descifrado, esta característica podría aprovecharse para aumentar la especificidad de las respuestas inducidas por un fármaco.

Además de iniciar respuestas dependientes de proteínas G; se ha demostrado que el receptor GPR35 recluta β -arrestina 2 directamente tras la estimulación con varios agonistas, incluidos ácido kinurénico y zaprinast (65) (**Figura 1.9**). Esta activación va seguida de la internalización dependiente de agonista del receptor, presumiblemente mediada por la β -arrestina 2 siguiendo el modelo clásico de desensibilización de GPCRs (16,70). Para muchos GPCRs, β -arrestina 2 funciona como una proteína *scaffold* interactuando con varias rutas de señalización, incluidas las rutas de kinasa c-Jun N-terminal, protein-kinasa B y AMPc, pero sobre todo la ruta de la kinasa regulada por señal extracelular (ERK 1/2) (78). Por el momento, las pocas evidencias de que esto ocurra en GPR35 son los estudios que identifican el ácido pamoico como un agonista eficaz de GPR35b mostrando una activación de ERK1/2 mediante reclutamiento de β -arrestina 2; pudiendo ser bloqueado este efecto mediante antagonistas y toxina pertussis (66). Atendiendo a todos los procesos en los que parece estar implicado GPR35, el cribado de ligandos

“sesgados” puede ser la mejor manera de comprender las funciones fisiológicas de este receptor y aprovecharlo como diana terapéutica.



1.4.4 GPR35 como diana terapéutica.

Pese al desconocimiento del ligando endógeno y la naturaleza compleja de su perfil de acoplamiento a proteínas G, junto con que su función fisiológica y su importancia siguen siendo poco conocidas; se ha conseguido asociar a una variedad de enfermedades que abarcan múltiples sistemas biológicos, lo que sugiere un gran potencial como diana terapéutica.

1.4.4.1 Perfil de expresión de GPR35

Se han detectado transcritos de ARNm de GPR35 en gran variedad de tejidos, tanto en humanos como en roedores. En el primer estudio en el que se identificó GPR35 se intentó determinar mediante *Northern blot* la distribución de este receptor en diversos tejidos humanos y de rata. Los autores detectaron expresión de ARNm del receptor en tejido de intestino de rata, pero sin réplica para tejido humano (40). Mediante una técnica más sensible, qRT-PCR, se encontró ARNm del receptor en pulmón, estómago, intestino delgado, colon y bazo de humanos y de ratón y en linfocitos periféricos humanos. La hibridación in situ con sondas de ARNm de GPR35 en un conjunto de tejidos de ratón, reveló expresión del receptor en todo el

tracto digestivo inferior (51). De forma similar, la qRT-PCR en ratas detectó niveles elevados de ARNm de GPR35 en pulmón, estómago, intestino delgado y colon, pero también músculo esquelético, ganglio de la raíz dorsal y útero, con expresión moderada en médula espinal, corazón, hígado, vejiga y cerebro (61). Desde estos estudios, se ha corroborado la expresión en médula y ganglios de la raíz dorsal de ratas (80) (81), así como la expresión en astrocitos de ratón (82). Finalmente, también se ha encontrado expresión de GPR35 en células inmunes humanas, incluyendo mastocitos, basófilos, eosinófilos (62), células iNKT (*natural killer* invariantes) (76), monocitos sensibles a CXCL17 y la línea celular de monocitos THP-1 (60).

1.4.4.2 Enfermedades gastrointestinales y metabolismo.

En base a los altos niveles de expresión de GPR35 en el tracto gastrointestinal, parece lógico pensar que este receptor tenga alguna función en la homeostasis de estos tejidos. La variante de splicing GPR35b fue descubierta a partir de cDNA de células de cáncer gástrico, participando, aparentemente, en la transformación de células NIH3T3. Además, la expresión de GPR35b estaba incrementada en tejidos de cáncer gástrico. Estas evidencias, junto con la elevada expresión de GPR35 en células HT-29, sugieren que este receptor puede ser una diana interesante para desarrollar nuevos tratamientos para cáncer gástrico. En el intestino, el receptor GPR35 se ha propuesto como un factor de riesgo para trastornos inflamatorios crónicos como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la colitis ulcerosa. En un estudio de asociación de genoma completo para la aparición temprana de EII (en el que se incluía la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa) se identificó un SNP de GPR35 asociado a colitis ulcerosa (83). El SNP en rs4676410 es una mutación de nucleótido único que codifica una sustitución de citosina a timina; aunque no se detectaron cambios de expresión de GPR35 en tejidos de individuos con EII en comparación con los controles. Sin embargo, el mismo SNP también se asoció con los genes de un bloque de desequilibrio de ligamiento (CAPN10, KIF1A y RNPEPL1). CAPN10 que codifica la calpaína 10, se expresó en niveles significativamente más bajos en individuos con colitis ulcerosa.

Antes del estudio de asociación de genoma completo de EII; los genes CAPN10 y GPR35 habían sido vinculados previamente, mediante otro estudio de asociación

de genoma completo, a diabetes mellitus tipo 2 (84). En este estudio se identificaron 4 SNPs no sinónimos en la región que codifica para GPR35, con un solo polimorfismo “UCSNP-38” que codifica una sustitución de serina por arginina en la posición del aminoácido 294, mostrando una asociación con diabetes tipo 2. Sin embargo, no hubo evidencias que vinculasen a GPR35, mientras que “UCSNP-43” en CAPN10 mostró una asociación con diabetes tipo 2 y evidencias de su vinculación con GPR35. El estudio concluye que las variaciones genéticas en CAPN10 y no en GPR35 son responsables de la susceptibilidad a la enfermedad.

Un estudio más reciente sobre colitis ulcerosa y colangitis esclerosante primaria (una enfermedad colestática crónica del hígado) ha señalado de nuevo a GPR35 como implicado en la EII. La mayoría de los pacientes con colangitis esclerosante primaria tienen colitis ulcerosa simultánea, y el análisis integrado de los estudios de asociación de genoma completo para ambas enfermedades identificó dos SNP de GPR35 que tienen una asociación significativa con la colangitis esclerosante primaria (85). Uno de ellos fue la variante rs4676410 identificada en el estudio de asociación de genoma completo de la EII (83), mientras que la otra variante, rs3749171, codifica una sustitución de metionina a treonina en TM3. Los autores de este estudio especularon sobre la posibilidad de que, debido al patrón de expresión de GPR35 y que los niveles de ácido kinurénico, tanto en el tracto gastrointestinal como en la bilis, muestran niveles más elevados en pacientes con estas enfermedades que en condiciones fisiológicas normales (86,87), puede que GPR35 desempeñe una función importante en procesos de inflamación en el tracto gastrointestinal y tracto biliar, aunque todavía debe de ser confirmado experimentalmente.

1.4.4.3 Enfermedades cardiovasculares.

Aunque el papel de GPR35 en enfermedades cardiovasculares no se deduce de forma evidente en su patrón de expresión, el receptor parece estar implicado, de forma directa o indirecta, en varios aspectos de la disfunción cardiovascular. El primer estudio que sugirió un rol para GPR35 en enfermedades cardiovasculares, fue un estudio de asociación de genoma completo para pacientes con hipertensión; con el objetivo de encontrar nuevas formas de predicción de enfermedad coronaria-arterial (88). En este estudio se identificó una asociación entre un SNP

de GPR35 y la calcificación coronaria arterial. Curiosamente, el SNP identificado fue el mismo (rs3749172) que se asoció con la diabetes tipo 2 (84,89,90). El SNP provoca una sustitución de serina a arginina en la posición 294 en la cola C-terminal del receptor, el dominio principal implicado en la unión de proteínas citoplasmáticas distintas de las proteínas G. Entonces, el polimorfismo podría influir en la respuesta mediada por β -arrestina y, en consecuencia, alterar la selectividad de la respuesta de proteínas G frente a la respuesta de β -arrestina. Sin embargo, otro estudio refuta esta hipótesis; ya que el cambio de serina a arginina no altera la potencia de un panel de ligandos ensayados mediante una técnica de interacción GPR35- β -arrestina 2 (70). De todos modos, dado que la serina 294 es un lugar potencial de fosforilación regulada por ligandos, la importancia de este SNP y el hecho de que sea una variación muy común (con una frecuencia de alelos minoritarios de 0.494) hacen que siga en estudio.

Otra evidencia más notable de la implicación de GPR35 en enfermedades cardíacas se encontró en un estudio de *microarrays* de expresión génica de 12 individuos diagnosticados con insuficiencia cardíaca crónica (91). La expresión de GPR35 en tejido de miocardio de pacientes con fallo cardíaco se vio incrementada significativamente en comparación con los individuos sanos, GPR35 fue uno de los 12 genes seleccionados para el análisis de seguimiento debido a su condición de receptor huérfano y su potencial como nueva diana terapéutica (91). La sobreexpresión mediada por adenovirus de GPR35 en cardiomiocitos de rata primarios dio como resultado una viabilidad reducida y una hipertrofia celular. La medición de parámetros hemodinámicos en ratones *knockout* para GPR35 reveló un aumento significativo de la presión sanguínea en comparación con los *wild type* de la misma camada. Lo que implica un efecto de GPR35 sobre la regulación de la presión arterial (91).

En una investigación más detallada de la expresión de GPR35 en cardiomiocitos de ratones recién nacidos se encontraron niveles elevados tanto de ARNm como de proteína en la superficie celular como respuesta a hipoxia e hipoxia inducida por el factor de activación 1 (92). Teniendo en cuenta que la hipoxia es una característica de la mayoría de las afecciones cardíacas crónicas; estos resultados sugieren una participación del receptor GPR35 en enfermedades cardiovasculares. En este

estudio, se observó que los cardiomiocitos de ratones neonatales con sobreexpresión de GPR35 presentaban ondulaciones de la membrana y aparición de fibras de retracción, pero no un cambio en el tamaño de las células. Esto entra en conflicto con los resultados del estudio de Min (91) en cardiomiocitos de rata, sugiriendo una posible variación inter-especie en los efectos celulares específicos de GPR35. No obstante, ambos estudios apuntan a una actividad de GPR35 en el reordenamiento de la actina del citoesqueleto; muy probablemente mediado por la actividad de la proteína $G\alpha_{13}$ y Rho A, ambos reguladores de la remodelación del citoesqueleto (93).

En modelos quirúrgicos de ratones con hipoxia aguda debido a infarto de miocardio e hipertensión crónica (modelo de hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca), se produce una expresión temprana de GPR35 en miocardio (tras un día y dos semanas respectivamente) (92). En el modelo crónico, se observó que la sobreexpresión precedía a una remodelación cardíaca patológica y al desarrollo de insuficiencia cardíaca. Nuevamente, estos descubrimientos sugieren que GPR35 juega un papel importante en el desarrollo de fisiopatologías cardíacas. Aunque siendo necesarios más estudios al respecto, en conjunto, todos estos datos sugieren que GPR35 podría ser un marcador efectivo para la predicción en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca y una diana terapéutica en el tratamiento de la hipertensión.

1.4.4.4 Inflamación y sistema inmune.

Varios estudios evidencian una relación entre GPR35 y procesos inflamatorios, principalmente en experimentos en los que la adición de agonistas de GPR35 ha conseguido la atenuación de procesos inflamatorios; lo que sugiere que este receptor puede modular las condiciones inflamatorias. GPR35 se ha relacionado con la salud inmunológica, principalmente a través de la ingesta dietética y la digestión de alimentos que contienen triptófano, como carne roja, pescado, huevos y verduras, que se descomponen para generar serotonina, melanina, ácido kinurénico y nicotinamida entre otros (94). En el intestino, el ácido kinurénico se puede liberar de las proteínas de la dieta mediante la actividad de *E. coli* y ser transportada al medio extracelular y la sangre, donde produce efectos claramente antiinflamatorios (95). También se descubrió que el ácido kinurénico atenúa la

secreción del factor α de necrosis tumoral inducida por lipopolisacáridos en células mononucleares de sangre periférica humana y monocitos purificados de sangre periférica (51). En un estudio independiente, se trataron monocitos y neutrófilos con ácido kinurénico induciendo el reposicionamiento de las capas endoteliales de la vena umbilical de humanos que expresan la molécula de adhesión intracelular (96). Esta señal disminuyó por el tratamiento con toxina pertussis y se redujo al utilizar ARNhc dirigido a GPR35, lo que implica que este receptor es un mediador directo de la adhesión de leucocitos (96). Si embargo, la potencia del ácido kinurénico en estos estudios fue claramente mayor a cualquiera registrada en ensayos anteriores en los que se haya empleado transcripción del receptor en células heterólogas. En células *natural killer* invariantes que participan en la maduración de células dendríticas y regulación de la autoinmunidad, se demostró que el ácido kinurénico y el zaprinast reducen, de forma concentración dependiente, la liberación de IL-4 al medio de cultivo y de manera independiente al tratamiento con toxina pertussis, reduciendo de forma significativa los niveles de interferón- γ ; aunque no está clara su relevancia a nivel fisiológico (76).

Los estudios basados en el efecto inducido por ácido kinurénico revelaron una regulación positiva de GPR35 en respuesta a la unión de anticuerpos IgE (62). El mismo estudio describió la potencia de los fármacos antialérgicos y antiasmáticos cromolina disódica y nedocromil sódico en GPR35, apoyados por un estudio independiente donde se muestra la potencia de estabilizadores de masa celular en mastocitos bloqueando la unión de IgE e impidiendo la liberación eficaz de histamina (70). Estos estudios sugieren que GPR35 puede estar involucrado en la inflamación mediada por la respuesta inmune innata y que GPR35 podría ser una diana terapéutica importante para el desarrollo de nuevos fármacos antiinflamatorios y tratamientos contra el asma.

GPR35 fue identificado como un receptor de quimioquinas en uno de los últimos estudios que planteaban la deorfanzación del receptor, sugiriendo al mismo tiempo un papel importante para él como modulador del sistema inmune (60). En él, se describió el efecto de CXCL17 sobre el receptor y como éste inducía un flujo de calcio intracelular en una línea celular pro-B de ratón al que se había transfectado el ortólogo humano de GPR35. CXCL17 funciona atrayendo

macrófagos y está sobre-expresado en fibrosis pulmonar idiopática (97). La expresión de GPR35, junto con la de marcadores de macrófagos, se redujo significativamente en pulmones de ratones *knockout* para CXCL17, lo que sugiere que los macrófagos que expresan GPR35 necesitan que CXCL17 migre a los pulmones, donde puede desempeñar un papel en la inflamación (60). Sin embargo, este es un estudio aislado que entra en conflicto con descubrimientos previos, por lo que esta función potencial de GPR35 debería ser confirmada.

1.4.4.5 Sistema nervioso central y nocicepción

Se confirmó la expresión de GPR35 en neuronas de la médula espinal y ganglios de la raíz dorsal de ratas (81) (80) (98). El receptor GPR35 en células de ganglios de la raíz dorsal se colocaliza con el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1), un marcador neuronal nociceptivo (80). El ácido kinurénico y el zaprinast inhibieron la producción de AMPc inducido por forskolina en neuronas sensibles a toxina pertussis, lo que implica al eje GPR35–proteína $G_{\alpha i/o}$ como una potencial diana en el tratamiento del dolor. En un modelo de dolor de ratones (test de contorsión), el pretratamiento con ácido kinurénico, precursor de L-kinurena, o zaprinast se redujeron las contracciones de los ratones en un 58 % y 54 % respectivamente (81). Por lo tanto, GPR35 podría ser una diana terapéutica anti-nociceptiva válida, aunque el traslado a humanos no se pudo realizar, debido a la falta de pruebas de la expresión de GPR35 en células nociceptivas humanas.

En relación con el sistema nervioso central, se observó la expresión de GPR35 en astrocitos corticales de ratón, donde el ácido kinurénico inhibió nuevamente la producción de AMPc inducida por forskolina, efecto que fue contrarrestado por la adición del antagonista de GPR35 CID-2745687 y por el silenciamiento del ARNm del receptor mediante ARNip (82). Sin embargo, una vez más hay que tener en cuenta que CID-2745687 es un antagonista altamente selectivo para el ortólogo humano de GPR35 (44), poniendo en duda el modo de acción de este compuesto en un modelo de ratón. En el mismo estudio, ácido kinurénico y zaprinast alteraron las concentraciones intracelulares de calcio y redujeron las corrientes excitatorias postsinápticas en neuronas de hipocampo de rata. Aunque el ácido kinurénico también actúa sobre el N-metil-D-aspartato y los receptores nicotínicos $\alpha 7$; los efectos sobre la señalización de calcio intracelular y las corrientes sinápticas

fueron insensibles a los antagonistas de estos receptores, pero sensibles a CID-2745687. Además, sildenafil, inhibidor de fosfodiesterasas de GPMc no logró reducir las corrientes sinápticas. Esto sugiere que los efectos de ácido kinurénico y zaprinast, observados en este estudio, se deben a su efecto agonista sobre GPR35 y no al efecto producido sobre otras dianas para estos compuestos. Por lo tanto, es posible que GPR35 participe en la transmisión sináptica, aunque una vez más, estos resultados no se han probado en células humanas. Sin embargo, no se puede descartar al GPR35 como una potencial diana terapéutica en el tratamiento de dolor o la prevención del daño excitotóxico.

1.5 Métodos utilizados para la identificación de ligandos de GPR35.

A lo largo de los años, en el estudio del receptor GPR35 se han utilizado técnicas de uso común en el estudio de la farmacología y unión de ligandos de GPCRs huérfanos. A continuación, se exponen los métodos más frecuentes, incluyendo de forma más detallada las técnicas empleadas en la presente tesis.

1.5.1 Transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET)

La Tecnología de BRET es un método útil para el estudio dinámico de las interacciones proteína-proteína a tiempo real. Por lo tanto, se convierte en una herramienta ideal tanto para el estudio de la activación GPCRs e interacción con β -arrestinas como para el estudio de dimerización de receptores.

El fenómeno de BRET se encuentra de forma natural en muchos organismos marinos (por ejemplo: *Renilla reniformis* y *Aequorea victoria*), donde la bioluminiscencia producida por la degradación catalítica de la luciferasa (con luciferina y/o coelenteracina h como sustrato) en presencia de oxígeno, es transferida a una molécula GFP que actúa como aceptor y emite luz basada en fluorescencia siempre que se encuentre próxima a la luciferasa activa. Este fenómeno a sido la base de la técnica empleada para el estudio de interacción proteína-proteína (99).

La eficiencia de la técnica de BRET depende de varios factores:

1. Las propiedades espectrales de la molécula fluorescente y la señal emitida por la actividad de la Rluc, el espectro de emisión del donante debe

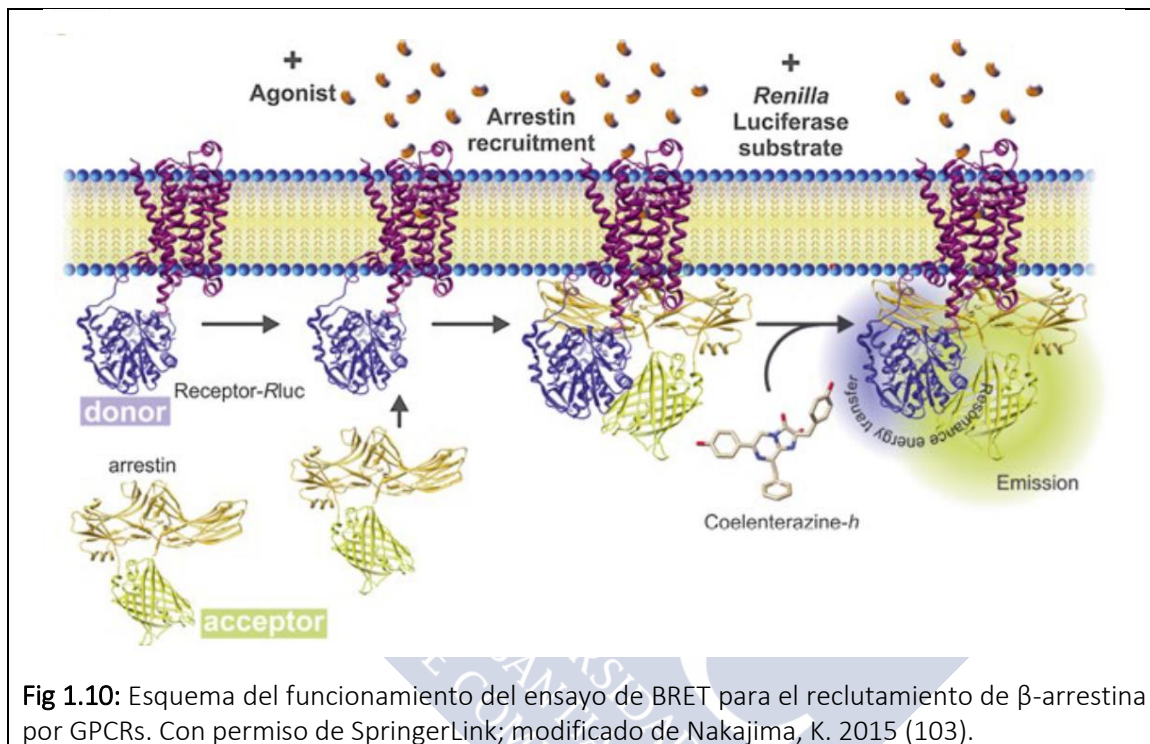
solaparse con el espectro del aceptor. Sin embargo, si los espectros se solapan demasiado, se pierde resolución espectral, dando lugar a baja señal y ruido.

2. La proximidad de ambas moléculas, la eficacia de BRET es inversamente proporcional a la distancia entre donante y aceptor, de hecho, se ha descrito que la distancia idónea entre ellas debe estar en el rango 10 – 100 Å, una distancia indicativa de interacción directa entre proteínas. Esta dependencia crítica de la distancia entre donante y aceptor para la transferencia de energía hace que los sistemas de transferencia de energía por resonancia (BRET y FRET) sean idóneos para el estudio de interacciones de GPCRs (unión con proteínas citoplasmáticas o formación de dímeros u oligómeros).
3. La orientación relativa de los dipolos donante y aceptor pueden jugar un papel importante en la eficiencia del BRET, ya que proteínas con gran libertad de movimiento podrían tener orientaciones más favorables para la transmisión de energía, al menos durante parte del tiempo de emisión; sin embargo, la fusión con proteínas, como en el caso de los GPCRs, es probable que restrinja esa libertad, pudiendo ser perjudicial en algunos casos, aunque más eficiente en otros.

Con el tiempo se han desarrollado muchas combinaciones de proteínas y cada una presenta sus ventajas e inconvenientes; las dos variantes más utilizadas son la forma clásica de BRET, ahora nombrada como BRET1 y una variante nombrada como BRET2. BRET1 emplea Renilla luciferasa (Rluc) como su donante y la proteína fluorescente amarilla (YFP) o una de sus variantes como aceptor y coelenterazina h como el sustrato de Rluc (100). La coelenterazina h hace que Rluc emita a una longitud de onda de 470 nm, ideal para excitar a YFP en su pico máximo de 515 nm. YFP emitirá a una longitud de onda máxima de 530 nm. Existe una superposición sustancial en los espectros de emisión de la degradación de coelenterazina h e YFP (**Figura 1.10**), que da como resultado una señal de fondo alta; esto hace necesario la aplicación de un factor de corrección para calcular la señal de BRET, para ello se necesita una condición de transfección adicional con RLuc y en ausencia de YFP (101). BRET2 reemplaza la molécula aceptora YFP con una proteína fluorescente verde (GFP2 o GFP10) y utiliza el sustrato DeepBlueC

que da como resultado un desplazamiento de la emisión de Rluc a una longitud de onda máxima de 395 nm. Esto permite una separación de espectros mejorada entre el donador y el aceptor (102).

Hay muchos otros tipos de BRET desarrollados como variaciones de estos dos que implementan, por ejemplo, el uso de Rluc 8 (eBRET2) o la luciferasa Nanoluc (NanoBRET), entre otros.



Esta técnica fue empleada para la identificación de ligandos de GPR35 a partir del cribado de la quimioteca Prestwick Chemical Library® en los estudios realizados por Jenkins en los que colaboró el grupo BioFarma (65) así como los realizados en la presente tesis. En esta puesta a punto del método se introdujo la secuencia de una proteína eYFP en el extremo C-terminal de las formas de rata y de humano del receptor GPR35. Estos receptores se cotrasnfectaron en células HEK 293T/17 con β -arrestina-2 marcada con Renilla luciferasa. Tras la adición de coelenteracina h, la activación de GPR35 mediante algún agonista dio como resultado la interacción de GPR35 y β -arrestina 2 produciendo una señal de BRET dependiente de la concentración de ligando.

1.5.2 Otras técnicas basadas en el reclutamiento de β -arrestina-2

Un ensayo alternativo al desarrollado con BRET, pero también basado en la unión GPR35- β -arrestina-2 es el que emplea el sistema “Tango™”. Este método utiliza una β -arrestina-2 marcada con una proteasa que escinde del extremo c-terminal modificado de GPR35 un fragmento que codifica el sitio de unión de una β -lactamasa. La β -lactamasa escindida se convierte entonces en el gen “*reporter*” que permite obtener una respuesta fluorescente mediante tecnología FRET (104). También se han empleado otras dos variantes de técnicas de interacción con β -arrestina-2 para identificar y caracterizar agonistas de GPR35. El primero de ellos se basa en análisis de *high content* de la translocación de un GFP marcado de la β -arrestina-2 (66), mientras que el kit “*PathHunter*®” de DiscoverX se ha utilizado para estudiar la potencia y selectividad entre especies de zaprinast y ácido kinurénico en los ortólogos de humano y de rata del receptor GPR35 (43). Este ensayo se basa en un sistema de complementación de fragmentos de β -galactosidasa unidos a GPR35 o β -arrestina-2. Es importante destacar que la naturaleza del reclutamiento de β -arrestina-2 en la membrana celular tras la activación del ligando contribuye tanto a la desensibilización como a la internalización del complejo de proteína del receptor, por lo tanto, las señales generadas a partir de este ensayo son esencialmente independientes de la activación de la proteína G (105,106). Esto puede ser una limitación para evaluar ciertos aspectos de la función del receptor; por ello, en las publicaciones en las que se ha empleado de forma principal este método para la identificación de *hits* del receptor GPR35, posteriormente se han realizado ensayos funcionales a nivel de segundos mensajeros para obtener una confirmación de la interacción ligando – receptor (43,66).

1.5.3 Unión de nucleótidos de guanina

Los ensayos de guanosina^[35S]-5'-O-(3-tio)trifosfato ([³⁵S]GTP γ S) miden el intercambio de nucleótidos de guanina que se produce en las subunidades G α tras la activación de los GPCRs y mediante el uso de un análogo de GTP resistente a la actividad GTPasa de la subunidad G α se retiene el complejo activo. Los ensayos de [³⁵S]GTP γ S son de uso frecuente porque permiten monitorizar la activación de los GPCRs en una etapa temprana de la ruta de transducción de señal y pueden

realizar en preparaciones de membrana celular. Los ensayos de unión de [³⁵S]GTPγS han sido empleados más comúnmente en el estudio de GPCRs que se unen preferentemente a Gα_{i/o} que tienen una mayor presencia en la membrana celular y tienen una ratio de intercambio de nucleótidos de guanina mayor que el resto de proteínas G. Además, los complejos GPCR–proteína G y la inmunoprecipitación de subunidades Gα marcadas con [³⁵S]GTPγS han permitido el estudio de la activación de Gα_q, Gα_{12/13} y Gα_s mediante modificaciones del ensayo estándar de [³⁵S]GTPγS (107). Tanto el ensayo estándar de unión de [³⁵S]GTPγS como el ensayo de inmunoprecipitación de [³⁵S]GTPγS han sido empleados para demostrar la activación del receptor GPR35 por el ácido kinurénico (51), así como ligandos de la quimioteca Prestwick Chemical Library® (65).

1.5.4 Movilización de calcio.

La activación de GPCRs se puede estudiar midiendo los cambios que ejercen los ligandos sobre los niveles de segundos mensajeros y sus rutas. Esto incluye ensayos que detecten variaciones en la concentración intracelular de cAMP, inositoles fosfato y niveles de Ca²⁺. Este tipo de ensayos se han empleado para medir la actividad de Gα_q mediante la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático, consecuencia de la señalización activada por esta proteína G. Este método se basa en la utilización de una molécula fluorescente selectiva para Ca²⁺ que cambia su patrón de emisión cuando se produce la unión entre ambas. Este método fue adaptado para el estudio de la respuesta de Gα_s, Gα_{i/o} y Gα_{12/13} a través de la liberación de Ca²⁺; esto fue posible mediante la utilización de quimeras de proteína G y proteínas G “promiscuas” (108,109). Estas quimeras se generaron reemplazando los últimos aminoácidos del extremo C-terminal de Gα_q por el correspondiente de Gα_s, Gα_{i/o} o Gα_{12/13}, para crear proteínas G con la especificidad de unión a GPCRs alterada, pero con su capacidad de unirse a PLC intacta y por lo tanto de regular los niveles intracelulares de Ca²⁺. La expresión de las llamadas proteínas G “promiscuas” Gα₁₅ y Gα₁₆ (109) que interactúan con una amplia gama de GPCRs, también pueden producir la activación de la vía de Ca²⁺.

Los ensayos de regulación de Ca²⁺. Han sido particularmente útiles en la identificación de ligandos para receptores huérfanos, para los cuales no existía a

menudo información sobre los tipos de proteínas G implicadas o las rutas de señalización reguladas tras la activación. De hecho, dos de los primeros estudios realizados para identificar agonistas de GPR35 emplearon estas técnicas, mostrando la activación del receptor GPR35 producida por zaprinast (61) y ácido kinurénico (51).

1.5.5 Métodos basados en la utilización de levaduras

Las proteínas G quiméricas también fueron utilizadas en modelos de levaduras, generalmente con modificaciones de las rutas de *Saccharomyces cerevisiae*. La delección de un único GPCR en levaduras haploides permite la expresión heteróloga y la medida de la actividad de GPCRs funcionales de mamíferos sin interferencia de otros receptores y la consiguiente activación de sus rutas de señalización (46,110). La construcción de proteínas G quiméricas en sistemas de levadura se realizan del mismo modo que las quimeras $G\alpha_q$ descritas anteriormente: reemplazando los últimos cinco aminoácidos de la secuencia c-terminal de la proteína $G\alpha$ endógena de la levadura por los de la proteína G de mamífero que se pretenda estudiar. De esta forma se confirmó la actividad de GPR35 y su unión a proteínas $G\alpha_{13}$ de los compuestos identificados en los ensayos de β -arrestina-BRET realizados por Jenkins y colaboradores (65). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las quimeras empleadas en estos sistemas solo contienen un pequeño fragmento de la proteína G original.

1.5.6 Fosforilación de la MAP quinasa ERK 1/2

La importancia de los ensayos sobre la ruta de señalización mediante ERK 1/2 reside en que es un punto de intersección común en las cascadas de señalización de la mayoría de los GPCRs. La activación de GPCRs puede influir en la señalización por ERK 1/2 por modulación de protein quinasa A (vía $G\alpha_s$), protein quinasa C (vía $G\alpha_q$ y $G\alpha_o$), mediante dímeros $\beta\gamma$ de $G\alpha_i$ y por activación de β -arrestinas (78,111,112). Por lo tanto, los ensayos de ERK 1/2 registran la actividad de diferentes proteínas G cuyas rutas de señalización convergen en un mismo punto de la cascada de señalización, dando lugar a un sistema experimental que permite medir la actividad de GPCRs sin tener conocimiento de las proteínas G implicadas. Se emplearon técnicas de *immunoblotting* fosfo-ERK 1/2 para estudiar la actividad

agonistas de GPR35 (42,104). Además, se utilizaron ensayos basados en la activación de ERK 1/2 para estudiar la especificidad de GPR35 y proteínas G; utilizando toxina pertussis se demostró que la actividad de zaprinast y ácido pamoico sobre GPR35 es dependiente de $G\alpha_{i/o}$ (66).

1.5.7 Estudios de internalización de receptor

Los estudios de internalización de receptores se han utilizado para visualizar y cuantificar el proceso de endocitosis que a menudo se origina como respuesta a la activación de los GPCRs por actividad de ligandos de alta afinidad (113). Añadiendo un epítipo al extremo N-terminal del receptor, es posible obtener imágenes de inmunofluorescencia al mismo tiempo que se desarrolla un análisis cuantitativo. Esta técnica fue utilizada para la identificación de ácido kinurénico como posible ligando endógeno de GPR35 (51) y la caracterización de ácido pamoico (66) y tirofostin-51 (104). Estos estudios demostraron que se produce internalización de GPR35 como respuesta a la activación producida por ligandos apropiados.

1.5.8 Redistribución dinámica de masas (DMR)

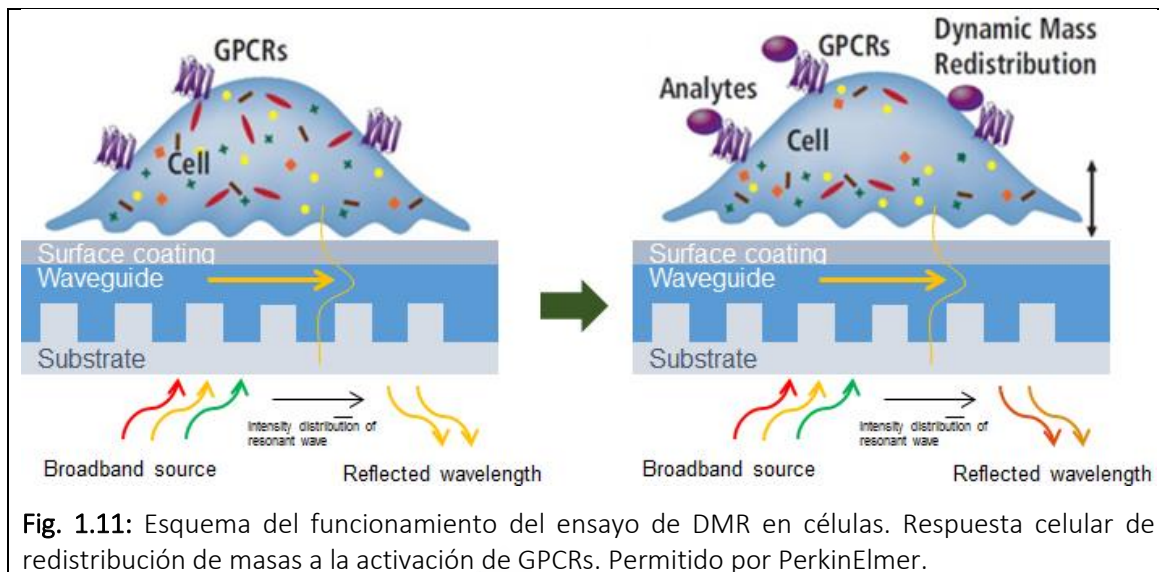
Los ensayos celulares basados en técnicas libres de marcaje (label-free) generalmente emplean un biosensor para registrar las respuestas inducidas por ligandos en células vivas. Un biosensor generalmente utiliza un transductor óptico, eléctrico, calorimétrico, acústico o magnético, para convertir un evento de reconocimiento molecular o un cambio inducido por un ligando en una capa celular en una señal cuantificable. Estos biosensores pueden ser utilizados para el análisis de interacción entre moléculas y caracterizar los complejos moleculares que se forman y se disocian con el tiempo. Al mismo tiempo pueden ser empleados para ver estas interacciones en células vivas, volviéndose particularmente útiles en el cribado de GPCRs (114).

En la presente tesis doctoral se describen estudios de DMR obtenidos mediante tecnología Epic® de Corning® que emplea biosensores de redes de onda de resonancia (*resonant waveguide grating*; RWG) que incluyen un transductor óptico. Un biosensor RWG consiste en una estructura que actúa de soporte (por ejemplo, vidrio) sobre el que sitúa una guía de ondas integrada en una fina película de

rejilla, sobre la que se adhiere una monocapa de células. El biosensor se basa en el acopamiento resonante de la luz en la guía de ondas, que llega a través de la rejilla de difracción. Esto genera una difracción total de la luz en la interfaz del sensor creando un campo electromagnético evanescente que se descompone de forma exponencial desde la superficie del sensor. Las alteraciones de la onda evanescente a causa de los cambios producidos en la monocapa celular a consecuencia de la actividad de un ligando o cerca de la superficie del sensor son detectadas por este para generar la señal registrada por el equipo.

El equipo de label-free *EnSpire® multimode reader* de PerkinElmer con tecnología Epic® utiliza un sistema de fibra óptica para medir los cambios en la longitud de onda de la luz incidente, como resultado de los cambios inducidos por el ligando en las células (**Figura 1.11**). Una serie de cabezales para iluminación y detección se disponen de forma lineal, de modo que los espectros de reflexión de cada pocillo se registran de forma simultánea en cada columna de la placa *EnSpire™-LFC cell assay plate* de 384 pocillos. El equipo hace un registro tanto de la longitud de onda incidente como reflectada, requisito necesario para la detección de la redistribución de masas en la muestra. Finalmente, es importante para la técnica el control de la temperatura para minimizar fluctuaciones aberrantes en las longitudes de onda debidas a pequeñas variaciones de temperatura (115).

Para generar una señal en forma de valor numérico, se asume que la señal detectada es directamente proporcional al cambio de índice de refracción en la cara basal de la capa celular y este, a su vez, es directamente proporcional a los cambios en la concentración local de dianas celulares o moléculas agrupadas dentro del campo de detección. En última instancia, la señal de DMR es el resultado de la suma de la redistribución de masas que tienen lugar a distintas distancias del sensor (cada una con una contribución desigual a la respuesta global de la célula) y del promedio de la respuesta (registrada mediante la redistribución de masas producida) de todas las células que se encuentran sobre el sensor formando una monocapa (116).



Debido a la complejidad de los mecanismos de señalización intracelular como respuesta a la activación de los GPCRs, la selección de la línea celular de estudio adecuada se convierte en un paso crítico a la hora de desarrollar un ensayo de DMR, así como poder identificar la respuesta específica del GPCR de estudio mediante ensayos de selectividad.

Cada evento celular: unión de ligando, activación de receptor, reclutamiento de proteína, internalización y reciclado de receptor, alternancia de segundo mensajero, remodelación citoesquelética, expresión génica, cambios de adhesión celular, entre otros; tiene sus propias características con respecto a su cinética, duración, amplitud y movimiento de masa. Por lo tanto, es aceptable asumir que cada uno de estos eventos celulares pueda contribuir de modo diferente a la señal de DMR general de la célula, dependiendo del lugar donde ocurran.

Como consecuencia del proceso completo de activación, respuesta y redistribución de masa, en ensayos con GPCRs, el análisis de la señal puede dar información de la vía de transducción de señal que se activa en cada caso (114); lo que convierte a este tipo de ensayos en una herramienta de gran importancia para la comprensión del funcionamiento de GPCRs huérfanos y ofrece la oportunidad de comprender como actúan los ligandos sobre sus dianas y sobre la respuesta global de la célula.

Esta técnica ha sido empleada, con una línea celular de cáncer de colon humano (HT-29) con expresión endógena de GPR35, para la identificación de ligandos de

GPR35 (57,104,117-119), así como para la caracterización de lodoxamida y bufrolina como agonistas equipotentes de hGPR35 y rGPR35 (70); además ha sido empleada en la presente tesis para la identificación y estudio de ligandos de GPR35 a partir del cribado de la quimioteca Prestwick Chemical Library®.





A large, stylized grey number '2' is positioned on the right side of the page, extending from the top to the bottom. It has a thick, rounded top and a diagonal stroke that tapers towards the bottom right.

2. Justificación, hipótesis y objetivos



2. Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

El receptor GPR35 es un GPCR de clase A, *rodopsin-like*, con una homología considerable con la del receptor purinérgico GPR23/P2Y9 (32 %), receptor nicotínico HM74 (30 %) y GPR55 (27%) (40). El receptor GPR35 se expresa en multitud de tejidos y de forma más relevante en pulmón, estomago, intestino delgado colon, bazo y cerebro (51). También se ha identificado expresión de este receptor en células inmunes humanas, incluyendo mastocitos, basófilos, eosinófilos, células iNKT y monocitos sensibles a CXCL17 (60,62,76). Se ha demostrado la participación del receptor GPR35, de forma directa o indirecta, con multitud de patologías, principalmente inflamatorias.

Se ha propuesto al receptor GPR35 como un factor de riesgo para trastornos inflamatorios crónicos gastrointestinales (enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa y colangitis esclerosante) (83,85), así como en cáncer gástrico (41). Existen evidencias de la implicación de GPR35 como factor activo en procesos de respuesta del sistema inmune (76,94-96). Los estudios de la actividad del ácido kinurénico GPR35 en células del ganglio de la raíz dorsal también sugieren la participación en procesos nociceptivos y lo sitúan como una diana potencial en el tratamiento del dolor (80,81).

El desconocimiento de un ligando endógeno para este receptor ha impedido la caracterización farmacológica del mismo, limitando su utilización como diana terapéutica. Se han propuesto varios compuestos de diferente naturaleza como ligandos endógenos del receptor GPR35:

1. El ácido lisofosfatídico, se postuló como posible agonista endógeno debido a su actividad sobre el receptor GPR35 (42,120) y las similitudes de secuencia entre GPR35 y otros receptores LPA como GPR55. Sin embargo, la existencia de una familia propia de receptores LPA y las diferencias en las rutas de señalización activadas por este ligando en comparación con otros agonistas de GPR35 hacen difícil que se pueda ubicar a esta molécula como ligando endógeno del receptor GPR35(42,46).

2. La L-kinunerina, metabolito del ácido kinurénico también actúa como agonista del receptor GPR35 (51), no obstante las concentraciones fisiológicas de L-kinurenina no son suficientes como para producir la activación del receptor (43,53).
3. La quimioquina CXCL17 se comportó como agonista endógeno del receptor GPR35 (57). La capacidad de esta molécula para activar el receptor GPR35 a concentraciones moderadamente bajas y la relación estructural entre GPR35 y algunos receptores de quimioquinas postulan a esta molécula como un buen candidato a ligando endógeno del receptor (60), sin embargo estos estudios carecen de confirmación.
4. Otras moléculas propuestas como agonistas endógenos del receptor GPR35 son el GMPc, aunque su relevancia funcional aún está por demostrar; DHICA (intermediario de la síntesis de melanina) y los intermediarios en la síntesis de la hormona tiroidea T3 (3,5,3' triiodotironina) y la T3 reversa (3,3',5 triiodotironina) promueven la respuesta de células de una línea de adenocarcinoma colorrectal humana HT-29, pero los niveles *in vivo* de estos dos compuestos no alcanzan las concentraciones necesarias para activar a GPR35 (57), al menos en condiciones fisiológicas.

Si bien los conocimientos actuales hacen que el receptor GPR35 sea un prometedor candidato a diana terapéutica, dada su participación en una amplia gama de procesos fisiológicos y fisiopatológicos; ningún estudio ha identificado un papel definitivo y concreto para GPR35. Esto se debe en parte al reducido número de herramientas farmacológicas equipotentes para diferentes especies que permitan en un futuro el estudio de enfermedades asociadas a este receptor en modelos animales. Mediante estudios de mutagénesis, se han identificado las diferencias en los residuos cargados positivamente dentro del bolsillo de unión del ligando genérico de GPR35 de humano y de rata. Estos estudios han permitido el descubrimiento de varios ligandos sintéticos agonistas equipotentes para ortólogos del receptor GPR35 de humano, rata y/o ratón (70); aunque con una utilidad limitada, ya que estos compuestos no se unen a regiones homólogas en cada una de las especies, si no que interaccionan de forma diferente en el sitio de unión de cada ortólogo. Por ello, se hace necesario identificar nuevas herramientas

farmacológicas que permitan la traslación de resultados entre modelos animales y humanos, necesaria para el desarrollo de fármacos.

Los estudios de las vías de señalización de GPR35 apuntan a un acoplamiento preferente a proteínas $G\alpha_i$ (51,60,75,76) y $G\alpha_{13}$ (43,65,77) y una señalización no dependiente de proteínas G mediada por la actividad de β -arrestina (65,66). La expresión diferencial de los efectores implicados o las diferentes conformaciones que puede tomar el complejo ligando-receptor-efector podrían inducir efectos de selectividad funcional, donde los ligandos pueden mostrar diferencias de eficacia y potencia según la vía efectora activada.

Por ello, en la presente tesis se aborda la identificación y la caracterización de ligandos del receptor GPR35 mediante dos métodos complementarios:

1. Un método basado en BRET permite detectar la movilización de la β -arrestina como resultado de la activación del receptor.
2. Un método fenotípico basado en DMR que permite detectar la respuesta celular global derivada de las interacciones originadas entre el receptor y cada ligando con una elevada sensibilidad a ligeros cambios en el efecto de cualquier vía.

2.2 Hipótesis

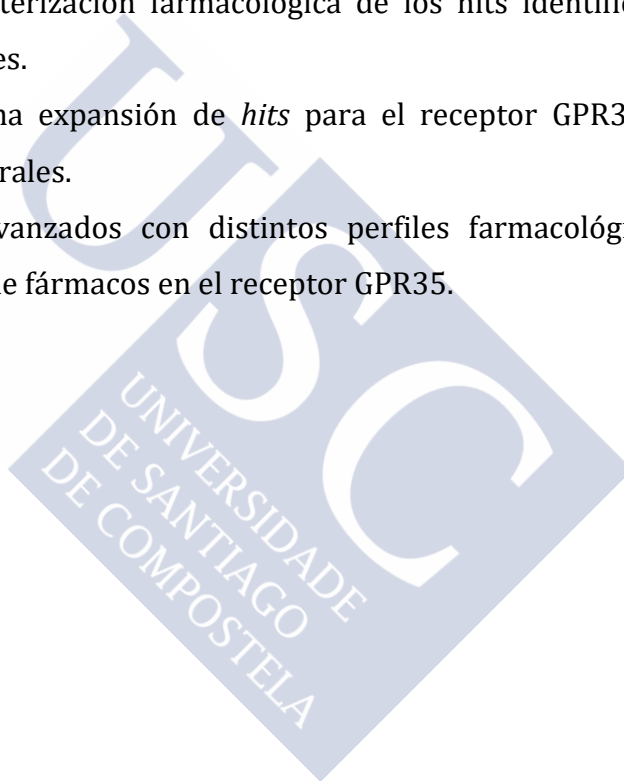
La identificación y caracterización de nuevos ligandos para los ortólogos de humano y rata del receptor huérfano GPR35, con distintos perfiles farmacológicos que permitan valorar la selectividad funcional, podrían generar nuevas herramientas farmacológicas útiles para el conocimiento del receptor y su farmacología.

2.3 Objetivos

Identificar compuestos activos, con distintos perfiles de eficacia, en los ortólogos de humano y de rata del receptor GPR35, a partir de un cribado de alto

rendimiento comparativo de translocación de β -arrestina frente a una respuesta fenotípica celular global.

