

VCH-FC  
DOC-Q  
A 414  
c.l



**INTERACCIONES DE DOPAMINA Y  
ALGUNOS ANALOGOS  
CON EL RECEPTOR DOPAMINERGICO D<sub>2</sub>**

Tesis  
Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Química

**Facultad de Ciencias**  
por  
**MARCELA PAZ ALISTE GÓMEZ**

**Agosto de 1999**

**Director de Tesis: Dr. Bruce K. Cassels.**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION  
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

MARCELA PAZ ALISTE GOMEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de las tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Química, en el exámen de defensa de Tesis rendido el día 9 de Julio de 1999.

**Director de Tesis:**

Dr. Bruce K. Cassels

*Bruce K. Cassels*

**Comisión de Evaluación de la Tesis:**

Dr. Octavio Vasquez (Presidente)

*Octavio Vasquez*

Dra. Leonor Contreras

*Leonor Contreras*

Dra Francesca Faini

*Francesca Faini*

Dra. Luz María Pérez

*Luz María Pérez*

Dr. Alejandro Toro

.....



*Con amor para Andrea  
y mi familia.*

## Agradecimientos



*Quisiera expresar mi más sinceros agradecimientos al Dr. Bruce K. Cassels, Director de esta Tesis, por guiarme a lo largo de este doctorado.*

*A los Dres. George G. Lunt y J. D. Schmidt, por su valiosa ayuda en la realización de esta tesis doctoral.*

*A los Dres. Alejandro Toro y Renato Contreras, quienes siempre me acogieron con amplia disposición para discutir parte del trabajo desarrollado en esta tesis.*

*A la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por otorgarme las becas de arancel que financiaron mi estadía en el Programa de Doctorado. Al Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile por el financiamiento parcial de esta tesis a través del Proyecto PG/038/97.*

*Agradecer a CONICYT por la beca de doctorado otorgada. Además del financiamiento de mi estadía de investigación en la Universidad de Bath, en conjunto con el British Council. Además, a la Escuela de Bioquímica de la Universidad de Bath, por los recursos que permitieron la realización de parte de esta tesis.*

*A mis profesores y compañeros de estudios con quienes compartí gratas jornadas.*

*A mi familia por su cariño, comprensión y apoyo a lo largo de todos estos años.*

## INDICE DE MATERIAS

|   |            |
|---|------------|
| <b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS .....</b>   | <b>xiv</b> |
| <b>RESUMEN .....</b>  | <b>xv</b>  |
| <b>SUMMARY .....</b>  | <b>xvi</b> |
| <b>INTRODUCCION .....</b>   | <b>1</b>   |
| Referencias .....   | 7          |
| <br>  |            |
| <b>CAPITULO 1. Estudio de la estructura conformacional y electrónica<br/>de la dopamina y sus orto metil derivados.....</b> | <b>8</b>   |
| 1.1 Introducción .....  | 8          |
| 1.2 Metodologías .....  | 14         |
| 1.3 Resultados y discusión .....  | 16         |
| 1.3.1 Estudio de la dureza química en Dopamina .....  | 16         |
| 1.3.2 Derivados orto-metilados de DA .....  | 24         |
| 1.4 Conclusiones .....  | 33         |
| Referencias .....   | 34         |
| <br>  |            |
| <b>CAPITULO 2. Estudio Conformacional de Alcaloides Aporfínicos .....</b>   | <b>35</b>  |
| 2.1 Introducción .....  | 35         |
| 2.2 Metodología .....   | 40         |
| 2.3 Resultados y discusión .....  | 42         |
| 2.3.1 Estudio conformacional del proceso de inversión<br>del nitrógeno en aporfinas como bases libres.....                  | 42         |
| 2.3.2 Estudio de simulaciones dinámicas para el proceso<br>de inversión .....   | 48         |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.3 Estudio conformacional de los diastereoisómeros<br>de aporfinas. ( <i>R</i> )-apomorfina y ( <i>R</i> )-boldina ..... | 54 |
| 2.3.4 Estudio del farmacóforo para compuestos agonistas<br>dopaminérgicos .....   | 71 |
| 2.4 Conclusiones .....  | 75 |
| Referencias .....   | 76 |

### **CAPITULO 3. Análisis de la Secuencia Aminoacídica para los receptores**

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| <b>Dopaminérgicos</b> .....      | 78  |
| 3.1 Introducción .....           | 78  |
| 3.2 Metodologías .....           | 85  |
| 3.3 Resultados y discusión ..... | 87  |
| 3.4 Conclusiones .....           | 103 |
| Referencias .....                | 104 |