1. Llevar a cabo un cribado de alto rendimiento de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] mediante un ensayo basado en BRET que permita detectar la translocación de β -arrestina.
2. Llevar a cabo la puesta a punto de un método fenotípico basado en DMR y realizar un cribado de alto rendimiento de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] que permita detectar la respuesta global resultante de la activación de las diferentes vías de señalización.
3. Realizar la caracterización farmacológica de los hits identificados en los ensayos anteriores.
4. Llevar a cabo una expansión de *hits* para el receptor GPR35 en base a criterios estructurales.
5. Proponer *hits* avanzados con distintos perfiles farmacológicos para el descubrimiento de fármacos en el receptor GPR35.



3. Material y métodos



3. Material y métodos

3.1 Líneas celulares y medios de cultivo.

Se utilizaron las siguientes líneas celulares y medios de cultivo suplementados para su correcto crecimiento:

Línea celular de carcinoma colorrectal humano HT-29 (ATCC® HTB-008™). Se cultivó en medio *McCoy's 5A* (ATCC® 30-2007) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) no dializado (Sigma F9665), Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) y 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma P0781).

Línea celular de epitelio de intestino delgado de rata IEC-6 (ATCC® CRL-1592™). Se cultivó en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (ATCC® 30-2002) suplementado con 10 % de FBS no dializado (Sigma F9665), 0,1 u/ml insulina (Sigma I0516) y 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma P0781).

Línea celular de epitelio de hígado embrionario humano HEK293T/17 (ATCC® CRL-11268™). Cultivada en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose* (DMEM 4.5 g/l glucosa) (Sigma D5671) suplementado con 10 % de FBS no dializado (Sigma F9665), 1% *GlutaMAX™* (Thermo Fisher 35050061) y 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma P0781).

Todas las líneas celulares empleadas en la presente tesis fueron cultivadas y mantenidas a condiciones constantes de 37⁰C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa en incubador.

3.2 Estudio de translocación de β -arrestina mediante transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (*BRET*)

3.2.1 Generación de construcciones plasmídicas del receptor GPR35

Se introdujo un epítipo *FLAG* (con secuencia aminoacídica DYKDDDDK) en el N-terminal del ácido desoxiribonucleico complementario (*cdNA*) de GPR35, tanto de humano como de rata, mediante PCR empleando los siguientes *primers* humanos: sentido: 5'-GCGAAGCTTGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGAATGGCACC TACAACACC-3' y antisentido: 5'-GGCCGCGGCCGCCTCTAGAATTAGGCGAGGG-3'. Y

los *primers* de rata: sentido: 5'-CGCGGATCCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGAACAATACAAATTGTAGCATC-3' y antisentido: 5'-GGCCGCGGCCGCGCGGTGAGGCTCAGGCTCTG-3'. El *cDNA* resultante se introdujo en el sentido correspondiente dentro de los sitios *HindIII/BamHI* y *NotI* de un plásmido *eYFP-pcDNA3* produciendo finalmente los constructos con el epítipo en N-terminal y C-terminal marcado con proteína fluorescente: *Flag-humanGPR35-eYFP-pcDNA3* y *Flag-ratGPR35-eYFP-pcDNA3*. La integridad de esta fusión fue confirmada mediante secuenciación de ADN.

3.2.2 Transfección de plásmidos *Flag-humanGPR35-eYFP-pcDNA3* y *Flag-ratGPR35-eYFP-pcDNA3* en HEK293T/17 (ATCC® CRL-11268™) para ensayos de *BRET*.

Para llevar a cabo ensayos de cribado de compuestos en los receptores hGPR35 y rGPR35 mediante *BRET* se realizaron transfecciones transitorias empleando los constructos definidos en el apartado anterior. Se sembraron tres millones de células HEK293T/17 en placas de cultivo estándar P100 en 10 ml de medio de cultivo DMEM alto en glucosa suplementado con FBS no dializado.

La transfección se realizó con polietilenimina (PEI), mezclando una cantidad de 5 µg de ADN total/placa (con una proporción *β-arrestin II-Rluc6-pcDNA3/ Flag-GPR35-eYFP-pcDNA3* = 1/4) en 500 µl de una mezcla NaCl esteril 150 mM y PEI en proporción 1:6 µg ADN/µg PEI a las 24 horas de la siembra, alcanzando una confluencia celular de 60 – 70 %. La mezcla de transfección se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras el período de incubación cada mezcla de transfección (500 µl/placa) se añadió gota a gota en cada placa distribuyendo la mezcla por todo el medio de cultivo. Como controles se transfectaron células con el plásmido *pcDNA3* sin inserto (transfección *mock*) y células con el plásmido *β-arrestin II-Rluc6-pcDNA3* (transfección *Rluc*); manteniendo la misma proporción que la transfección con el gen del receptor.

Tras 24 horas las placas se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron las células en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose* (DMEM 4.5 g/D-glucosa) (Gibco 31053-028) suplementado con 10 % de *FBS* dializado (Sigma F0392), 1% *GlutaMAX™* (Thermo Fisher 35050061) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma P0781), un medio transparente idóneo para la siembra en placas de ensayo que

bloquea la transfección. Se sembraron 50000 células/pocillo en placas de 96 pocillos (Greiner 655944) pretratadas con poli-D-lisina, en un volumen final de 100 μ l/pocillo. 48 horas tras la transfección se realizaron los ensayos de *BRET*.

3.2.3 Identificación de ligandos de GPR35 en la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] mediante cribado de alto rendimiento basado en *BRET*.

En este cribado se analizaron los 1120 compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] a una concentración 10 μ M, tanto para el cribado de agonistas como antagonistas. Para el cribado como antagonistas, cada compuesto se coincubó con una concentración correspondiente al valor de EC₈₀ del agonista de referencia para GPR35, zaprinast (Sigma Z0878) (10 μ M o 1 μ M en los ensayos de hGPR35 o rGPR35 respectivamente). Todas las diluciones se realizaron en *Hank's Balanced Salt solution* (HBSS) que fue empleado como *buffer* de ensayo. Los *hits* obtenidos se confirmaron mediante un ensayo con las mismas condiciones a la misma concentración 10 μ M con duplicados para cada compuesto. En cada placa se incluyeron ocho controles con zaprinast a 10 μ M que determinaron la señal específica del agonista.

Para estos ensayos se utilizaron las células transfectadas y sembradas en placas de 96 pocillos a las que 24 horas tras la siembra se le realizaron tres lavados con 100 μ l de HBSS atemperado a 37 °C con un dispensador de reactivos automático *Multidrop™ Combi* (Thermo Scientific) y un aspirador *BioTek® 405 TS washer* (Biotek). En los ensayos de identificación de agonistas se añadieron 80 μ l de HBSS y se incubaron las placas durante 30 minutos a 37 °C. En los ensayos de identificación de antagonistas, se añadieron 70 μ l de HBSS, las condiciones de incubación fueron las mismas.

Transcurrido ese tiempo se cuantificó la expresión del aceptor YFP en las células mediante una lectura de intensidad de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}$: 480 nm; $\lambda_{\text{emisión}}$: 530 nm) para confirmar la correcta expresión del receptor por las células transfectadas.

Posteriormente se añadieron 10 μ l de una dilución de compuesto y se realizó una nueva incubación de 15 minutos a 37 °C. Para el estudio de antagonistas, en este momento del proceso se añadieron 10 μ l de una dilución de zaprinast y se realizó

una nueva incubación de 15 minutos a 37 °C. Se añadieron 10 µl de una dilución 5 µM de coelenteracina h (Sigma-Aldrich C6780) a todos los pocillos, alcanzando un volumen final en cada pocillo de 100 µl; tras una nueva incubación de 15 minutos a 37 °C en oscuridad se llevó a cabo la medida de BRET (luminiscencia dual: Rluc/coelenteracina h: 470 nm; YFP: 530 nm).

Los *hits* identificados, tanto agonistas como antagonistas, se caracterizaron mediante el ensayo de curvas concentración-respuesta con ocho concentraciones por duplicado de cada compuesto. Nuevamente, cada concentración de antagonista ensayada se coincubó con el agonista estándar para GPR35 zaprinast a 10 µM o 1 µM para ensayos con hGPR35 o rGPR35 respectivamente.

En el caso de los compuestos identificados como antagonistas del receptor humano, se constituyeron las curvas concentración-respuesta con ocho diluciones coincubándolas con ácido pamoico a 3 µM (concentración correspondiente a su valor de EC₈₀ en ensayos de BRET), compuesto identificado como agonista de hGPR35. Se automatizó el sistema de lavados con *buffer* y dispensado de compuestos empleando un pipeteador automático *Janus™ work station* (PerkinElmer).

3.2.4 Estudio mecanístico del antagonismo.

Los ensayos para el estudio del desplazamiento de la actividad de los agonistas de GPR35 se realizaron siguiendo el mismo protocolo que los ensayos para el estudio de la actividad de dichos compuestos, a excepción de la adición de los compuestos. En este caso, los compuestos a estudio se añadieron al menos a dos concentraciones fijas y fueron los compuestos de referencia, zaprinast o ácido pamoico los que se añadieron como una dilución seriada, con gradientes de concentraciones de 30 nM a 100 µM.

3.3 Ensayo de redistribución dinámica de masas (DMR).

3.3.1 Puesta a punto del estudio de compuestos activos frente a hGPR35 mediante ensayo de DMR.

24 horas antes del ensayo se sembraron las células HT-29 en una placa *EnSpire™-LFC cell assay plate* de 384 pocillos (PerkinElmer 6057408) a las concentraciones

de 10000, 15000, 20000 y 30000 células por pocillo reemplazando el medio de cultivo por *McCoy's 5A* (ATCC® 30-2007) suplementado con 10 % de FBS dializado (Sigma F0392), Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma P0781).

Con el propósito de optimizar las lecturas de DMR reduciendo el ruido de fondo de la señal basal se compararon dos tipos de *buffer* de ensayo: *McCoy's 5A* (ATCC® 30-2007) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) y 0,01% dimetil sulfóxido (*DMSO*) o HBSS (Sigma-Aldrich H6648) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) y 0,01% de *DMSO*; y sus *buffers* de lavado correspondientes: *McCoy's 5A* (ATCC® 30-2007) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) o HBSS (Sigma-Aldrich H6648) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) respectivamente.

Para eliminar el medio de cultivo y reemplazarlo por *buffer* de ensayo se utilizaron un dispensador de reactivos automático *Multidrop™ Combi* (Thermo Scientific) y un aspirador *405 TS washer* (BioTek), realizando tres lavados de la placa *EnSpire™-LFC cell assay plate* con 25 µl de *buffer* de lavado atemperado a 37 °C y finalmente se dispensaron 40 µl de *buffer* de ensayo atemperado a 37 °C. La placa se incubó dentro del lector *EnSpire® multimode reader* (PerkinElmer) a temperatura ambiente durante 45-90 minutos, permitiendo la estabilización de los sensores de la placa *EnSpire™-LFC cell assay plate* y el detector *label-Free DMR* del equipo. Pasado este tiempo se realizaron 15 lecturas de la línea basal (1 por minuto), que determinaron la señal de las células HT-29 en reposo. Una vez concluida la lectura basal, para cada concentración de células sembrada, se dispensaron 10 µl/pocillo de diluciones seriadas de zaprinast en rangos de concentración de 10 µM a 3nM y 32 µM a 125 nM; así como de ácido pamóico en rangos de concentración de 10 µM a 3 nM. Todas las diluciones se realizaron en *buffer* de ensayo, igualando la concentración de *DMSO* presente en cada una de ellas. Por último, se realizó una lectura cinética final de la señal de DMR de 60 repeticiones (1 por minuto).

3.3.2 Puesta a punto del estudio de compuestos activos frente a rGPR35 mediante ensayo de DMR.

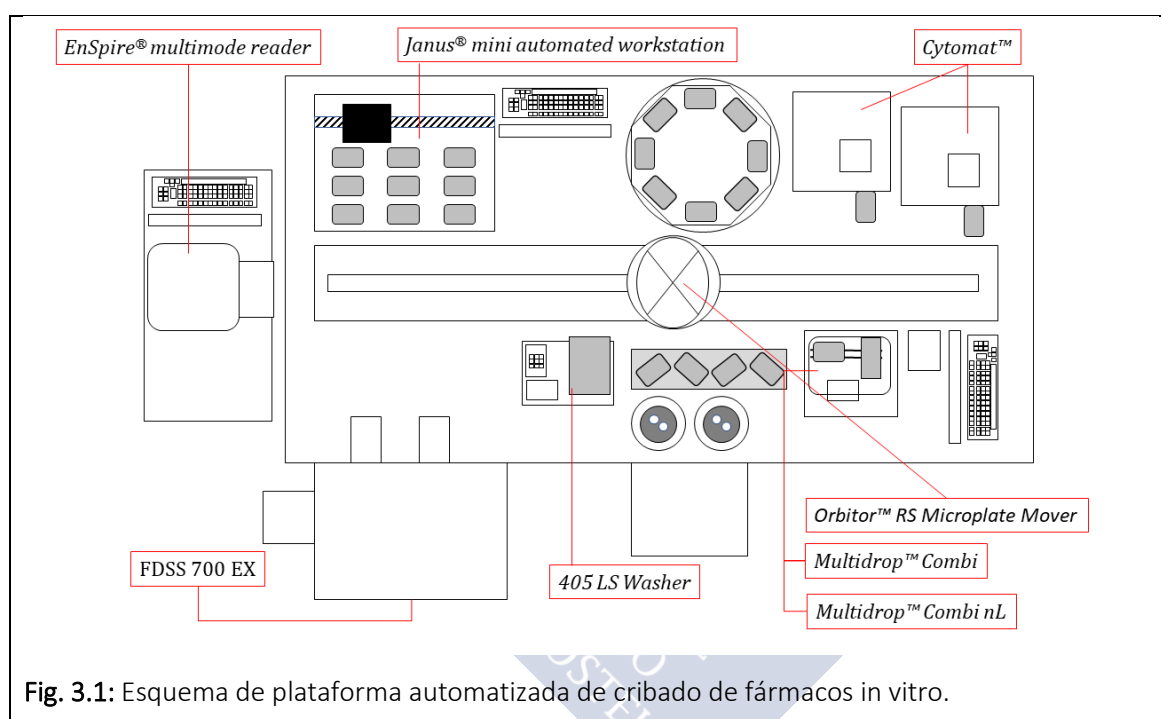
Para esta puesta a punto, 24 horas antes del ensayo se sembraron las células IEC-6 en una placa *EnSpire™-LFC cell assay plate* de 384 pocillos (PerkinElmer 6057408) a las concentraciones de 10000, 15000, 20000 y 30000 células por pocillo reemplazando el medio de cultivo por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)* (ATCC® 30-2002) suplementado con 10 % de FBS dializado (Sigma F0392), 0,1 u/ml insulina (Sigma I0516) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma P0781).

Con el propósito de optimizar las lecturas de DMR reduciendo el ruido de fondo de la señal basal se compararon dos tipos de buffer de ensayo: DMEM (ATCC® 30-2002) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) y 0,01% DMSO o HBSS (Sigma-Aldrich H6648) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) y 0,01% de DMSO; y sus buffers de lavado correspondientes: DMEM (ATCC® 30-2002) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) o HBSS (Sigma-Aldrich H6648) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) respectivamente.

Para eliminar el medio de cultivo y reemplazarlo por buffer de ensayo se utilizó un robot pipeteador *Janus® automated workstation* (PerkinElmer), realizando tres lavados de la placa *EnSpire™-LFC cell assay plate* con 25 µl de *buffer* de lavado atemperado a 37 °C y finalmente se dispensaron 40 µl de *buffer* de ensayo atemperado a 37 °C. La placa se incubó dentro del lector *EnSpire® multimode reader* (PerkinElmer) a temperatura ambiente durante 45-90 minutos, permitiendo la estabilización de los sensores de la placa *EnSpire™-LFC cell assay plate* y el detector *Label-Free DMR* del equipo. Pasado este tiempo se realizaron 15 lecturas de la línea basal (1 por minuto), que determinaron la señal de las células IEC-6 en reposo. Una vez concluida la lectura basal, para cada concentración de células sembrada, se dispensaron 10 µl/pocillo de diluciones seriadas de zaprinat, así como de dicumarol, en rangos de concentración de 32 µM a 125nM. Todas las diluciones se realizaron en *buffer* de ensayo, igualando la concentración de *DMSO* presente en cada una de ellas. Por último, se realizó una lectura cinética final de la señal de DMR de 60 repeticiones (1 por minuto).

3.3.3 Automatización del ensayo de DMR para cribados de alto rendimiento.

Se empleó una plataforma automatizada de cribado de fármacos *in vitro* que consiste en un sistema que acopla un robot *Orbitor™ RS Microplate Mover* (Thermo Scientific) y en el que se integran dos incubadores de placas *Cytomat™* (Thermo Scientific), dos dispensadores de reactivos, un *Multidrop™ Combi* y un *Multidrop™ Combi nL*; un aspirador lavador de placas *405 LS Washer* (Biotek), un robot pipeteador *Janus® mini automated workstation* (PerkinElmer), un lector FDSS 700 EX (Hamamatsu) y un lector *EnSpire® multimode reader* (PerkinElmer).



3.3.4 Identificación de ligandos de hGPR35 en la quimioteca Prestwick Chemical Library® en un cribado de alto rendimiento mediante DMR.

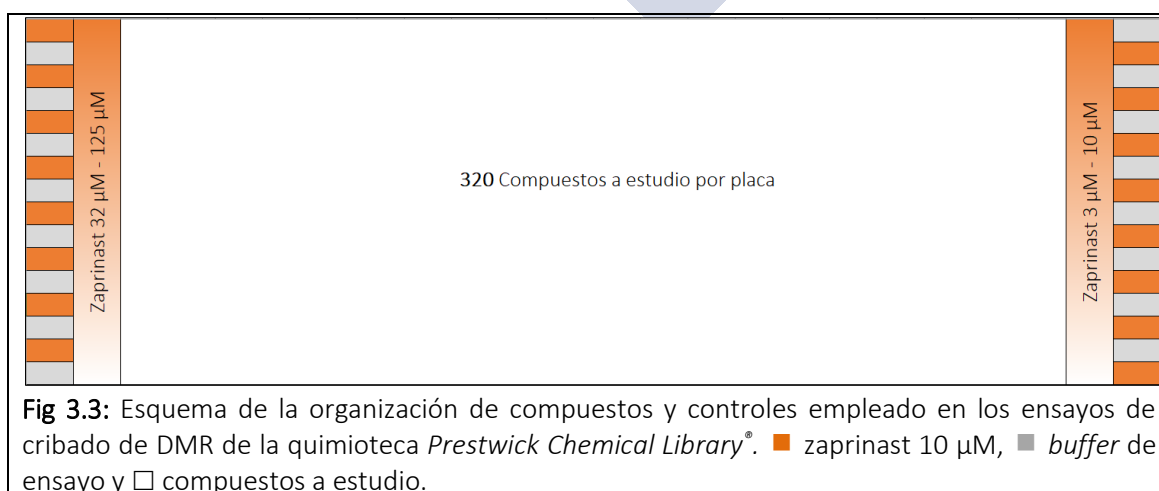
En este cribado se analizaron los 1120 compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library®* a una concentración 10 μM a un único pocillo por compuesto y debido a las características del método empleado, el cribado de agonistas y antagonistas se llevó a cabo en el mismo ensayo, realizando una primera lectura de la respuesta de las células HT-29 en presencia de cada compuesto y una segunda lectura de la respuesta de cada compuesto coincubado durante 15 minutos con el agonista estándar para GPR35 zaprinast (Sigma Z0878) a 1 μM (concentración

correspondiente su valor de EC₈₀ obtenido mediante este método) (**Figura 3.2**). Todas las diluciones se realizaron en *McCoy's 5A* (ATCC® 30-2007) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) y 0.01% de DMSO, que fue empleado como *buffer* de ensayo. Los *hits* obtenidos se confirmaron mediante un ensayo independiente manteniendo las mismas condiciones y la misma concentración 10 µM con duplicados para cada compuesto.



24 horas antes del ensayo se sembraron las células HT-29 en placas *EnSpire™-LFC cell assay plate* de 384 pocillos (PerkinElmer 6057408) a una concentración de 15000 células por pocillo reemplazando el medio de cultivo por *McCoy's 5A* (ATCC® 30-2007) suplementado con 10 % de FBS dializado (Sigma F0392), Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma P0781).

En cada placa empleada se incluyó como control 2 curvas concentración-respuesta de zaprinast con diluciones seriadas en rangos de concentración de 10 µM a 3 nM y 32 µM a 125 nM. Además, en todas las placas empleadas se incluyeron, como control, 16 pocillos con zaprinast 10 µM y 16 pocillos con buffer de ensayo, que permitieron determinar los criterios de calidad de cada cribado (**figura 3.3**).



El medio de cultivo se reemplazó por buffer de ensayo, realizando tres lavados de las placas con 25 μl de buffer de lavado atemperado a 37 $^{\circ}\text{C}$ y finalmente se dispensaron 40 μl de buffer de ensayo atemperado a 37 $^{\circ}\text{C}$; para ello se utilizaron un dispensador de reactivos automático *Multidrop™ Combi* (Thermo Scientific) y un aspirador *405 TS washer* (BioTek). La placa se incubó dentro del lector *EnSpire® multimode reader* (PerkinElmer) a temperatura ambiente durante 60 minutos, lo que permitió la estabilización de los sensores de la placa y el detector *Label-Free DMR* del equipo. Pasado este tiempo se realizaron 15 lecturas de la línea basal (1 por minuto), que determinaron la señal de las células HT-29 en reposo. Una vez concluida la lectura basal se dispensaron 10 μl /pocillo de cada compuesto a una concentración final 10 μM así como las diluciones de zaprinast empleadas como control. Se realizó una primera lectura de la actividad celular de 30 repeticiones (1 por minuto). Seguidamente, se dispuso en todos los pocillos con compuestos a ensayar 10 μl de una dilución 1 μM de zaprinast y se realizó una segunda y última lectura de 30 repeticiones (1 por minuto) Todas las diluciones realizadas en *buffer* de ensayo e igualando la concentración de DMSO presente en cada una de ellas.

Todo el proceso se realizó de forma automatizada empleando la plataforma de cribado descrita en el apartado 3.3.3.

Los *hits* identificados, tanto agonistas como antagonistas, se caracterizaron mediante el ensayo de curvas concentración-respuesta con ocho concentraciones por triplicado de cada compuesto. Nuevamente cada concentración de antagonista ensayada se coincubó con el agonista estándar para GPR35 zaprinast a 1 μM .

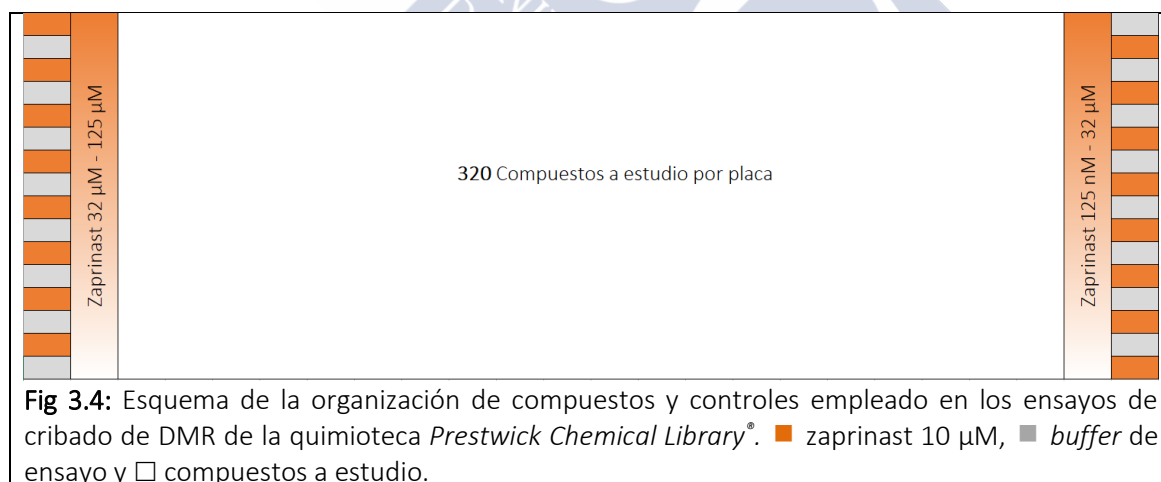
3.3.5 Identificación de ligandos de rGPR35 en la quimioteca *Prestwick Chemical Library®* en un cribado de alto rendimiento mediante DMR.

En este cribado se analizaron los 1120 compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library®* a una concentración 10 μM a un único pocillo por compuesto y debido a las características del método empleado, el cribado de agonistas y antagonistas se llevó a cabo en el mismo ensayo, realizando una primera lectura de la respuesta de las células IEC-6 en presencia de cada compuesto y una segunda lectura de la respuesta de cada compuesto coincubado durante 15 minutos con el agonista estándar para GPR35 zaprinast (Sigma Z0878) a 5 μM (concentración

correspondiente su valor de EC₈₀ obtenido mediante este método). Todas las diluciones se realizaron en HBSS (Sigma-Aldrich H6648) con Hepes 25 mM a pH=7.4 (Thermo Fisher 15630-056) y 0.01% de DMSO, que fue empleado como buffer de ensayo. Los *hits* obtenidos se confirmaron mediante un ensayo con las mismas condiciones a la misma concentración 10 μM con duplicados para cada compuesto.

24 horas antes del ensayo se sembraron las células IEC-6 en placas *EnSpire™-LFC cell assay plate* de 384 pocillos (PerkinElmer 6057408) a una concentración de 15000 células por pocillo reemplazando el medio de cultivo por DMEM (ATCC® 30-2002) suplementado con 10 % de FBS dializado (Sigma F0392), 0.1 u/ml insulina (Sigma I0516) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Sigma P0781).

En cada placa empleada se incluyó como control 2 curvas concentración-respuesta de zaprinast con diluciones seriadas en rangos de concentración de 32 μM a 125 nM. Además, en todas las placas empleadas se incluyeron, como control, 16 pocillos con zaprinast 10 μM y 16 pocillos con buffer de ensayo, que permitieron determinar los criterios de calidad de cada cribado (**figura 3.4**).



El medio de cultivo se reemplazó por *buffer* de ensayo, realizando tres lavados de las placas con 25 μl de *buffer* de lavado atemperado a 37 °C y finalmente se dispensaron 40 μl de *buffer* de ensayo atemperado a 37 °C; para ello se utilizó un robot pipeteador *Janus® automated workstation* (PerkinElmer). La placa se incubó dentro del lector *EnSpire® multimode reader* (PerkinElmer) a temperatura ambiente durante 45-90 minutos, lo que permitió la estabilización de los sensores

de la placa y el detector *Label-Free DMR* del equipo. Pasado este tiempo se realizaron 15 lecturas de la línea basal (1 por minuto), que determinaron la señal de las células IEC-6 en reposo. Una vez concluida la lectura basal se dispensaron 10 μl /pocillo de cada compuesto a una concentración final 10 μM así como las diluciones de zaprinast empleadas como control. Se realizó una primera lectura de la actividad celular de 30 repeticiones (1 por minuto). A continuación, se dispuso en todos los pocillos con compuestos a ensayar 10 μl de una dilución 5 μM de zaprinast y se realizó una segunda y última lectura de 30 repeticiones (1 por minuto) Todas las diluciones realizadas en *buffer* de ensayo e igualando la concentración de DMSO presente en cada una de ellas.

Todo el proceso se realizó de forma automatizada empleando la plataforma de cribado descrita en el apartado 3.3.3.

Los *hits* identificados, tanto agonistas como antagonistas, se caracterizaron mediante el ensayo de curvas concentración-respuesta con ocho concentraciones por triplicado de cada compuesto. Cada concentración de antagonista ensayada se coincubó con el agonista estándar para GPR35 zaprinast a 5 μM .

3.3.6 Estudio mecanístico del antagonista

Los ensayos para el estudio del desplazamiento de la actividad de los agonistas de GPR35 se realizaron siguiendo el mismo protocolo que los ensayos para el estudio de la actividad de dichos compuestos, a excepción de la adición de los compuestos. En este caso, los compuestos a estudio se añadieron a una concentración fija y fueron los compuestos de referencia, zaprinast o ácido pamoico los que se añadieron como una dilución seriada, variando los gradientes de concentraciones a requerimiento de cada condición de compuesto de referencia o variedad interespecífica del receptor.

3.4 Análisis y procesamiento de datos

Los datos obtenidos del cribado de compuestos mediante BRET se analizaron usando Microsoft® Excel 2011 (Microsoft) y fueron representados mediante *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software Inc.).

Los valores de mili BRET (mBRET) obtenidos se calcularon a partir de la ratio net BRET obtenida de la señal de luminiscencia dual: Rluc/coelenteracina h: 470 nm; YFP: 530 nm de los pocillos con compuesto, corregida con la señal obtenida en los pocillos control de R-luciferasa. Una vez obtenidos los valores de net BRET, se multiplicaron por 1000 para obtener los valores de mBRET.

Las actividades de los compuestos fueron calculadas con la ecuación:

$$Actividad (\%) = \frac{mBRET_{compuesto} - mBRET_{basal}}{mBRET_{max} - mBRET_{basal}} \times 100$$

Donde mBRET_{compuesto} es el valor de mBRET obtenido en los pocillos tratados con los compuestos estudiados, mBRET_{basal} es el promedio de los valores de mBRET obtenidos de los pocillos tratados con buffer de ensayo y mBRET_{max} es el promedio de los valores de mBRET obtenidos de los pocillos con células tratadas con zaprinast 10 µM.

Los datos obtenidos del cribado de compuestos mediante DMR se analizó usando Microsoft® Exel 2011 (Microsoft) y fueron representados mediante *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software Inc.). Las actividades de los compuestos fueron calculadas con la ecuación:

$$Actividad (\%) = \frac{Respuesta_{compuesto} - Respuesta_{basal}}{Respuesta_{max} - Respuesta_{basal}} \times 100$$

Donde Respuesta_{compuesto} es el valor de la respuesta en pm obtenido en los pocillos tratados con los compuestos estudiados, Respuesta_{basal} es el promedio de los valores de respuesta en pm obtenidos de los pocillos tratados con buffer de ensayo y Respuesta_{max} es el promedio de los valores de respuesta en pm obtenidos de los pocillos con células tratadas con zaprinast 1 µM. en caso de las HT-29 (hGPR35) y 5 µM en el caso de las IEC-6 (rGPR35). La respuesta se obtiene de la siguiente ecuación:

$$R(t) = S(t) - S^{linea base}(t_b)$$

Donde S(t) la señal cruda en pm a un tiempo t de un pocillo y S^{linea base}(t_b) es el promedio de la señal de las lecturas de línea base realizadas en dicho pocillo.

Se consideraron como posibles *hits* los compuestos cuya actividad superó el valor de la media más 3 veces la desviación estándar de la actividad del conjunto de los compuestos ensayados. Los *hits* fueron confirmados si su actividad se mantuvo sobre este umbral en un segundo ensayo independiente.

La calidad del ensayo fue estimada mediante el cálculo del valor de Z' para el conjunto de todos los datos de cada cribado usando la ecuación (121):

$$Z' = 1 - \frac{(3 \times \sigma_{max}) + (3 \times \sigma_{basal})}{\mu_{max} - \mu_{basal}}$$

Donde σ_{max} y σ_{basal} son los valores de desviación estándar de los pocillos que contienen zaprinast 10 μM y buffer de ensayo respectivamente. Un valor de Z' mayor que 0.5 fue seleccionado como corte en el cribado.

La ratio señal específica / señal de fondo se calculó usando la ecuación:

$$\text{Señal específica / señal de fondo} = \frac{\text{promedio de la señal máxima}}{\text{promedio de la señal mínima}}$$

Donde para los ensayos de BRET el promedio de la señal máxima corresponde con los pocillos con la concentración máxima de zaprinast y el promedio de la señal mínima a los pocillos que corresponden con la transfección mock con buffer de ensayo; para los ensayos de DMR el promedio de la señal máxima corresponde con los pocillos que contienen zaprinast 10 μM y el promedio de la señal mínima con los pocillos con buffer.

La potencia de inhibición de cada compuesto estudiado se determinó mediante el cálculo de la IC_{50} que determina la concentración requerida para inhibir la actividad del agonista en un 50%. Este análisis se realizó usando *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software Inc.), ajustando cada curva concentración-respuesta a un modelo de regresión no lineal. El cálculo de IC_{50} se hizo mediante la ecuación de la curva de dicho modelo:

$$Y = \text{Valor mínimo} + \frac{(\text{Valor máximo} - \text{Valor mínimo})}{1 + 10^{\log(IC_{50} - X) \times \text{pendiente}}}$$

Donde el valor mínimo corresponde con el valor de actividad más bajo que alcanza la curva y el valor máximo corresponde con el valor de actividad más alto que alcanza la curva.

La potencia antagonista de cada compuesto estudiado se determinó mediante la constante pA_2 calculada mediante la gráfica de Schild, simplificada en la siguiente ecuación (122):

$$pA_2 = \log \left(\frac{\left(\frac{EC'_{50}}{EC_{50}} \right) - 1}{[antagonista]} \right)$$

Donde EC_{50} corresponde al 50% de la concentración eficaz máxima del agonista y EC'_{50} al 50% de la concentración eficaz máxima del agonista en presencia de cada concentración de antagonista.





4. Resultados



4. Resultados

4.1 Identificación de ligandos activos sobre GPR35 mediante ensayo de translocación de β -arrestina basado en transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET)

Se estudiaron los 1120 compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] en dos cribados; uno de ellos para la identificación de compuestos agonistas de hGPR35 y otro para la identificación de antagonistas de dicho receptor, en el cual, se coincubó cada compuesto de estudio con el compuesto de referencia zaprinast.

El mismo proceso se llevó a cabo para la forma del receptor humano y la de rata, completando un total de 4 cribados.

4.1.1 Estudios de BRET en hGPR35

4.1.1.1 *El pamoato de pirivinio y el pamoato de oxantel fueron identificados como los agonistas más activos de hGPR35.*

EL cribado de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] permitió identificar 11 compuestos como *hits* (entre los que se encuentra zaprinast) que superaron el punto de corte establecido. En este cribado se obtuvo un valor de $Z' = 0.75 \pm 0.11$ y la relación señal específica / señal de fondo fue de 15.64 (**figura 4.1**).

En un siguiente ensayo de confirmación se descartaron seis compuestos, reconocidos como falsos positivos, debido a la coloración de estos compuestos o un efecto de autofluorescencia que interfirió en la lectura de BRET. Los compuestos descartados fueron: rifampicina, riboflavina, clorhidrato de fenazopiridina, merbromina, tetrahidroxi-1,4- quinona monihidrato y nifurtimox.

Se confirmó una actividad inferior al 50% en relación con la actividad máxima de zaprinast de 2 compuestos (cromolina disódica y ácido niflúmico), ambos con valores cercanos al punto de corte fijado en el cribado. Dos compuestos asociados a pamoato (pamoato de pirivinio y oxantel pamoato), presentaron una actividad entre 50% y 60% (**tabla 4.1**).

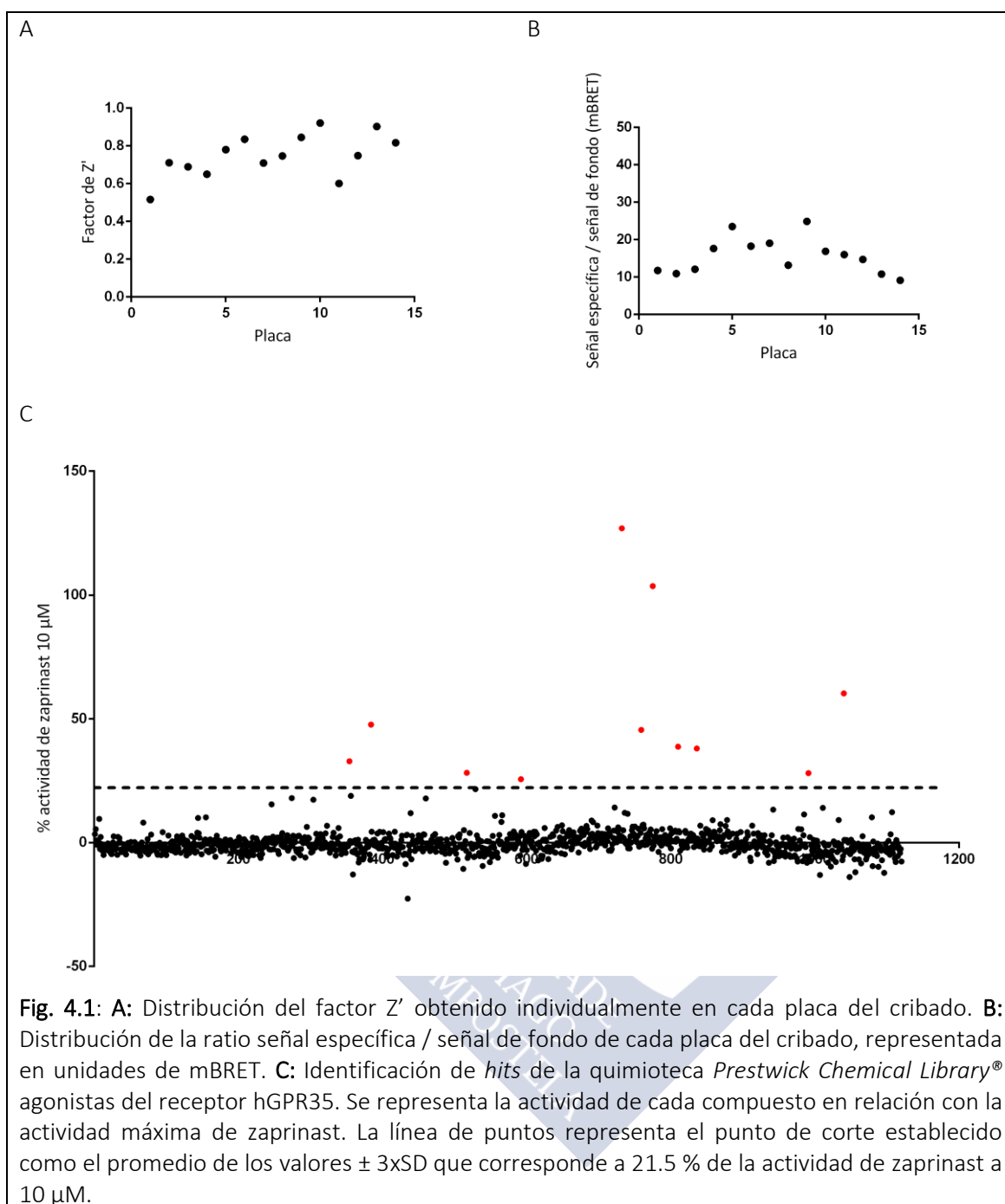
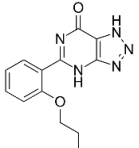
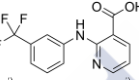
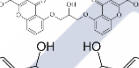
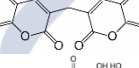
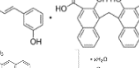
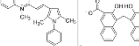


Tabla 4.1: Porcentajes de actividad de compuestos identificados como *hits* agonistas de hGPR35 mediante BRET. Valores correspondientes al cálculo de % de actividad con relación a la actividad máxima de zaprinast.

Identificación y confirmación de agonistas de hGPR35			
Compuesto	Estructura	HTS % Actividad (10 μ M)	Confirmación % Actividad (10 μ M)
Zaprinast		32.86	38.30
Ácido niflúmico		18.00	20.00
Cromolina		38.77	39.2
Dicumarol		45.51	56.70
Oxantel pamoato		47.69	51.00
Pamoato de pirvinio		60.29	61.40

Para todos estos compuestos se determinó su potencia mediante el cálculo de su EC_{50} ; se construyeron curvas concentración respuesta mediante diluciones seriadas de dichos compuestos (**figura 4.2**) obteniendo los resultados que se resumen en la **tabla 4.2**.

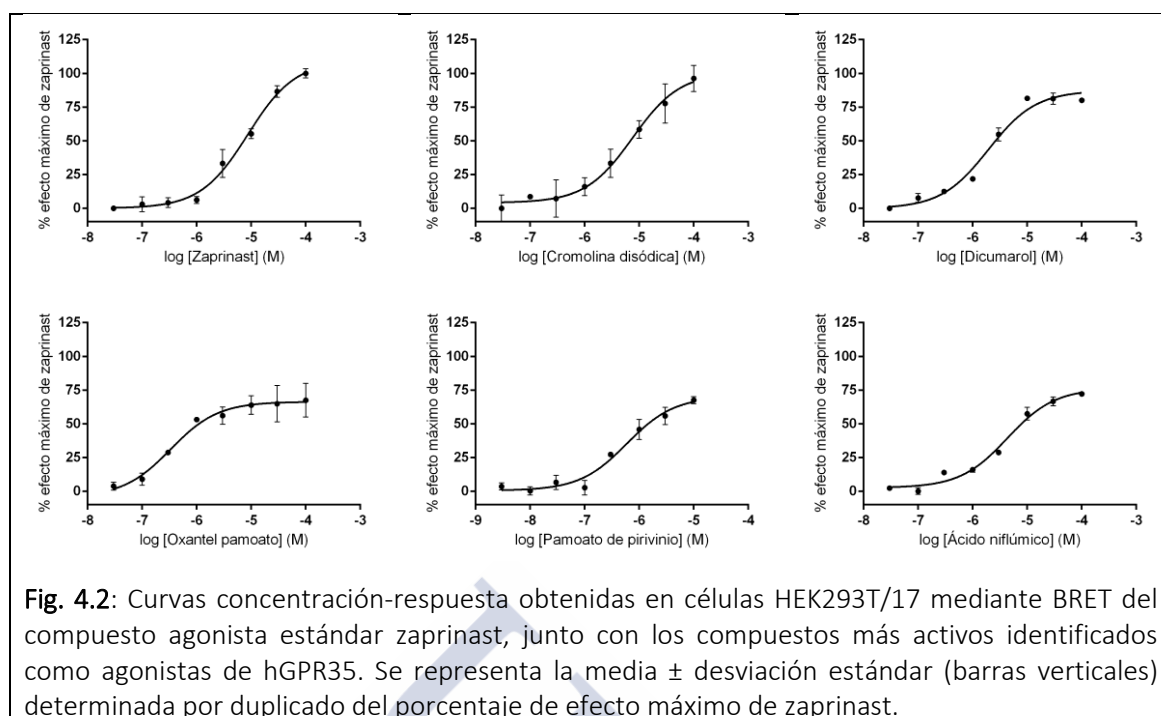


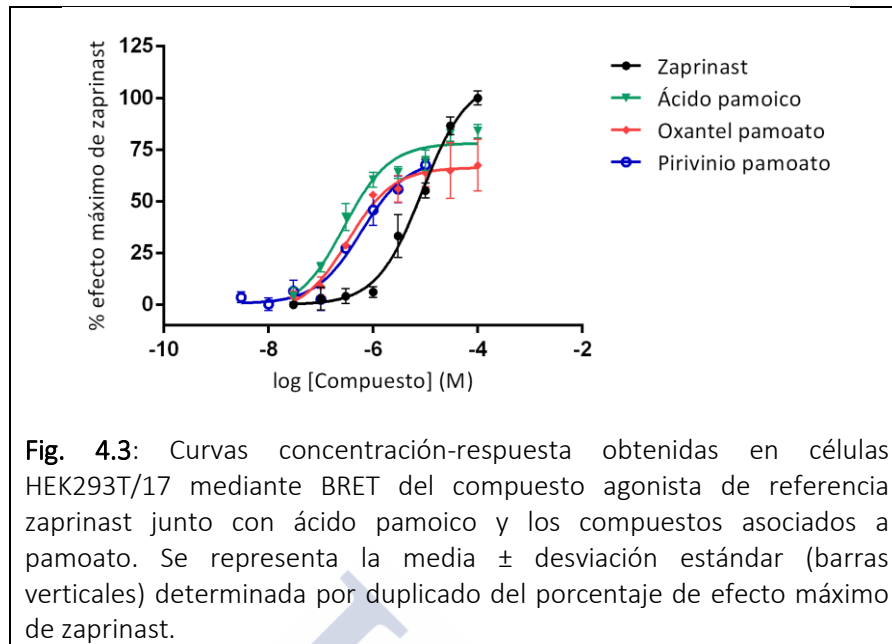
Fig. 4.2: Curvas concentración-respuesta obtenidas en células HEK293T/17 mediante BRET del compuesto agonista estándar zaprinast, junto con los compuestos más activos identificados como agonistas de hGPR35. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por duplicado del porcentaje de efecto máximo de zaprinast.

Tabla 4.2: Valores de potencia (EC_{50}) y valores de eficacia (E_{max}) de cada agonista.

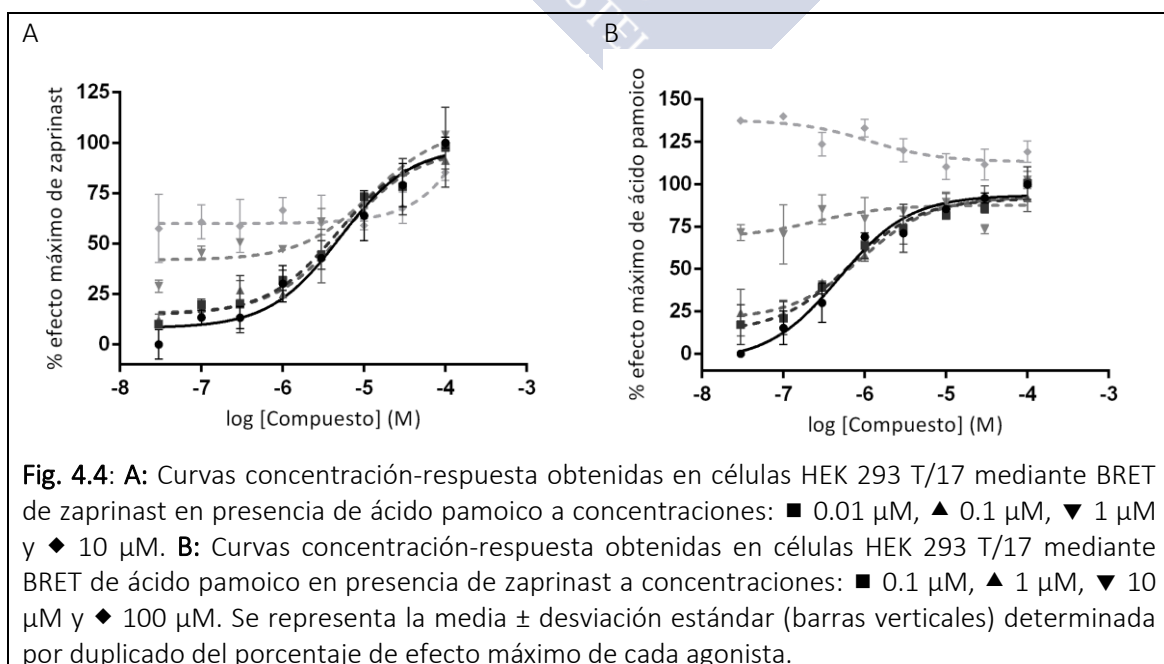
Identificación y confirmación de agonistas de hGPR35		
Compuesto	EC_{50} (μ M)	E_{max} (% actividad)
Zaprinast	8.65 ± 0.85	100.00 ± 4.37
Ácido niflúmico	4.34 ± 0.83	76.23 ± 2.79
Cromolina disódica	7.59 ± 0.74	100.60 ± 6.74
Dicumarol	1.94 ± 0.82	87.20 ± 3.08
Oxantel pamoato	0.33 ± 0.07	63.38 ± 2.62
Pamoato de pirvinio	0.59 ± 0.08	70.25 ± 4.02

Tanto dicumarol como cromolina disódica se comportaron como agonistas de alta eficacia; sin embargo, dicumarol se comportó como agonista parcial y cromolina disódica como agonista total con una potencia similar a la de zaprinast.

Los dos compuestos asociados a pamoato (oxantel pamoato y pamoato de pirvinio), presentaron eficacias máximas entre 60%-70% y potencias superiores al zaprinast. Dado que estos compuestos forman una sal con el ácido pamoico, se estudió la posible actividad del ácido pamoico obteniendo un perfil similar a estos dos compuestos, con una $EC_{50} = 0.28 \mu$ M y una $E_{max} = 78.19$ (figura 4.3).



Para confirmar el efecto de agonismo parcial del ácido pamoico, se construyeron curvas concentración-respuesta de zaprinast con diluciones seriadas en un rango entre 100 μ M y 30 nM, en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de ácido pamoico (**figura 4.4 A**). Se observó un comportamiento clásico de agonismo parcial donde el punto de cruce de las curvas coincide con el efecto máximo del agonista parcial. Este comportamiento se confirmó construyendo curvas concentración-respuesta de ácido pamoico, en presencia de diferentes concentraciones de zaprinast (**figura 4.4 B**)



4.1.1.2 La digitonina y la tomatina fueron identificados como los antagonistas más activos de hGPR35.

El cribado de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] permitió identificar 9 compuestos como *hits* antagonistas que superaron el punto de corte establecido. En este cribado se obtuvo un valor de $Z' = 0.59 \pm 0.02$ y la relación señal específica / señal de fondo fue de 54.94 (figura 4.5).

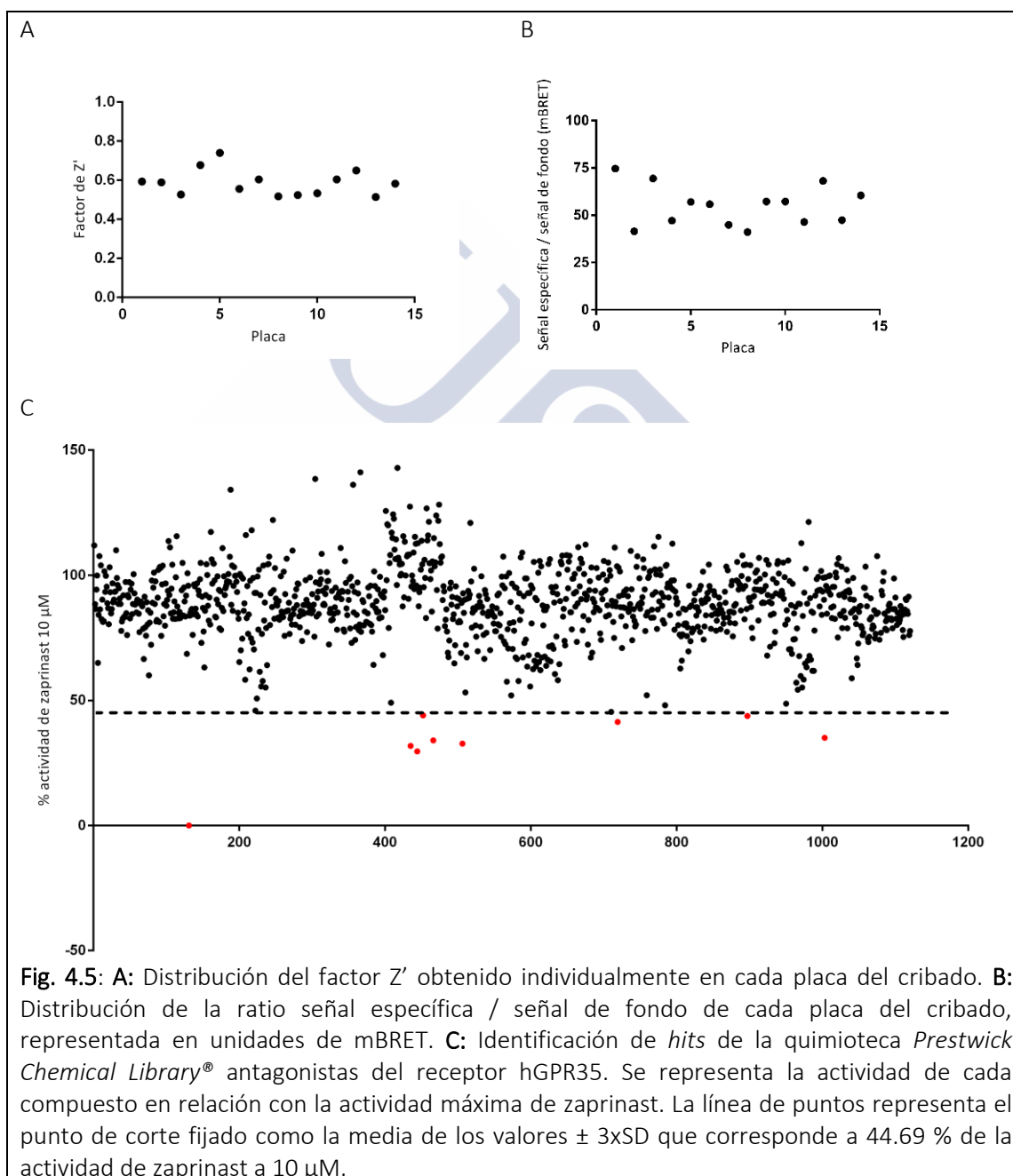
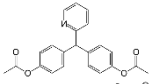
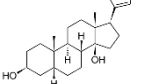
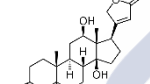
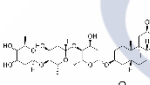
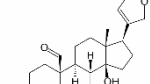
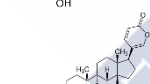
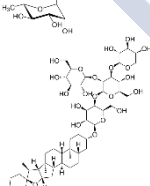


Fig. 4.5: **A:** Distribución del factor Z' obtenido individualmente en cada placa del cribado. **B:** Distribución de la ratio señal específica / señal de fondo de cada placa del cribado, representada en unidades de mBRET. **C:** Identificación de *hits* de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] antagonistas del receptor hGPR35. Se representa la actividad de cada compuesto en relación con la actividad máxima de zaprinast. La línea de puntos representa el punto de corte fijado como la media de los valores $\pm 3 \times \text{SD}$ que corresponde a 44.69 % de la actividad de zaprinast a 10 μM .

En un ensayo de confirmación, en el que se mantuvieron las mismas condiciones y se incluyeron duplicados de cada compuesto, dos de ellos fueron reconocidos

como falsos positivos. La actividad del resto fue ratificada en este ensayo (**tabla 4.3**).

Tabla 4.3: Porcentajes de actividad de compuestos identificados como *hits* antagonistas de hGPR35 mediante BRET. Valores correspondientes al cálculo de % de inhibición con relación a la actividad máxima de zaprinast.

Identificación y confirmación de agonistas de hGPR35			
Compuesto	Estructura	HTS % Inhibición (10 μ M)	Confirmación % Inhibición (10 μ M)
Bisacodilo		65.99	53.34
Digitoxigenina		70.37	65.32
Digoxigenina		56.20	48.14
Digoxina		55.95	55.28
Estrofantidina		58.61	56.62
Proscilaridina A		64.93	44.66
Tomatina		100.00	100.04

Se determinó la potencia de estos 7 compuestos activos mediante el cálculo de su IC_{50} . Además, se incluyó en el estudio el compuesto digitonina (que no está presente en la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®]), un glucósido esteroide al igual que varios de los compuestos activos obtenidos (digoxina, digitoxigenina y digoxigenina), todos de la familia de los cardenólidos. Para ello, se planteó un ensayo en el que se construyeron curvas concentración-respuesta mediante diluciones seriadas de dichos compuestos frente zaprinast 10 μ M (**figura 4.6**) y frente a ácido pamoico 1 μ M; (**figura 4.7**) obteniendo los siguientes resultados que se resumen en la **tabla 4.4**.

Resultados

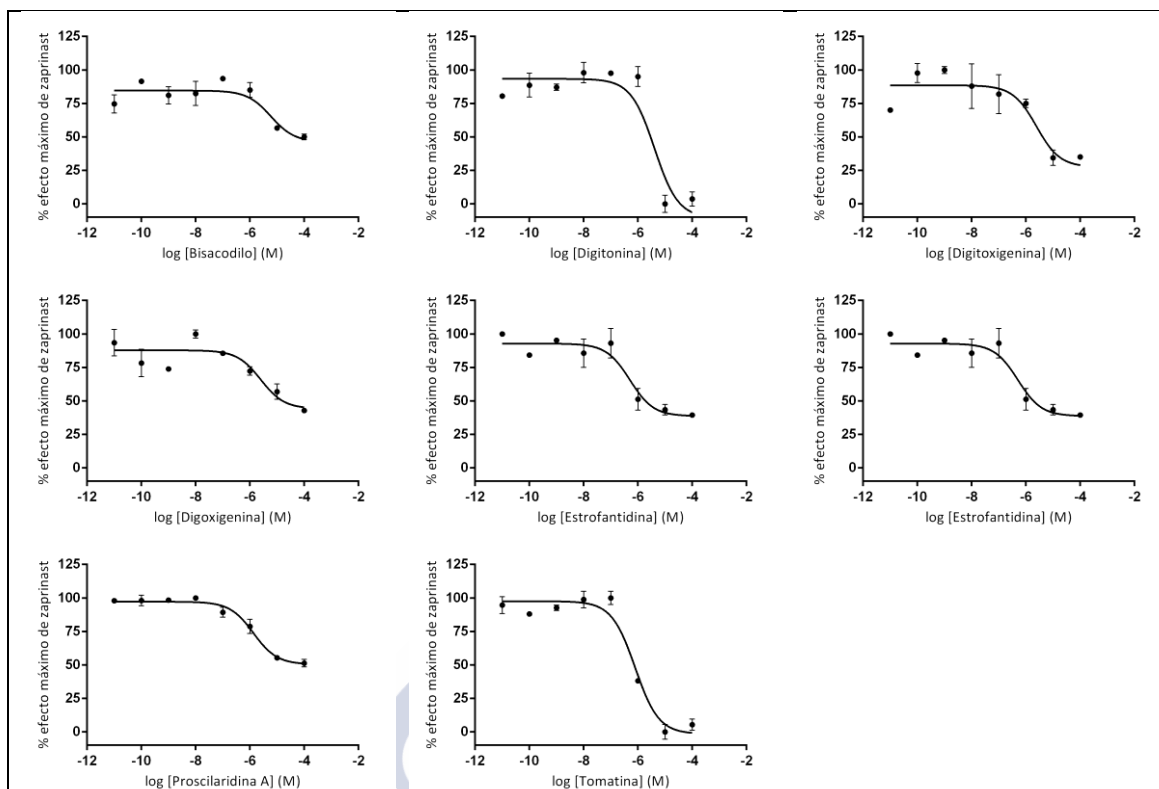


Fig. 4.6: Curvas concentración-respuesta obtenidas en células HEK 293 T/17 mediante BRET de los *hits* antagonistas de hGPR35 frente al agonista zaprinast. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por duplicado del porcentaje de efecto máximo de zaprinast.

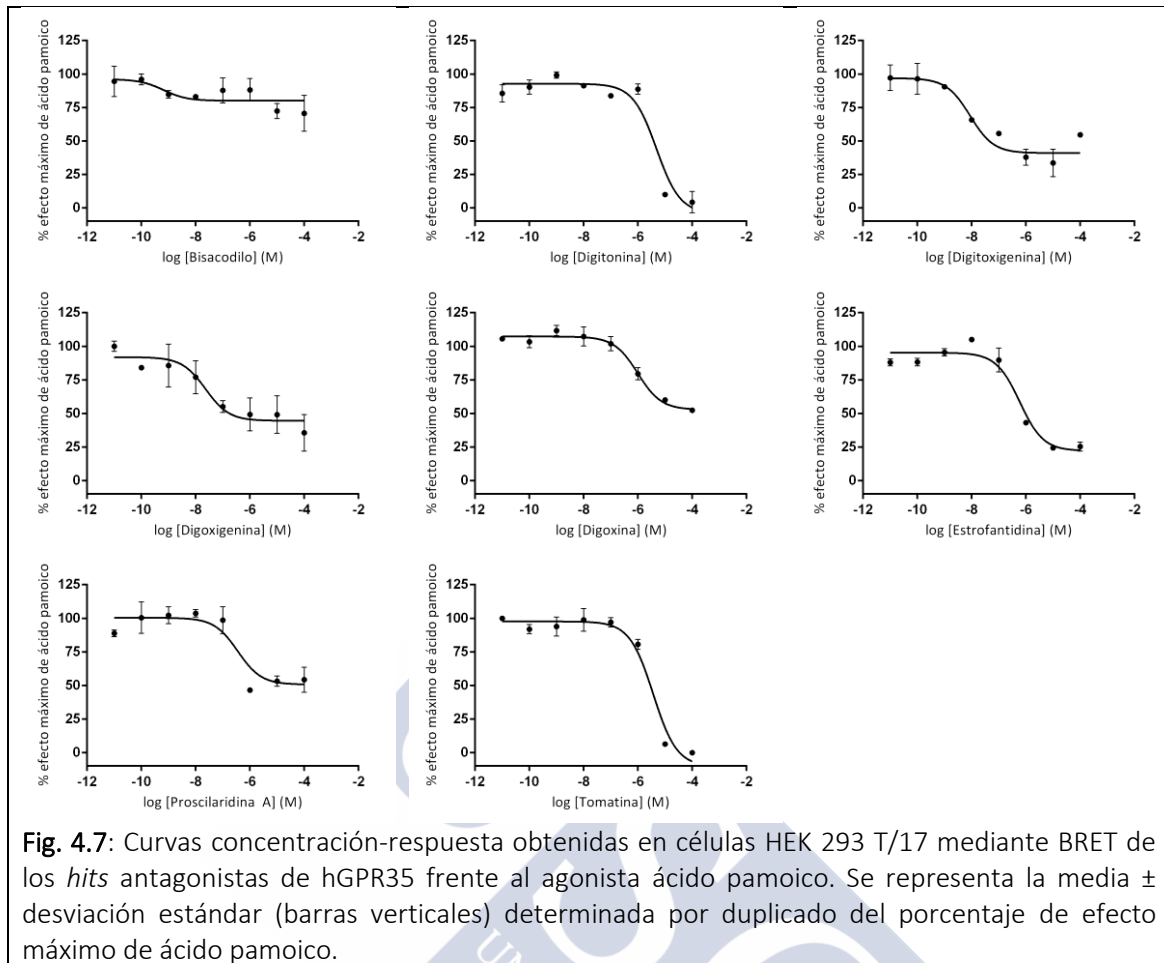


Tabla 4.4: Valores de potencia (IC_{50}) y eficacia (I_{max}) obtenidos para cada antagonista de hGPR35 frente zaprinast y frente ácido pamoico.

Antagonismo hGPR35				
Compuesto	IC_{50} (μ M) frente zaprinast	% reversión de zaprinast	IC_{50} (μ M) frente ácido pamoico	% reversión de ácido pamoico
Bisacodilo	5.29 \pm 0.45	53.71 \pm 6.77	-	19.98 \pm 3.03
Digitonina	4.08 \pm 0.59	110.33 \pm 11.66	4.82 \pm 0.64	104.13 \pm 8.09
Digitoxigenina	2.44 \pm 0.22	72.55 \pm 11.18	0.009 \pm 0.001	59.12 \pm 3.83
Digoxigenina	2.51 \pm 0.43	55.85 \pm 6.90	0.023 \pm 0.001	55.49 \pm 4.44
Digoxina	3.82 \pm 0.56	79.55 \pm 9.39	0.98 \pm 0.07	47.22 \pm 2.84
Estrofantidina	0.51 \pm 0.05	61.39 \pm 5.81	0.59 \pm 0.07	77.89 \pm 4.18
Proscillaridina A	1.35 \pm 0.77	49.60 \pm 2.20	0.36 \pm 0.05	49.35 \pm 5.25
Tomatina	0.79 \pm 0.07	101.55 \pm 4.87	3.66 \pm 0.75	110.30 \pm 7.34

De los ocho compuestos estudiados, digitonina y tomatina inhibieron completamente la actividad de zaprinast y ácido pamoico sobre el receptor. Los compuestos restantes no inhibieron completamente la actividad del zaprinast o el ácido pamoico sobre hGPR35.

4.1.2 Estudios de BRET en rGPR35

4.1.2.1 La cromolina disódica y el dicumarol fueron identificados como los agonistas más activos de rGPR35.

El cribado de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] permitió identificar 14 compuestos como *hits* (entre los que se encuentra el zaprinast) que superaron el punto de corte establecido. En este cribado se obtuvo un valor de $Z' = 0.84 \pm 0.04$ y la relación señal específica / señal de fondo fue de 14.50 (**figura 4.8**).

En un ensayo de confirmación se descartaron siete compuestos identificados como falsos positivos, debido a una interferencia del color de estos compuestos o un efecto de autofluorescencia que interfirió en la lectura de BRET. Los compuestos descartados fueron: hicantona, clorhidrato de doxorubicina, rifampicina, clorhidrato de daunorubicina, sulfasalacina, clorhidrato de fenazopiridina, merbromina, salmeterol, hidroxinaftoato de befenio.

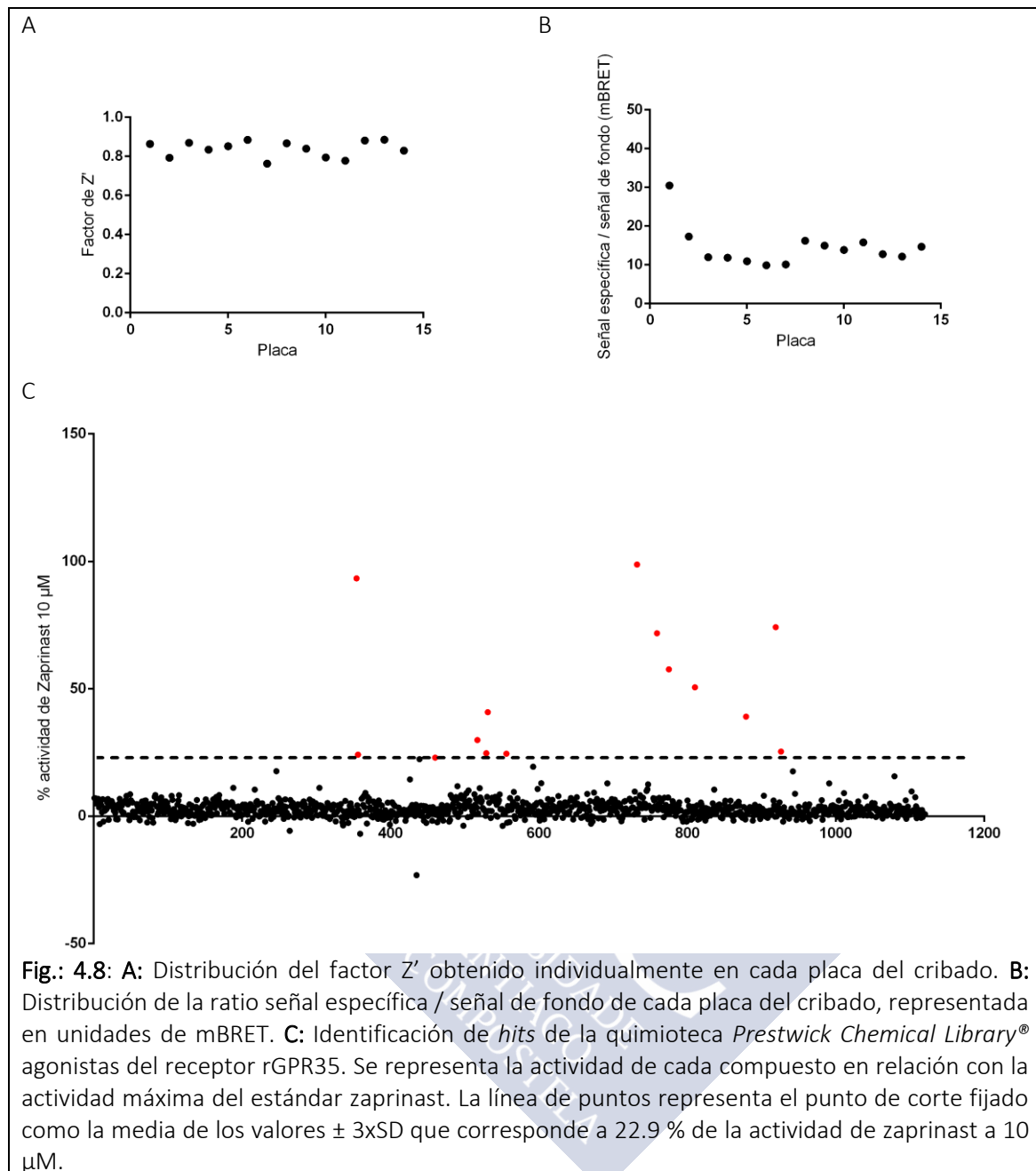
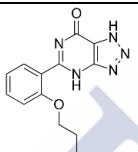
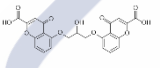
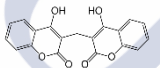
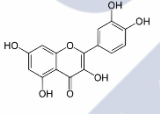
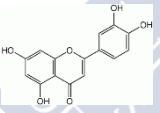


Fig.: 4.8: **A:** Distribución del factor Z' obtenido individualmente en cada placa del cribado. **B:** Distribución de la ratio señal específica / señal de fondo de cada placa del cribado, representada en unidades de mBRET. **C:** Identificación de *hits* de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] agonistas del receptor rGPR35. Se representa la actividad de cada compuesto en relación con la actividad máxima del estándar zaprinast. La línea de puntos representa el punto de corte fijado como la media de los valores ± 3 SD que corresponde a 22.9 % de la actividad de zaprinast a 10 μ M.

Cuatro compuestos fueron confirmados como agonistas de rGPR35 (dihidrato de quercetina, dicumarol, sal disódica de cromolina y luteolina), todos ellos con actividades entre el 35% y el 65% a 10 μM con relación a la actividad máxima obtenida con zaprinast (**tabla 4.5**).

Tabla 4.5: Porcentajes de actividad de compuestos identificados como *hits* agonistas de rGPR35 mediante BRET. Valores correspondientes al cálculo de % de actividad con relación a la actividad máxima de zaprinast.

Identificación y confirmación de agonistas de rGPR35			
Compuesto	Estructura	HTS % Actividad (10 μM)	Confirmación % Actividad (10 μM)
Zaprinast		93.30	97.84
Cromolina disódica		50.60	49.70
Dicumarol		71.76	52.49
Dihidrato de quercetina		40.81	63.25
Luteolina		39.06	36.64

Se determinó la potencia de los 4 compuestos activos confirmados mediante el cálculo de su EC_{50} , para ello se diseñó un ensayo en el que se construyeron curvas concentración respuesta mediante diluciones seriadas de dichos compuestos (**figura 4.9**), los valores obtenidos se resumen en la **tabla 4.6**.

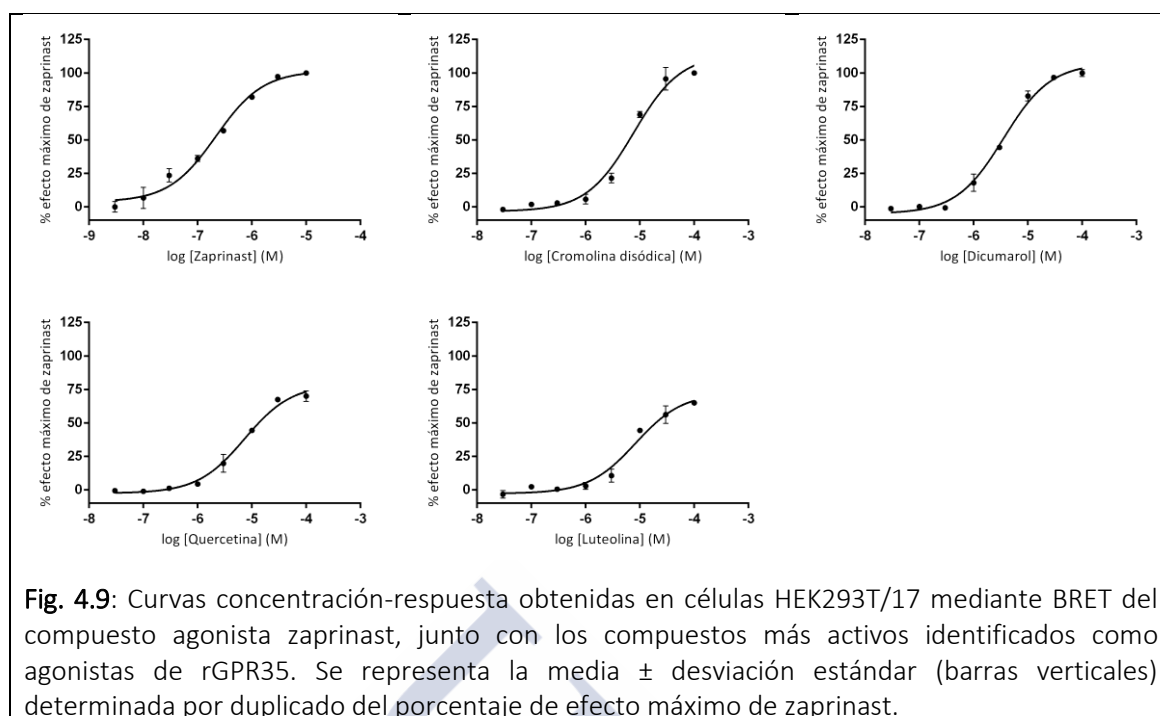


Fig. 4.9: Curvas concentración-respuesta obtenidas en células HEK293T/17 mediante BRET del compuesto agonista zaprinast, junto con los compuestos más activos identificados como agonistas de rGPR35. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por duplicado del porcentaje de efecto máximo de zaprinast.

Tabla 4.6: Valores de potencia (EC_{50}) y de eficacia (E_{max}) de cada compuesto agonista de rGPR35.

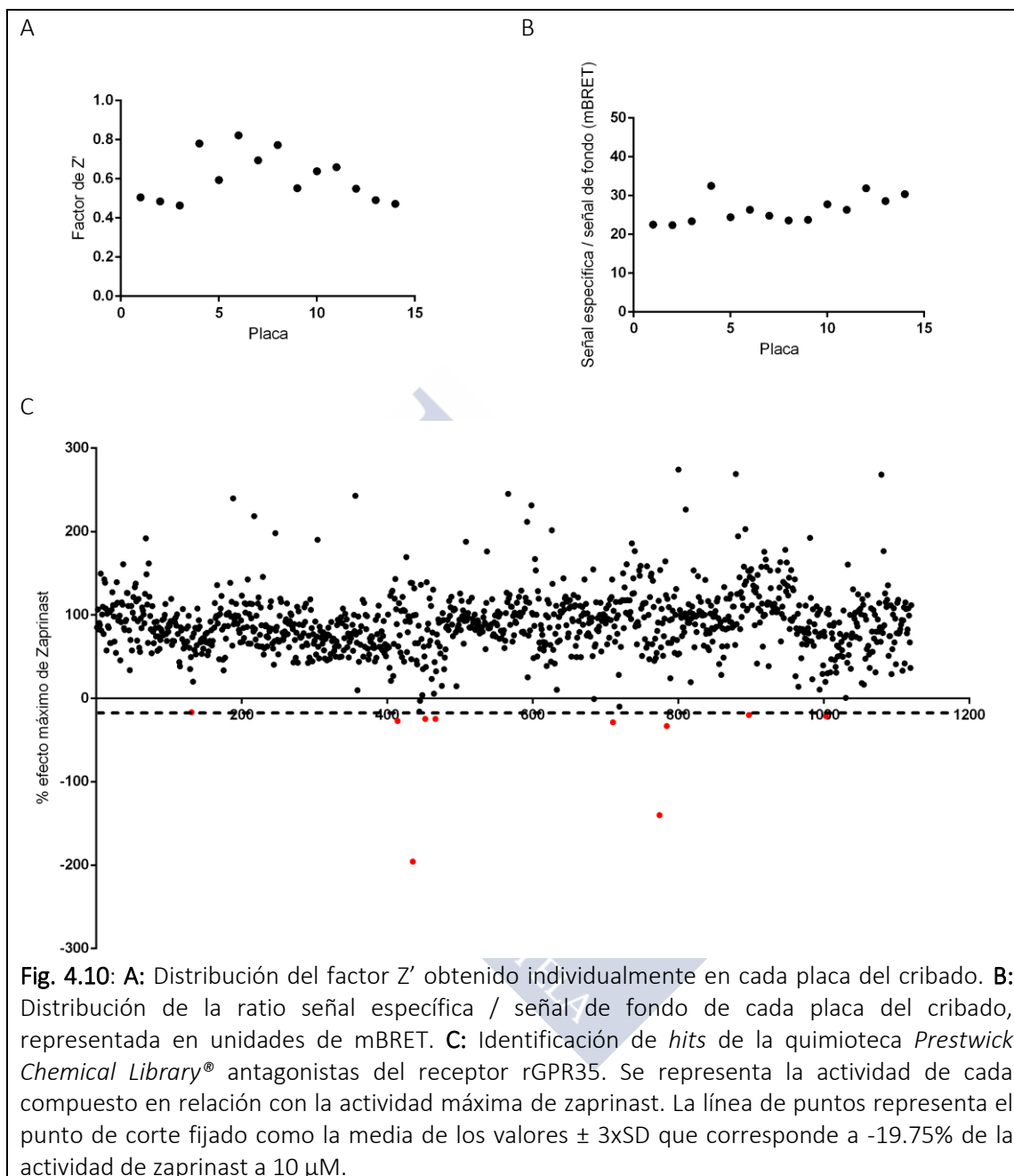
Identificación y confirmación de agonistas de rGPR35		
Compuesto	EC_{50} (μ M)	E_{max} (% actividad)
Zaprinast	0.22 ± 0.08	100.06
Cromolina disódica	7.64 ± 0.83	113.80
Dicumarol	3.56 ± 0.89	107.30
Dihidrato de quercetina	7.34 ± 0.87	78.86
Luteolina	8.32 ± 0.80	72.41

Dicumarol y cromolina disódica se comportaron como agonistas totales del receptor rGPR35, aunque con potencias inferiores (16 y 35 veces menor respectivamente) a la obtenida para zaprinast en este ortólogo de GRP35. Dihidrato de quercetina y luteolina se confirmaron como agonistas parciales con una potencia y actividad máxima similares.

4.1.2.2 La digitonina y la tomatina fueron identificados como los antagonistas más activos de rGPR35.

EL cribado de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] permitió identificar 10 compuestos como *hits* antagonistas que superaron el punto de corte establecido.

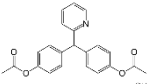
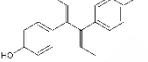
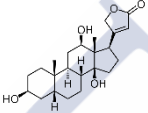
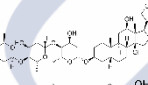
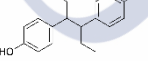
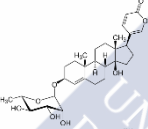
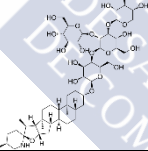
En este cribado se obtuvo un valor de $Z' = 0.60 \pm 0.12$ y la relación señal específica / señal de fondo fue de 26.35 (figura 4.10).



En un ensayo de confirmación se descartaron 3 compuestos, reconocidos en este ensayo como falsos positivos, debido a la coloración de estos compuestos o un efecto de autofluorescencia que interfirió en la lectura de BRET. Los compuestos que se descartaron en este punto son: chicao sky blue, ácido lactobiónico y dihidrocloruro de alexidina. Los compuestos restantes confirmaron su actividad como antagonistas del receptor, aunque cuatro de ellos (digoxina, bisacodilo,

digoxigenina y proscillaridina A) con porcentajes de inhibición considerablemente inferiores al obtenido en el cribado (**tabla 4.7**).

Tabla 4.7: Porcentajes de actividad de compuestos identificados como *hits* antagonistas de rGPR35 mediante BRET. Valores correspondientes al cálculo de % de inhibición con relación a la actividad máxima de zaprinast.

Identificación y confirmación de agonistas de rGPR35			
Compuesto	Estructura	HTS	Confirmación
		% Inhibición (10 μ M)	% Inhibición (10 μ M)
Bisacodilo		124.69	35.90
Dienestrol		133.16	78.20
Digoxigenina		119.89	32.19
Digoxina		124.66	33.12
Hexestrol		123.69	82.63
Proscillaridina A		121.38	46.74
Tomatina		116.67	101.23

Se determinó la potencia de los 8 compuestos confirmados mediante el cálculo de su IC₅₀; entre ellos: digoxina, bisacodilo, digoxigenina y proscillaridina A; todos ellos, confirmados previamente como antagonistas del ortólogo humano de GPR35. Asimismo, se incluyeron la digitoxigenina y la estrofantidina, que, si bien en el cribado en el receptor rGPR35 no superaron el punto de corte estipulado, presentaron valores de inhibición muy cercanos al mismo. Además, igual que en el estudio de antagonistas de GPR35, se incluyó digitonina.

Para ello, se construyeron curvas concentración respuesta mediante diluciones seriadas de dichos compuestos frente zaprinast 1 μ M (**figura 4.11**); obteniendo los siguientes resultados que se resumen en la **tabla 4.8**.

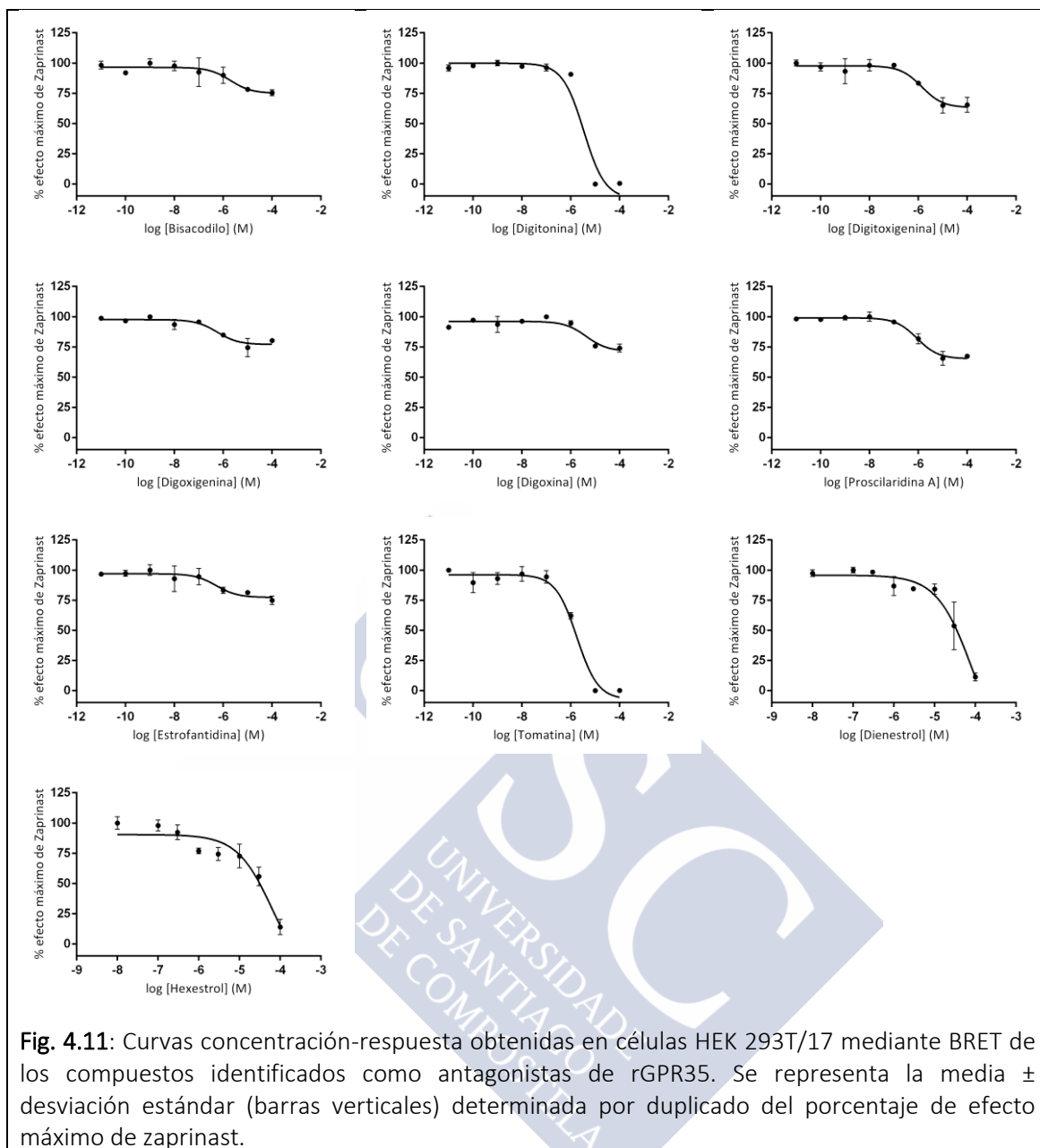


Fig. 4.11: Curvas concentración-respuesta obtenidas en células HEK 293T/17 mediante BRET de los compuestos identificados como antagonistas de rGPR35. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por duplicado del porcentaje de efecto máximo de zaprinast.

Tabla 4.8: Valores de potencia (IC_{50}) y de % de reversión del efecto máximo de zaprinast obtenidos para cada antagonista de rGPR35.

Antagonismo rGPR35		
Compuesto	IC_{50} (μM)	% reversión
Bisacodilo	1.97 ± 0.45	25.06 ± 3.31
Dienestrol	85.07 ± 0.60	86.68 ± 3.31
Digitonina	3.41 ± 0.71	99.48 ± 0.47
Digitoxigenina	1.38 ± 0.6	36.83 ± 3.05
Digoxigenina	0.58 ± 0.06	23.04 ± 2.02
Digoxina	4.29 ± 0.53	28.51 ± 3.25
Hexestrol	64.66 ± 0.55	85.94 ± 6.21
Estrofantidina	0.52 ± 0.04	22.66 ± 2.59
Proscillaridina A	0.89 ± 0.01	34.82 ± 1.66
Tomatina	1.78 ± 0.80	99.88 ± 0.51

Se confirmaron digitonina y tomatina como los compuestos más activos con unas IC_{50} de $3.41 \pm 0.71 \mu M$ y $1.78 \pm 0.80 \mu M$, respectivamente; mostrando una potencia relativamente alta. Los compuestos dienestrol y hexestrol, pese a alcanzar casi el 100% de inhibición de la actividad de zaprinast, no describieron una curva sigmoidea completa, por ello puede que los valores de IC_{50} extrapolados por el software de análisis que se muestran en la tabla 4.8 no hayan sido calculados con precisión. El resto de los compuestos resultaron inhibidores parciales y el cálculo de su potencia en forma de IC_{50} está nuevamente limitada por la baja inhibición de la actividad de zaprinast.

4.2 Puesta a punto de un ensayo de distribución dinámica de masas para el estudio de la actividad del receptor GPR35.

4.2.1 Puesta a punto de un ensayo para el estudio de la actividad de hGPR35 de expresión endógena en la línea HT-29 mediante redistribución dinámica de masas.

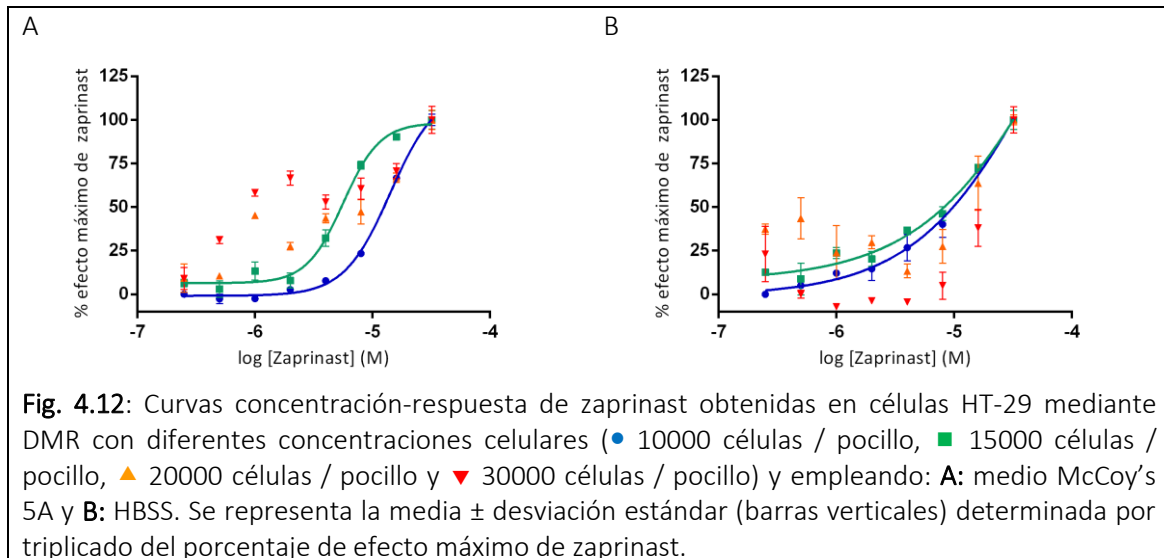
Esta puesta a punto para el estudio del ortólogo humano del receptor se llevó a cabo en una línea celular de carcinoma colorrectal humano HT-29 que expresan de forma endógena el receptor GPR35 (71,123).

En el proceso de puesta a punto del método de DMR para el estudio de la actividad del receptor hGPR35 y de la actividad de posibles ligandos; se consideraron 2 condiciones principales: el número de células por pocillo empleadas en el ensayo y el tipo de buffer empleado.

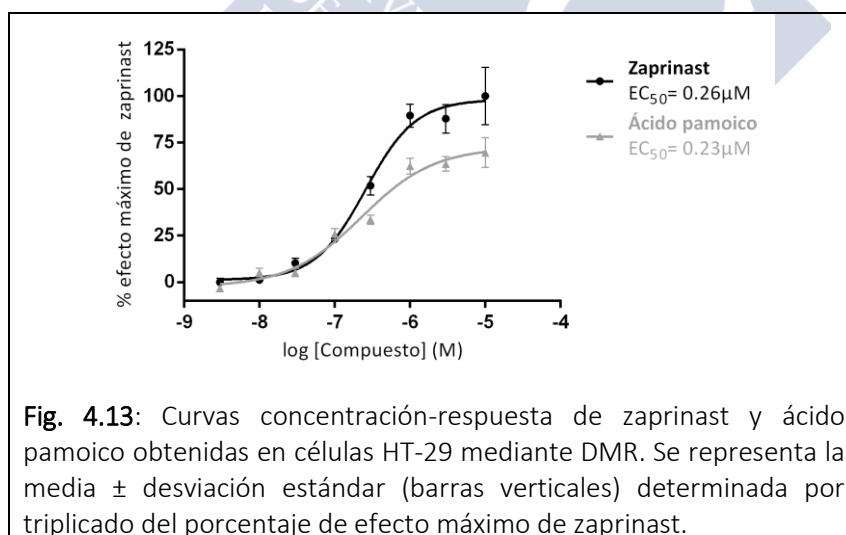
Con el objetivo de fijar una densidad óptima de células, con la que se consiga una monocapa celular que cubra el fondo del pocillo de forma homogénea sin llegar a un sobrecrecimiento celular, se realizó un ensayo donde se evaluaron 4 concentraciones diferentes de células HT-29: 10000, 15000, 20000 y 30000 células/pocillo.

Para obtener un *buffer* de ensayo que permitiera una buena estabilidad de las lecturas basales (lo que se traduciría en un buen ratio señal específica / señal de fondo) se compararon dos posibles opciones: McCoy's 5A suplementado con Hepes 25 mM a pH=7.4 y 0.01% DMSO o *Hank's balanced salt solution* suplementado con Hepes 25 mM a pH=7.4 y 0.01% de DMSO.

Se hicieron curvas concentración-respuesta con diluciones seriadas de zaprinast en un rango de concentración entre 125nM y 32 μ M, lo que permitió determinar cómo condiciones óptimas para este ensayo: 15000 células/pocillo y McCoy's 5A como *buffer* de ensayo; con ellas se obtuvo un valor de $EC_{50} = 5.6 \mu$ M (**figura 4.12**).



Para confirmar la validez del método, se construyeron curvas concentración-respuesta de zaprinast (agonista total) y ácido pamoico (agonista parcial) en un rango de concentración de 3 nM a 10 μ M, reduciendo considerablemente la cantidad de DMSO (compuesto que interfiere en la respuesta obtenida en los ensayos de DMR). Esto permitió obtener un valor de $EC_{50} = 0.26 \mu$ M para zaprinast (**figura 4.13**), similar al valor obtenido por Deng H. et al (2011) de 0.16 μ M.



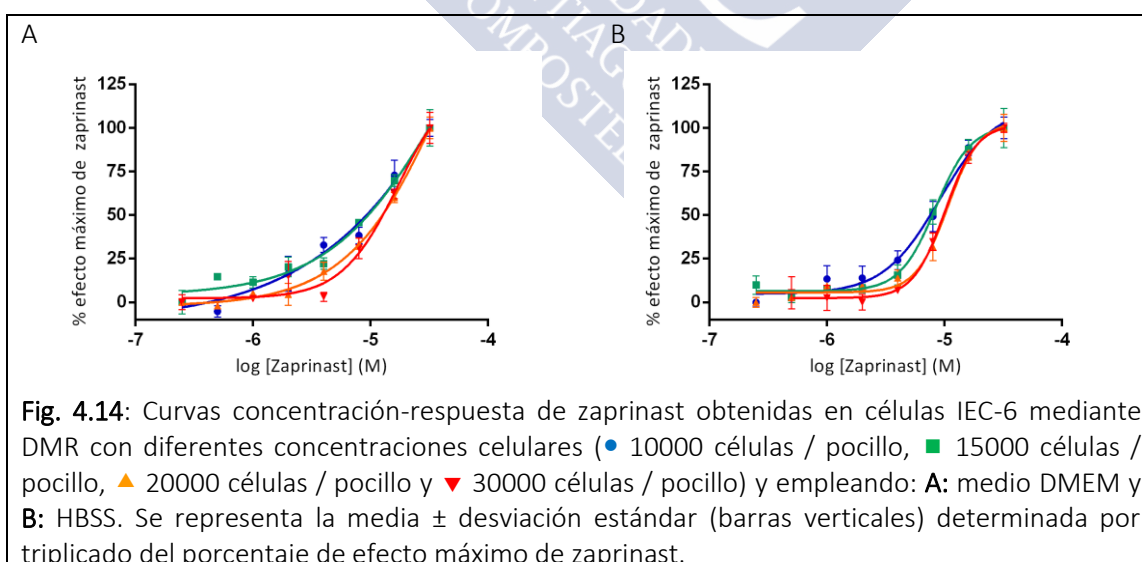
4.2.2 Puesta a punto de un ensayo para el estudio de la actividad de rGPR35 de expresión endógena en la línea IEC-6 mediante redistribución dinámica de masas.

En esta puesta a punto en la que se empleó una línea celular de epitelio de intestino delgado de rata IEC-6 con expresión endógena de rGPR35 (39), se llevó a cabo el mismo proceso que para la puesta a punto de la forma humana de GPR35 y se consideraron las mismas condiciones.

Para determinar la concentración celular que permita obtener una monocapa celular, se evaluaron 4 concentraciones diferentes de células IEC-6: 10000, 15000, 20000 y 30000 células/pocillo.

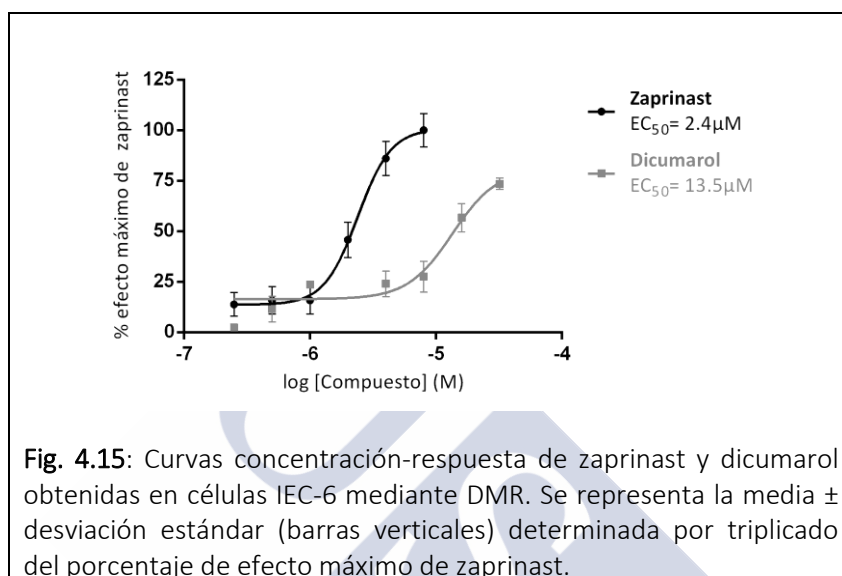
Para obtener un *buffer* de ensayo que permitiera una buena estabilidad de las lecturas basales se compararon dos opciones: el propio medio de cultivo celular DMEM suplementado con Hepes 25 mM a pH=7.4 y 0.01% DMSO o HBSS con Hepes 25 mM a pH=7.4 y 0.01% de DMSO.

Se hicieron curvas concentración-respuesta con diluciones seriadas de zaprinast en un rango de concentración entre 125 nM y 32 μ M lo que permitió determinar cómo condiciones óptimas para este ensayo: 15000 células/pocillo y HBSS como *buffer* de ensayo, con las que se obtuvo un valor de $EC_{50} = 8.4 \mu$ M (figura 4.14).



Para confirmar la validez del método, se construyeron curvas concentración-respuesta de zaprinast (agonista total) en un rango de concentraciones de 125 nM

a 8 μM (rango mínimo de concentraciones a las que se pudo obtener una curva concentración-respuesta de este compuesto) y dicumarol (agonista parcial) en un rango de concentración de 125 nM a 32 μM . Esto permitió obtener unos valores de $\text{EC}_{50} = 2.4 \mu\text{M}$ para zaprinast y $\text{EC}_{50} = 13.5 \mu\text{M}$ para dicumarol. (**figura 4.15**)



4.3 Identificación de ligandos de GPR35 mediante ensayo de redistribución dinámica de masas (DMR)

El registro de la actividad de los compuestos se basa en las pequeñas variaciones (pm) que detecta el lector como consecuencia de redistribución dinámica de masas sufrida por las células debido a las interacciones con los compuestos.

En cada cribado se estudiaron los 1120 compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] en un único ensayo de redistribución dinámica de masas, mediante dos lecturas cinéticas consecutivas, en ausencia (identificación de agonistas) y presencia (identificación de antagonistas) del agonista estándar zaprinast. Se seleccionaron los compuestos identificados como ligandos activos (tanto agonistas como antagonistas) y se incluyeron en nuevos ensayos de confirmación, empleando la misma técnica, siempre con zaprinast como compuesto de referencia.

4.3.1 Estudios de DMR en hGPR35

4.3.1.1 *Maleato de trimipramina y benzocaína fueron identificados como los agonistas más activos de hGPR35.*

El cribado se realizó a partir de la primera lectura cinética tras la administración de los compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®], se identificaron 33 compuestos como *hits* (entre los que se encuentra zaprinast) que superaron el punto de corte establecido. En este cribado se obtuvo un valor de $Z' = 0.71 \pm 0.03$ y la relación señal específica / señal de fondo fue de 127 (**figura 4.16**).

En un siguiente ensayo de confirmación se descartaron 19 compuestos, reconocidos como falsos positivos debido a interferencias con la metodología de medida de DMR. Los compuestos descartados fueron: norciclobenzaprina, sulmazol, mesilato de deferoxamina, delcorina, himecromina, cefoxitina sódica, tartrato de pempidina, heliotrina, tinidazol, citalopram bromhidrato, hidrocloreuro de cloperastina, sulfacloropiridacina, hidrocloreuro de propanolol, tyloxapol, benzoato de denatonio, etomidato, escopoletina, piperacetazina y roxarsona. El resto de los compuestos identificados en el cribado fueron confirmados como agonistas (**tabla 4.9**).

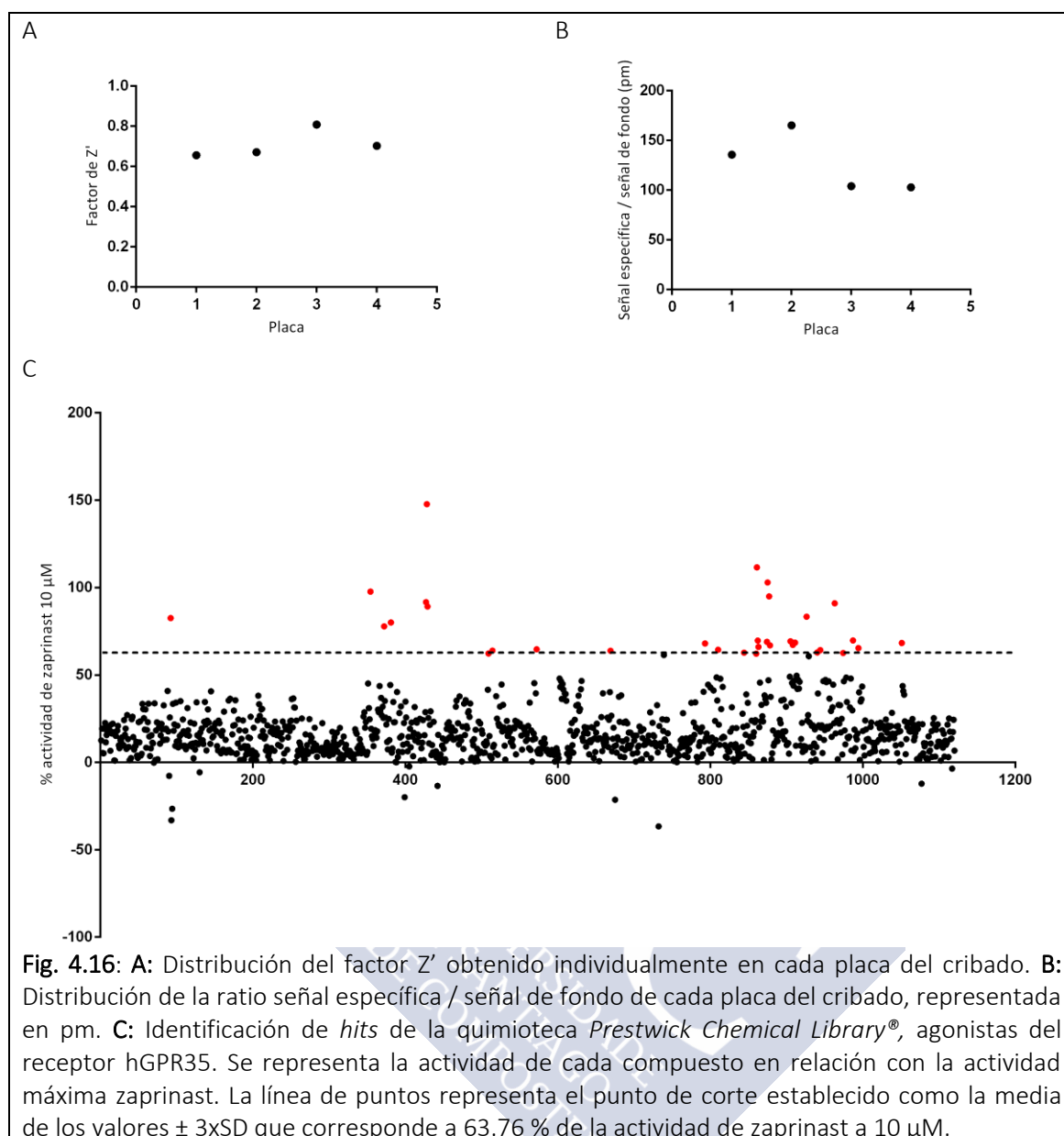


Fig. 4.16: **A:** Distribución del factor Z' obtenido individualmente en cada placa del cribado. **B:** Distribución de la ratio señal específica / señal de fondo de cada placa del cribado, representada en pm. **C:** Identificación de *hits* de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®], agonistas del receptor hGPR35. Se representa la actividad de cada compuesto en relación con la actividad máxima zaprinast. La línea de puntos representa el punto de corte establecido como la media de los valores $\pm 3xSD$ que corresponde a 63.76 % de la actividad de zaprinast a 10 μ M.

Resultados

Tabla 4.9: Porcentajes de actividad de compuestos identificados como *hits* agonistas de hGPR35 mediante DMR. Valores correspondientes al cálculo de % de actividad con relación a la actividad máxima de zaprinast.

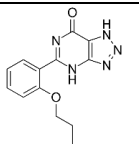
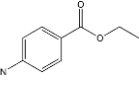
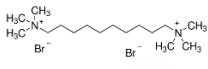
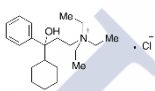
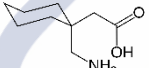
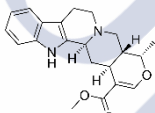
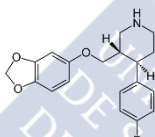
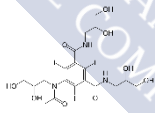
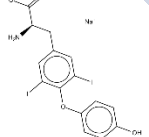
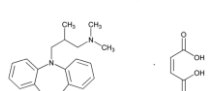
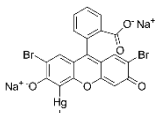
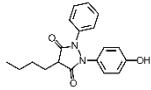
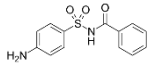
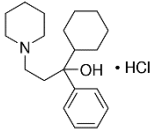
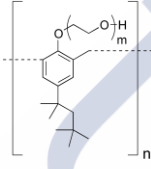
Identificación y confirmación de agonistas de hGPR35			
Compuesto	Estructura	HTS % Actividad (10 μ M)	Confirmación % Actividad (10 μ M)
Zaprinast		97.67	102.01
Benzocaina		69.27	82.68
Bromuro de decametonio		68.98	61.49
Cloruro de tridihexetilo		66.07	43.39
Gabapentina		65.44	77.70
Hidrocloruro de ajmalacina		147.76	84.90
Hidrocloruro de paroxetina		62.94	98.85
Iohexol		91.71	45.10
Liotironina		64.26	56.44
Maleato de trimipramina		82.60	95.46
Merbromina		69.80	84.78

Tabla 4.9 (continuación): Porcentajes de actividad de compuestos identificados como *hits* agonistas de hGPR35 mediante DMR. Valores correspondientes al cálculo de % de actividad con relación a la actividad máxima de zaprinast.

Identificación y confirmación de agonistas de hGPR35			
Compuesto	Estructura	HTS	Confirmación
		% Actividad (10 μ M)	% Actividad (10 μ M)
Oxifenbutazona		94.96	48.15
Sulfabenzamida		90.98	113.75
Trihexifenidilo-D,L hidrocloruro		62.64	57.10
Tyloxapol		68.33	18.17

De los 13 compuestos confirmados se seleccionaron todos aquellos los que superaron el 60 % del efecto máximo de zaprinast para determinar su potencia mediante el cálculo de su EC_{50} . Para ello, se construyeron curvas concentración-respuesta mediante diluciones seriadas de dichos compuestos (**figura 4.17**) obteniendo los resultados que se resumen en la **tabla 4.10**.

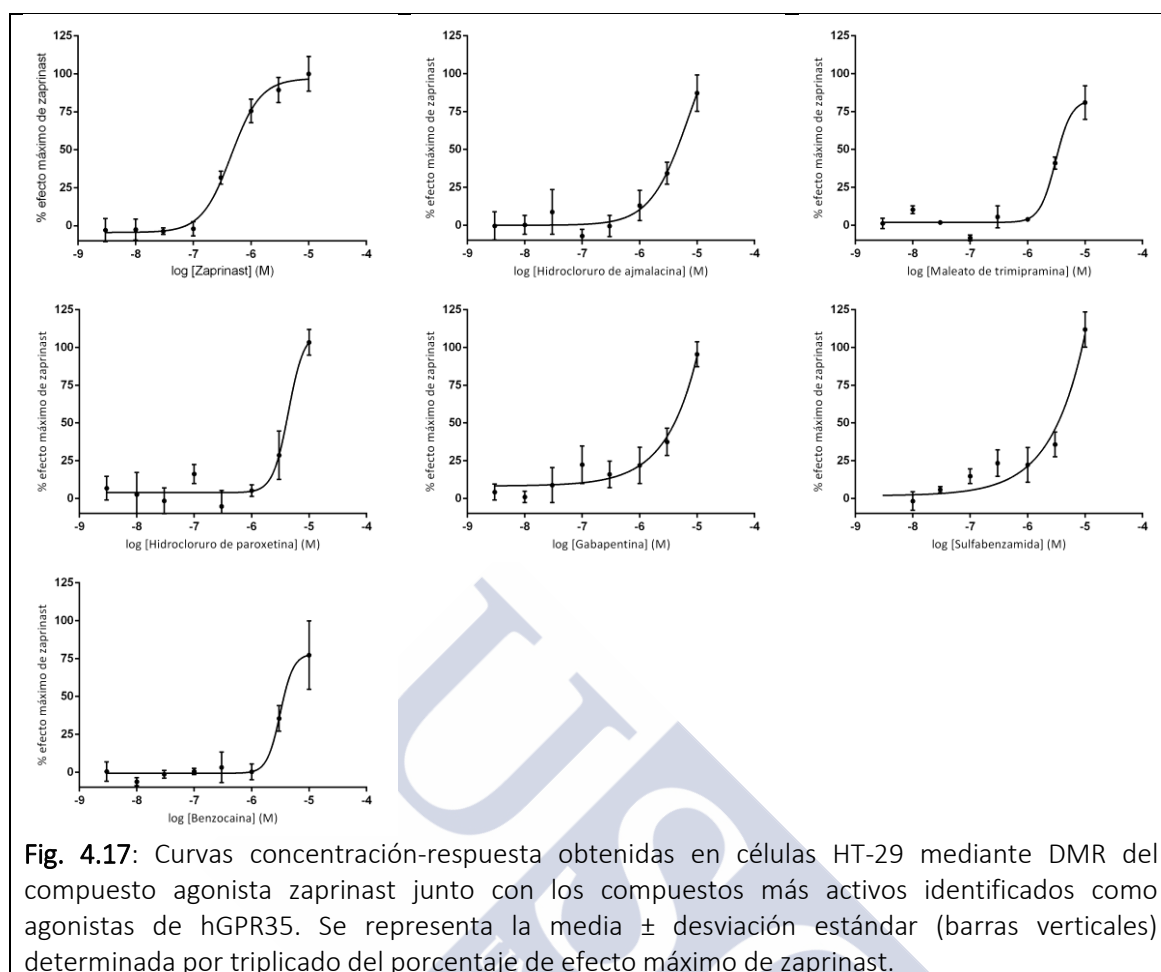


Fig. 4.17: Curvas concentración-respuesta obtenidas en células HT-29 mediante DMR del compuesto agonista zaprinast junto con los compuestos más activos identificados como agonistas de hGPR35. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por triplicado del porcentaje de efecto máximo de zaprinast.

Tabla 4.10: Valores de potencia (EC_{50}) y de eficacia (E_{max}) de cada agonista de hGPR35.

Agonismo hGPR35		
Compuesto	EC_{50} (μ M)	E_{max} (% actividad)
Zaprinast	0.45 ± 0.11	100.00 ± 3.63
Benzocaina	3.13 ± 1.13	77.26 ± 8.37
Gabapentina	-	95.44 ± 8.25
Hidrocloruro de ajmalicina	7.28 ± 1.15	145.00 ± 11.99
Hidrocloruro de paroxetina	4.35 ± 1.11	110.40 ± 8.53
Sulfabenzamida	-	111.93 ± 11.67
Maleato de trimipramina	3.06 ± 1.14	82.90 ± 9.54

Pese a presentar un buen porcentaje de actividad a la concentración máxima (10 μ M), no se consiguió obtener curvas concentración respuesta completas, por lo que la estimación de los valores de EC_{50} extrapolados por el software de análisis pueden no estar calculados con precisión.

4.3.1.2 El hidrocloreto de pronetalol y la proscilaridina A fueron identificados como los antagonistas más activos de hGPR35.

El cribado se realizó a partir de la segunda lectura cinética tras la administración de los compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] y la administración de zaprinast. Se identificaron 41 compuestos como *hits*, superando todos ellos el punto de corte establecido. En este cribado se obtuvo un valor de $Z' = 0.65 \pm 0.02$ y la relación Señal específica / señal de fondo fue de 45.33. (**figura 4.18**).

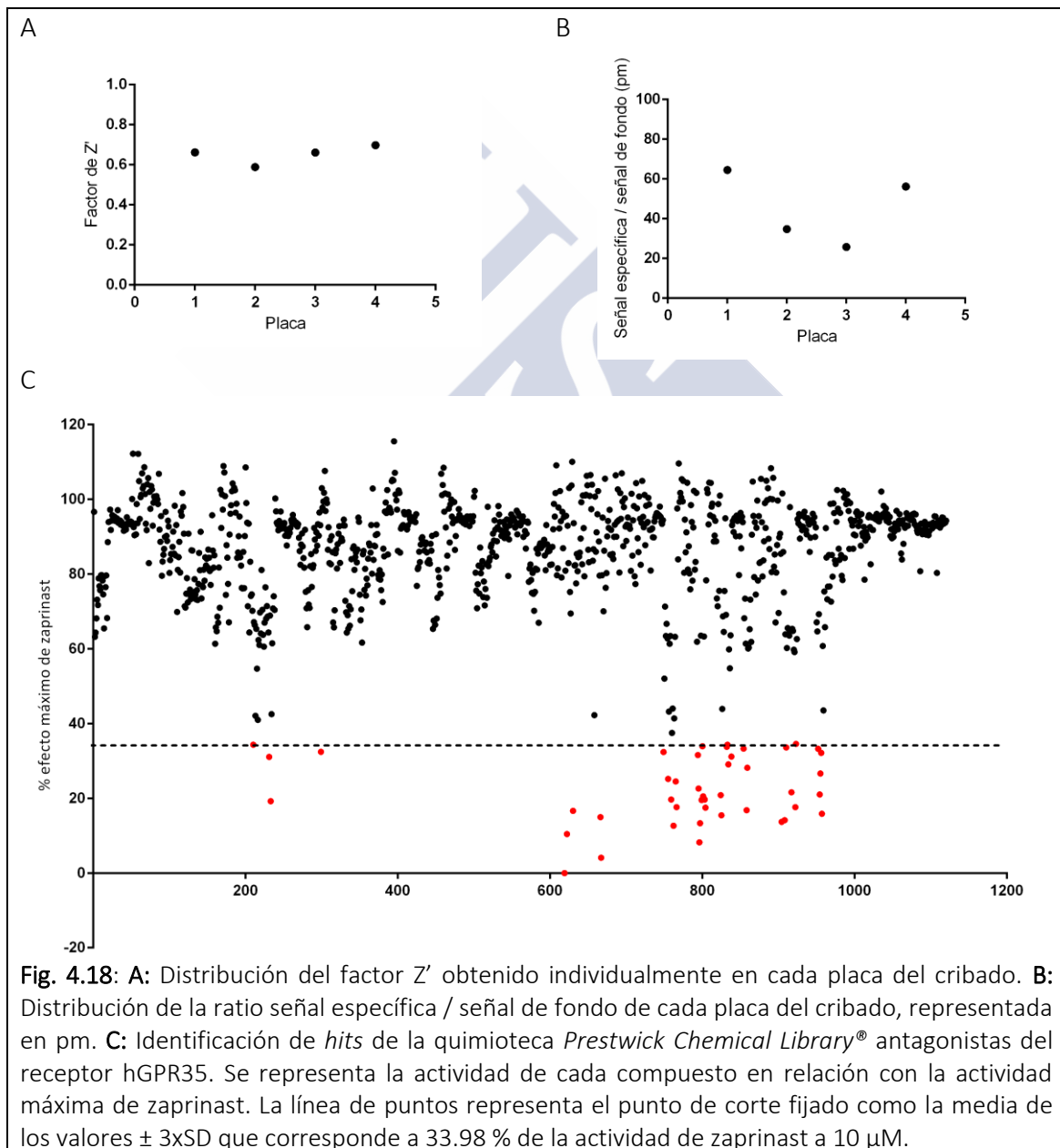
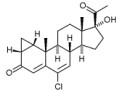
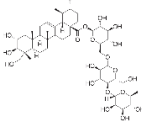
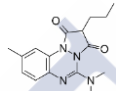
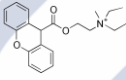
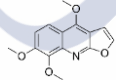
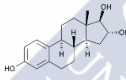
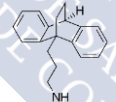
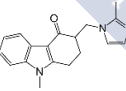
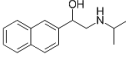
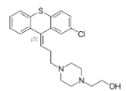
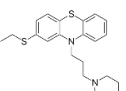
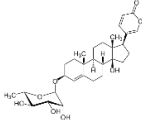
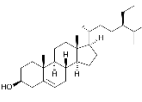


Fig. 4.18: A: Distribución del factor Z' obtenido individualmente en cada placa del cribado. B: Distribución de la ratio señal específica / señal de fondo de cada placa del cribado, representada en pm. C: Identificación de *hits* de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] antagonistas del receptor hGPR35. Se representa la actividad de cada compuesto en relación con la actividad máxima de zaprinast. La línea de puntos representa el punto de corte fijado como la media de los valores $\pm 3 \times \text{SD}$ que corresponde a 33.98 % de la actividad de zaprinast a 10 μM .

Resultados

Tabla 4.11: Porcentajes de actividad de compuestos identificados como *hits* antagonistas de hGPR35 mediante DMR. Valores correspondientes al cálculo de % de actividad con relación a la actividad máxima de zaprinast.

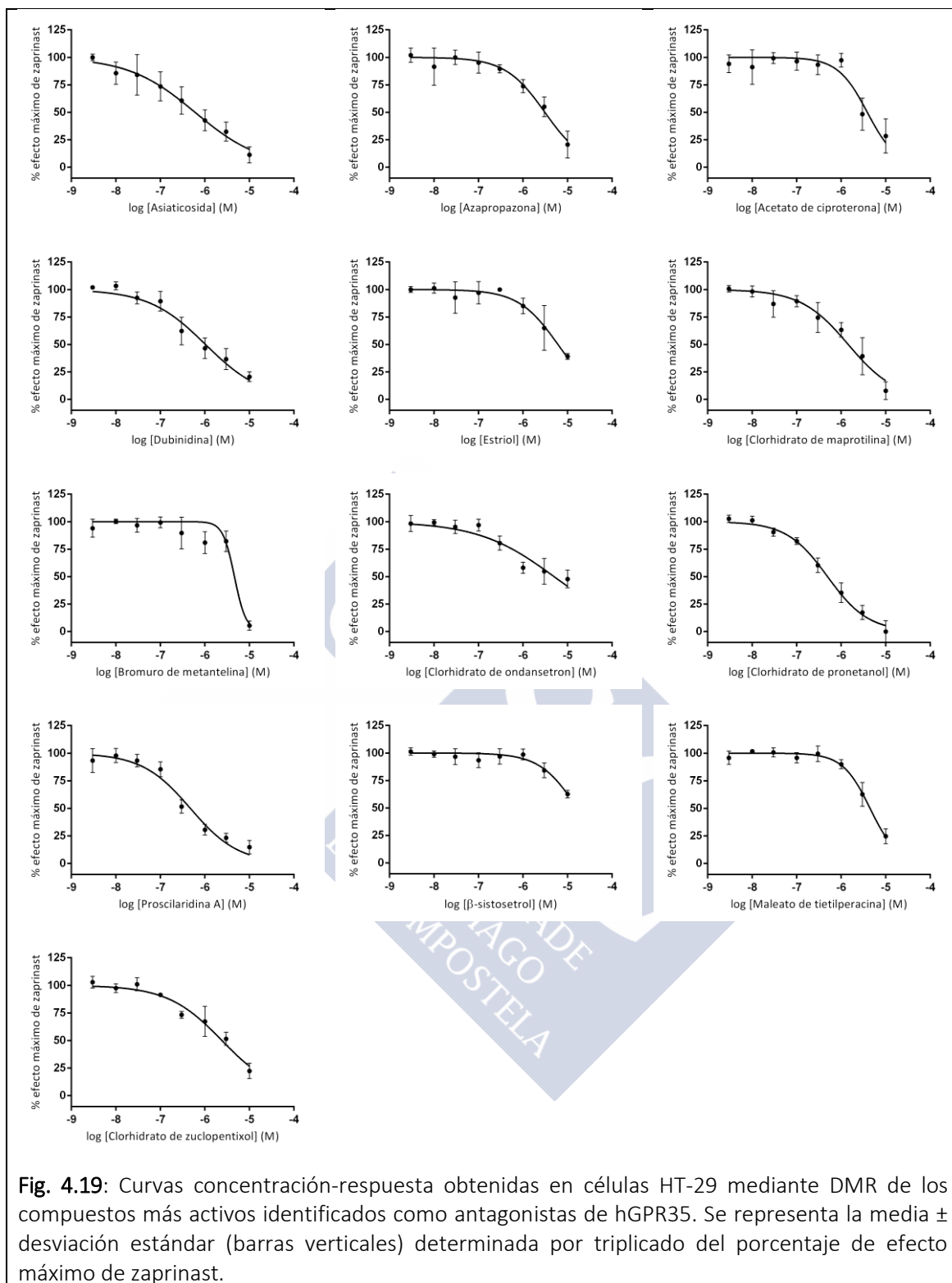
Identificación y confirmación de antagonistas de hGPR35			
Compuesto	Estructura	HTS % Actividad (10 μ M)	Confirmación % Actividad (10 μ M)
Acetato de ciproterona		70.18	58.61
Asiaticosida		84.54	100.04
Azapropazona		71.73	63.15
Bromuro de metantelina		73.61	31.33
Dubinidina		84.12	42.78
Estriol		75.67	55.06
Hidrocloruro de maprotilina		77.58	92.66
Hidrocloruro de ondansetron		82.51	51.18
Hidrocloruro de pronetalol		77.39	38.32
Hidrocloruro de zuclopentixol		83.18	46.80
Maleato de tietilperacina		79.15	53.07
Prsocillaridina A		87.35	51.44
β -sistosetrol		72.49	45.95

Posteriormente, en un ensayo de confirmación, se descartaron 28 compuestos identificados como falsos positivos debido a interacciones con la metodología de medida. En la **tabla 4.11** se muestra el resultado tras la confirmación de los compuestos antagonistas de hGPR35.

Tabla 4.12: Valores de potencia (IC_{50}) y de % de reversión del efecto de zaprinast de cada antagonista de hGPR35

Antagonismo hGPR35		
Compuesto	IC_{50} (μ M)	% reversión
Acetato de ciproterona	3.86 ± 1.17	71.59 ± 8.98
Asiaticosida	0.60 ± 0.12	88.70 ± 4.19
Azapropazona	3.09 ± 1.15	79.39 ± 3.02
Bromuro de metantelina	4.6 ± 1.13	94.54 ± 2.4
Dubinidina	1.03 ± 0.11	79.46 ± 2.62
Estriol	6.09 ± 1.18	60.93 ± 1.51
Hidrocloruro de maprotilina	1.44 ± 1.12	92.19 ± 4.61
Hidrocloruro de ondansetron	4.98 ± 1.28	52.17 ± 4.73
Hidrocloruro de pronetalol	0.49 ± 0.11	100.00 ± 5.70
Hidrocloruro de zuclopentixol	2.42 ± 1.15	77.60 ± 3.97
Maleato de tietilperazina	4.45 ± 1.08	75.31 ± 3.89
Proscilaridina A	0.47 ± 0.11	85.22 ± 3.54
β -sistosetrol	16.3 ± 1.21	37.41 ± 2.04

Se estudió la potencia de estos 13 compuestos mediante el cálculo de su IC_{50} , en un ensayo en el que se construyeron curvas concentración respuesta a partir de diluciones seriadas de dichos compuestos, coincubados con zaprinast (**figura 4.19**). Los resultados del ensayo se resumen en la **tabla 4.12**.



De los 13 compuestos ensayados, 6 de ellos (acetato de ciproterona, estriol, clorhidrato de ondansetron, β -sisotsetrol, maleato de tietilperacina y clorhidrato de zuclopentixol) no inhiben completamente la actividad del zaprinast sobre hGPR35, por este motivo, el valor de IC_{50} extrapolado por el software de análisis puede no estar

estimado con precisión. Por otra parte, clorhidrato de pronetalol y proscillaridina A presentan curvas concentración respuesta y valores de IC_{50} similares (0.49 μ M y 0.47 μ M respectivamente), ambos con una potencia de inhibición considerablemente alta.

4.3.2 Estudios de DMR en rGPR35

4.3.2.1 El sulindac fue identificado como el agonista más activo de rGPR35.

El cribado se realizó a partir de la primera lectura cinética tras la administración de los compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®], permitió identificar 13 compuestos como *hits* (entre los que se encuentra zaprinast) que superaron el punto de corte establecido. En este cribado se obtuvo un valor de $Z'=0.57 \pm 0.02$ y la relación Señal específica / señal de fondo fue de 16.58 (**figura 4.20**).

En un siguiente ensayo de confirmación se descartaron 6 compuestos, reconocidos como falsos positivos debido a interferencias con la metodología de medida de DMR. Los compuestos descartados fueron: R (-) apomorfina clorhidrato hemihidrato, hidrocloreuro de metanefrina, hidrocloreuro de Imipramina, hidrocloreuro de amitriptilina, metilsulfato de difemanil y dihidrocloreuro de trifluoperacina. Se determinó una actividad cercana al 50% del efecto máximo del zaprinast para 3 de los 7 compuestos que resultaron activos: metolazona, dapsona e hidrocloreuro de adifenina. Los otros cuatro *hits* identificados (zaprinast, hidrobromuro de fenoterol, tamoxifen citrato y sulindac), alcanzaron porcentajes de actividad superiores al 95% (**tabla 4.13**).

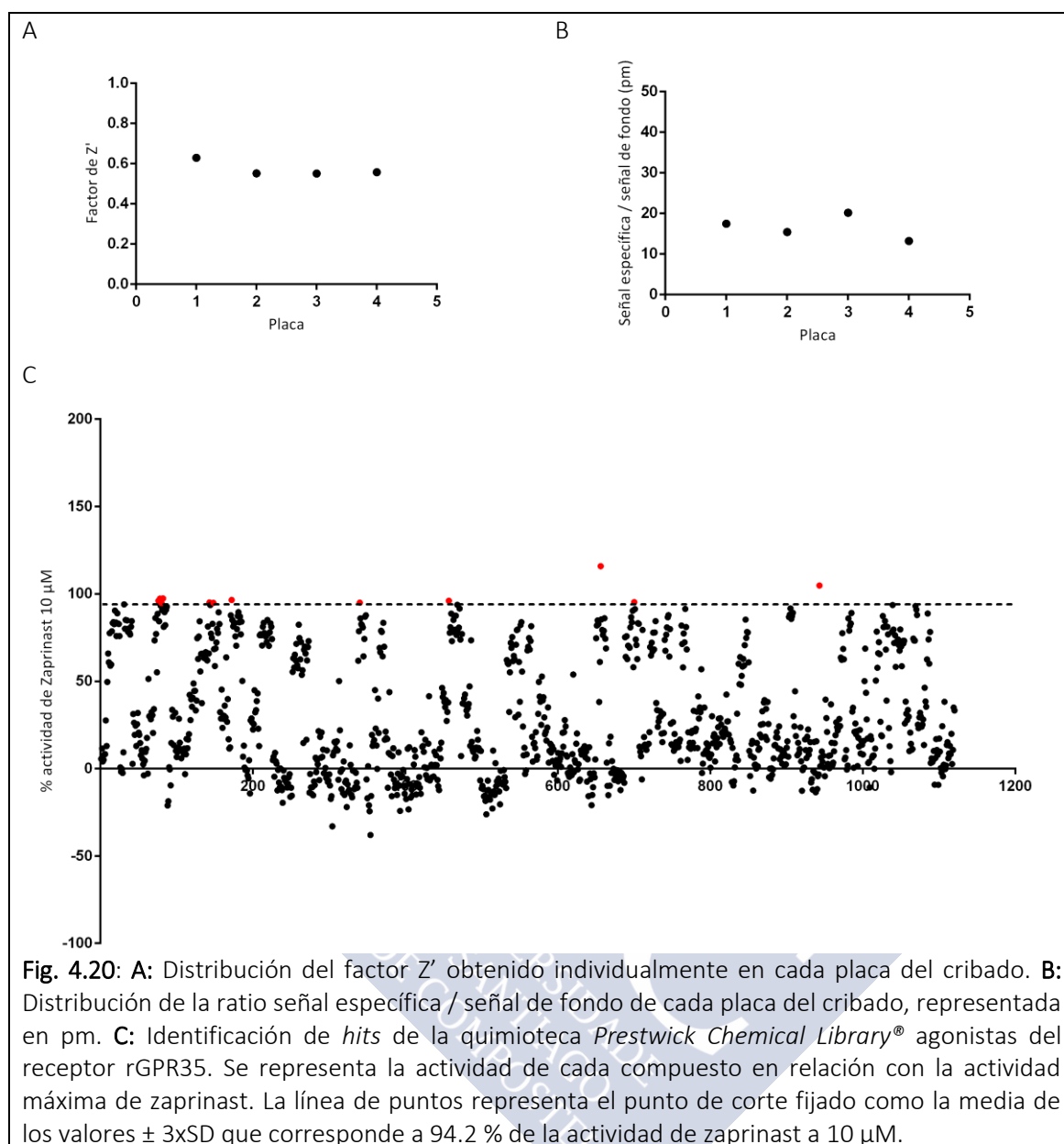
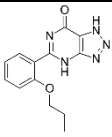
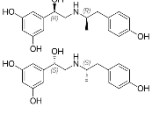
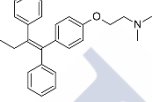
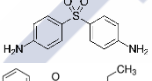
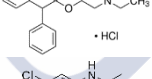
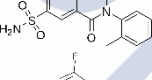
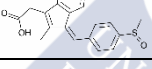


Fig. 4.20: **A:** Distribución del factor Z' obtenido individualmente en cada placa del cribado. **B:** Distribución de la ratio señal específica / señal de fondo de cada placa del cribado, representada en pm. **C:** Identificación de *hits* de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] agonistas del receptor rGPR35. Se representa la actividad de cada compuesto en relación con la actividad máxima de zaprinast. La línea de puntos representa el punto de corte fijado como la media de los valores $\pm 3 \times \text{SD}$ que corresponde a 94.2 % de la actividad de zaprinast a 10 μM .

Tabla 4.13: Porcentajes de actividad de compuestos identificados como *hits* agonistas de rGPR35 mediante DMR. Valores correspondientes al cálculo de % de actividad con relación a la actividad máxima de zaprinast.

Identificación y confirmación de agonistas de rGPR35			
Compuesto	Estructura	HTS % Actividad (10 μ M)	Confirmación % Actividad (10 μ M)
Zaprinast		97.05	98.17
Bromhidrato de fenoterol		115.82	106.55
Citrato de tamoxifeno		104.78	95.41
Dapsona		94.88	50.71
Hidrocloruro de adifenina		97.39	41.43
Metolazona		95.13	65.23
Sulindac		97.38	100.18

Se determinó la potencia de los compuestos más activos identificados anteriormente (zaprinast, hidrobromuro de fenoterol, tamoxifen citrato y sulindac) mediante el cálculo de su EC_{50} . A partir de un ensayo en el que se incluyeron diluciones seriadas de cada compuesto, se construyeron curvas concentración respuesta (**figura 4.21**) obteniendo los resultados que se resumen en la **tabla 4.14**:

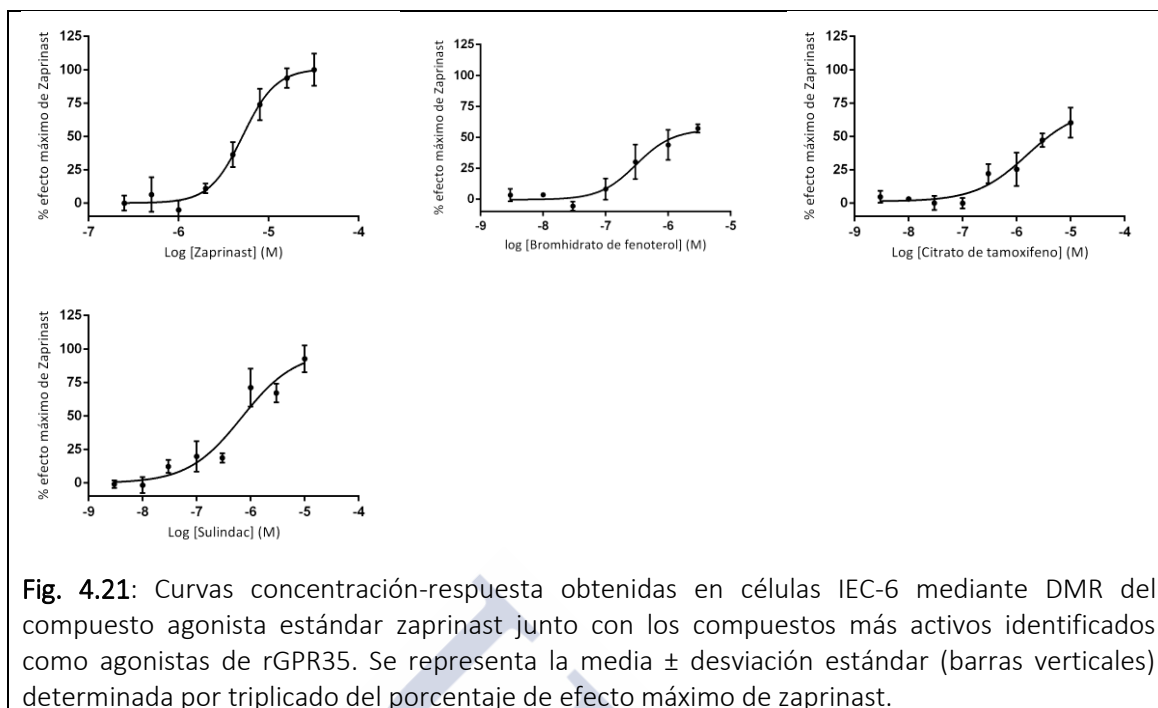


Tabla 4.14: Valores de potencia (EC_{50}) y de eficacia (E_{max}) de cada agonista de rGPR35.

Agonismo rGPR35		
Compuesto	EC_{50} (μ M)	E_{max} (% actividad)
Zaprinast	5.15 ± 1.10	100.00 ± 5.36
Bromhidrato de fenoterol	0.31 ± 0.65	57.17 ± 1.94
Citrato de tamoxifeno	1.57 ± 0.07	71.24 ± 11.23
Sulindac	0.69 ± 0.10	98.29 ± 15.18

Sulindac fue el compuesto más activo con una $EC_{50} = 0.69 \mu\text{M}$. El citrato de tamoxifeno con una $EC_{50} = 1.57 \mu\text{M}$ se comportó como un agonista parcial para este receptor con un máximo de actividad del 71.24 % con respecto al efecto máximo de zaprinast. Bromhidrato de fenoterol, aunque a la concentración máxima ensayada ($10 \mu\text{M}$) alcanzó una actividad incluso superior a la del zaprinast; no describió una verdadera curva sigmoidea, por lo que no se ajusta correctamente a un modelo concentración dependiente y el valor de $EC_{50} = 1.23 \mu\text{M}$ extrapolado por el software de análisis parece claramente sobreestimado.

4.3.2.2 El bromuro de hemicolinio fue identificado como el antagonista más activo de rGPR35.

El cribado se realizó a partir de la segunda lectura cinética tras la administración de los compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] y la

administración de zaprinast. Se identificaron 3 compuestos como *hits*: quinacrina, tosilato de clofilium y bromuro de hemicolinio. Posteriormente, estos tres compuestos fueron incluidos en un ensayo de confirmación (**tabla 4.15**). En este cribado se obtuvo un valor de $Z'=0.72 \pm 0.05$ y la relación Señal específica / señal de fondo fue de 12.83 (**figura 4.22**).

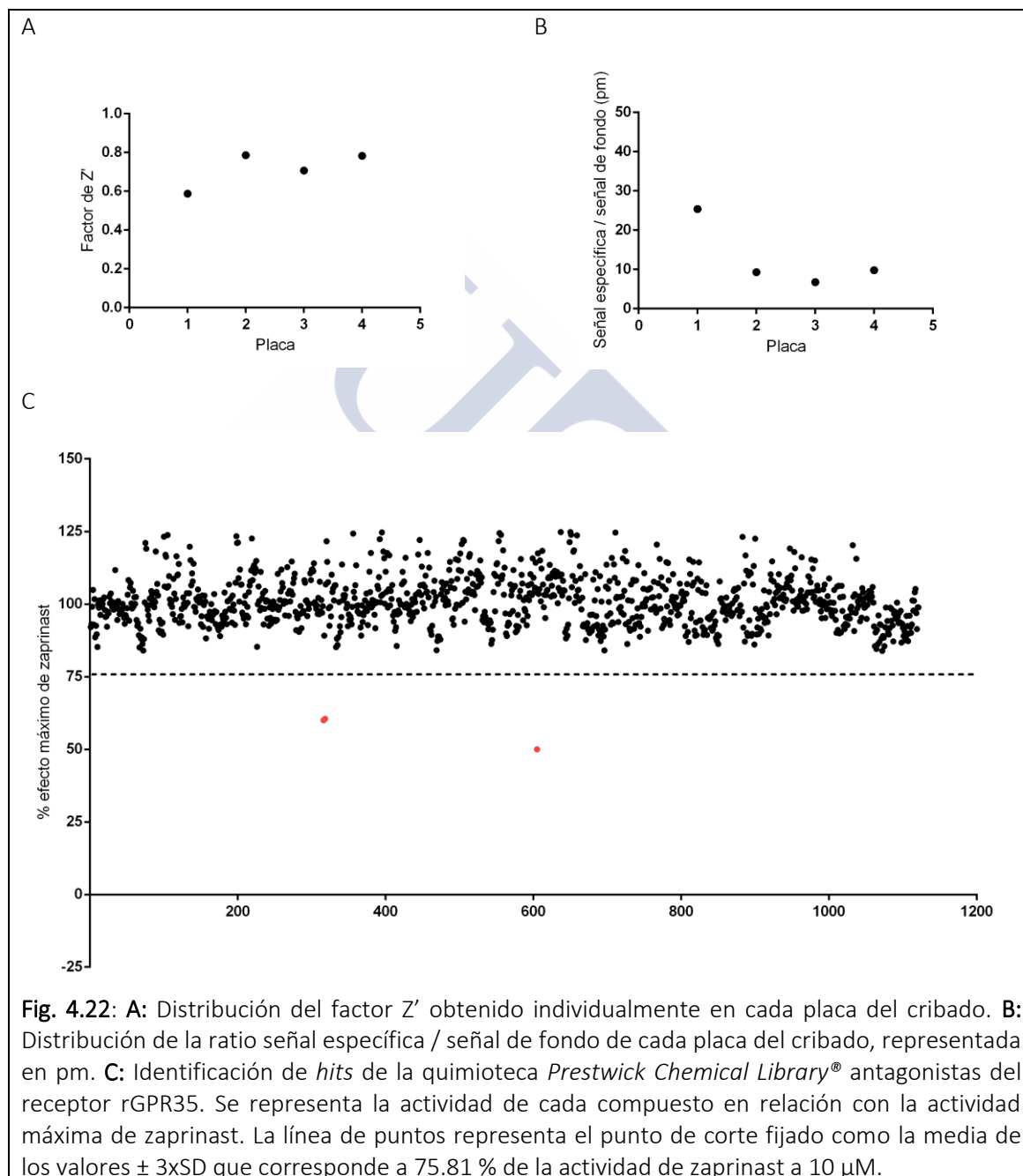
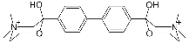
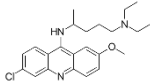
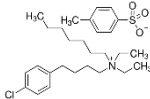


Tabla 4.15: Porcentajes de actividad de compuestos identificados como *hits* antagonistas de rGPR35 mediante DMR. Valores correspondientes al cálculo de % de actividad con relación a la actividad máxima de Zaprínast.

Antagonismo rGPR35			
Compuesto	Estructura	% Inhibición (10 μ M)	% Inhibición (10 μ M)
Bromuro de hemicolinio		50.03	99.99
Quinacrina		39.99	65.20
Tosilato de clofilium		39.47	66.48

Se determinó la potencia de los tres compuestos activos mediante el cálculo de su IC_{50} (**figura 4.23**); para ello, se realizó un ensayo en el que se construyeron curvas concentración respuesta a partir de diluciones seriadas de dichos compuestos, coincubadas con una dilución de zaprinast 5 μ M, los datos obtenidos se resumen en la **tabla 4.16**.

Bromuro de hemicolinio fue el compuesto más potente, con una $IC_{50} = 0.47 \mu$ M y el único antagonista total identificado.

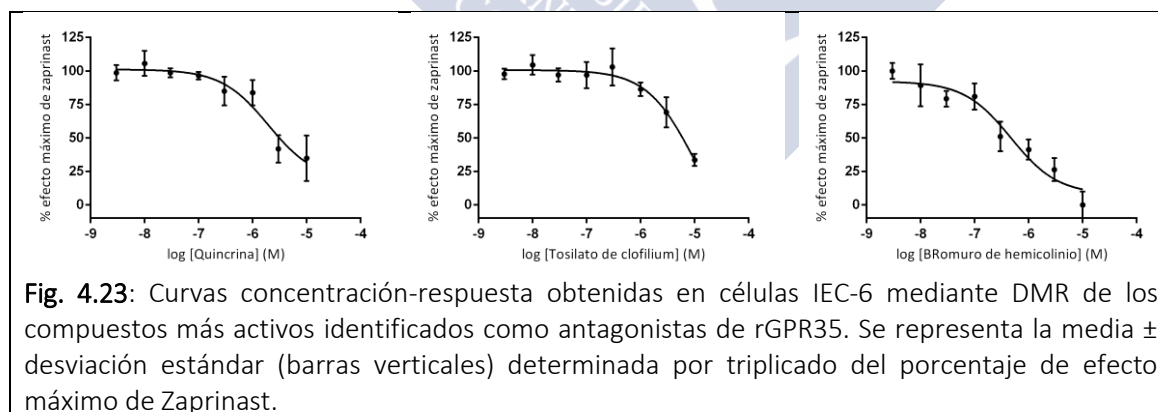


Tabla 4.16: Valores de potencia (IC_{50}) y % de reversión del efecto de zaprinast de cada antagonista de rGPR35.

Antagonismo rGPR35		
Compuesto	IC_{50} (μ M)	% reversión
Bromuro de hemicolinio	0.47 ± 0.07	92.22 ± 7.18
Quinacrina	1.97 ± 0.66	82.50 ± 10.95
Tosilato de clofilium	9.46 ± 0.57	66.48 ± 4.59

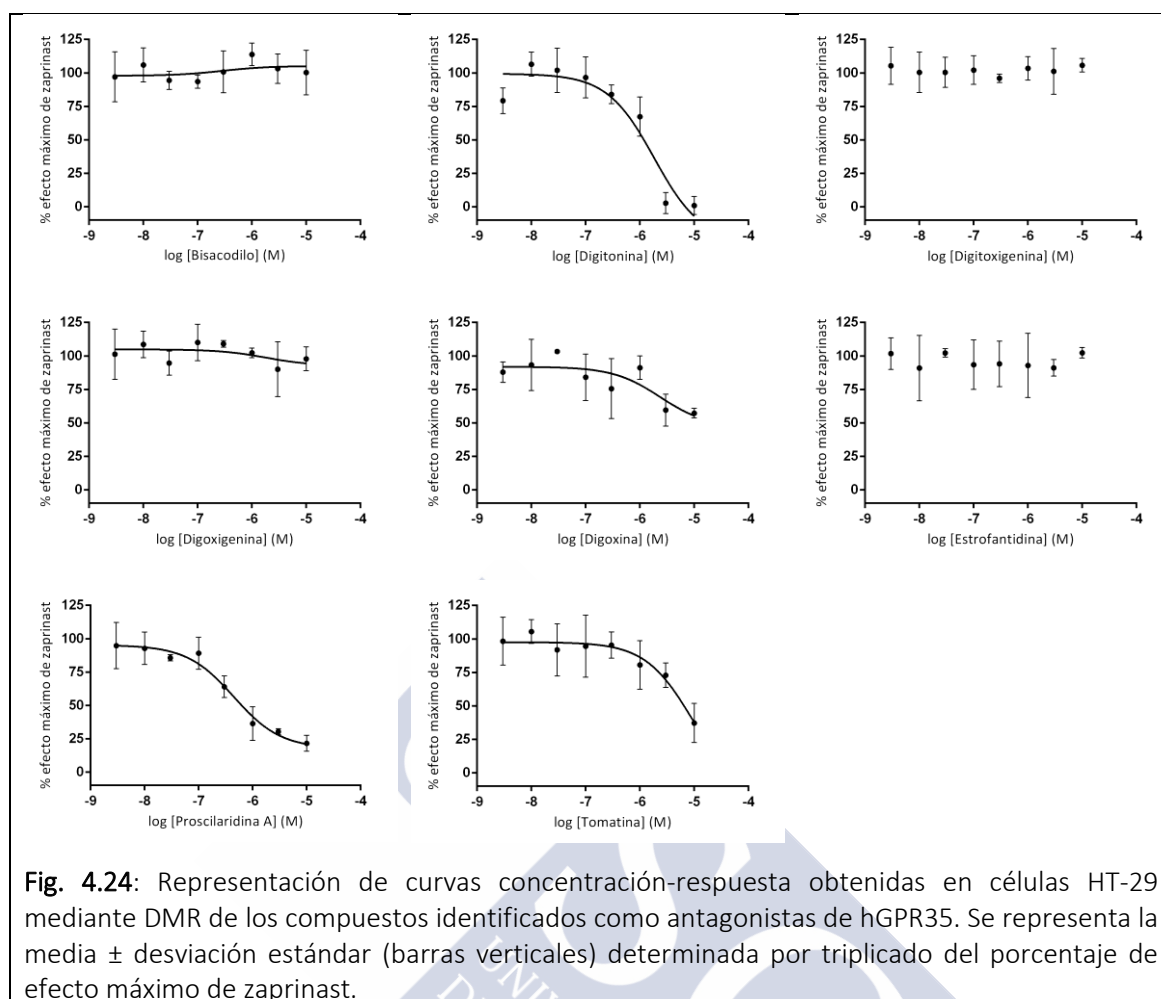
4.4 Los antagonistas identificados mostraron diferencias atribuibles a selectividad funcional e interespecie.

4.4.1 La digitonina se confirmó en un ensayo de DMR como el antagonista más activo de hGPR35.

Para caracterizar los compuestos identificados como *hits* antagonistas del receptor hGPR35, en el cribado de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®], mediante BRET; se evaluaron dichos compuestos en una línea HT-29 en un ensayo de DMR. Para ello se construyeron curvas concentración-respuesta mediante diluciones seriadas de cada uno de ellos y se coincubaron con una concentración de zaprinast 1μ M (**figura 4.24**). Los valores de IC_{50} obtenidos se resumen en la **tabla 4.17**.

Tabla 4.17: Valores de potencia (IC_{50}) y % de reversión del efecto máximo de zaprinast obtenidos mediante DMR para cada antagonista de hGPR35.

Antagonismo hGPR35		
Compuesto	IC_{50} (μ M)	% reversión
Bisacodilo	-	-
Digitonina	1.83 ± 0.66	99.07 ± 6.75
Digitoxigenina	-	-
Digoxigenina	-	-
Digoxina	2.38 ± 0.31	53.30 ± 17.54
Estrofantidina	-	-
Proscillaridina A	0.45 ± 0.24	78.43 ± 3.41
Tomatina	9.29 ± 0.32	62.80 ± 14.60



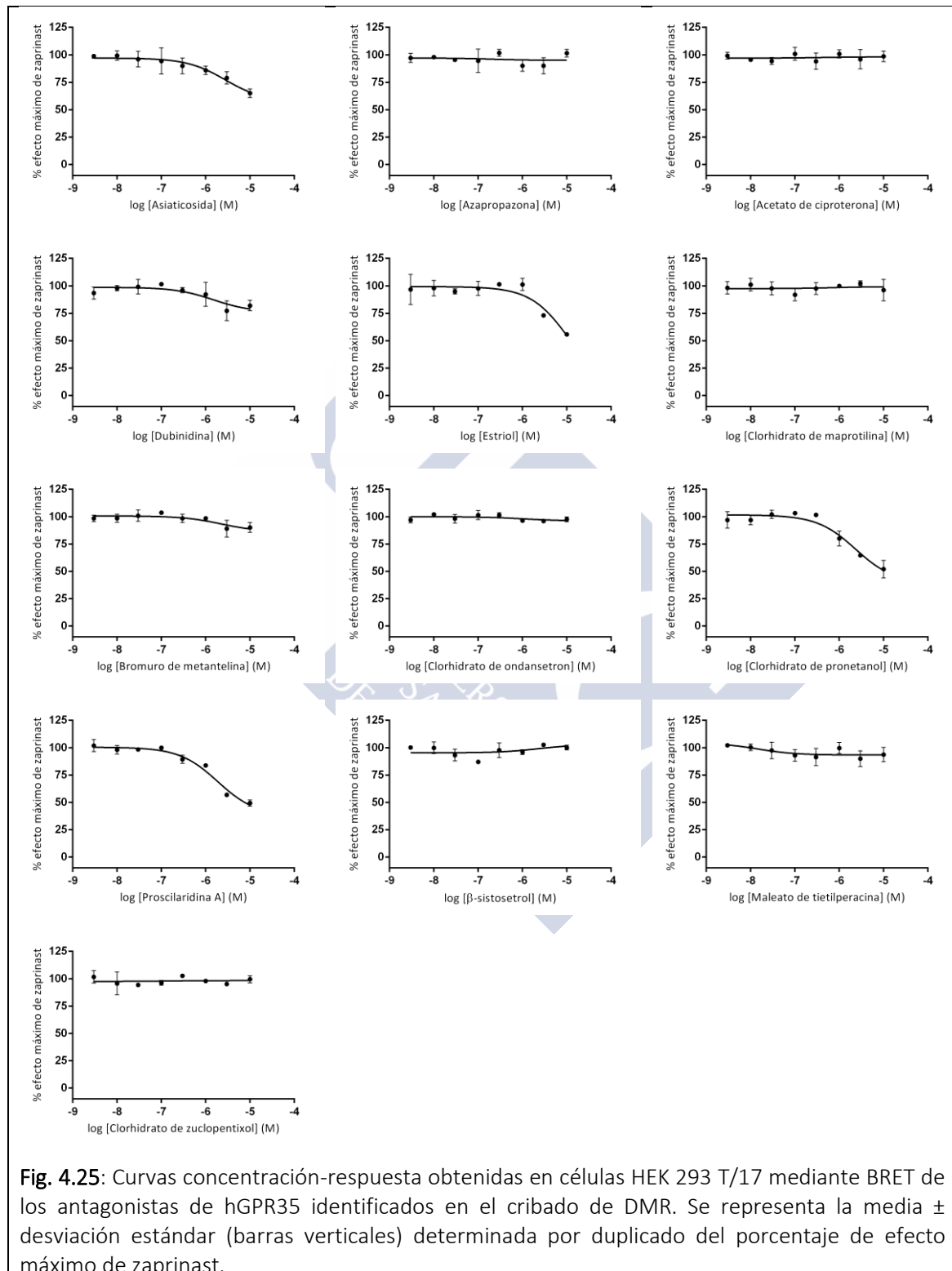
De los compuestos ensayados, solo la digitonina inhibió completamente la actividad del zaprinast; tres compuestos: digoxina, proscillaridina y tomatina; resultaron inhibidores parciales, por este motivo, el valor de IC_{50} extrapolado por el software de análisis puede no estar estimado con precisión. Para los cuatro compuestos restantes, debido a la poca actividad que presentaron, no fue posible obtener un valor de IC_{50} .

4.4.2 El hidrocloreuro de pronetalol y la proscillaridina A se confirmaron en un ensayo de BRET como los antagonistas más activos de hGPR35.

Los compuestos identificados como *hits* antagonistas del receptor hGPR35, en el cribado de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] mediante DMR, fueron posteriormente estudiados en un ensayo de BRET.

Para estudiar la actividad de los compuestos, se diseñó un ensayo en el que se construyeron curvas concentración respuesta mediante diluciones seriadas de

dichos compuestos coincubadas con zaprinast 10 μM (**figura 4.25**) o ácido pamoico 1 μM (**figura 4.26**); obteniendo los valores de potencia y eficacia que se resuemen en la **tabla 4.18**



Resultados

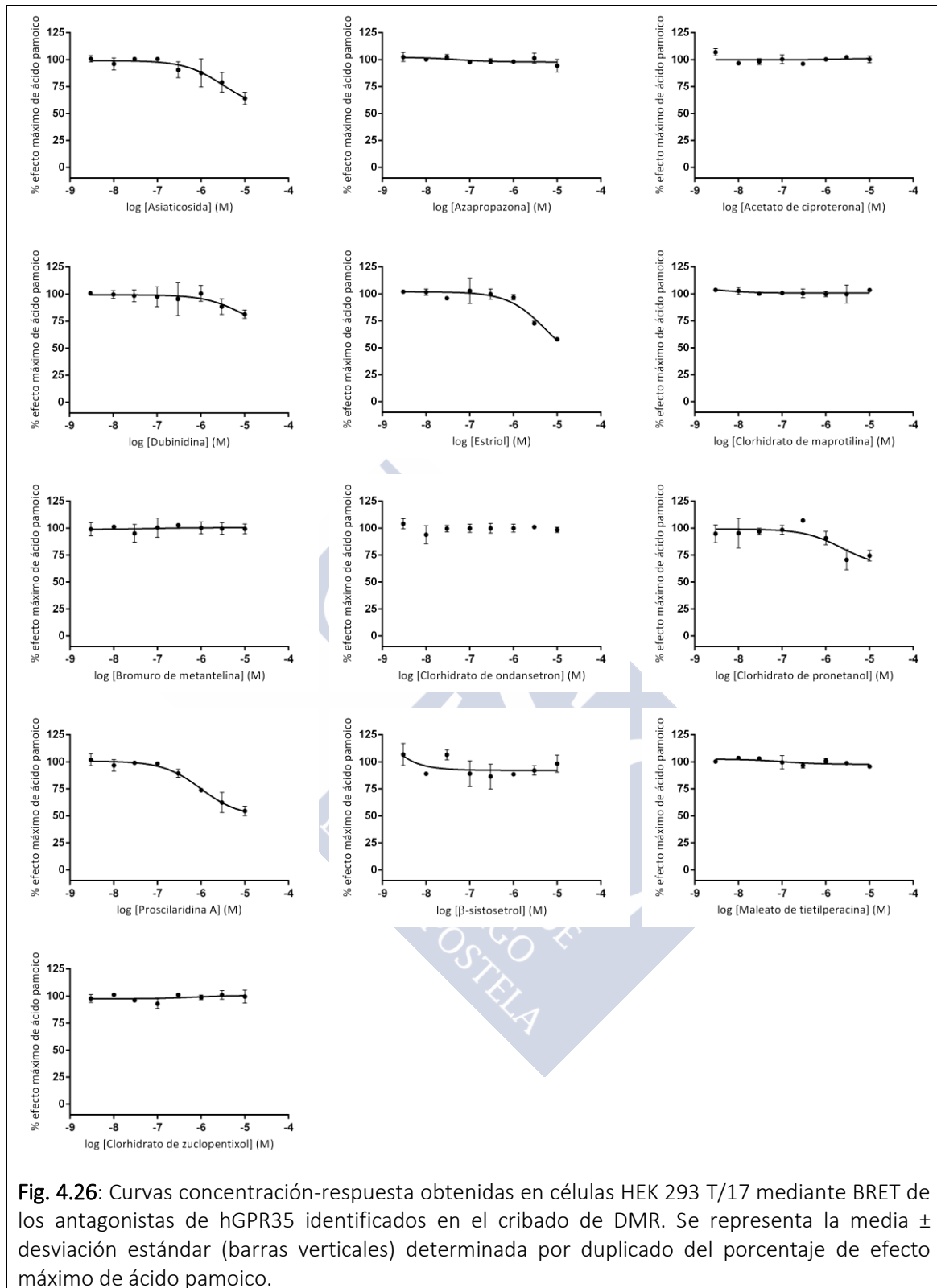


Tabla 4.18: Valores de potencia (IC_{50}) y de % de reversión del efecto máximo del agonista obtenidos mediante BRET para cada antagonista de hGPR35.

Compuesto	Antagonismo hGPR35			
	IC_{50} (μM) frente zaprinast	% reversión	IC_{50} (μM) frente ácido pamoico	% reversión
Acetato de ciproterona	-	-	-	-
Asiaticosida	5.35 ± 0.46	34.92 ± 3.97	5.48 ± 0.46	35.91 ± 5.61
Azapropazona	-	-	-	-
Bromuro de metantelina	-	-	-	-
Dubinidina	-	-	-	-
Estriol	10.7 ± 0.62	44.25 ± 0.37	6.92 ± 0.69	42.14 ± 1.84
hidrocloruro de maprotilina	-	-	-	-
hidrocloruro de ondansetron	-	-	-	-
hidrocloruro de pronetalol	1.65 ± 0.68	47.98 ± 8.02	2.13 ± 0.38	25.60 ± 4.62
Hidrocloruro de zuclopentixol	-	-	-	-
Maleato de tietilperacina	-	-	-	-
Proscillaridina A	2.18 ± 0.73	50.71 ± 2.89	0.59 ± 0.07	45.53 ± 4.47
β -sistosetrol	-	-	-	-

De los compuestos estudiados solo cuatro de ellos (asiaticosida, clorhidrato de pronetalol, proscillaridina A y estriol) resultaron suficientemente activos como para poder calcular un valor de IC_{50} ; sin embargo, el valor extrapolado por el software de análisis puede no estar estimado con precisión debido al efecto parcial de los mismos.

4.4.3 La tomatina se confirmó en un ensayo de DMR como el antagonista más activo de rGPR35.

Para una mejor caracterización de los compuestos identificados como *hits* antagonistas del receptor rGPR35, en el cribado de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®], mediante un ensayo de BRET; se evaluaron dichos compuestos en una línea celular IEC-6 empleando DMR. Se obtuvieron curvas concentración respuesta para cada compuesto (**figura 4.27**) que permitieron conocer la potencia de cada uno de ellos en esta línea celular.

De los compuestos ensayados, solo la digitonina, con un valor de $IC_{50} = 18.47 \pm 0.31$ μM y la Tomatina, con un valor de $IC_{50} = 2.02 \pm 0.91$ μM inhibieron completamente

la actividad del zaprinast. Para los compuestos restantes, debido a la poca actividad que presentaron, no fue posible obtener un valor de IC₅₀. Los compuestos dienestrol y hexestrol fueron eliminados de este análisis debido a problemas de solubilidad con el buffer empleado en este ensayo.

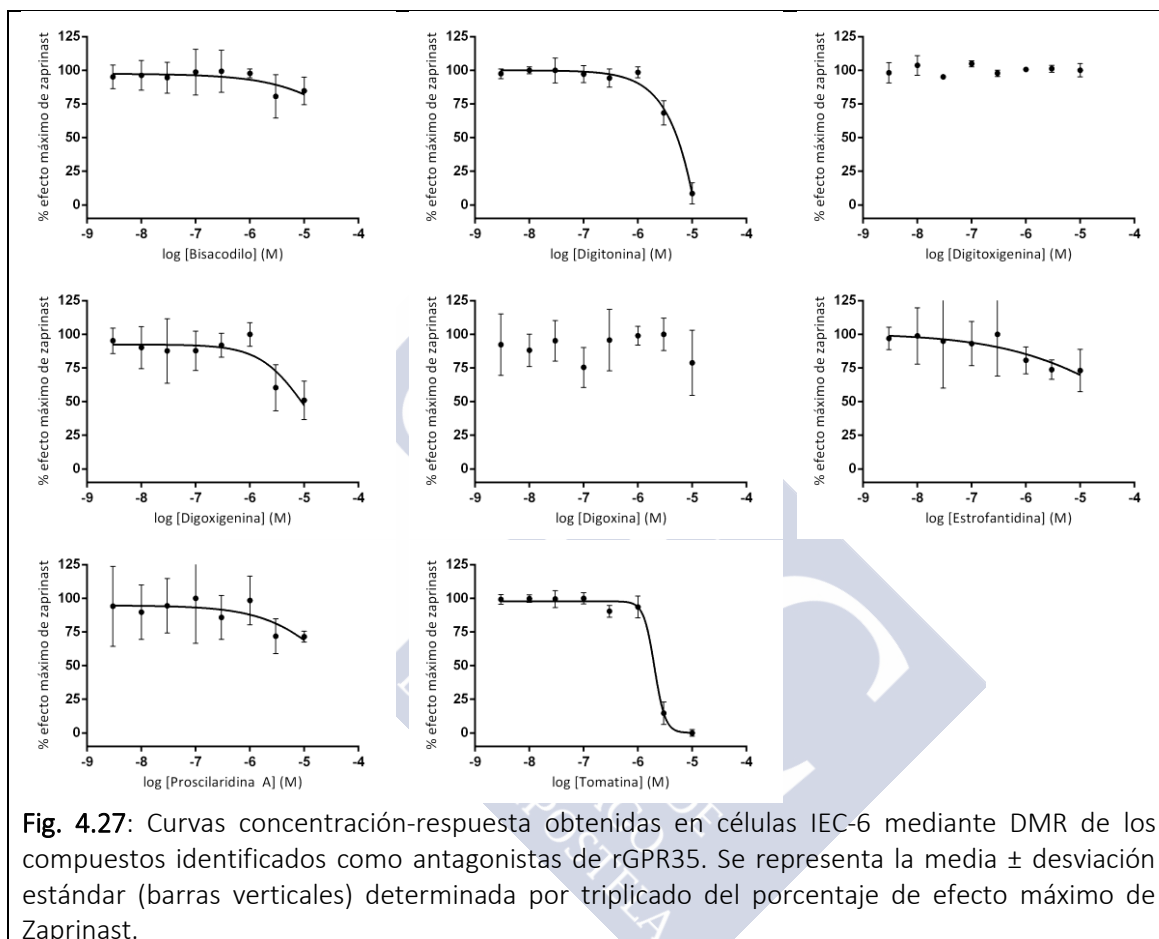


Fig. 4.27: Curvas concentración-respuesta obtenidas en células IEC-6 mediante DMR de los compuestos identificados como antagonistas de rGPR35. Se representa la media ± desviación estándar (barras verticales) determinada por triplicado del porcentaje de efecto máximo de Zaprinast.

4.5 Los antagonistas mostraron un comportamiento compatible con el de moduladores alostéricos negativos de GPR35

4.5.1 Estudio mecanístico del antagonismo de los *hits* identificados en los cribados de hGPR35 y rGPR35 mediante BRET.

Con el propósito de evaluar el comportamiento de los ocho compuestos identificados como antagonistas de los dos ortólogos del receptor estudiados (humano y rata) se se estudió el desplazamiento de las curvas concentración-respuesta de zaprinast (**figura 4.28**) y ácido pamoico (**figura 4.29**) en células HEK 293T/17 transfectadas con hGPR35- β -arrestina-2 mediante ensayos de BRET. Igualmente se estudió el desplazamiento de la curva concentración-respuesta de zaprinast (**figura 4.30**) en células HEK 293T/17 transfectadas con rGPR35- β -arrestina-2 mediante ensayos de BRET. Por último, se desarrolló un ensayo de DMR de desplazamiento de la curva concentración-respuesta de zaprinast (**figura 4.31**) en células HT-29.

Las concentraciones de cada compuesto empleadas para el desplazamiento de las curvas de estándar se establecieron tomando como referencia los valores de actividad y potencia obtenidos para cada uno de ellos.

Los valores de pA_2 obtenidos para cada compuesto y condición se resumen en la **tabla 4.19**.

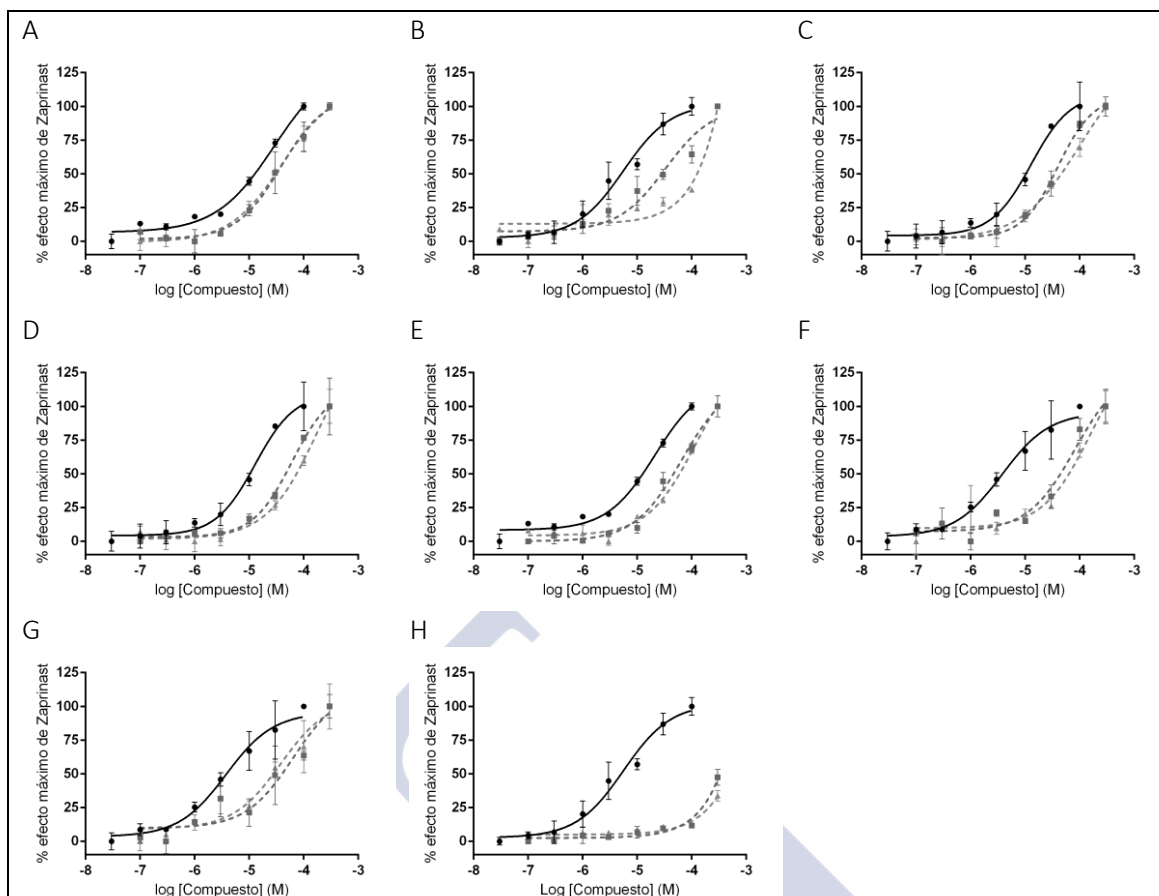
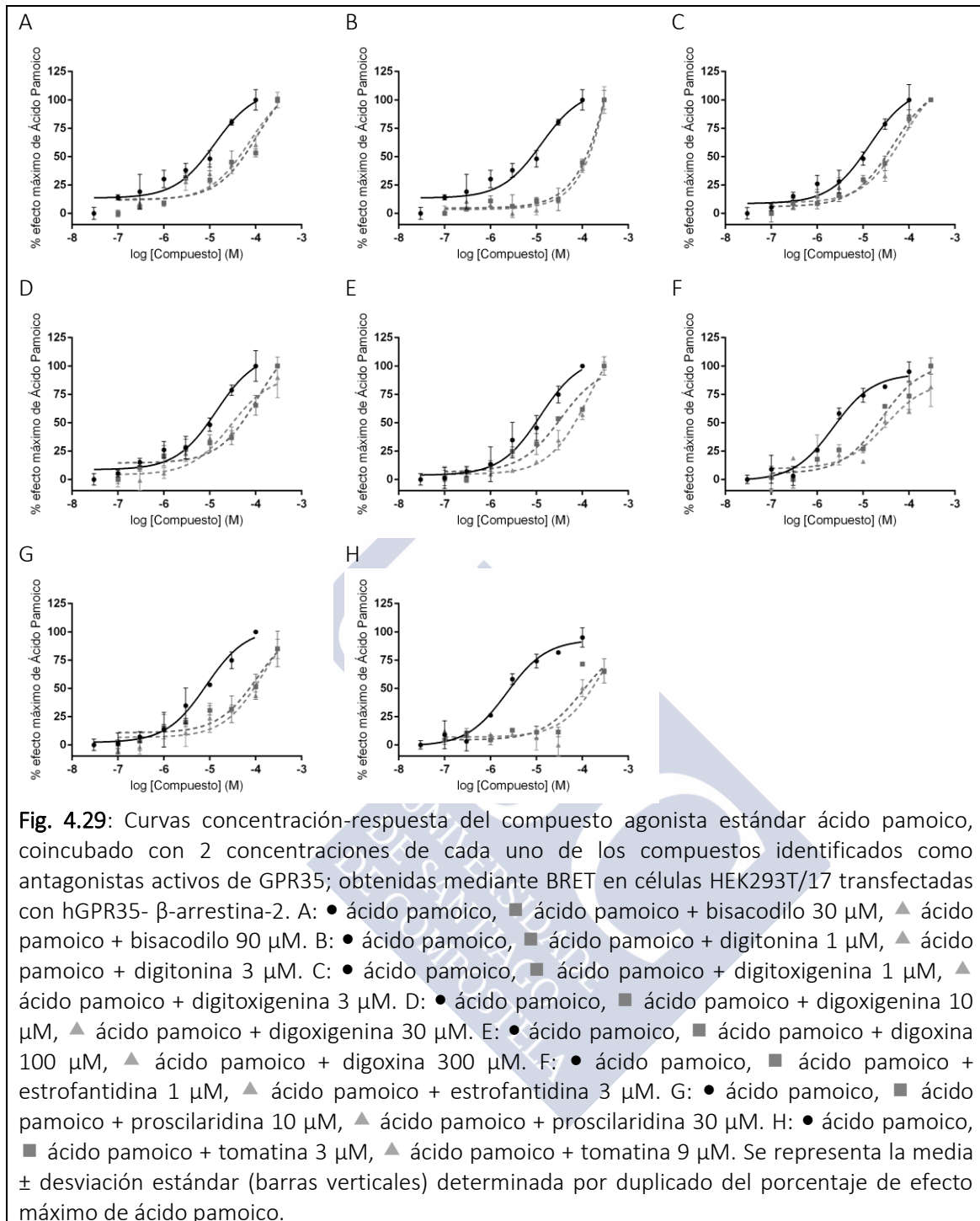


Fig. 4.28: Curvas concentración-respuesta del compuesto agonista estándar zaprinast, coincubado con 2 concentraciones de cada uno de los compuestos identificados como antagonistas activos de GPR35; obtenidas mediante BRET en células HEK293T/17 transfectadas con hGPR35- β -arrestina-2. A: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + bisacodilo 30 μ M, \blacktriangle zaprinast + bisacodilo 90 μ M. B: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + digitonina 1 μ M, \blacktriangle zaprinast + digitonina 3 μ M. C: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + digitoxigenina 1 μ M, \blacktriangle zaprinast + digitoxigenina 3 μ M. D: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + digoxigenina 10 μ M, \blacktriangle zaprinast + digoxigenina 30 μ M. E: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + digoxina 100 μ M, \blacktriangle zaprinast + digoxina 300 μ M. F: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + estrofantidina 1 μ M, \blacktriangle zaprinast + estrofantidina 3 μ M. G: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + proscilaridina 10 μ M, \blacktriangle zaprinast + proscilaridina 30 μ M. H: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + tomatina 3 μ M, \blacktriangle zaprinast + tomatina 9 μ M. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por duplicado del porcentaje de efecto máximo de zaprinast.

En el ensayo de desplazamiento de zaprinast en células HEK 293T/17 transfectadas con hGPR35; solo un compuesto, digitonina, mostró un efecto antagonista concentración-dependiente. Por otra parte, la potencia inhibitoria de la tomatina sobre el zaprinast impidió obtener un valor de pA_2 preciso; además, se pudo identificar la tomatina como un competidor no remontable para el zaprinast con relación a su actividad sobre el receptor hGPR35.



En el ensayo de desplazamiento de ácido pamoico en células HEK 293T/17 transfectadas con hGPR35; ningún compuesto mostró un efecto antagonista concentración-dependiente. Por otra parte, al igual que en el ensayo con zaprinast, se pudo identificar la tomatina como un competidor no remontable para el ácido pamoico con relación a su actividad sobre el receptor hGPR35.

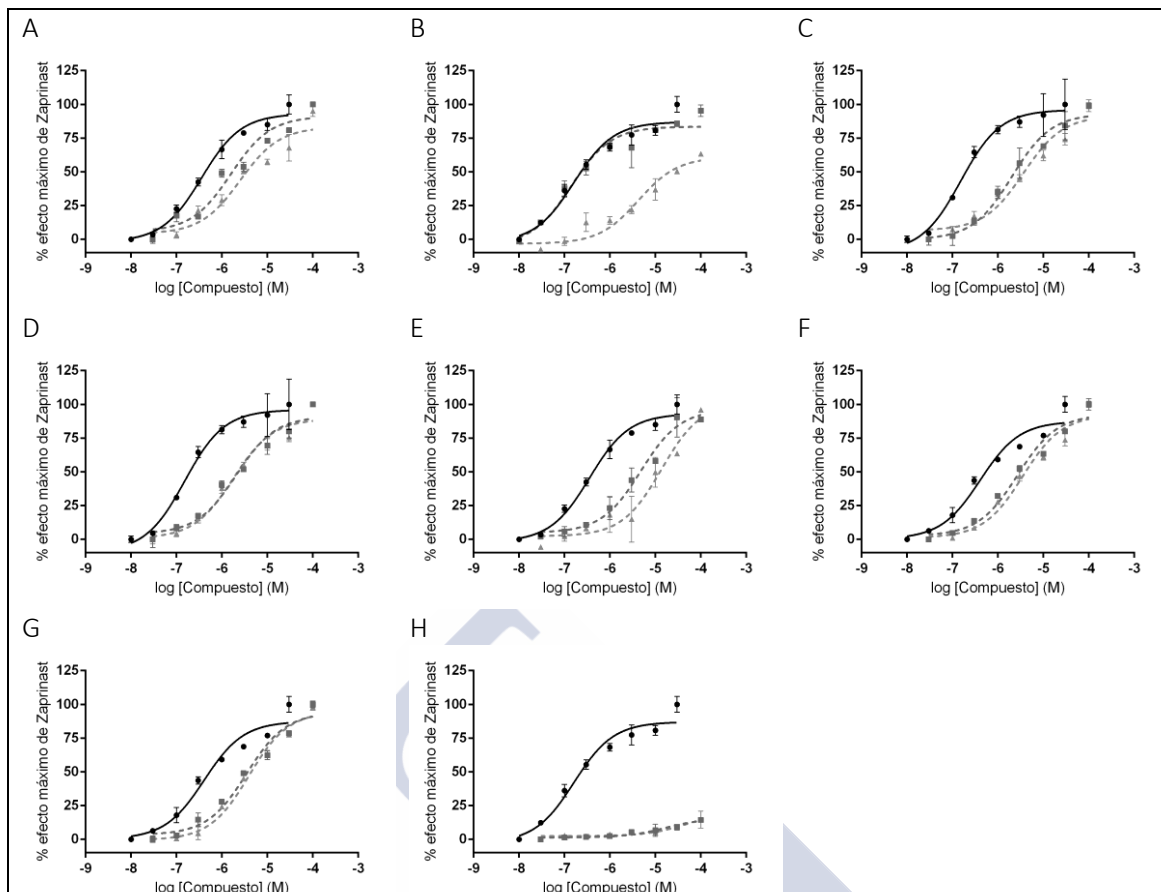
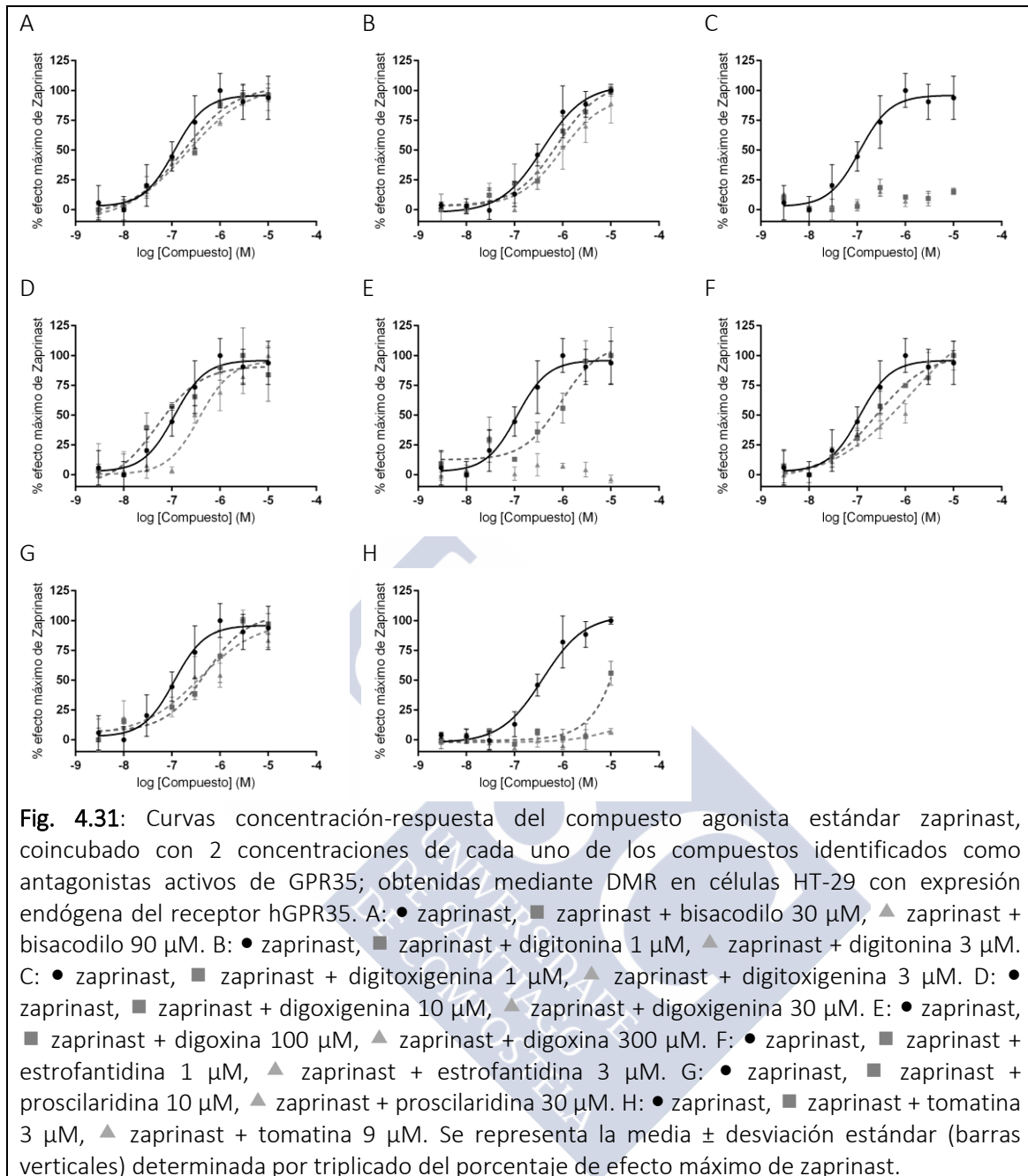


Fig. 4.30: Curvas concentración-respuesta del compuesto agonista estándar zaprinast, coincubado con 2 concentraciones de cada uno de los compuestos identificados como antagonistas activos de GPR35; obtenidas mediante BRET en células HEK293T/17 transfectadas con rGPR35- β -arrestina-2. A: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + bisacodilo 30 μ M, \blacktriangle zaprinast + bisacodilo 90 μ M. B: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + digitonina 1 μ M, \blacktriangle zaprinast + digitonina 3 μ M. C: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + digitoxigenina 1 μ M, \blacktriangle zaprinast + digitoxigenina 3 μ M. D: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + digoxigenina 10 μ M, \blacktriangle zaprinast + digoxigenina 30 μ M. E: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + digoxina 100 μ M, \blacktriangle zaprinast + digoxina 300 μ M. F: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + estrofantidina 1 μ M, \blacktriangle zaprinast + estrofantidina 3 μ M. G: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + proscillaridina 10 μ M, \blacktriangle zaprinast + proscillaridina 30 μ M. H: \bullet zaprinast, \blacksquare zaprinast + tomatina 3 μ M, \blacktriangle zaprinast + tomatina 9 μ M. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por duplicado del porcentaje de efecto máximo de zaprinast.

En el ensayo de desplazamiento de zaprinast en células HEK 293T/17 transfectadas con rGPR35; no se pudo demostrar un efecto antagonista concentración-dependiente para ninguno de los compuestos. Por otra parte, la potencia inhibitoria de la tomatina sobre el zaprinast impidió obtener un valor de pA_2 preciso; además, la tomatina actuó como un competidor no remontable para el zaprinast con relación a su actividad sobre el receptor rGPR35.



En el ensayo de desplazamiento de zaprinast en células HT-29 con expresión endógena de hGPR35; no se pudo demostrar un efecto antagonista concentración-dependiente de ninguno de los compuestos estudiados. Por otra parte, la potencia inhibitoria de la digitoxigenina y la tomatina sobre el efecto de zaprinast impidió obtener un valor de pA_2 , comportándose ambos compuestos como competidores no remontables para el zaprinast con relación a su actividad sobre el receptor hGPR35.

Tabla 4.19: Valores de la medida de antagonismo (pA_2) obtenidos para cada compuesto estudiado como antagonista de zaprinast y/o ácido pamoico en hGPR35 y rGPR35.

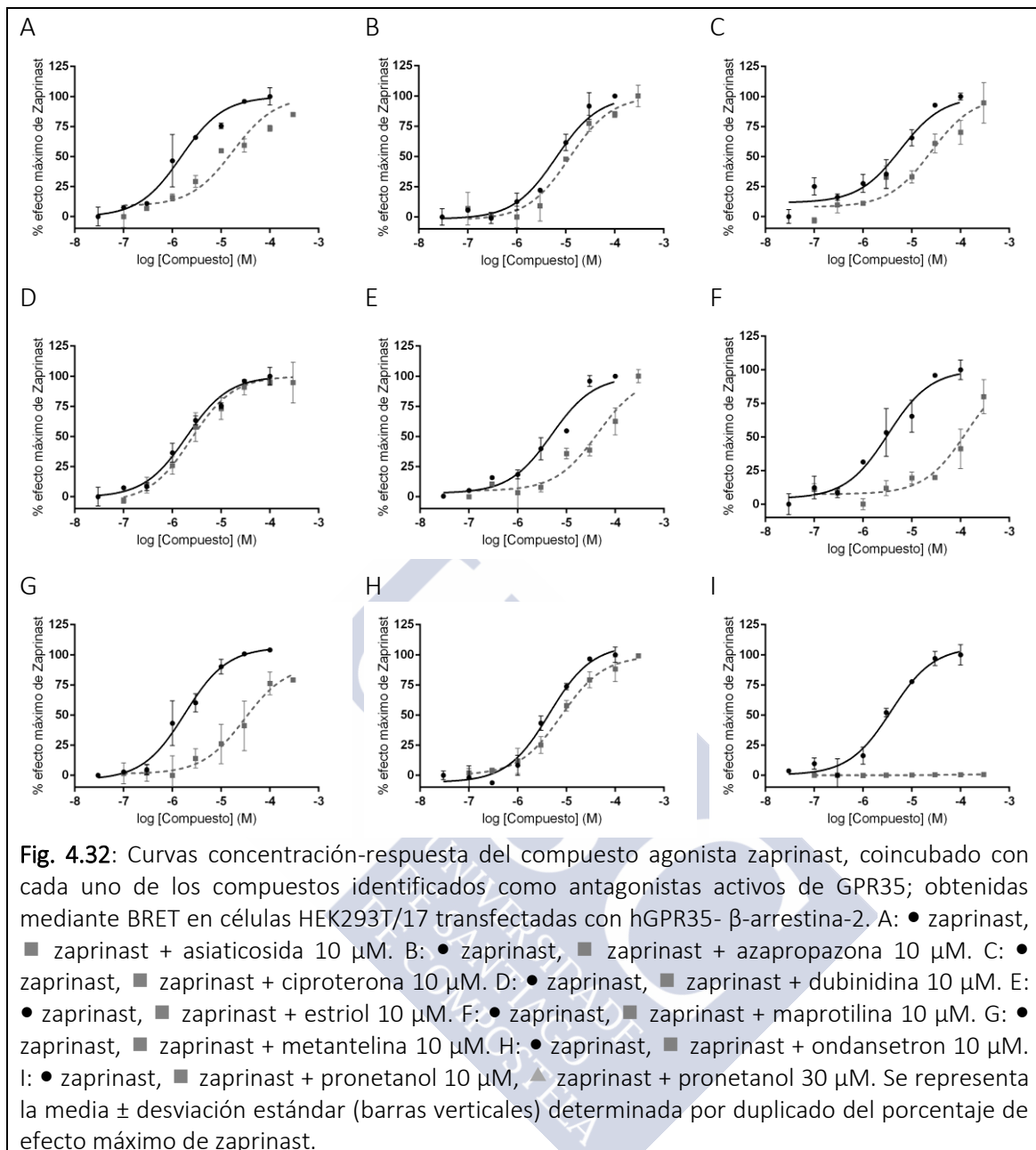
Compuesto	Medida de antagonismo (pA_2)			
	BRET / hGPR35		BRET / rGPR35	DMR / hGPR35
	Zaprinast	Pamoico	Zaprinast	Zaprinast
Bisacodilo	3.59	5.40	5.06	4.30
Digitonina	6.69	7.35	6.92	5.67
Digitoxigenina	6.32	6.36	7.09	-
Diogoxigenina	5.57	5.86	6.10	4.89
Digoxina	4.32	4.54	5.09	-
Estrofantidina	7.32	7.01	6.75	6.55
Proscilaridina A	6.20	6.09	5.40	5.55
Tomatina	11.16	7.17	7.52	10.52

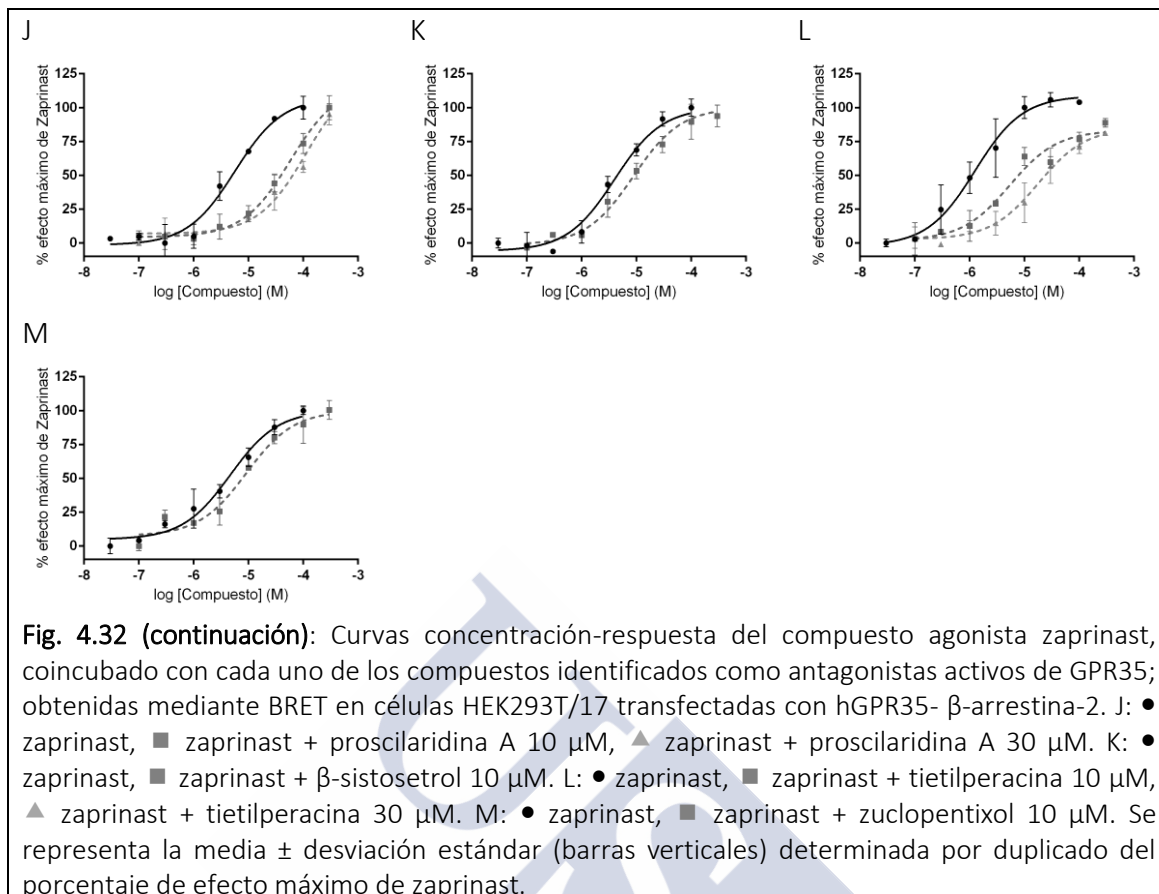
4.5.2 Estudio mecanístico del antagonismo para los hits identificados en el cribado de hGPR35 mediante DMR.

Con el propósito de evaluar el comportamiento de los 13 compuestos identificados como antagonistas de del ortólogo humano de GPR35 se estudió el desplazamiento de la curva concentración-respuesta de zaprinast (**figura 4.32**) en células HEK 293T/17 transfectadas con hGPR35- β -arrestina-2 mediante ensayos de BRET. Así mismo se desarrolló un ensayo de DMR de desplazamiento de la curva concentración-respuesta de zaprinast (**figura 4.33**) en células HT-29, con expresión endógena de hGPR35.

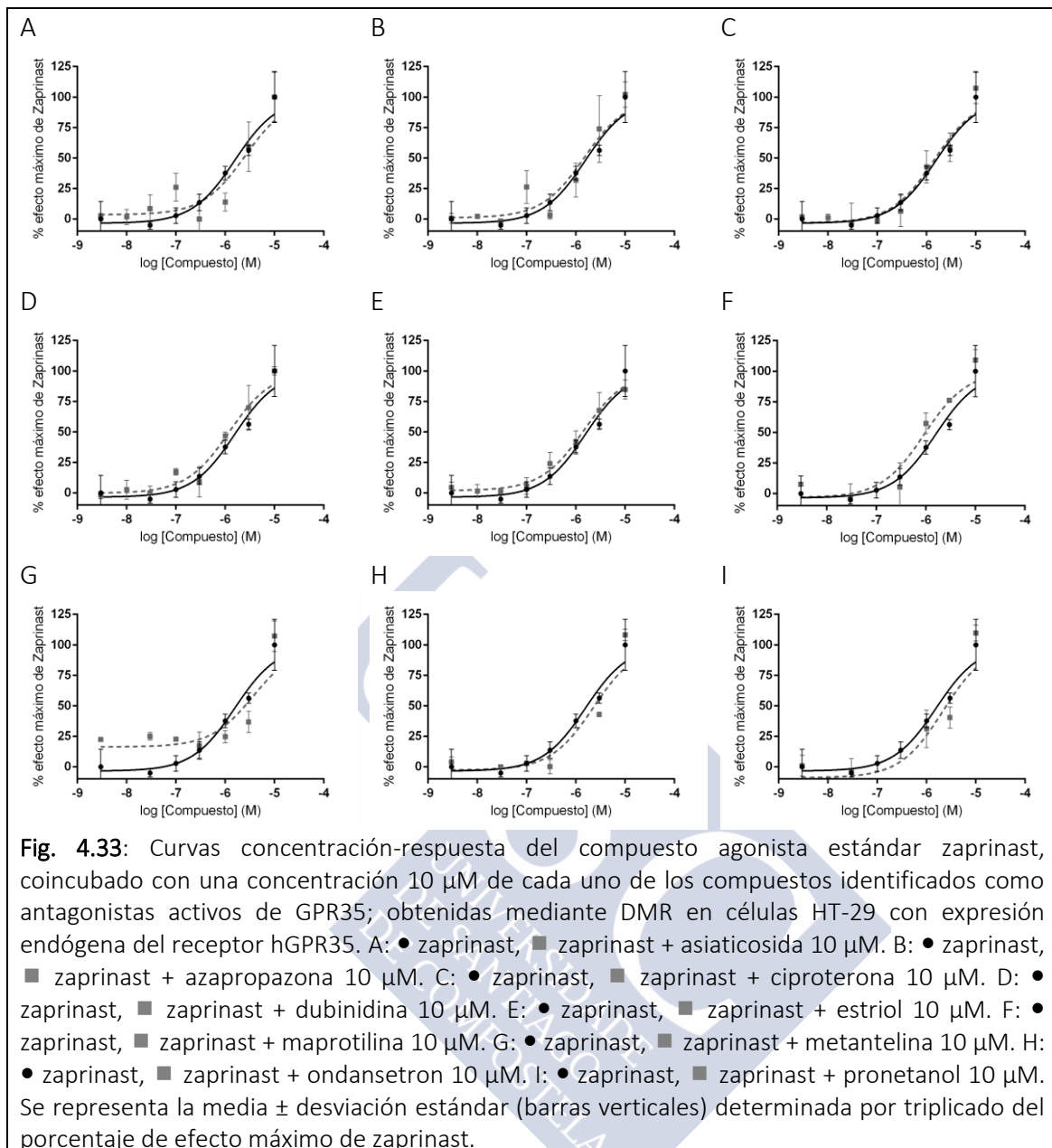
Todos los compuestos se evaluaron a una concentración 10 μ M. Esta es la concentración máxima que se pudo emplear tanto en los en los ensayos de DMR como en los de BRET; los 13 compuestos presentaron problemas de solubilidad (salvo tres compuestos; hidrocloreuro de pronetanol, maleato de tetilperacina y proscilaridina A, que fueron evaluados a otra concentración de 30 μ M en los ensayos de BRET) a concentraciones superiores a 10 μ M; ello impidió la construcción de curvas concentración-respuesta de zaprinast con concentraciones de compuesto superiores a la mencionada.

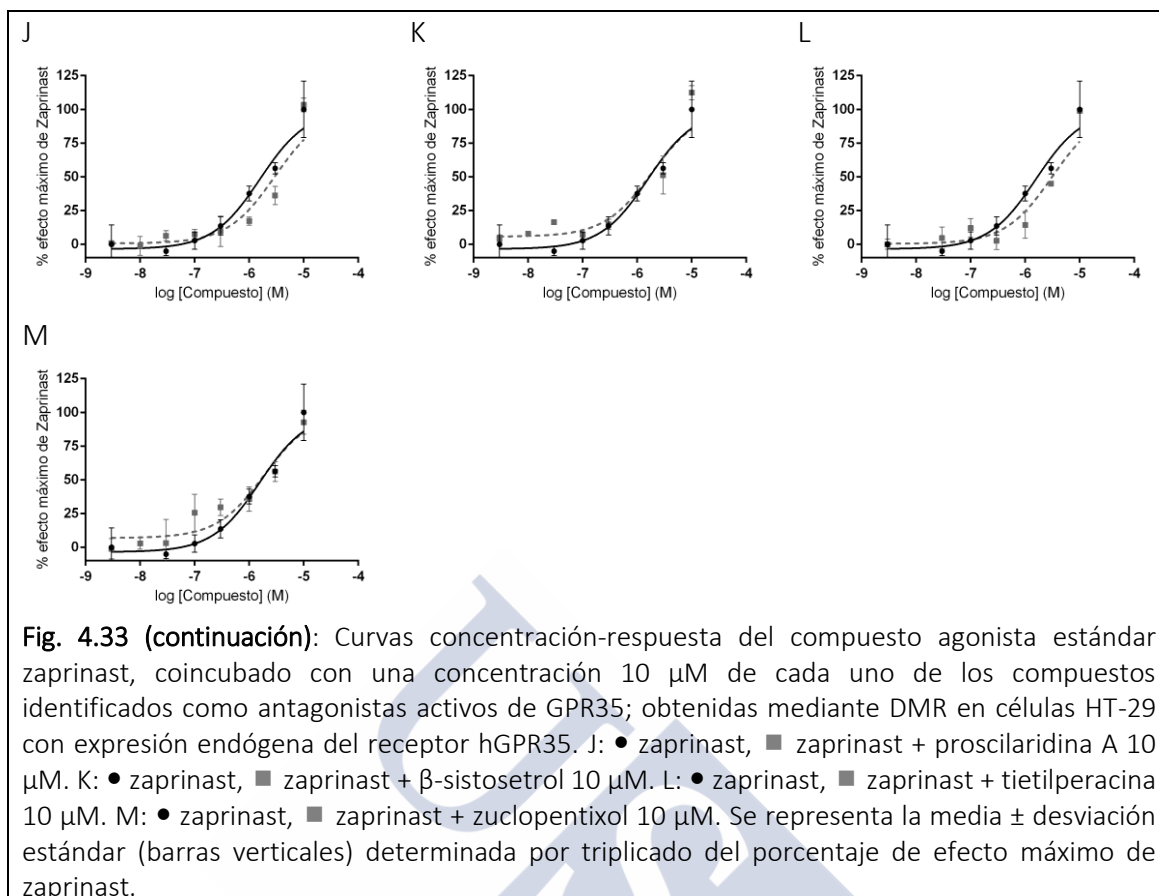
Los valores de pA_2 obtenidos para cada compuesto y condición se resumen en la **tabla 4.20**.





En el ensayo de desplazamiento de zaprinast en células HEK 293T/17 transfectadas con hGPR35; las características de solubilidad de la mayoría de los compuestos impidieron su estudio a concentraciones superiores a 10 μM, por lo que no se pudo observar un efecto dosis-dependiente. Por otra parte, maleato de tietilperacina, bromuro de metantelina e hidrocloreto de pronetanol produjeron una competición no remontable para el zaprinast con relación a su actividad sobre el receptor hGPR35, impidiendo, en el caso de hidrocloreto de pronetanol, el cálculo de un valor de pA_2 .





En el ensayo de desplazamiento de zaprinast en células HT-29 con expresión endógena de hGPR35; ninguno de los compuestos ensayados desplaza a la derecha significativamente la curva concentración-respuesta del agonista.

Tabla 4.20: Valores de la medida de antagonismo (pA_2) obtenidos para cada compuesto estudiado como antagonista de zaprinast en hGPR35.

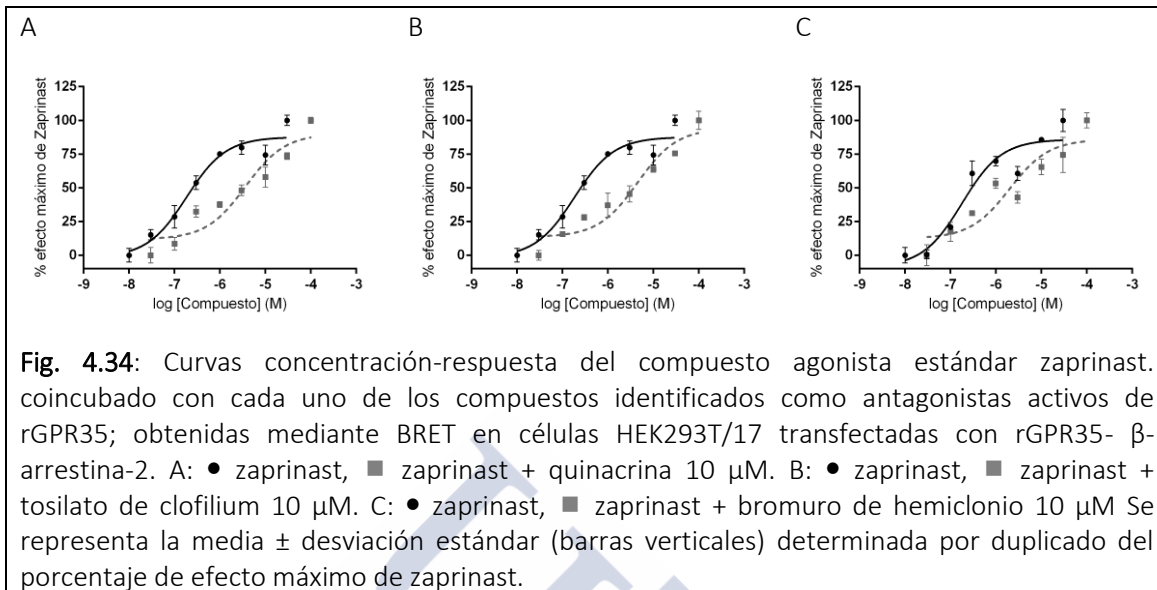
Compuesto	Medida de antagonismo (pA_2)	
	BRET / hGPR35	DMR / hGPR35
Acetato de ciproterona	5.51	-
Asiaticosida	6.02	4.79
Azapropazona	4.93	-
Bromuro de metantelina	6.19	5.14
Dubinidina	4.39	-
Estriol	5.89	-
Hidrocloruro de maprotilina	6.60	-
Hidrocloruro de ondansetron	4.88	4.64
Hidrocloruro de pronetanol	-	4.55
Hidrocloruro de zuclopentixol	4.98	4.29
Maleato de tietilperacina	5.52	5.00
Proscillaridina A	5.97	4.94
β -Sistosetrol	5.08	4.23

4.5.3 Estudio mecanístico del antagonismo de los hits identificados en el cribado de rGPR35 mediante DMR.

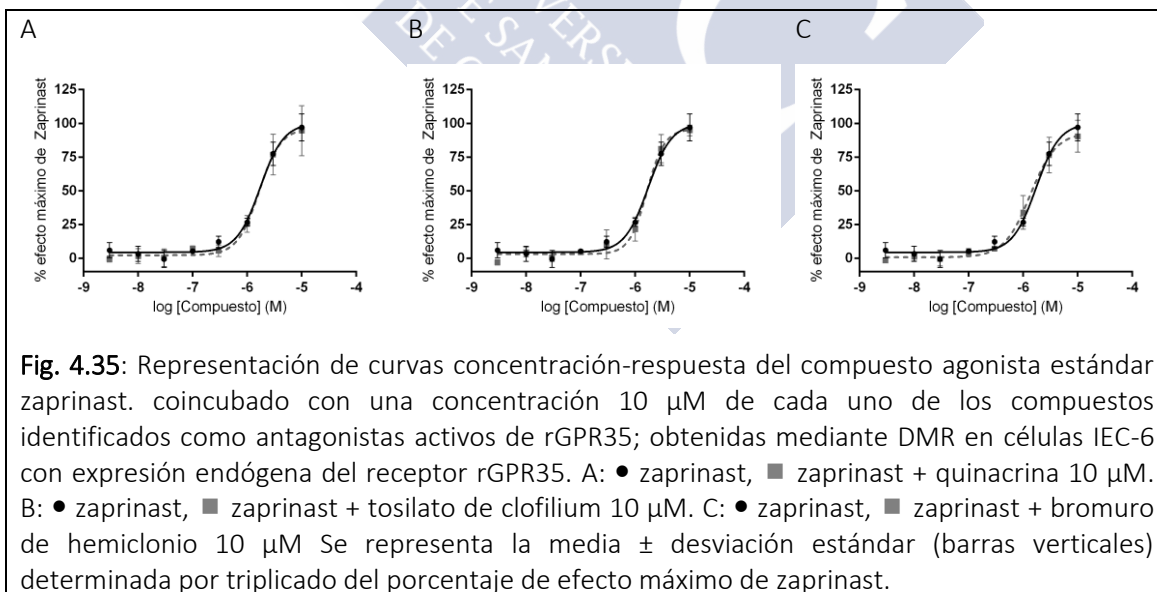
Con el propósito de evaluar el comportamiento de los 3 compuestos identificados como antagonistas de del ortólogo de rata de GPR35 se diseñó un experimento para el estudio del desplazamiento de la curva concentración-respuesta de zaprinast (**figura 4.34**) en células HEK 293T/17 transfectadas con rGPR35- β -arrestina-2 mediante ensayos de BRET. Así mismo se estudió el desplazamiento de la curva concentración-respuesta de zaprinast (**figura 4.35**) en células IEC-6. con expresión endógena de rGPR35.

Todos los compuestos se evaluaron a una concentración 10 μ M. Esta es la concentración máxima que se pudo emplear tanto en los en los ensayos de DMR como en los de BRET. Los 3 compuestos presentaron problemas de solubilidad a concentraciones superiores a 10 μ M; lo que impidió la construcción de curvas concentración-respuesta de zaprinast con concentraciones de compuesto superiores a la mencionada.

Los valores de pA₂ obtenidos para cada compuesto y condición se resumen en la **tabla 4.21**.



En el ensayo de desplazamiento de zaprinast en células HEK 293T/17 transfectadas con hGPR35; los tres compuestos presentaron un grado de antagonismo significativo, desplazando a la derecha la curva de agonista.



En el ensayo de desplazamiento de zaprinast en células IEC-6; ninguno de los compuestos desplazó significativamente la curva de zaprinast a la derecha, por lo que no ejercieron un grado de antagonismo significativo.

Tabla 4.21: Valores de la medida de antagonismo (pA_2) obtenidos para cada compuesto estudiado como antagonista de zaprinast en rGPR35.

Compuesto	Medida de antagonismo (pA_2)	
	BRET / rGPR35	DMR / rGPR35
Bromuro de hemiclonoio	6.00	-
Quinacrina	6.28	-
Tosilato de clofilium	6.37	-

4.6 Ampliación estructural para el descubrimiento de nuevos compuestos antagonistas del receptor GPR35.

El estudio de los hits obtenidos de los cribados de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*[®] muestra un número significativo esteroides vegetales y estrógenos animales, que se comportan como antagonistas para los dos ortólogos del receptor GPR35 estudiados en la presente tesis doctoral.

En base a este hecho, se llevó a cabo un experimento para la ampliación estructural de los antagonistas del receptor GPR35; en el que mediante una serie de ensayos se caracterizó el efecto de un panel representativo de derivados humanos de esterol.

4.6.1 El β -estradiol, la estrona y la hidrocortisona fueron los antagonistas más activos de hGPR35.

Para el estudio mediante BRET se realizaron curvas concentración-respuesta de los compuestos a partir de ensayos en los que se incluyeron en diluciones seriadas junto con zaprinast o ácido pamoico (**figura 4.36 y figura 4.37**), del mismo modo que se hizo en el estudio de los hits obtenidos en los cribados. También se representaron curvas concentración respuesta de estos compuestos a partir de los valores obtenidos en ensayos de DMR. (**figura 4.38**). Los valores obtenidos se resumen en la **tabla 4.22**.

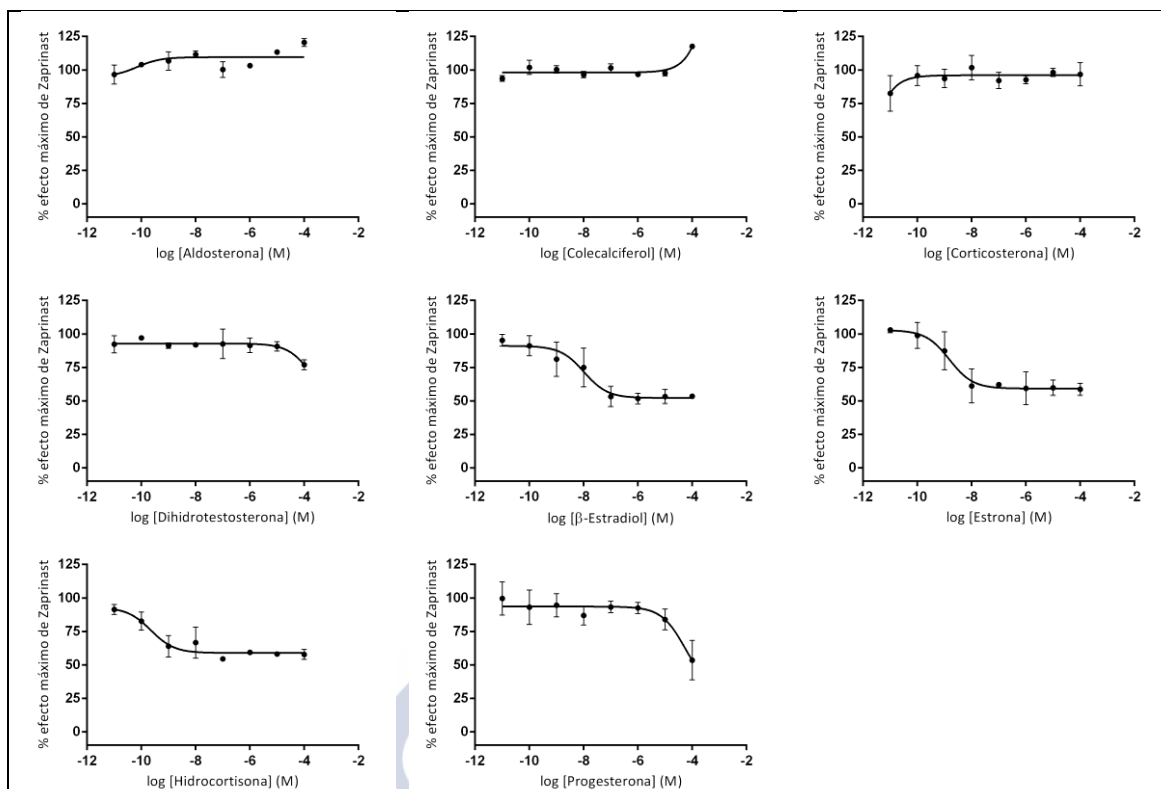
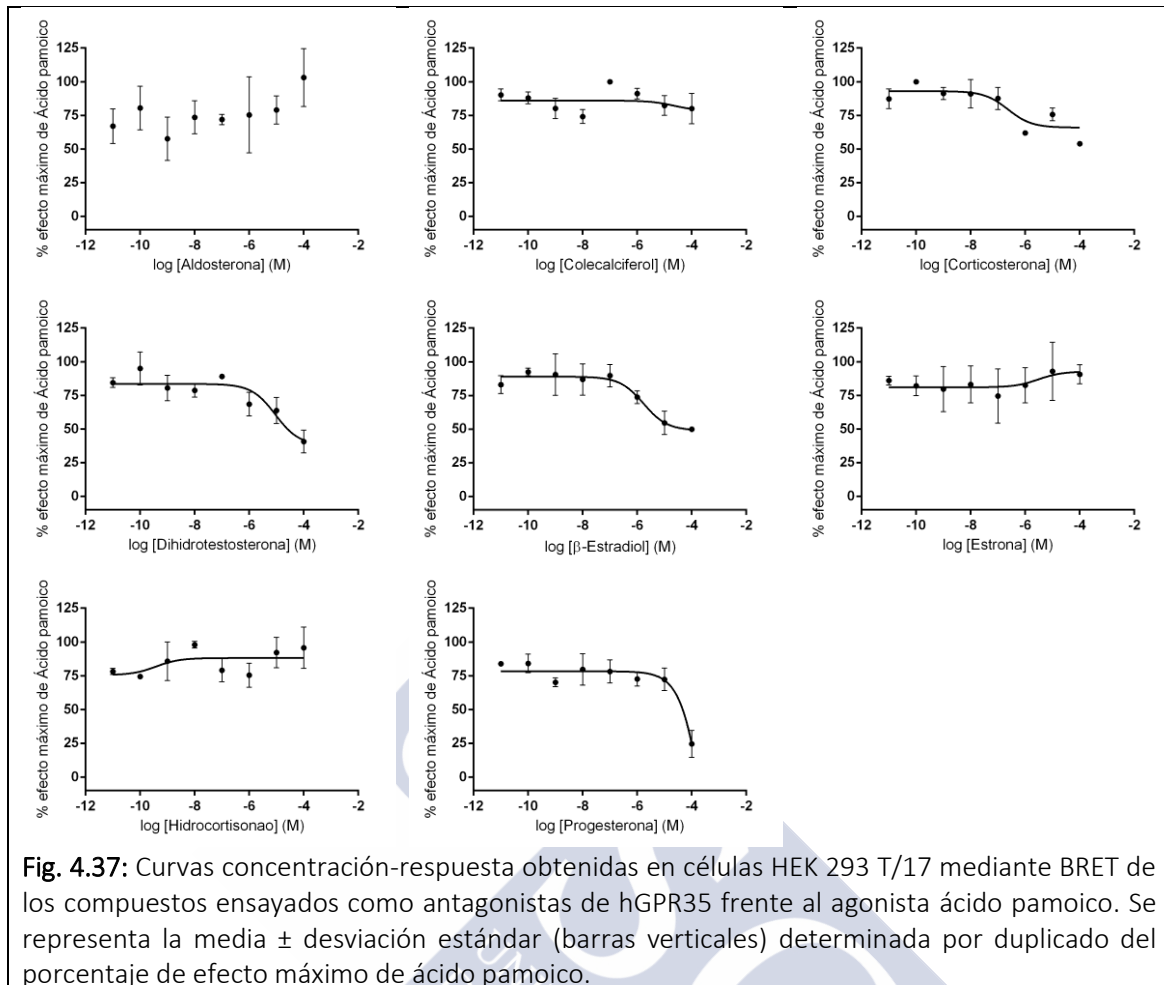


Fig. 4.36: Curvas concentración-respuesta obtenidas en células HEK 293 T/17 mediante BRET de los compuestos ensayados como antagonistas de hGPR35 frente al agonista zaprinast. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por duplicado del porcentaje de efecto máximo de Zaprinasat.





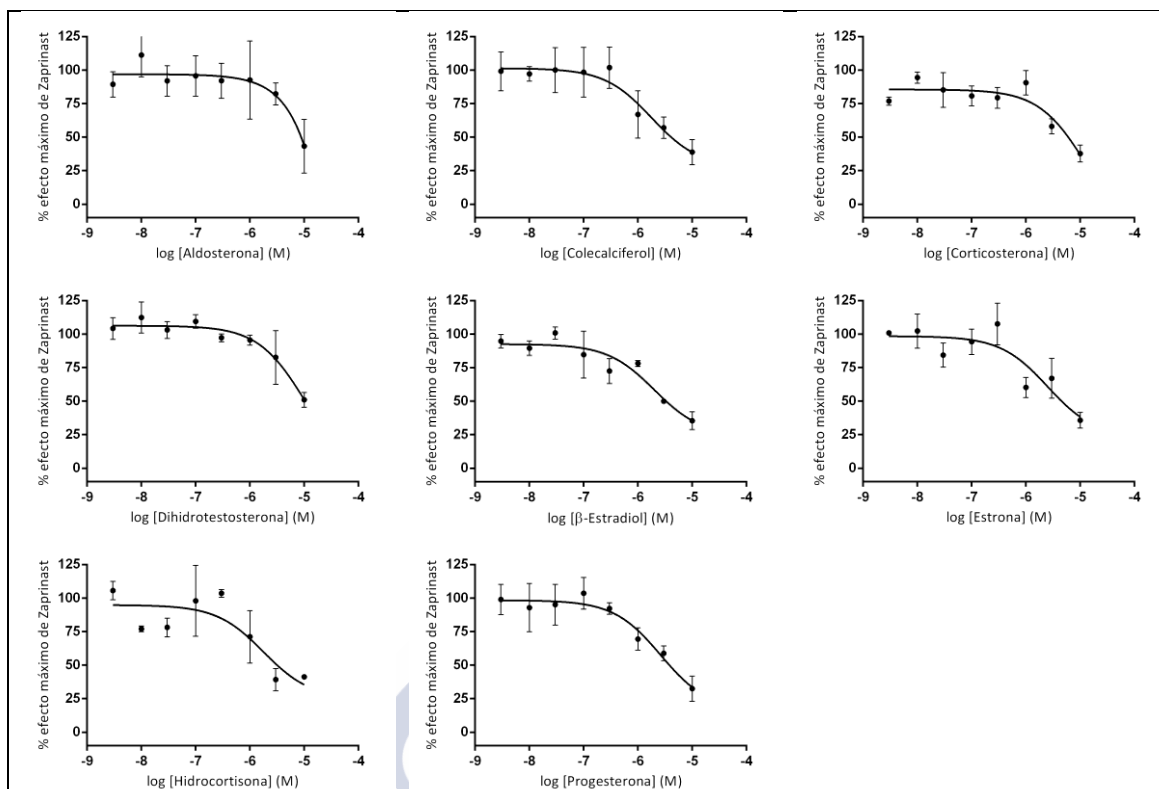
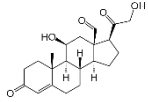
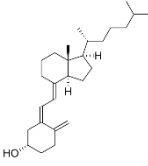
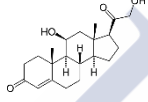
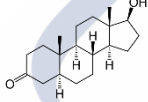
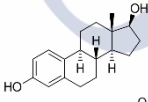
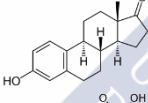
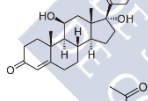
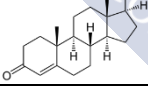


Fig. 4.38: Curvas concentración-respuesta obtenidas en células HT-29 mediante DMR de los compuestos ensayados como antagonistas de hGPR35 frente al agonista zaprinast. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por triplicado del porcentaje de efecto máximo de Zaprinast.

Tabla 4.22: Valores de potencia (IC_{50}) de cada antagonista con relación al 100% de actividad del agonista empleado.

Antagonismo hGPR35				
Compuesto	Estructura	BRET		DMR
		IC_{50} (nM) frente zaprinast	IC_{50} (μ M) frente ácido pamoico	IC_{50} (μ M) frente zaprinast
Aldosterona		-	-	-
Colecalciferol		-	-	1.78 ± 0.55
Corticosterona		-	0.24 ± 0.03	12.60 ± 0.31
Dihidrotestosterona		-	9.11 ± 0.44	10.33 ± 0.44
β -Estradiol		10.35 ± 0.55	1.72 ± 0.53	2.02 ± 0.57
Estrona		1.51 ± 0.56	-	2.50 ± 0.49
Hidrocortisona		0.22 ± 0.05	-	1.78 ± 0.43
Progesterona		5.42 ± 0.25	37.93 ± 7.51	2.63 ± 0.60

Ninguno de los compuestos ensayados inhibió completamente la actividad del agonista empleado en cada caso.

4.6.2 El β -Estradiol y la progesterona fueron los antagonistas más activos de rGPR35.

Para el estudio mediante BRET se realizaron curvas concentración-respuesta de los compuestos a partir de ensayos en los que se incluyeron en diluciones seriadas junto con zaprinast (**figura 4.39**), del mismo modo que se hizo en el estudio de los hits obtenidos en los cribados. También se representaron curvas concentración respuesta de estos compuestos a partir de los valores obtenidos en ensayos de DMR. (**figura 4.40**). Los valores obtenidos se resumen en la **tabla 4.23**.

Resultados

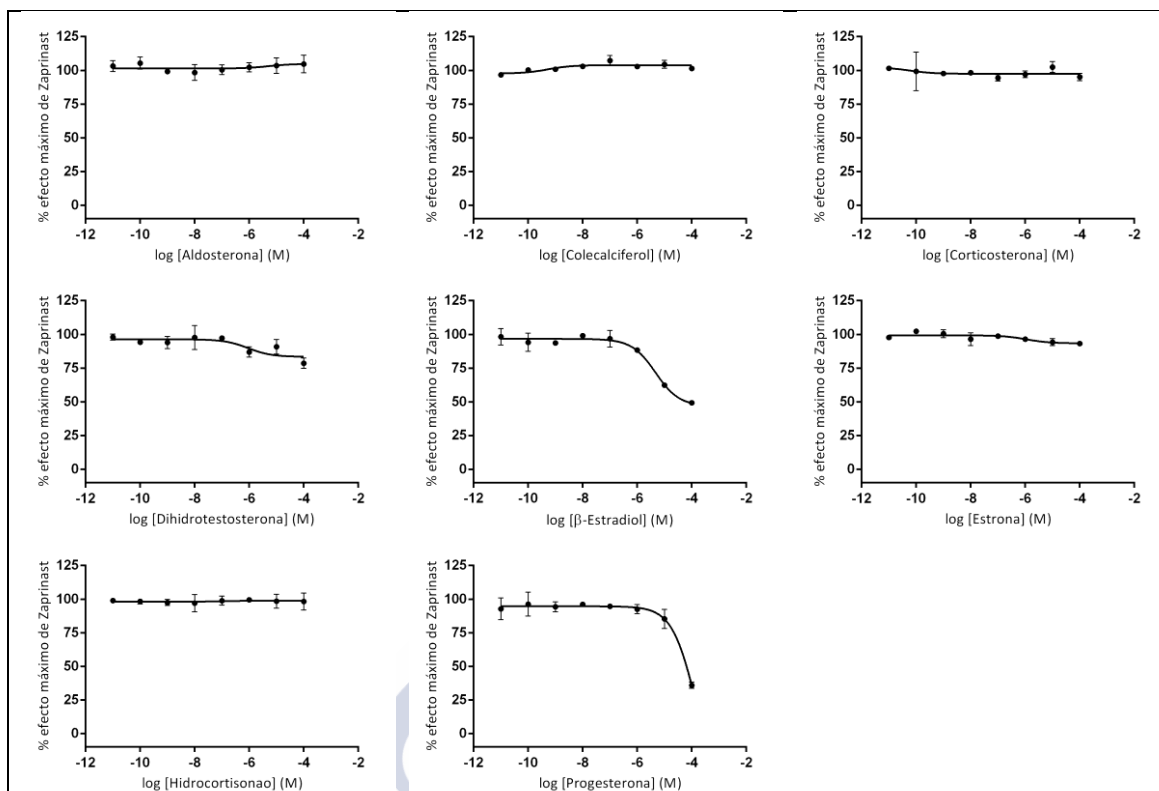


Fig. 4.39: Curvas concentración-respuesta obtenidas en células HEK 293 T/17 mediante BRET de los compuestos ensayados como antagonistas de rGPR35 frente al agonista zaprinast. Se representa la media \pm desviación estándar (barras verticales) determinada por duplicado del porcentaje de efecto máximo de Zaprinast.

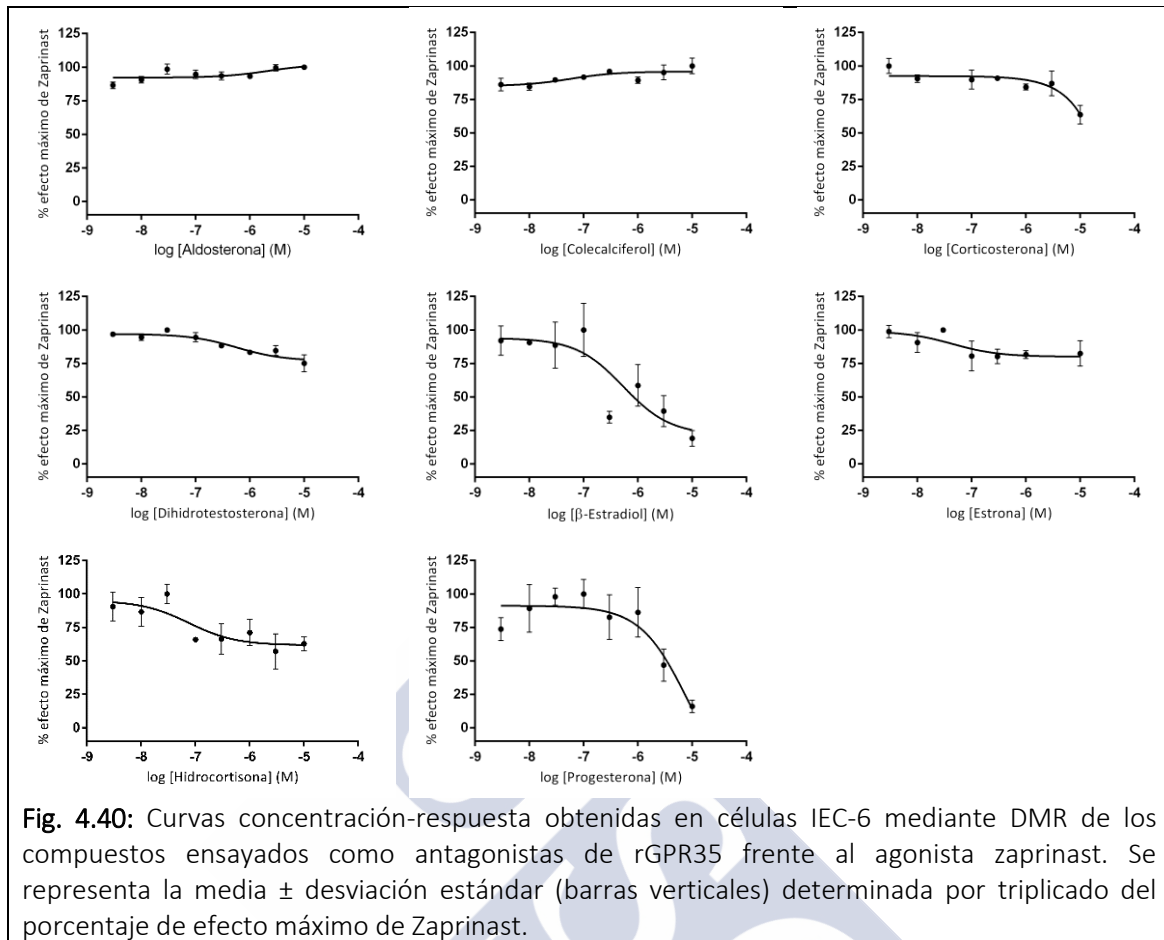


Tabla 4.23: Valores de potencia (IC_{50}) de cada antagonista con relación al 100% de actividad del agonista empleado.

Compuesto	Antagonismo rGPR35	
	BRET	DMR
	IC_{50} (μ M)	IC_{50} (μ M)
Aldosterona	-	-
Colecalciferol	-	-
Corticosterona	-	-
Dihidrotestosterona	-	-
β -Estradiol	4.71 \pm 0.75	0.54 \pm 0.05
Estrona	-	-
Hidrocortisona	-	0.07 \pm 0.04
Progesterona	13.54 \pm 0.37	8.19 \pm 0.41

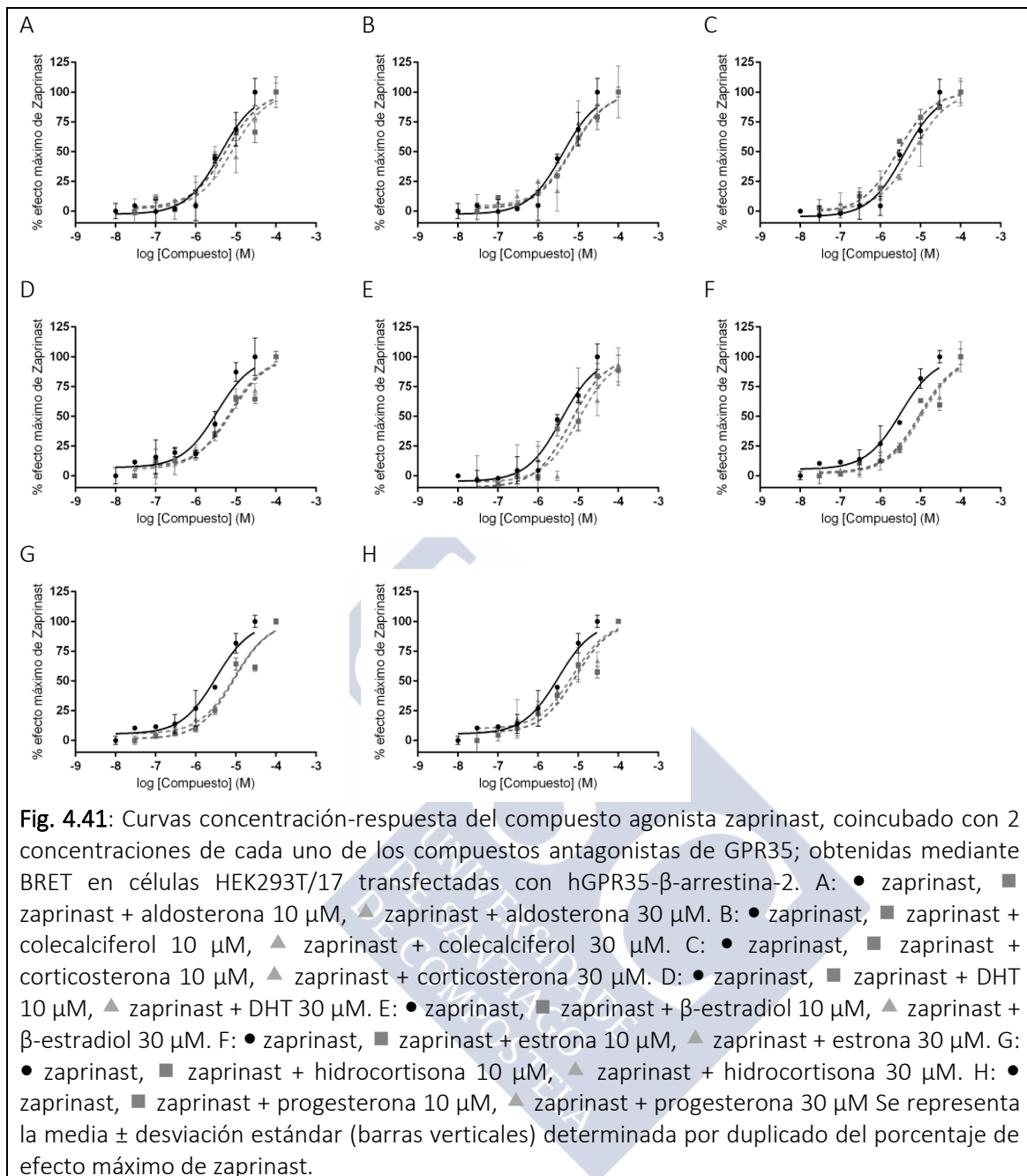
Ninguno de los compuestos ensayados inhibió completamente la actividad del zaprinast. Sin embargo, β -estradiol y progesterona resultaron mediante ambas técnicas los compuestos más activos y potentes.

4.6.3 Estudio mecanístico del antagonismo de los derivados humanos de esterol.

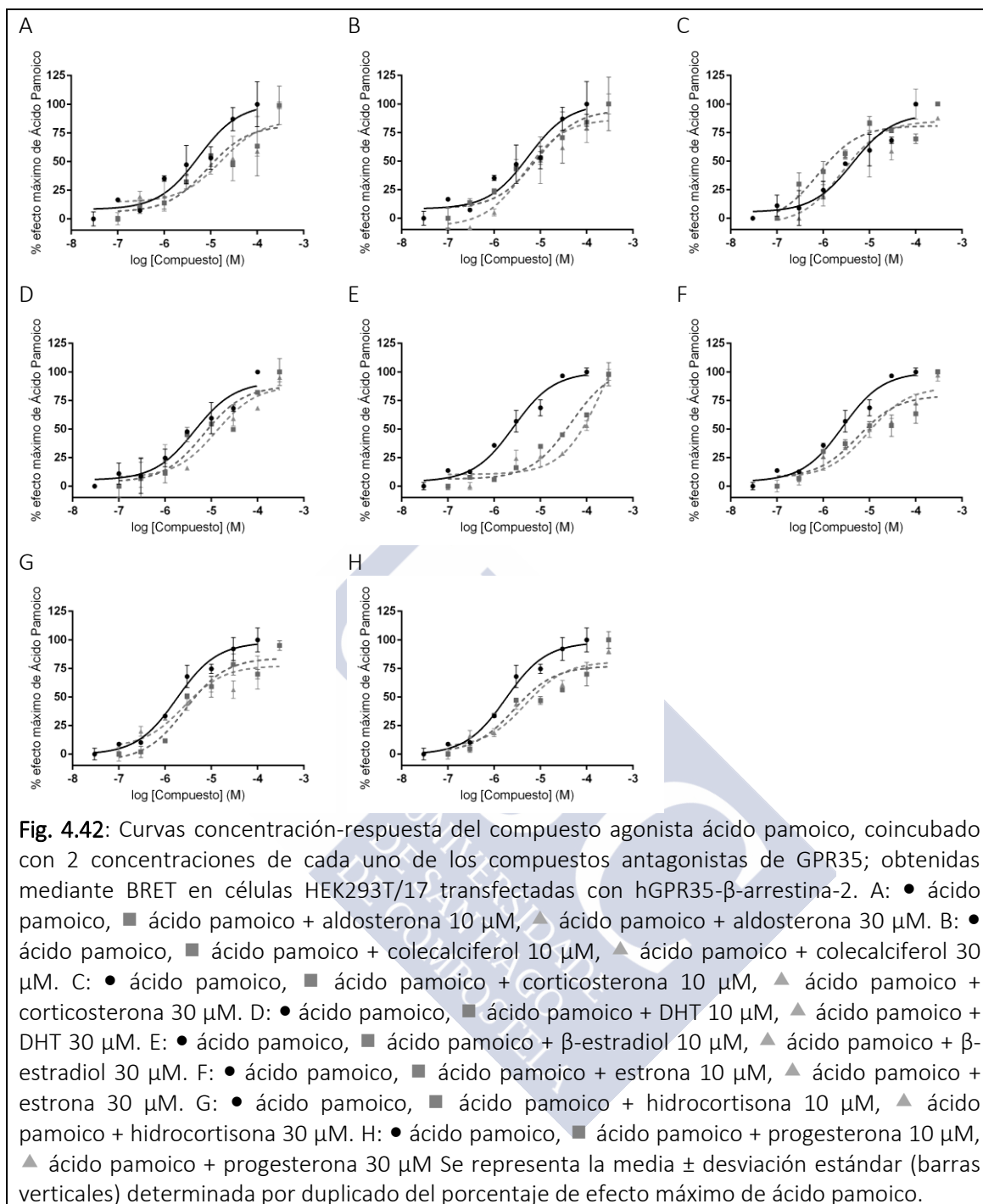
Con el propósito de evaluar el comportamiento de estos 8 compuestos como antagonistas de los dos ortólogos del receptor estudiados (humano y rata) se diseñó un experimento para el estudio del desplazamiento de la curva concentración-respuesta de zaprinast (**figura 4.41**) y ácido pamoico (**figura 4.42**) en células HEK 293T/17 transfectadas con hGPR35- β -arrestina-2 mediante ensayos de BRET. Igualmente se estudió el desplazamiento de la curva concentración-respuesta de zaprinast (**figura 4.43**) en células HEK 293T/17 transfectadas con rGPR35- β -arrestina-2 mediante ensayos de BRET

Todos los compuestos se ensayaron para las 3 condiciones planteadas a 10 μ M y 30 μ M.

Los valores de pA_2 obtenidos para cada compuesto y condición se resumen en la **tabla 4.24**.

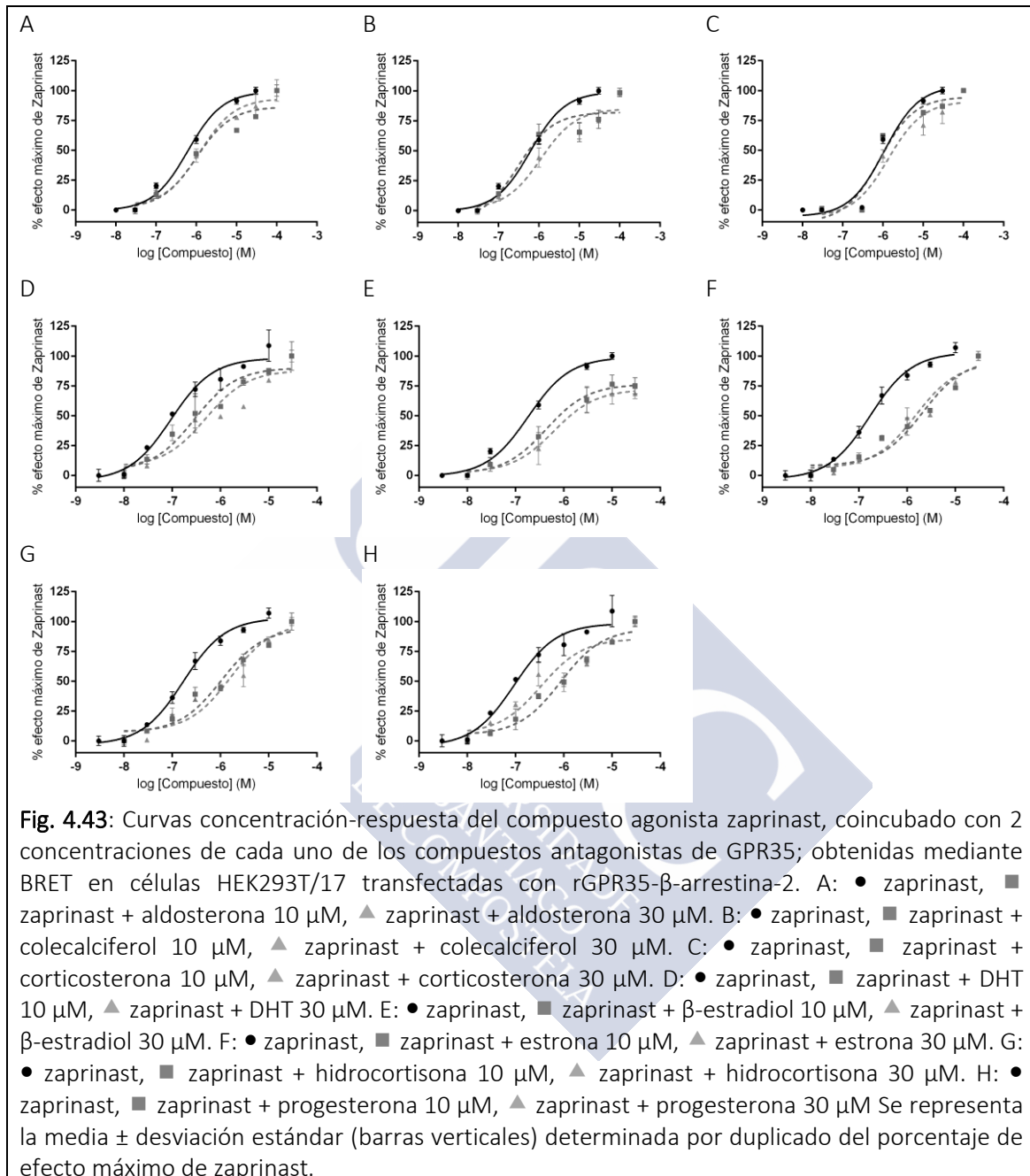


En el ensayo de desplazamiento de zaprinast en células HEK 293T/17 transfectadas con hGPR35; ninguno de los compuestos mostró un efecto antagonista concentración-dependiente.



En el ensayo de desplazamiento de ácido pamoico en células HEK 293T/17 transfectadas con hGPR35; del conjunto de todos los compuestos, con mayor o menor grado de antagonismo sobre el efecto del ácido pamoico en hGPR35, β-estradiol fue el compuesto con mayor grado de antagonismo, aunque sin conseguir un desplazamiento de la curva a la derecha concentración-dependiente. Además,

estrona, hidrocortisona y progesterona impidieron una recuperación completa del efecto del ácido pamoico.



En el ensayo de desplazamiento de zaprinast en células HEK 293T/17 transfectadas con rGPR35; se pudo identificar el β-estradiol como un compuesto competidor no remontable para el zaprinast con relación a su actividad sobre el receptor rGPR35. B-estradiol impidió una recuperación completa del efecto de zaprinast.

Tabla 4.24: Valores de la medida de antagonismo (pA_2) obtenidos para cada compuesto estudiado como antagonista de zaprinast y/o ácido pamoico en hGPR35 y rGPR35.

Compuesto	Medida de antagonismo (pA_2)		
	BRET / hGPR35		BRET / rGPR35
	Zaprinast	Pamoico	Zaprinast
Aldosterona	4.60	4.73	4.81
Colecalciferol	4.82	4.71	4.44
Corticosterona	-	-	3.93
Dihidrotestosterona	5.13	4.77	5.31
β -Estradiol	4.83	6.21	5.14
Estrona	5.30	5.06	6.05
Hidrocortisona	5.24	4.72	5.71
Progesterona	5.22	4.71	5.91



Tabla 4.25: Resumen de la caracterización farmacológica de los hits antagonistas de hGPR35 identificados. Se muestran los valores de potencia (IC_{50}) y de % de reversión del efecto máximo del agonista.

Compuesto	hGPR35					
	BRET			DMR		
	antagonismo del efecto de zaprinast		antagonismo del efecto de pamopico	antagonismo del efecto de zaprinast		% reversión
IC_{50} (μ M)	% reversión	IC_{50} (μ M)	% reversión	IC_{50} (μ M)	% reversión	
Bisacodilo	5.29 ± 0.45	53.71 ± 6.77	-	19.98 ± 3.03	-	-
Digitonina	4.08 ± 0.59	110.33 ± 11.66	4.82 ± 0.64	104.13 ± 8.09	1.83 ± 0.66	99.07 ± 6.75
Digitoxigenina	2.44 ± 0.22	72.55 ± 11.18	0.009 ± 0.001	59.12 ± 3.83	-	-
Digoxigenina	2.51 ± 0.43	55.85 ± 6.90	0.023 ± 0.001	55.49 ± 4.44	-	-
Digoxina	3.82 ± 0.56	79.55 ± 9.39	0.98 ± 0.07	47.22 ± 2.84	2.38 ± 0.31	53.30 ± 17.54
Proscillaridina A	1.76 ± 0.33	50.15 ± 0.97	0.475 ± 0.06	47.44 ± 1.97	0.47 ± 0.11	85.22 ± 3.54
Estrofantidina	0.51 ± 0.05	61.39 ± 5.81	0.59 ± 0.07	77.89 ± 4.18	-	-
Tomatina	0.79 ± 0.07	101.55 ± 4.87	3.66 ± 0.75	110.30 ± 7.34	9.29 ± 0.32	62.80 ± 14.60
Acetato de ciproterona	-	-	-	-	3.86 ± 1.17	71.59 ± 8.98
Asiaticosida	5.35 ± 0.46	34.92 ± 3.97	5.48 ± 0.46	35.91 ± 5.61	0.60 ± 0.12	88.70 ± 4.19
Azapropazona	-	-	-	-	3.09 ± 1.15	79.39 ± 3.02
Bromuro de metantelina	-	-	-	-	4.6 ± 1.13	94.54 ± 2.4
Dubinidina	-	-	-	-	1.03 ± 0.11	79.46 ± 2.62
Estriol	10.7 ± 0.62	44.25 ± 0.37	6.92 ± 0.69	42.14 ± 1.84	6.09 ± 1.18	60.93 ± 1.51
Hidrocloruro de maprotilina	-	-	-	-	1.44 ± 1.12	92.19 ± 4.61
Hidrocloruro de ondansetron	-	-	-	-	4.98 ± 1.28	52.17 ± 4.73
Hidrocloruro de pronetanolol	1.65 ± 0.68	47.98 ± 8.02	2.13 ± 0.38	25.60 ± 4.62	0.49 ± 0.11	100.00 ± 5.70
Hidrocloruro de zuclopentixol	-	-	-	-	2.42 ± 1.15	77.60 ± 3.97
Maleato de Tietilperazina	-	-	-	-	4.45 ± 1.08	75.31 ± 3.89
β -sitosetrol	-	-	-	-	16.3 ± 1.21	37.41 ± 2.04
Aldosterona	-	-	-	-	-	-
Colecalciferol	-	-	-	-	1.78 ± 0.55	61.13 ± 5.41
Corticosterona	-	-	0.24 ± 0.03	53.98 ± 0.12	12.60 ± 0.31	62.20 ± 3.62
Dihidrotosterona	-	-	9.11 ± 0.44	59.29 ± 5.97	10.33 ± 0.44	49.00 ± 3.19
Beta-Estradiol	10.35 ± 0.55	46.52 ± 0.95	1.72 ± 0.53	50.11 ± 0.76	2.02 ± 0.57	64.57 ± 3.82
Estrona	1.51 ± 0.56	41.29 ± 3.17	-	-	2.50 ± 0.49	64.26 ± 3.37
Hidrocortisona	0.22 ± 0.05	42.19 ± 2.58	-	-	1.78 ± 0.43	58.73 ± 0.02
Progesterona	5.42 ± 0.25	46.51 ± 10.44	37.93 ± 7.51	75.41 ± 7.08	2.63 ± 0.60	67.54 ± 5.45

Tabla 4.26: Resumen de la caracterización farmacológica de los hits antagonistas de rGPR35 identificados. Se muestran los valores de potencia (IC_{50}) y de % de reversión del efecto máximo del agonista.

rGPR35					
Compuesto	antagonismo del efecto de zaprinast		antagonismo del efecto de zaprinast		DMR
	IC_{50} (μ M)	% reversión	IC_{50} (μ M)	% reversión	
Bisacodilo	1.97 \pm 0.45	25.06 \pm 3.31	-	-	-
Dienestrol	85.07 \pm 0.60	86.68 \pm 3.31	-	-	-
Digitonina	3.41 \pm 0.71	99.48 \pm 0.47	18.47 \pm 0.31	100.00 \pm 10.02	-
Digitoxigenina	1.38 \pm 0.6	36.83 \pm 3.05	-	-	-
Digoxigenina	0.58 \pm 0.06	23.04 \pm 2.02	-	-	-
Digoxina	4.29 \pm 0.53	28.51 \pm 3.25	-	-	-
Hexestrol	64.66 \pm 0.55	85.94 \pm 6.21	-	-	-
Estrofantidina	0.52 \pm 0.04	22.66 \pm 2.59	-	-	-
Proscillaridina A	0.89 \pm 0.01	34.82 \pm 1.66	-	-	-
Tomatina	1.78 \pm 0.80	99.88 \pm 0.51	2.02 \pm 0.91	100.01 \pm 1.43	-
Bromuro de hemicolinio	-	-	0.47 \pm 0.07	92.22 \pm 7.18	-
Quinacrina	-	-	1.97 \pm 0.66	82.50 \pm 10.95	-
Tosilato de clofilium	-	-	9.46 \pm 0.57	66.48 \pm 4.59	-
Aldosterona	-	-	-	-	-
Colecalciferol	-	-	-	-	-
Corticosterona	-	-	-	-	-
Dihidrotestosterona	-	-	-	-	-
Beta-Estradiol	4.71 \pm 0.75	50.69 \pm 0.64	0.54 \pm 0.05	80.97 \pm 3.43	-
Estrona	-	-	-	-	-
Hidrocortisona	-	-	0.07 \pm 0.04	37.29 \pm 3.09	-
Progesterona	13.54 \pm 0.37	64.00 \pm 1.72	8.19 \pm 0.41	83.96 \pm 2.69	-

5. Discusión



5. Discusión.

El principal resultado de la presente tesis doctoral fue la identificación de ligandos con distintas potencias y eficacias para el receptor GPR35 humano y para su ortólogo de rata, con utilidad para el conocimiento farmacológico del receptor. Mediante dos técnicas se comparó la respuesta del receptor a través de su vía de señalización más estudiada, la β -arrestina y la respuesta de vías globales.

El receptor GPR35 es un GPCR huérfano poco caracterizado. En términos de similitud de secuencia, el receptor GPR35 está relacionado con el receptor de ácido lisofosfatídico LPA4 (32%), receptores de unión al ácido hidrocarboxílico HCA₂ y HCA₃ (30%) y con el receptor fosfatidilinositol y cannabinoide GPR55 (30%) (39). A consecuencia de sus propiedades de unión a ligandos y la similitud de secuencia con GPR55, varios grupos se han centrado en GPR35 como un supuesto receptor sensible a ácido lisofosfatídico (42,120), proponiendo este compuesto como candidato a agonista endógeno para este receptor. Aunque la existencia de una familia propia de receptores LPA y las diferencias en las rutas de señalización activadas por este ligando en comparación con otros agonistas de GPR35 hacen difícil que se pueda ubicar a esta molécula como ligando endógeno del receptor GPR35(42,46). A lo largo de los años y fruto de las investigaciones realizadas, se han postulado otros compuestos como candidatos a agonista endógeno del receptor GPR35 aunque sin confirmación categórica para ninguno de ellos: el neuromodulador L-kinunerina (metabolito del ácido kinurénico), que interacciona con varios receptores del SNC también actúa como agonista del receptor GPR35 (51). Sin embargo, pese a que si podría tener un efecto relevante sobre GPR35 en el sistema nervioso periférico (52), las concentraciones fisiológicas de esta molécula en los tejidos donde el receptor GPR35 se expresa en mayor proporción no coincide con la concentración necesaria para activar a este receptor (43,53). El GMPc también fue identificado como posible ligando endógeno del receptor GPR35, pero su relevancia funcional aún está por demostrar, aunque las concentraciones *in vivo* de GMPc sean suficientes para activar al receptor (46). Por otro lado, tanto el intermediario de la síntesis de melanina DHICA como los intermediarios en la síntesis de la hormona tiroidea T3 (3,5,3' triiodotironina) y T3

reversa (3,3',5 triiodotironina) promueven la respuesta de células de una línea de adenocarcinoma colorrectal humana HT-29 en ensayos de DMR; activando al receptor GPR35. Nuevamente los niveles *in vivo* de estos dos compuestos no alcanzan las concentraciones necesarias para activar a este receptor (57). Por último, la quimioquina CXCL17 es capaz de elevar los niveles de calcio intracelular en células HEK 293 transfectadas con hGPR35 y en la línea celular de monocitos humanos THP-1, sugiriendo una activación del receptor por parte de esta quimioquina. La capacidad de esta quimioquina para activar el receptor GPR35 a concentraciones moderadamente bajas y la relación estructural entre GPR35 y algunos receptores de quimioquinas postulan a esta molécula como un buen candidato a ligando endógeno del receptor (60); sin embargo, se requieren otros ensayos confirmatorios que apoyen esta hipótesis.

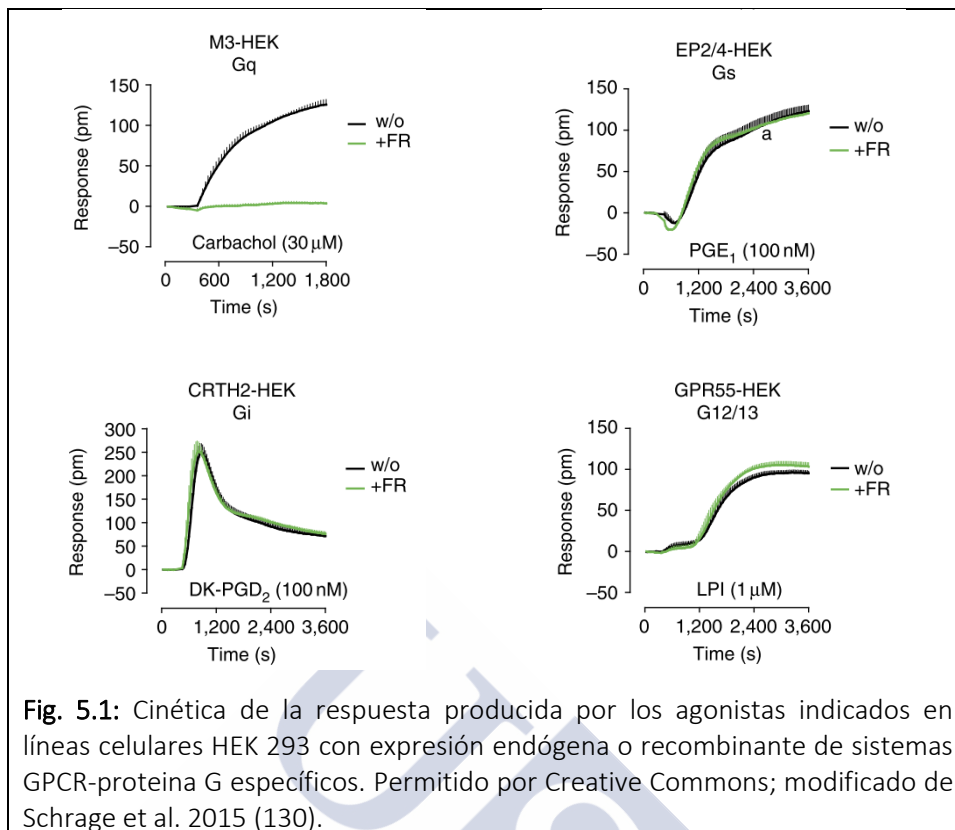
Diferentes estudios genéticos relacionan al receptor GPR35 con ciertas enfermedades originadas en los tejidos y órganos donde la expresión de este receptor es mayor. Combinaciones alélicas o alteraciones en el número de copias del gen del receptor (41,124,125) se relacionan con diferentes enfermedades; así como algunas variantes polimórficas que parecen estar implicadas en diabetes de tipo 2 (84), desarrollo de enfermedades coronarias (incluyendo la formación de placas ateroscleróticas) (88), enfermedad inflamatoria intestinal y colitis ulcerosa (83). Los estudios de la actividad de ácido kinurénico en células del ganglio de la raíz dorsal también sugieren la participación del receptor GPR35 en procesos nociceptivos y lo sitúan como una diana potencial en el tratamiento del dolor (80,81). Cabe destacar también que existe una sobreexpresión de la variante GPR35b en células de cáncer de estómago (41).

En los últimos años se han producido avances significativos en el conocimiento de la farmacología del receptor GPR35 y su relevancia fisiopatológica, entre estos avances destacan el descubrimiento y la caracterización de varios ligandos sintéticos, entre ellos, agonistas equipotentes para los ortólogos del receptor GPR35 de humano, rata y/o ratón. Además, los estudios de mutagénesis han proporcionado una explicación a la selectividad de los ligandos entre los ortólogos de diferentes especies. También ha sido posible generar el primer radioligando de hGPR35: [³H]PBS-13253, un agonista con una $K_D = 5.3$ nM (68), que permite

evaluar la afinidad de los ligandos de este receptor. Si bien los conocimientos actuales hacen que GPR35 sea un prometedor candidato a diana terapéutica, dada su participación en una amplia gama de procesos fisiológicos y fisiopatológicos; en ningún estudio se ha identificado una función concreta para este receptor. Esto se debe en parte a la escasez de herramientas farmacológicas como por ejemplo los antagonistas equipotentes para diferentes especies que permitan en un futuro el estudio de enfermedades asociadas a este receptor en modelos animales; así como moduladores alostéricos que ayuden a descifrar los fenómenos de selectividad funcional observados y la relevancia de las rutas de señalización implicadas.

Los estudios de señalización realizados con GPR35 apuntan a un acoplamiento preferente a proteínas $G\alpha_i$ (51,60,75,76) y $G\alpha_{13}$ (43,65,77) y una señalización no dependiente de proteínas G mediada por la actividad de β -arrestina (65,66). Los diferentes acoplamientos entre receptor y las proteínas efectoras dan lugar a un conjunto de posibles conformaciones del receptor que junto a los fenómenos de alosterismo implicados (26,29) generan una eficacia global de cada ligando que determina su comportamiento (126,127). Así, cada ligando selecciona las conformaciones del receptor por las cuales tiene mayor afinidad (128); en el caso de los antagonistas depende también del agonista implicado (126,129), lo que supone que la potencia de un antagonista es dependiente de la conformación y la vía efectora seleccionada (**figura 5.1**).

Todo ello sugiere que se podrían obtener agonistas y antagonistas con selectividad funcional que modulen de forma diferencial las vías efectoras acopladas al receptor.



El objetivo general de la presente tesis doctoral fue la identificación de ligandos agonistas y antagonistas (para las formas de humano y de rata) del receptor huérfano GPR35, con el fin de emplearlos como herramienta farmacológica para la potencial caracterización de dicho receptor como diana terapéutica. Para ello, se planteó la búsqueda de ligandos en la quimioteca Prestwick empleando un ensayo de translocación de β -arrestina basado en BRET. Esta técnica fue puesta a punto en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del profesor Graeme Milligan de la Universidad de Glasgow y fue empleada para el estudio del receptor GPR35 en ensayos previos a la presente tesis doctoral (65). En el procedimiento de esta técnica, los receptores GPR35 de humano y de rata se modificaron con un doble marcaje incluyendo un epítipo Flag en el extremo N-terminal y una eYFP al extremo C-terminal. Estos receptores se cotransfectaron en células HEK 293T/17 con β -arrestina 2 fusionada con una *Renilla*-luciferasa 6. Tras la adición del sustrato de luciferasa coelenteracina h, la incorporación de un agonista de GPR35 dio como resultado la interacción entre GPR35 y β -arrestina 2 y por consiguiente se generó la señal de BRET dependiente de la concentración de agonista.

El método de translocación de β -arrestina basado en BRET permite, por tanto, detectar la movilización de la β -arrestina como resultado de la activación del receptor y ofrece información directa y cuantitativa de la unión entre el receptor y el efector.

No obstante; teniendo en cuenta la complejidad de las rutas efectoras implicadas en la activación del receptor GPR35 y los posibles fenómenos de selectividad funcional, nos propusimos desarrollar un método que permitiera detectar la respuesta celular global derivada de las interacciones originadas en la interacción del receptor a cada ligando. Por esta razón, se llevó a cabo la puesta a punto de un método fenotípico basado en DMR (57,70,71,131) que ofrece una respuesta global del sistema al efecto de cada ligando con una elevada sensibilidad a ligeros cambios en el efecto de cualquier vía.

En la puesta a punto del método de DMR empleado en la presente tesis doctoral, se utilizaron líneas celulares con expresión endógena del receptor GPR35, la línea humana de carcinoma colorrectal HT-29 y la línea de epitelio de intestino delgado de rata IEC-6. Se estableció una concentración óptima de 15000 células/pocillo para obtener una monocapa celular sobre el sensor RWG que permitiera una correcta lectura de la respuesta celular. Se buscó para cada línea celular el *buffer* de ensayo que produjera menor ruido de fondo en la señal basal y se seleccionó medio *McCoy's 5A* para las HT-29 y HBSS para las IEC-6. Por último, se estableció en 60 minutos el tiempo de incubación necesario para la estabilización de la señal, tras realizar pruebas en un rango de tiempo de 45-90 minutos.

Con esta metodología de DMR se llevaron a cabo cribados de la quimioteca *Prestwick* paralelos a los realizados con BRET.

5.1 Los agonistas identificados presentan selectividad funcional en GPR35.

Como resultado de los cribados de alto rendimiento de la quimioteca *Prestwick* en ensayo de translocación de β -arrestina basado en BRET se identificaron seis compuestos agonistas de hGPR35 y cinco de rGPR35. En ambos cribados se identificó **zaprinast**, un inhibidor de fosfodiesterasas selectivas de GMPc, PDE5A y PDE9A, que fue descrito en 2006 como agonista de GPR35 (61) y usado como

estándar en multitud de publicaciones, así como en la presente tesis doctoral. Este compuesto actúa como agonista total de hGPR35 con una EC_{50} = 8.65 μ M y de rGPR35 con una EC_{50} = 0.22 μ M. Otros autores obtuvieron valores similares para este compuesto en ensayos de BRET (43,44,65). También fueron identificados otros dos agonistas de hGPR35 y rGPR35 en ensayos de BRET, el **dicumarol** con valores de EC_{50} = 1.94 μ M y EC_{50} = 3.56 μ M para humano y rata respectivamente y la **cromolina disódica** con valores de EC_{50} = 7.59 μ M y EC_{50} = 7.64 μ M; ninguno de los compuestos mostró una selectividad inter-especie significativa; sin embargo, el **dicumarol** se comportó como un agonista parcial para el ortólogo humano y como agonista total en rata.

Se identificaron otros tres agonistas parciales de hGPR35 e inactivos para rGPR35: el **ácido niflúnico** (EC_{50} = 4.34 μ M), el **oxantel pamoato** (EC_{50} = 0.33 μ M) y el **pamoato de pirivinio** (EC_{50} = 0.59 μ M). Debido a las similitudes entre **oxantel pamoato** y **pamoato de pirivinio**, tanto en potencia como eficacia se planteó la posibilidad de que fuera la propia sal de pamoato la que ejerciera de agonista de hGPR35; en consecuencia, se evaluó la potencia del **ácido pamoico** obteniendo una EC_{50} = 0.28 μ M y una E_{max} = 78.19 % con respecto al efecto máximo de **zaprinast**. Además, se confirmó el carácter parcial de la actividad del ácido pamoico en un ensayo donde se obtuvo el punto de cruce entre curvas de **zaprinast** coincubadas con concentraciones crecientes de **ácido pamoico**, que coincidió con la E_{max} del **ácido pamoico**.

En el cribado en rGPR35 mediante BRET se identificaron dos agonistas parciales selectivos para el ortólogo de rata: el **dihidrato de quercetina** (EC_{50} = 7.34 μ M) y la **luteolina** (EC_{50} = 8.32 μ M).

En los cribados de la quimioteca Prestwick realizados mediante DMR en células HT-29 e IEC-6, se identificaron 13 ligandos con efecto agonista sobre hGPR35 y siete ligandos con efecto agonista sobre rGPR35. Del grupo de agonistas de hGPR35 se seleccionaron los siete más activos para el cálculo de su potencia. El **zaprinast** con una EC_{50} = 0.45 μ M fue el compuesto más activo y como cabía esperar se comportó como agonista total. Se han descrito datos similares por otros autores empleando la misma metodología (57,118,119,131). Además, se identificaron dos agonistas parciales, el **maleato de triptamina** (EC_{50} = 3.06 μ M) y

la **benzocaína** ($EC_{50}= 3.13 \mu\text{M}$). Las curvas concentración-respuesta del resto de los compuestos estudiados no se ajustan a una curva sigmoidea completa, que atribuimos a problemas de solubilidad a las concentraciones más altas ensayadas.

En el grupo de agonistas de rGPR35, al igual que en el de hGPR35 se seleccionaron los compuestos más activos para calcular su potencia, una vez más el **zaprinast** con una $EC_{50}= 5.15 \mu\text{M}$ se comportó como un agonista total, al igual que el **sulindac** ($EC_{50}= 0.69 \mu\text{M}$). En este caso no consta publicado ningún valor de **zaprinast** comparable. Además, se identificaron dos agonistas parciales, el **citrate de tamoxifeno** ($EC_{50}= 1.57 \mu\text{M}$) y el **bromhidrato de fenoterol** ($EC_{50}= 0.31 \mu\text{M}$).

A partir de los cribados realizados, queda patente que la mayoría de los compuestos identificados son selectivos para uno de los dos ortólogos estudiados, con la excepción de **dicumarol** y **cromolina disódica**. El **zaprinast** a pesar de ser activo en ambos, muestra una mayor potencia en rata que en humano (hecho confirmado en otros estudios (43,61)). Estos resultados podrían proporcionar información sobre el modo de unión de los ligandos en el sitio de unión del receptor, dando como consecuencia en último término, las bases de la selectividad entre especies.

Los estudios con mutantes y *modeling* de los ortólogos de humano y rata llevados a cabo por Jenkins y colaboradores (70) demostraron la contribución de los residuos aminoácidos R4.60, R(164) y R6.58 a la unión de ligandos en la región TMH3-4-5-6 (70), identificada como una zona crucial en la unión de del agonista y el inicio de la activación de GPR35 (74). Por otra parte; a pesar de la elevada similitud de los dominios transmembrana de los GPCRs de clase A cristalizados, los *loops* extracelulares, concretamente el *loop* extracelular 2 (ECL2), muestran una baja conservación de la estructura primaria y terciaria (132). Por ello, no sorprende que residuos aminoácidos de *loops* extracelulares junto con residuos de las zonas más externas de los dominios transmembrana participen en la unión y reconocimiento de ligandos.

Los receptores hGPR35 y rGPR35 difieren tanto en la longitud como en la secuencia de ECL2, donde las diferencias más relevantes las producen los residuos R4.62 en rGPR35 que corresponde a una leucina en humanos y a otros dos

residuos (serina y glutamina) que se encuentran a una distancia de 2 y 4 residuos, respectivamente, de la cisteína del puente disulfuro entre ECL2 y TMH3. Estas variaciones entre especies afectan en gran medida a los residuos de ECL2 implicados en la unión del ligando (70). Por tanto, cabe la posibilidad de que la posición exacta que tomen los agonistas en el sitio de unión y los residuos con los que interactúen esté determinando, en cierta medida, la selectividad observada entre ortólogos de diferentes especies.

Respecto a las técnicas de medida utilizadas en nuestros ensayos, la potencia del **zaprinast** en hGPR35 obtenida en ensayos de DMR fue significativamente superior (t-student; $P < 0.005$) que la obtenida mediante BRET. Esta diferencia de potencia también fue descrita para **cromolina disódica** y **ácido niflúmico** (57). El resto de los agonistas identificados también presentaron de forma acusada estas diferencias de potencia entre las dos técnicas empleadas. Estas diferencias parecen estar relacionadas con las bases metodológicas de ambas técnicas, ya que la respuesta de BRET obtenida por la proximidad de la β -arrestina-II-Rluc 6 al complejo eYFP-GPR35 permite detectar la activación del receptor, pero no la movilización de todos los efectores generada por dicha activación. Sin embargo, dicha movilización efectiva de las vías de señalización acopladas a este receptor si se puede detectar globalmente en los ensayos de DMR. En el caso de los ligandos con selectividad conformacional se produciría una activación diferencial (sesgada) de vías de señalización (20,27). Este comportamiento por parte de los agonistas del receptor GPR35 podría estar relacionado con efectos de selectividad funcional enmascarados en el BRET que únicamente detecta la vía de β -arrestina, pero desenmascarados al medir la respuesta global de la célula en ensayos de DMR. Lo que puede explicar las diferencias en la potencia observada por ambas técnicas.

El sesgo del sistema podría deberse también a la preferencia del receptor por una proteína transductora en concreto o bien a la expresión diferencial de los efectores de señalización en las líneas celulares u otros cofactores implicados (23,133). De todos modos, es importante recordar que los fenómenos de selectividad observados se refieren a efectos farmacológicos diferentes en distintos tipos de ensayos y diferentes sistemas y por tanto no pueden descartarse diferencias de

unión al receptor, de amplificación diferencial de señales de transducción, diferencias en la expresión del receptor, etc.

A pesar de estas limitaciones, podemos afirmar que disponemos de diferentes agonistas con distinta selectividad entre especies y que mediante las técnicas de estudio empleadas hemos detectado que los compuestos identificados activan de forma preferente alguna vía de señalización específica mediada por el receptor, produciendo un efecto de selectividad funcional.

5.2 Los antagonistas identificados presentan selectividad funcional en GPR35.

Como resultado del cribado de alto rendimiento de la quimioteca prestwick en ensayo de translocación de β -arrestina basado en BRET se identificaron siete compuestos antagonistas sobre efecto de zaprinast en el receptor hGPR35. De ellos, cuatro glucósidos esteroides extraídos de *Digitalis purpurea* clasificados como heterósidos cardiotónicos: **digitoxigenina** (IC_{50} = 2.44 μ M), **digoxigenina** (IC_{50} = 2.51 μ M), **digoxina** (IC_{50} = 3.82 μ M) y **proscilaridina A** (IC_{50} = 1.76 μ M) no revirtieron totalmente el efecto del **zaprinast** (antagonistas incópletos), alcanzando porcentajes de reversión del efecto del mismo comprendidos entre 50.15 % y 79.55 %. Estos antagonistas se comportaron de forma similar frente al **ácido pamoico** en el receptor hGPR35 (47.22–59.12 % de reversión) con potencias similares a las obtenidas con **zaprinast** en el caso de **proscilaridina A** (IC_{50} = 0.45 μ M) y significativamente superiores para **digitoxigenina**, **digoxigenina** (t-student; $P < 0.01$) y **digoxina** (t-student; $P < 0.05$) (IC_{50} de 0.009, 0.023 y 0.98 μ M respectivamente). Los tres compuestos restantes identificados en el cribado fueron: **bisacodilo** (un compuesto tricíclico que aumenta las contracciones peristálticas del colon), que actuó como antagonista incompleto del efecto del **zaprinast** (IC_{50} = 5.29 μ M) sobre el receptor hGPR35 e inactivo sobre el efecto del **ácido pamoico**. **Estrofantidina**, un heterósido extraído de las plantas del género *Strophanthus* que al igual que **digitoxigenina** y **digoxigenina**, actuó como antagonista incompleto del efecto de **zaprinast** y **pamoico** con IC_{50} = 0.51 μ M y IC_{50} = 0.59 μ M respectivamente. Por último, la **tomatina** inhibió completamente la actividad del **zaprinast** y del **ácido pamoico**, aunque con un

efecto significativamente superior (t-student; $P < 0.05$) frente al **zaprinast** ($IC_{50} = 0.79 \mu M$) que frente al **ácido pamoico** ($IC_{50} = 3.66 \mu M$).

En cuanto al cribado de antagonistas mediante BRET para el ortólogo rGPR35; se identificaron dos estrógenos no esteroideos sintéticos, selectivos para este receptor: el **dienestrol** y el **hexestrol**, que se comportaron como antagonistas incompletos de baja potencia, con valores de IC_{50} de $85.07 \mu M$ y $64.66 \mu M$ respectivamente. Además, también resultaron activos la **proscilaridina A** ($IC_{50} = 0.89 \mu M$) como antagonista incompleto y la **tomatina** ($IC_{50} = 1.78 \mu M$) como antagonista total. Por último, se completó el perfil de actividad de los *hits* obtenidos para hGPR35, estudiando su efecto sobre rGPR35, donde a excepción del **bisacodilo** ($IC_{50} = 1.97 \mu M$) y la **digoxigenina** ($IC_{50} = 0.58 \mu M$) que mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al valor obtenido en hGPR35 (t-student; $P < 0.001$ y $P < 0.05$ respectivamente) todos los compuestos presentaron potencias similares. Sin embargo, se aprecia una disminución considerable de la reversión el efecto del **zaprinast** en todos ellos.

Los antagonistas estudiados en los ensayos de BRET también fueron evaluados en células HT-29 frente al **zaprinast** mediante ensayos de DMR. Se obtuvo una $IC_{50} = 0.47 \mu M$ para **proscilaridina A**, que no mostró diferencias significativas con respecto al valor obtenido mediante BRET, sin embargo, sí que se registró un aumento del porcentaje máximo de reversión del efecto de **zaprinast** en DMR pasando de 50.15 % a 85.22 %. Se obtuvo una $IC_{50} = 2.38 \mu M$ para la **digoxina**, mostrando por lo tanto mayor potencia en ensayos de DMR. Por el contrario, la **digitoxigenina**, la **digoxigenina**, el **bisacodilo** y la **estrofantidina** no mostraron actividad inhibitoria de la respuesta del efecto del **zaprinast** en ensayos de DMR. La **tomatina** se comportó como antagonista incompleto del efecto del **zaprinast** en ensayos de DMR, con un % de reversión de 62.80 % y una potencia ($IC_{50} = 9.29 \mu M$) considerablemente inferior a la obtenida mediante ensayos de BRET.

En base al tipo de compuestos identificados, se decidió incluir en este grupo la **digitonina**, otro heterósido cardiotónico, disponible en la quimioteca del grupo BioFarma. Este compuesto se comportó como antagonista del efecto del **zaprinast** y del **ácido pamoico** en hGPR35 en ensayos de BRET con valores de potencia similares ($IC_{50} = 4.08 \mu M$ e $IC_{50} = 4.82 \mu M$ respectivamente). Se obtuvieron

resultados similares como antagonista del efecto de **zaprinast** en rGPR35 ($IC_{50}= 3.41 \mu M$). Al igual que en BRET, la **digitonina** se comportó como un antagonista del efecto de **zaprinast** en células HT-29 en ensayos de DMR, con una $IC_{50}= 1.83 \mu M$, potencia superior (t-student; $P<0.05$) a la obtenida mediante BRET.

Además de los antagonistas comentados anteriormente; se consiguió identificar 12 antagonistas selectivos para hGPR35 y tres selectivos para rGPR35 realizando cribados de la quimioteca Prestwick mediante DMR. Los 12 antagonistas de hGPR35 se incluyeron en ensayos de translocación de β -arrestina; sin embargo, solo tres compuestos mostraron actividad en ensayos de BRET: los antagonistas incompletos **asiaticosida** ($IC_{50}= 0.60 \mu M$) y **estriol** ($IC_{50}= 6.09 \mu M$) y el antagonista **hidrocloruro de pronetanol** ($IC_{50}= 0.49 \mu M$); aunque con una disminución de la potencia, leve en el caso del **hidrocloruro de pronetanol** ($IC_{50}= 1.65 \mu M$) y más evidente para la **asiaticosida** ($IC_{50}= 5.35 \mu M$) y el **estriol** ($IC_{50}= 10.7 \mu M$) (t-student; $P<0.01$). Además, se produjo una disminución significativa en el porcentaje de reversión máximo del efecto del **zaprinast** en los tres casos, más evidente en el **hidrocloruro de pronetanol** que se comportó como antagonista incompleto (% reversión máximo= 47.95 %).

Al igual que el resto de los compuestos analizados como antagonistas de hGPR35 mediante BRET, se estudió su efecto sobre la actividad del **ácido pamoico** de los 12 compuestos identificados en este cribado; nuevamente los tres compuestos activos en BRET frente al **zaprinast** fueron los únicos que inhibieron el efecto del **ácido pamoico** en hGPR35. La **asiaticosida** y el **hidrocloruro de pronetanol** mostraron potencias similares a las obtenidas frente al zaprinast, sin embargo, el hidrocloruro de pronetanol presentó menor eficacia con un % máximo de reversión del 25.60 %. En el caso de los antagonistas de rGPR35, ninguno resultó activo en ensayos de translocación de β -arrestina.

De forma generalizada los compuestos estudiados (a excepción de la **proscilaridina A** y la **tomatina**) presentaron selectividad por alguno de los ortólogos del receptor GPR35 empleados. Esta selectividad parece mayor entre los antagonistas identificados mediante DMR. Nuevamente, estos resultados podrían convertir a estos compuestos en herramientas farmacológicas relevantes para el estudio de la interacción entre ligando y receptor en diferentes especies

planteándose como fin último el conocimiento y desarrollo de un modelo animal útil para el estudio de una posible diana terapéutica.

El estudio del efecto antagonista de los *hits* confirmados frente a la actividad del **zaprinast** y del **ácido pamoico** en ensayos de BRET pone de manifiesto la existencia de fenómenos de selectividad en el sistema ligando-receptor-efector que podrían estar relacionados con alteraciones en las interacciones específicas de cada agonista con residuos aminoacídicos de su sitio de unión.

El modelo de interacción de GPR35 con **zaprinast** y **ácido pamoico** planteado por Zhao y colaboradores describe la colocación de ambos agonistas en el sitio de unión y las diferencias en la interacción con los residuos aminoacídicos más relevantes para la activación del receptor (74). Los estudios de *docking* sugieren que el bolsillo de unión del **ácido pamoico** se encuentra en la región TMH3-4-5-6 del receptor donde es capaz de formar varias interacciones altamente polares con los residuos de arginina incluidos puentes salinos (R3.36) e interacciones catiónicas. También puede formar puentes de hidrógeno y principalmente interacciones de van der Waals con otros residuos aminoacídicos. Esta molécula se estabiliza mediante puentes de hidrógeno con el residuo R(164) de ECL2. En el caso del **zaprinast**, que mostró una EC₅₀ considerablemente superior que la del **ácido pamoico**, su bolsillo de unión también se ubica en la región TMH3-4-5-6 pero en una posición más alejada de la zona extracelular, motivado por el hecho de que el **zaprinast** es una molécula apolar que no forma puentes salinos, si no que crea puentes de hidrógeno con R4.60 y se une por fuerzas de van der Waals con otros residuos aminoacídicos como L3.33, L6.51 y L6.55. Y3.32 también participa en la unión del **zaprinast** interactuando con su anillo heterocíclico. (**figura 1.8**)

Los estudios realizados con mutantes para residuos de arginina en la región TMH3-4-5-6 (R4.60, R6.58, R3.36, R(164) y R(167) en el *loop* ECL2) muestran cambios en la señalización de los dos agonistas estudiados. El reemplazo de R4.60 por una alanina impide la activación del receptor inducida por el **zaprinast** y el **ácido pamoico** en la señalización por β -arrestina y por ERK1/2. La inactivación de R6.58, pese a no formar ningún enlace con el **zaprinast**, genera un cambio conformacional que aumenta 30 veces la potencia del **zaprinast** en ensayos de pERK. Además, mutantes para la arginina R(167) producen un descenso de

potencia del **ácido pamoico** en la vía de β -arrestina, al mismo tiempo que mutantes para R(164) potencian el efecto de ambos agonistas.

Los estudios de *modeling* señalan a R3.36 como el responsable principal de la interacción del **ácido pamoico** en la forma activa de GPR35. Este residuo también parece interactuar con el **zaprinast**, pero a un nivel energético inferior. Otros estudios independientes identificaron Y3.32 como un residuo importante para la acción del **zaprinast** en el sitio de unión (43). Estos estudios de *modeling* postulan que Y3.32 es parte importante de los sitios de unión de ambos agonistas en la forma activa del receptor, con interacciones más fuertes para el **zaprinast** (**figura 1.7**).

El estudio de los antagonistas identificados mediante dos técnicas complementarias reveló para la mayoría de los compuestos (con la excepción de **proscilaridina A**) un sesgo de actividad con una potencia antagonista significativamente superior en uno de los dos métodos empleados. Un fenómeno de selectividad funcional podría provocar la inhibición de una o varias rutas de señalización causando el efecto observado; por ejemplo, un mayor efecto antagonista en ensayos de DMR que en ensayos de BRET sugiere un descenso de la respuesta en rutas que no impliquen movilización de β -arrestina. Sin embargo, hay que tener presente que estos efectos farmacológicos fueron registrados con metodologías diferentes en sistemas celulares distintos, que al igual que en el estudio de agonistas, no pueden descartarse diferencias de unión al receptor, de amplificación diferencial de señales de transducción, diferencias en la expresión del receptor, etc.

La mayoría de los compuestos estudiados produjeron una inhibición incompleta del efecto de los agonistas, tanto para hGPR35 como para rGPR35. Este fenómeno de antagonismo incompleto es característico de moduladores alostéricos negativos (134) (**figura 5.2**). Debido a que los moduladores alostéricos se unen a su propio sitio de unión, independiente de la unión ortostérica del agonista endógeno, sus efectos serán saturables y no se observará ningún efecto adicional del modulador cuando su sitio de unión alostérico esté saturado. Este efecto contrasta con los sistemas ortostéricos que teóricamente pueden mostrar una cinética competitiva siempre que se agreguen concentraciones variables de agonista y antagonista al

sistema. La saturación del efecto de los moduladores alostéricos permite que cambien, pero no eliminen por completo los efectos de los agonistas (134).

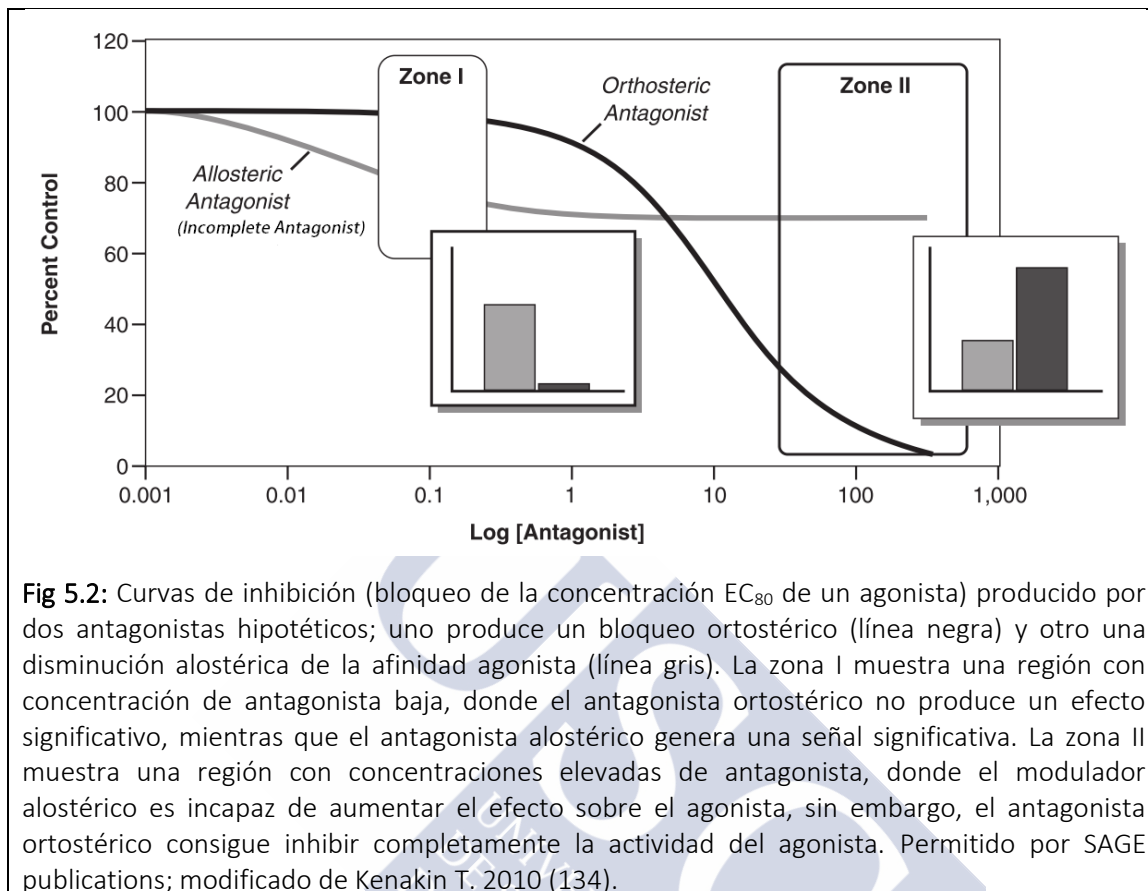
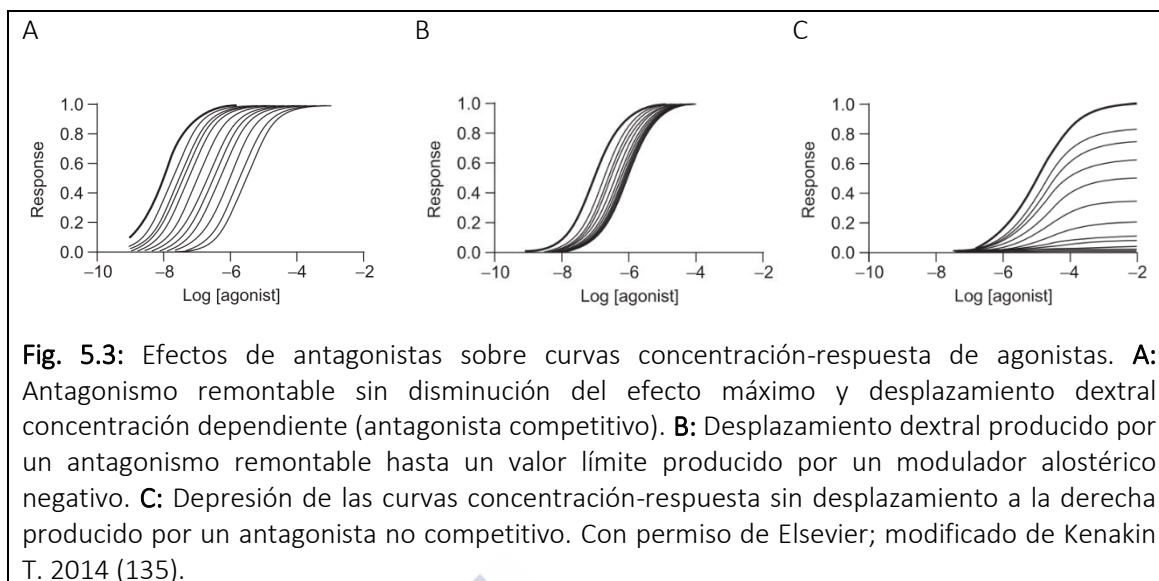


Fig 5.2: Curvas de inhibición (bloqueo de la concentración EC_{80} de un agonista) producido por dos antagonistas hipotéticos; uno produce un bloqueo ortostérico (línea negra) y otro una disminución alostérica de la afinidad agonista (línea gris). La zona I muestra una región con concentración de antagonista baja, donde el antagonista ortostérico no produce un efecto significativo, mientras que el antagonista alostérico genera una señal significativa. La zona II muestra una región con concentraciones elevadas de antagonista, donde el modulador alostérico es incapaz de aumentar el efecto sobre el agonista, sin embargo, el antagonista ortostérico consigue inhibir completamente la actividad del agonista. Permitido por SAGE publications; modificado de Kenakin T. 2010 (134).

Ante la posibilidad de haber identificado en la presente tesis doctoral una serie de moduladores alostéricos negativos, se realizó un estudio del desplazamiento de la curva de agonista para determinar el modo de antagonismo de cada compuesto. Así, atendiendo a los modelos de los posibles efectos de un antagonista sobre la curva concentración-respuesta de un agonista planteados por Kenakin (135), los efectos sobre la afinidad y/o la eficacia del agonista podrían caracterizar tres tipos de comportamiento antagonista: competitivo, modulador alostérico negativo y no competitivo (con o sin reserva de receptores) (**figura 5.3**).



El estudio del desplazamiento de la curva del **zaprinast** y del **pamoico** por parte de los *hits* identificados en los cribados de BRET, realizado mediante concentraciones crecientes de estos compuestos reveló que todos ellos ejercieron un efecto antagonista, desplazando a la derecha y de forma paralela la curva de los agonistas (a excepción de la **tomatina**). Sin embargo, este desplazamiento no fue concentración-dependiente, por lo que el efecto de los compuestos no se ajusta a un modelo de antagonismo competitivo ortostérico. El patrón de desplazamiento resultante sugiere que todos ellos se comportan como moduladores alostéricos negativos, según el modelo de Kenakin (135). La **tomatina** ejerció un efecto antagonista no remontable en todas las condiciones ensayadas, lo que sugiere un tiempo de permanencia en el sitio de unión elevado que impidió la recuperación del efecto del agonista. Se detectó el mismo efecto para la **digitoxigenina** y la **digoxina** en los ensayos realizados por DMR.

Por último, la **digitonina** ejerció un efecto antagonista remontable para todas las condiciones ensayadas con hGPR35, pero no remontable en rGPR35, por lo que es posible que estas diferencias sean debidas a que el tiempo de permanencia de este modulador alostérico en el sitio de unión dependa de diferencias estructurales y/o conformacionales entre los ortólogos hGPR35 y rGPR35.

En cuanto a los hits identificados mediante cribados con DMR, las propiedades de solubilidad de este grupo de compuestos impidieron que, en su mayoría, se

estudiase el modo de antagonismo a concentraciones superiores a 10 μM , limitando la interpretación de los datos obtenidos. En los ensayos de BRET; la **asiaticosida**, la **ciproterona** y el **estriol** produjeron un desplazamiento a la derecha y de forma paralela de la curva de agonista, dejando patente su efecto antagonista, sin embargo, la imposibilidad de estudiar el desplazamiento ejercido a concentraciones superiores no permitió discernir entre el efecto de un antagonista competitivo o de un modulador alostérico negativo. La **maprotilina** y la **metantelina** produjeron un efecto antagonista no remontable sobre la curva del **zaprinast**, ello implica un tiempo de permanencia superior en el sitio de unión que impidió la recuperación del efecto del **zaprinast** y el equilibrio en el sistema agonista-receptor-antagonista. Esto mismo ocurrió en el caso de la **tietilperacina**, pero la posibilidad de obtener una curva de desplazamiento adicional a 30 μM permitió detectar un efecto de desplazamiento que concuerda con una situación de antagonismo alostérico no remontable, producido por un modulador alostérico negativo que no permite la recuperación del efecto del agonista. Por último, el **pronetanol** ejerció un efecto de inhibición total sobre la curva de **zaprinast** sin producir desplazamiento a la derecha, tanto a 10 μM como a 30 μM , ajustándose a un modelo de antagonismo ortostérico no competitivo. Los ensayos realizados mediante DMR no permitieron una mayor caracterización de los compuestos, ya que no produjeron un desplazamiento significativo de la curva de **zaprinast**.

A pesar de las limitaciones metodológicas; podemos afirmar que disponemos de diferentes antagonistas que presentan selectividad por alguno de los ortólogos del receptor GPR35. **Proscilaridina A** y **tomatina** fueron equipotentes para ambas especies. Estos antagonistas identificados (a excepción de la **proscilaridina A**) mostraron un sesgo de potencia/eficacia significativamente superior en uno de los dos métodos empleados, atribuible a un fenómeno de selectividad funcional, mostrando diferencias de potencia en la translocación de β -arrestina con respecto a una medida de respuesta global fenotípica. Todos los compuestos estudiados (a excepción de la **digitonina**) produjeron una inhibición incompleta del efecto de los agonistas en hGPR35 y/o rGPR35. Este efecto es compatible con un modelo de alosterismo negativo; que se confirmó por el desplazamiento a la derecha y de forma paralela, pero sin una relación concentración-dependiente de la curva de los agonistas.

5.3 Ampliación estructural con derivados del colesterol

Se llevó a cabo una expansión de *hits* en base a la relación estructura-actividad de los moduladores alostéricos identificados, entre los que existe un predominio de derivados de esterol. Por ello se planteó un estudio de antagonismo en un panel de compuestos endógenos derivados del colesterol, estableciendo una ampliación estructural que permitiera identificar, posiblemente, moduladores alostéricos negativos de GPR35 presentes en condiciones fisiológicas normales o patológicas.

Entre los derivados de esterol estudiados; el **β -estradiol**, la **estrona** y la **hidrocortisona** se comportaron como antagonistas parciales del efecto del zaprinast sobre hGPR35, con potencias mil veces superiores en los ensayos de translocación de β -arrestina mediante BRET que en los obtenidos mediante DMR como respuesta global de células HT-29. Sin embargo, estos compuestos alcanzaron una mayor eficacia en ensayos de DMR. El **β -estradiol** también se comportó como antagonista parcial del efecto del **ácido pamoico** sobre hGPR35 en ensayos de BRET, aunque con una potencia mucho menor ($IC_{50} = 10.35$ nM para el zaprinast e $IC_{50} = 1.72$ μ M para el ácido pamoico), la **aldosterona**, el **colecalfiferol**, la **estrona** y la **hidrocortisona** no mostraron efecto antagonista sobre el **ácido pamoico**. Por el contrario, la **corticosterona** y la **dihidrotestosterona** se comportaron como antagonistas incompletos y selectivos del **ácido pamoico** en ensayos de BRET, aunque ambos respondieron como antagonistas incompletos del efecto de **zaprinast** en ensayos de DMR.

El estudio de estos compuestos en rGPR35 volvió a mostrar un efecto de antagonismo incompleto del **β -estradiol** sobre **zaprinast**. La IC_{50} obtenida en ensayos de translocación de β -arrestina ($IC_{50} = 4.71$ μ M) es significativamente inferior (t-student; $P < 0.001$) que la obtenida para la forma humana del receptor. Por el contrario, la potencia obtenida en ensayos de DMR en rGPR35 ($IC_{50} = 0.54$ μ M) resultó significativamente superior (t-student; $P < 0.05$) a la obtenida en hGPR35 ($IC_{50} = 2.02$ μ M). La **progesterona**, actuó como antagonista sobre el zaprinast en ensayos de BRET realizados en rGPR35; al contrario que en los ensayos para el ortólogo humano donde no mostró actividad frente al **zaprinast** en ensayos de BRET, pero si en DMR.

En este grupo de compuestos se detectó nuevamente un efecto antagonista incompleto, atribuible a la saturación de su sitio de unión alostérico, lo que se traduce en una disminución del efecto del agonista, pero incapaz de alcanzar una inhibición total del mismo.

Por tanto, se procedió al estudio del modo de antagonismo de todos ellos. Al igual que para otros derivados de esterol identificados en la presente tesis doctoral, el estudio del desplazamiento de la curva de agonista por estos compuestos reveló un efecto atribuible a moduladores alostéricos negativos. Este efecto produjo un desplazamiento a la derecha paralelo y sin relación concentración-dependiente, que fue más evidente en el caso del **β -estradiol** en hGPR35. Además, este compuesto evitó la recuperación total de la eficacia del zaprinast en rGPR35.

En conjunto, los modelos estructurales y los ensayos de interacción ligando receptor presentados, establecen un punto de partida para la interpretación de las diferencias de selectividad funcional observadas en los compuestos estudiados en la presente tesis doctoral. Más allá de la selectividad entre especies observada para los agonistas identificados; como por ejemplo el **ácido pámico**, el **oxantel pamoato** y el **pamoato de privino** para humano o el **dihidrato de quercetina** y la **luteolina** para rata; los modelos de *docking* para el **zaprinast** y el **ácido pámico** revelan diferencias de colocación e interacción con los residuos del sitio de unión. Estas diferencias podrían explicar la selectividad observada en los moduladores alostéricos negativos identificados como antagonistas de hGPR35 y dar las claves para el desarrollo de nuevos ligandos de este receptor.

La utilización combinada de dos técnicas complementarias para la identificación y el estudio de los antagonistas, una de ellas basada en la translocación de β -arrestina como consecuencia de la activación del receptor y otra en la redistribución dinámica de masas producida por la activación de las vías de señalización acopladas al receptor; revelaron, en la mayoría de los casos, un posible efecto de selectividad funcional como responsable del bloqueo específico de rutas señalización dependientes de la movilización de β -arrestina (por ejemplo: la **digoxina**, la **digitonina**, el **estriol** y el **hidrocloruro de pronetanol**) o de rutas que no requieran de la activación de esta proteína (la **tomatina**, la **digitoxigenina** y la **digoxigenina**). Sin embargo, debido a la distinta naturaleza de las técnicas y a

la utilización de sistemas biológicos diferentes, no se puede descartar que al menos parte de la selectividad detectada dependa de otros fenómenos, como por ejemplo: amplificación diferencial de vías de señalización o diferencias en la expresión del receptor. La relación entre interacción de determinados residuos aminoacídicos del sitio de unión TMH3-4-5-6 con los agonistas de GPR35 y una activación selectiva de las diferentes vías de señalización quedó patente en los modelos descritos (74). Basándonos en estos modelos, cabe la posibilidad de que los moduladores alostéricos identificados tanto en los HTS realizados como en el cribado de productos endógenos de colesterol actúen impidiendo la interacción entre ciertos residuos y el agonista produciendo un sesgo en las rutas de señalización activadas.

En resumen; en la presente tesis se ha identificado un grupo de agonistas selectivos para las formas de humano y de rata del receptor huérfano GPR35, a partir del cribado de la quimioteca *Prestwick chemical Library*[®], empleando un ensayo basado en la translocación de β -arrestina mediante BRET. Con la misma técnica se han identificado una serie de compuestos antagonistas, aparentemente moduladores alostéricos negativos de GPR35 a partir del cribado de esta quimioteca. Además, se ha puesto a punto una metodología basada en redistribución dinámica de masas que ha permitido identificar en la quimioteca *Prestwick chemical Library*[®] nuevos compuestos agonistas selectivos para los ortólogos de GPR35 estudiados; así como un nuevo grupo de antagonistas con patrón de moduladores alostéricos negativos. El perfil de potencia/eficacia obtenido mediante las dos técnicas para los compuestos antagonistas reveló un sesgo en la modulación de las vías de señalización implicadas; atribuible al menos en parte a un efecto de selectividad funcional.

Por tanto; en la presente tesis doctoral disponemos de una pequeña subquimioteca de herramientas farmacológicas con perfil de agonistas con selectividad funcional e interespecie (entre los que destacan el **zaprinast**, el **ácido pamoico**, el **oxantel pamoato** y el **pamoato de pirivinio**; así como el **hidrocloruro de triptamina** y la **benzocaína** como agonistas de hGPR35. La **cromolina disódica**, el **dicumarol** y el **sulindac** como agonistas de rGPR35) y moduladores alostéricos negativos con selectividad funcional e interespecie (el **hidrocloruro de pronetanol** y la

proscilaridina A en hGPR35; el **bromuro de hemiclonio** en rGPR35 y la **digitonina** y la **tomatina** en ambos ortólogos) que pueden ser útiles para el conocimiento de la farmacología del receptor GPR35. Con esta subquimioteca también se pueden abordar los retos de la selectividad entre especies que podrían comprometer la traslación en procesos de descubrimiento de fármacos.



6. Conclusiones



6. Conclusiones

1. Se identificaron ligandos agonistas y antagonistas de los ortólogos de humano y rata del receptor GPR35 mediante la medida de la translocación de β -arrestina, realizando cribados de alto rendimiento de la quimioteca Prestwick Chemical Library®.
 - 1.1. El **pamoato de pirivinio** y el **oxantel pamoato** fueron identificados como los agonistas más potentes de hGPR35 ($EC_{50}=0.59 \mu\text{M}$ y $EC_{50}=0.33 \mu\text{M}$ respectivamente). Confirmándose que este efecto es debido al **ácido pamoico** ($EC_{50}=0.28 \mu\text{M}$) presente en ambos *hits*.
 - 1.2. La **cromolina disódica** y el **dicumarol** fueron identificados como los agonistas más potentes de rGPR35 ($EC_{50}=7.64 \mu\text{M}$ y $EC_{50}=3.56 \mu\text{M}$ respectivamente).
 - 1.3. La **digitonina** (con valores de $IC_{50}=4.08 \mu\text{M}$ en hGPR35 e $IC_{50}=3.41 \mu\text{M}$ en rGPR35) y la **tomatina** (con valores de $IC_{50}=0.79 \mu\text{M}$ en hGPR35 e $IC_{50}=1.78 \mu\text{M}$ en rGPR35) fueron identificados como los antagonistas con mejor relación potencia/eficacia en los dos ortólogos de GPR35 estudiados.
2. Se llevó a cabo la puesta a punto de un método fenotípico basado en DMR que permitió observar la respuesta celular global para cada ligando, compensando el sesgo en las vías de señalización.
3. Se identificaron ligandos agonistas y antagonistas de los ortólogos de humano y de rata del receptor GPR35 mediante DMR, realizando cribados de alto rendimiento de la quimioteca Prestwick Chemical Library®.
 - 3.1. El **maleato de trimipramina** y la **benzocaína** fueron identificados como los agonistas más potentes de hGPR35 ($EC_{50}=3.06 \mu\text{M}$ y $EC_{50}=3.13 \mu\text{M}$ respectivamente).
 - 3.2. El **hidrocloruro de pronetanol** y la **proscillaridina A** fueron identificados como los antagonistas más potentes de hGPR35 ($IC_{50}=0.49 \mu\text{M}$ e $IC_{50}=0.47 \mu\text{M}$ respectivamente).
 - 3.3. El **sulindac** fue identificado como el agonista más potente de rGPR35 ($EC_{50}=0.69 \mu\text{M}$).
 - 3.4. El **bromuro de hemiclonio** fue identificado como el antagonista más potente de rGPR35 ($IC_{50}=0.47 \mu\text{M}$).

4. La potencia de **zaprinast** en hGPR35 fue significativamente superior (t-student; $P < 0.005$) en ensayos de DMR que en los realizados mediante BRET. Este comportamiento podría deberse, al menos en parte, a diferencias de selectividad funcional.
5. Los antagonistas estudiados (a excepción de la **proscilaridina A** y la **tomatina**) presentaron diferencias de potencia entre especies (t-student; $P < 0.05$); de forma más notoria en los identificados con DMR.
6. Los antagonistas identificados (a excepción de la **proscilaridina A** y la **estrona**) también mostraron un sesgo en su eficacia (1 compuesto, $P < 0.05$), en su potencia (2 compuestos, $P < 0.05$) o en su eficacia y potencia (15 compuestos, $P < 0.05$) hacia la medida de DMR frente al efecto mostrado en el acoplamiento de β -arrestina; lo cual puede atribuirse a un fenómeno de selectividad funcional.
7. Los compuestos estudiados (a excepción de la **digitonina**) produjeron una inhibición incompleta del efecto de los agonistas en hGPR35 y/o rGPR35. Este efecto es compatible con un modelo de alosterismo negativo; que se confirmó por el desplazamiento a la derecha y de forma paralela, pero sin una relación concentración-dependiente de la curva de los agonistas.
8. El **pronetanol** inhibió de forma completa y no remontable la curva concentración-respuesta de zaprinast, ajustándose a un modelo de antagonismo ortostérico no competitivo.
9. Se llevó a cabo una expansión de *hits* en base a la relación estructura-actividad de los moduladores alostéricos identificados. Por ello se planteó un estudio de antagonismo en un panel de compuestos endógenos derivados del colesterol en el que se identificó el **β -estradiol** como un nuevo modulador alostérico negativo en el receptor GPR35.
10. Se proponen los siguientes *hits* avanzados con distinto perfil farmacológico y con diferencias entre especies:
 - Agonistas en hGPR35: el **zaprinast**, el **ácido pamoico**, el **oxantel pamoato**, el **pamoato de pirivinio**, el **hidrocloruro de triptamina** y la **benzocaína**.
 - Agonistas en rGPR35: el **zaprinast**, la **cromolina disódica**, el **dicumarol** y el **sulindac**.

- Moduladores alostéricos negativos en hGPR35: el **clorhidrato de pronetanol**, la **proscilaridina A** la **digitonina** y la **tomatina**.
- Moduladores alostéricos negativos en rGPR35: el **bromuro de hemiclonio**, la **digitonina** y la **tomatina**.

Estos compuestos pueden ser útiles como herramientas farmacológicas que permitan avanzar en el descubrimiento temprano de fármacos en el receptor GPR35.





A large, stylized number '7' graphic in a light gray color, positioned on the right side of the page. The '7' is composed of a horizontal top bar and a vertical stem that tapers slightly towards the bottom.

7. Bibliografía



7. Bibliografía.

1. Zhang D, Zhao Q, Wu B. Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Cells* 38, 836-42 (2015).
2. Fredriksson R. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256-1272 (2003).
3. Flower DR, Attwood TK, Integrative bioinformatics for functional genome annotation: Trawling for G protein-coupled receptors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 693-701 (2004).
4. Tuteja N. Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal. Behav.* 4, 942-947 (2009).
5. Lagerström MC, Schiöth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 339-357 (2008).
6. Peeters MC, van Westen GJP, Li Q, IJzerman AP. Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 35-42 (2011).
7. Kolakowski LF Jr. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Recept. Channels* 2, 1-7 (1994).
8. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-Activated Receptors. 53, 245-282 (2001).
9. Heldin CH, Lu B, Evans R, Gutkind JS. Signals and receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, (2016).
10. Morris MB, Dastmalchi S, Church WB. Rhodopsin: Structure, signal transduction and oligomerisation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 721-724 (2009).
11. Baltoumas FA, Theodoropoulou MC, Hamodrakas SJ. Interactions of the α -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: A

critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J. Struct. Biol.* 182, 209-218 (2013).

12. Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257 (1995).

13. Iyengar R, Hildebrandt JD. G protein pathways. Part A, Receptors. 296, 680 (2002).

14. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 79-94 (2007).

15. Shi CS, Kehrl JH. PYK2 Links Gq α and G13 α Signaling to NF- κ B Activation. *J. Biol. Chem.* 276, 31845-31850 (2001).

16. Flock T, Ravarani CNJ, Sun D, Venkatakrishnan AJ. Universal allosteric mechanism for G α activation by GPCRs. *Cell* 166, 173-179 (2016).

17. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 274, 32248-32257 (1999).

18. Hanyaloglu AC, Zastrow M. Regulation of GPCRs by Endocytic Membrane Trafficking and Its Potential Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48, 537-568 (2008).

19. Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, Persani L, Lohse MJ. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol.* 7, (2009).

20. Smith JS, Lefkowitz RJ, Rajagopal S. Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov.* 17(4):243-260 (2018).

21. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, Mailman

- RB. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* 320(1):1-13 (2007).
22. Spengler D, Waeber C, Pantaloni C, Holsboer F, Bockaert J, Seeburg PH, Journot L. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature.*365(6442):170-5 (1993).
23. Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW. Biased ligands at G-protein-coupled receptors: Promise and progress. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 308-316 (2014).
24. Shonberg J, Lopez L, Scammells PJ, Christopoulos A, Capuano B, Lane JR. Biased agonism at G protein-coupled receptors: the promise and the challenges—a medicinal chemistry perspective. *Med Res Rev.* 34(6):1286-330 (2014).
25. Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* 268, 4625-4636 (1993).
26. Changeux JP, Edelstein SJ. Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* 308, 1424-1428 (2005).
27. Kenakin TP. Biased signalling and allosteric machines: New vistas and challenges for drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1659-1669 (2012).
28. De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 255, 7108-7117 (1980).
29. Gentry PR, Sexton PM, Christopoulos A. Novel allosteric modulators of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 290, 19478-19488 (2015).
30. Onaran HO, Rajagopal S, Costa T. What is biased efficacy? Defining the relationship between intrinsic efficacy and free energy coupling. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 639-647 (2014).

31. Kenakin TP. Gaddum Memorial Lecture 2014: Receptors as an evolving concept: From switches to biased microprocessors. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4238-4253 (2015).
32. Galandrin S, Oligny-Longpré G, Bouvier M. The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 423-430 (2007).
33. Strachan RT, Ferrara G, Roth BL. Screening the receptorome: an efficient approach for drug discovery and target validation. *Drug Discov. Today* 11, 708-716 (2006).
34. Civelli O, Reinscheid RK, Zhang Y, Wang Z, Fredriksson R, Schiöth HB. G protein-coupled receptor deorphanizations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*; 53:127-46 (2013).
35. Ngo T, Kufareva I, Coleman JLJ, Graham RM, Abagyan R, Smith NJ. Identifying ligands at orphan GPCRs: current status using structure-based approaches. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2934-2951 (2016).
36. Stockert JA, Devi LA. Advancements in therapeutically targeting orphan GPCRs. *Front. Pharmacol.* 6, 1-8 (2015).
37. Roth BL. DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683-694 (2017).
38. Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* 458, 1025-1029 (2009).
39. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, Kolakowski LF Jr, George SR. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. Jan 15;47(2):310-3 (1998).
40. Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, Ψ GPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Mol. Brain Res.* 64, 193-198 (1999).

41. Okumura S, Baba H, Kumada T, Nanmoku K, Nakajima H, Nakane Y, Hioki K, Ikenaka K. Cloning of a G-protein-coupled receptor that shows an activity to transform NIH3T3 cells and is expressed in gastric cancer cells. *Cancer Sci.* 95, 131-135 (2004).
42. Oka S, Ota R, Shima M, Yamashita A, Sugiura T. GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395, 232-237 (2010).
43. Jenkins L, Alvarez-Curto E, Campbell K, de Munnik S, Canals M, Schyler S, Milligan G. Agonist activation of the G protein-coupled receptor GPR35 involves transmembrane domain III and is transduced via $G\alpha_{13}$ and β -arrestin-2. *Br. J. Pharmacol.* 162, 733-748 (2011).
44. Jenkins L, Harries N, Lappin JE, MacKenzie AE, Neetoo-Isseljee Z, Southern C, McIver EG, Nicklin SA, Taylor DL, Milligan G. Antagonists of GPR35 Display High Species Ortholog Selectivity and Varying Modes of Action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 683-695 (2012).
45. MacKenzie AE, Lappin JE, Taylor DL, Nicklin SA, Milligan G. GPR35 as a novel therapeutic target. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2, 1-10 (2011).
46. Southern C, Cook JM, Neetoo-Isseljee Z, Taylor DL, Kettleborough CA, Merritt A, Bassoni DL, Raab WJ, Quinn E, Wehrman TS, Davenport AP, Brown AJ, Green A, Wigglesworth MJ, Rees S. Screening β -arrestin recruitment for the identification of natural ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *J. Biomol. Screen.* 18, 599-609 (2013).
47. Schober A, Siess W. Lysophosphatidic acid in atherosclerotic diseases. *Br. J. Pharmacol.* 167, 465-482 (2012).
48. Gotoh M, Fujiwara Y, Yue J, Liu J, Lee S, Fells J, Uchiyama A, Murakami-Murofushi K, Kennel S, Wall J, Patil R, Gupte R, Balazs L, Miller DD, Tigyi GJ. Controlling cancer through the autotaxin-lysophosphatidic acid receptor axis. *Biochem Soc Trans* 40, 31-36 (2012).

49. Rancoule C, Dusaulcy R, Tréguer K, Grès S, Attané C, Saulnier-Blache JS. Involvement of autotaxin/lysophosphatidic acid signaling in obesity and impaired glucose homeostasis. *Biochimie* 96, 140-143 (2014).
50. Ueda H, Matsunaga H, Olaposi OI, Nagai J. Lysophosphatidic acid: Chemical signature of neuropathic pain. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 61-73 (2013).
51. Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, Ling L. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Biol. Chem.* 281, 22021-22028 (2006).
52. Resta F, Masi A, Sili M, Laurino A, Moroni F, Mannaioni G. Kynurenic acid and zaprinast induce analgesia by modulating HCN channels through GPR35 activation. *Neuropharmacology* 108, 136-143 (2016).
53. Milligan G. Orthologue selectivity and ligand bias: Translating the pharmacology of GPR35. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 317-325 (2011).
54. Garcia-Dorado D, Agulló L, Sartorio CL, Ruiz-Meana M. Myocardial protection against reperfusion injury: The cGMP pathway. *Thromb. Haemost.* 101, 635-642 (2009).
55. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MP, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Somsen A, Verheugt FW, Niessen HW, Paulus WJ. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation* 126, 830-839 (2012).
56. Lukowski R, Krieg T, Rybalkin SD, Beavo J, Hofmann F. Turning on cGMP-dependent pathways to treat cardiac dysfunctions: Boom, bust, and beyond. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 404-413 (2014).
57. Deng H, Fang Y. Multiple tyrosine metabolites are GPR35 agonists. *Sci. Rep.* 373, 1-12 (2012).
58. Friberg L, Werner S, Eggertsen G, Ahnve S. Rapid Down-regulation of Thyroid Hormones in Acute Myocardial Infarction. *Arch. Intern. Med.* 162, 1388 (2002).

59. Iervasi G, Pingitore A, Landi P, Raciti M, Ripoli A, Scarlattini M, L'Abbate A, Donato L. Low-T3 syndrome: A strong prognostic predictor of death in patients with heart disease. *Circulation* 107, 708-713 (2003).
60. Maravillas-Montero JL, Burkhardt AM, Hevezi PA, Carnevale CD, Smit MJ, Zlotnik A. Cutting Edge: GPR35/CXCR8 Is the Receptor of the Mucosal Chemokine CXCL17. *J. Immunol.* 194, 29-33 (2015).
61. Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Shinjo K. Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. *FEBS Lett.* 580, 5003-5008 (2006).
62. Yang Y, Lu JY, Wu X, Summer S, Whoriskey J, Saris C, Reagan JD. G-protein-coupled receptor 35 is a target of the asthma drugs cromolyn disodium and nedocromil sodium. *Pharmacology* 86, 1-5 (2010).
63. Yoon MH, Choi JI, Bae HB, Jeong SW, Chung SS, Yoo KY, Jeong CY, Kim SJ, Chung ST, Kim CM. Lack of the nitric oxide-cyclic GMP-potassium channel pathway for the antinociceptive effect of intrathecal zaprinast in a rat formalin test. *Neurosci. Lett.* 390, 114-117 (2005).
64. Choi JH, Kim DH, Yun IJ, Chang JH, Chun BG, Choi SH. Zaprinast inhibits hydrogen peroxide-induced lysosomal destabilization and cell death in astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 571, 106-115 (2007).
65. Jenkins L, Brea J, Smith NJ, Hudson BD, Reilly G, Bryant NJ, Castro M, Loza MI, Milligan G. Identification of novel species-selective agonists of the G-protein-coupled receptor GPR35 that promote recruitment of β -arrestin-2 and activate G α 13. *Biochem. J.* 432, 451-459 (2010).
66. Zhao P, Sharir H, Kapur A, Cowan A, Geller EB, Adler MW, Seltzman HH, Reggio PH, Heynen-Genel S, Sauer M, Chung TD, Bai Y, Chen W, Caron MG, Barak LS, Abood ME. Targeting of the orphan receptor GPR35 by pamoic acid: a potent activator of extracellular signal-regulated kinase and β -arrestin2 with antinociceptive activity. *Mol. Pharmacol.* 78, 560-8 (2010).

67. Neetoo-Isseljee Z, MacKenzie AE, Southern C, Jerman J, McIver EG, Harries N, Taylor DL, Milligan G. High-Throughput Identification and Characterization of Novel Species-selective GPR35 Agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 344, 568-578 (2013).
68. Thimm D, Funke M, Meyer A, Mu C. E. 6-Bromo-8-(4-[3H]methoxybenzamido)-4-oxo-4H-chromene-2- carboxylic Acid: A Powerful Tool for Studying Orphan G Protein- Coupled Receptor GPR35. *J. Med. Chem.* 56, 7084-7099 (2013).
69. Funke M, Thimm D, Schiedel AC, Müller C. E. 8-benzamidochromen-4-one-2-carboxylic acids: Potent and selective agonists for the orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J. Med. Chem.* 56, 5182-5197 (2013).
70. MacKenzie AE, Caltabiano G, Kent TC, Jenkins L, McCallum JE, Hudson BD, Nicklin SA, Fawcett L, Markwick R, Charlton SJ, Milligan G. The Antiallergic Mast Cell Stabilizers Lodoxamide and Bufrolin as the First High and Equipotent Agonists of Human and Rat GPR35. *Mol. Pharmacol.* 85, 91-104 (2013).
71. Deng H, Hu H, He M, Hu J, Niu W, Ferrie AM, Fang Y. Discovery of 2-(4-Methylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile and Thieno[3,2-b]thiophene-2-carboxylic Acid Derivatives as G Protein-Coupled Receptor 35 (GPR35) Agonists. *J. Med. Chem.* 2, 7385-7396 (2011).
72. Deng H, Hu J, Hu H, He M, Fang Y. Thieno[3,2-b]thiophene-2-carboxylic acid derivatives as GPR35 agonists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 22, 4148-4152 (2012).
73. Venkatakrisnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185-194 (2013).
74. Zhao P, Lane TR, Gao HG, Hurst DP, Kotsikorou E, Le L, Brailoiu E, Reggio PH, Abood ME. Crucial positively charged residues for ligand activation of the GPR35 receptor. *J. Biol. Chem.* 289, 3625-3638 (2014).
75. Guo J, Williams DJ, Iii HLP, Ikeda SR. Inhibition of N-Type Calcium Channels by Activation of GPR35, an Orphan Receptor, Heterologously Expressed in Rat Sympathetic Neurons. 324, 342-351 (2008).

76. Fallarini S, Magliulo L, Paoletti T, de Lalla C, Lombardi G. Expression of functional GPR35 in human iNKT cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 420-425 (2010).
77. Reggio PH, Shore DM. The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Front. Pharmacol.* 6, 1-22 (2015).
78. Luttrell LM, Gesty-Palmer D. Beyond Desensitization: Physiological Relevance of Arrestin -Dependent Signaling. *Pharmacol. Rev.* 62, 305-330 (2010).
79. Mackenzie AE, Milligan G. The emerging pharmacology and function of GPR35 in the nervous system. *Neuropharmacology* 113, 661-671 (2017).
80. Ohshiro H, Tonai-Kachi, H, Ichikawa K. GPR35 is a functional receptor in rat dorsal root ganglion neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 344-348 (2008).
81. Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, Carlà V, Sili M, Cavone L, Maratea D, Moroni F. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology* 60, 1227-1231 (2011).
82. Berlinguer-Palmini R, Masi A, Narducci R, Cavone L, Maratea D, Cozzi A, Sili M, Moroni F, Mannaioni G. GPR35 activation reduces Ca²⁺ transients and contributes to the kynurenic acid-dependent reduction of synaptic activity at CA3-CA1 synapses. *PLoS One* 8, 1-11 (2013).
83. Imielinski M, Annese V, Dubinsky M, Kugathasan S, Bradfield JP. Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 41, 1335-1340 (2009).
84. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Horikawa Y, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 26, 163-175 (2000).

85. Ellinghaus D, Folseraas T, Holm K, Ellinghaus E, Melum E, Balschun T, Laerdahl JK, Shiryaev A, Gotthardt DN, Weismüller TJ, Schramm C, Wittig M, Bergquist A, Björnsson E, Marschall HU, Vatn M, Teufel A, Rust C, Gieger C, Wichmann HE, Runz H, Sterneck M, Rupp C, Braun F, Weersma RK, Wijmenga C, Ponsioen CY, Mathew CG, Rutgeerts P, Vermeire S, Schrumpf E, Hov JR, Manns MP, Boberg KM, Schreiber S, Franke A, Karlsen TH. Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis identifies risk loci at GPR35 and TCF4. *Hepatology* 58, 1074-1083 (2013).
86. Forrest CM, Gould SR, Darlington G, Stone TW. Levels of purine, kynurenine and lipid peroxidation products in patients with inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol.* 527, 395-400 (2003).
87. Paluszkiwicz P, Zgrajka W, Saran T, Schabowski J, Piedra JL, Fedkiv O, Rengman S, Pierzynowski SG, Turski WA. High concentration of kynurenic acid in bile and pancreatic juice. *Amino Acids* 37, 637-641 (2009).
88. Sun YV, Bielak LF, Peyser PA, Turner ST, Sheedy PF 2nd, Boerwinkle E, Kardia SL. Application of machine learning algorithms to predict coronary artery calcification with a sibship-based design. *Genet. Epidemiol.* 32, 350-360 (2008).
89. Vander Molen J, Frisse LM, Fullerton SM, Qian Y, Del Bosque-Plata L, Hudson RR, Di Rienzo A. Population Genetics of CAPN10 and GPR35: Implications for the Evolution of Type 2 Diabetes Variants. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 548-560 (2005).
90. Costa V, Federico A, Pollastro C, Ziviello C, Cataldi S, Formisano P, Ciccodicola A. Computational analysis of single nucleotide polymorphisms associated with altered drug responsiveness in type 2 diabetes. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1-14 (2016).
91. Min KD, Asakura M, Liao Y, Nakamaru K, Okazaki H, Takahashi T, Fujimoto K, Ito S, Takahashi A, Asanuma H, Yamazaki S, Minamino T, Sanada S, Seguchi O, Nakano A, Ando Y, Otsuka T, Furukawa H, Isomura T, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 393, 55-60 (2010).

92. Ronkainen VP, Tuomainen T, Huusko J, Laidinen S, Malinen M, Palvimo JJ, Ylä-Herttua S, Vuolteenaho O, Tavi P. Hypoxia-inducible factor 1-induced G protein-coupled receptor 35 expression is an early marker of progressive cardiac remodelling. *Cardiovasc. Res.* 101, 69-77 (2014).
93. Thumkeo D, Watanabe S, Narumiya S. Physiological roles of rho and rho effectors in mammals. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 303-315 (2013).
94. Thorburn AN, Macia L, Mackay C. R. Diet, Metabolites, and «Western-Lifestyle» Inflammatory Diseases. *Immunity* 40, 833-842 (2014).
95. Kuc D, Zgrajka W, Parada-Turska J, Urbanik-Sypniewska T, Turski W. A. Micromolar concentration of kynurenic acid in rat small intestine. *Amino Acids* 35, 503-505 (2008).
96. Barth MC, Ahluwalia N, Anderson TJ, Hardy GJ, Sinha S, Alvarez-Cardona JA, Pruitt IE, Rhee EP, Colvin RA, Gerszten RE. Kynurenic acid triggers firm arrest of leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *J. Biol. Chem.* 284, 19189-19195 (2009).
97. Burkhardt AM, Tai KP, Flores-Guiterrez JP, Vilches-Cisneros N, Kamdar K, Barbosa-Quintana O, Valle-Rios R, Hevezi PA, Zuñiga J, Selman M, Ouellette AJ, Zlotnik A. CXCL17 Is a Mucosal Chemokine Elevated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis That Exhibits Broad Antimicrobial Activity. *J. Immunol.* 188, 6399-6406 (2012).
98. Moroni F, Cozzi A, Sili M, Mannaioni G. Kynurenic acid: A metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *J. Neural Transm.* 119, 133-139 (2012).
99. Zhang R, Xie X. Tools for GPCR drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 33, 372-384 (2012).
100. Bacart J, Corbel C, Jockers R, Bach S, Couturier C. The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnol. J.* 3, 311-324 (2008).
101. Powell E, Xu W. Intermolecular interactions identify ligand-selective activity of estrogen receptor/dimers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 19012-19017 (2008).

102. Bertrand L, Parent S, Caron M, Legault M, Joly E, Angers S, Bouvier M, Brown M, Houle B, Ménard L. The BRET2/arrestin assay in stable recombinant cells: A platform to screen for compounds that interact with G protein-coupled receptors (GPCRs). *J. Recept. Signal Transduct.* 22, 533-541 (2002).
103. Nakajima K, Diaz Gimenez LEV, Gurevich V, Wess J. Designer receptors exclusively activated by designer drugs. *Neuromethods* 108, 29-48 (2015).
104. Deng H, Hu H, Fang Y. Tyrphostin analogs are GPR35 agonists. *FEBS Lett.* 585, 1957-1962 (2011).
105. Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J, Bouvier M. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based β -arrestin2 recruitment assay. *J. Biomol. Screen.* 10, 463-475 (2005).
106. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. β -Arrestins and Cell Signaling. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 483-510 (2007).
107. Milligan G. Principles: Extending the utility of [35 S]GTP γ S binding assays. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 87-90 (2003).
108. Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: A short history. *Br. J. Pharmacol.* 147, (2006).
109. Kostenis E, Waelbroeck M, Milligan G. Techniques: Promiscuous G α proteins in basic research and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 595-602 (2005).
110. Dowell S.J., Brown A.J. Yeast Assays for G Protein-Coupled Receptors. In: Leifert W. (eds) *G Protein-Coupled Receptors in Drug Discovery. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 552. Humana Press, Totowa, NJ (2009).
111. Luttrell LM. «Location, location, location»: activation and targeting of MAP kinases by G protein-coupled receptors. *J. Mol. Endocrinol.* 30, 117-126 (2003).
112. Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. The stability of the G protein-coupled receptor- β -

arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J. Biol. Chem.* 278, 6258-6267 (2003).

113. Marchese A, Paing MM, Temple BR, Trejo J. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 48:601-29. (2008)

114. Fang Y, Frutos AG, Verklereen R. Label-free cell-based assays for GPCR screening. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 11, 357-369 (2008).

115. Fang Y. The development of label-free cellular assays for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 6, 1285-98 (2011).

116. Fang Y. Label-free drug discovery. *Front Pharmacol.* 27; 5:52 (2014).

117. Deng H, Fang Y. Synthesis and agonistic activity at the GPR35 of 5,6-dihydroxyindole-2- carboxylic acid analogues. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 550-554 (2012).

118. Deng H, Hu H, Ling S, Ferrie AM, Fang Y. Discovery of natural phenols as G protein-coupled receptor-35 (GPR35) agonists. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 165-169 (2012).

119. Hu H, Deng H, Fang Y. Label-Free Phenotypic Profiling Identified D-Luciferin as a GPR35 Agonist. *PLoS One* 7, e34934 (2012).

120. Zhao P, Abood ME. GPR55 and GPR35 and their relationship to cannabinoid and lysophospholipid receptors. *Life Sci.* 92, 453-457 (2013).

121. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen.* 4(2):67-73 (1999).

122. Kenakin TP. The Schild regression in the process of receptor classification. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 249-265 (1982).

123. Hu HH, Deng H, Ling S, Sun H, Kenakin T, Liang X, Fang Y. Chemical genomic analysis of GPR35 signaling. *Integr Biol (Camb).* 9(5):451-463. (2017).

124. Smith M, Escamilla JR, Filipek P, Bocian ME, Modahl C, Flodman P, Spence MA. Molecular genetic delineation of 2q37.3 deletion in autism and osteodystrophy: report of a case and of new markers for deletion screening by PCR. *Cytogenet. Genome Res.* 94, 15-22 (2001).
125. Evillard F, Guinchat V, Moreno-De-Luca D, Tabet AC, Gruchy N, Guillem P, Nguyen Morel MA, Leporrier N, Leboyer M, Jouk PS, Lespinasse J, Betancur C. Paracentric inversion of chromosome 2 associated with cryptic duplication of 2q14 and deletion of 2q37 in a patient with autism. *Am. J. Med. Genet. Part A* 152, 2346-2354 (2010).
126. Kenakin TP. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 407-415 (2007).
127. Marchese A, Chen C, Kim YM, Benovic JL. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem. Sci.* 28, 369-376 (2003).
128. Kenakin TP. Ligand-selective receptor conformations revisited: The promise and the problem. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 346-354 (2003).
129. Clarke WP, Bond RA. The elusive nature of intrinsic efficacy. *Trends Pharmacol. Sci.* 19, 270-276 (1998).
130. Schrage R, Schmitz AL, Gaffal E, Annala S, Kehraus S, Wenzel D, Büllsbach KM, Bald T, Inoue A, Shinjo Y, Galandrin S, Shridhar N, Hesse M, Grundmann M, Merten N, Charpentier TH, Martz M, Butcher AJ, Slodczyk T, Armando S, Effern M, Namkung Y, Jenkins L, Horn V, Stößel A, Dargatz H, Tietze D, Imhof D, Galés C, Drewke C, Müller CE, Hölzel M, Milligan G, Tobin AB, Gomeza J, Dohlman HG, Sondek J, Harden TK, Bouvier M, Laporte SA, Aoki J, Fleischmann BK, Mohr K, König GM, Tüting T, Kostenis E. The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. *Nat. Commun.* 6, 1-7 (2015).
131. Wei L, Wang J, Zhang X, Wang P, Zhao Y, Li J, Hou T, Qu L, Shi L, Liang X, Fang Y. Discovery of 2H-Chromen-2-one Derivatives as G Protein-Coupled Receptor-35 Agonists. *J. Med. Chem.* 60, 362-372 (2017).

132. Wheatley M, Wootten D, Conner MT, Simms J, Kendrick R, Logan RT, Poyner DR, Barwell J. Lifting the lid on GPCRs: The role of extracellular loops. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1688-1703 (2012).
133. Kenakin TP. Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 296-302 (2011).
134. Kenakin TP. Ligand detection in the allosteric world. *J. Biomol. Screen.* 15, 119-130 (2010).
135. Kenakin TP. *A Pharmacology Primer. Techniques for More Effective and Strategic Drug Discovery* (Elsevier Inc., 2014).