### **CAPITULO 4. Modelo molecular tridimensional de los receptores**

|  |     |
|--|-----|
| <b>dopaminérgicos. Interacción droga-receptor</b> .....              | 106 |
| 4.1 Introducción .....   | 106 |
| 4.2 Metodología .....  | 113 |
| 4.3 Resultados y Discusión .....                                     | 115 |
| 4.3.1 Modelos tridimensionales de los receptores dopaminérgicos .... | 115 |
| 4.3.2 Energía de unión droga-receptor .....                          | 129 |
| 4.3.3 Estructura del complejo agonista-receptor .....                | 131 |
| 4.3.4 Complejos antagonista-receptor .....                           | 145 |
| 4.3.5 Modelo de unión para apomorfina y boldina .....                | 148 |
| 4.4 Conclusiones .....   | 156 |
| Referencias .....  | 158 |

## INDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.1</b> Geometría optimizada HF/6-31G para los ángulos diedros $\theta$ y $\phi$ obtenidos para las formas neutra y N-protonada de la dopamina .....                           | 16 |
| <b>Tabla 1.2</b> Energías relativas ( $\Delta E$ ), dureza química ( $\eta$ ) y potencial químico Electrónico ( $\mu$ ) para la dopamina; cálculos HF/6-31G .....                       | 17 |
| <b>Tabla 1.3</b> Energías relativas para orto-metil derivados de dopamina en sus formas neutras y N-protonadas usando metodología semiempírica AM1.....                                 | 26 |
| <b>Tabla 2.1</b> Constantes de disociación ( $K_i$ ) para algunos derivados de apomorfinas frente a receptores $D_1$ y $D_2$ .....  | 39 |
| <b>Tabla 2.2</b> Afinidades protónicas (kcal/mol) calculadas y experimentales .....   | 44 |
| <b>Tabla 2.3</b> Selección de parámetros geométricos obtenidos de la optimización total <i>ab initio</i> 6-31G para los diastereoisómeros de la forma protonada de la apomorfinas ..... | 58 |
| <b>Tabla 2.4</b> Selección de parámetros geométricos obtenidos de la optimización total <i>ab initio</i> 6-31G para los diastereoisómeros de la (R)-boldina .....                       | 58 |
| <b>Tabla 2.5</b> Parámetros estructurales de ligandos dopaminérgicos que definen el farmacóforo .....   | 73 |
| <b>Tabla 3.1</b> Tipos de receptores definidos a través de estudios farmacológicos, bioquímicos y fisiológicos .....  | 79 |
| <b>Tabla 3.2</b> Resumen de las afinidades de algunos ligandos por los subtipos de los receptores dopaminérgicos.....   | 81 |
| <b>Tabla 3.3</b> Receptores utilizados en la determinación de la homología .....  | 85 |
| <b>Tabla 3.4a</b> Porcentajes de homología (%) basados en la secuencia aminoacídica obtenidos para los diferentes receptores .....  | 87 |
| <b>Tabla 3.4b</b> Porcentajes de homología (%) de las hélices transmembranales basados en la secuencia aminoacídica .....   | 87 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>CAPITULO 5. Aplicación del principio HSAB a la interacción</b> |     |
| <b>droga-receptor</b> .....                                       | 161 |
| 5.1 Introducción .....  | 161 |
| 5.2 Metodología .....   | 164 |
| 5.3 Resultados y discusión .....                                  | 170 |
| 5.4 Conclusiones .....  | 176 |
| Referencias .....   | 177 |
| <br>  |     |
| <b>CAPITULO 6. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....                   | 178 |
| <br>  |     |
| <b>APENDICE 1 Teoría de Orbitales Moleculares</b> .....           | 182 |
| <br>  |     |
| <b>APENDICE 2 Teoría de Funcionales de la Densidad</b> .....      | 186 |
| <br>  |     |
| <b>APENDICE 3 Mecánica Molecular</b> .....                        | 192 |
| <br>  |     |
| <b>APENDICE 4 Publicaciones</b> .....                             | 201 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 3.4c</b> Porcentajes de homología con respecto al tipo de aminoácido .....  | 88  |
| <b>Tabla 3.5</b> Porcentajes de identidad en la comparación de los distintos receptores dopaminérgicos para cada segmento de la transmembrana .....  | 89  |
| <b>Tabla 3.6a</b> Predicción de los segmentos transmembranales para el receptor D <sub>1</sub> y la utilización de la secuencia en el modelo .....   | 96  |
| <b>Tabla 3.6b</b> Predicción de los segmentos transmembranales para el receptor D <sub>2</sub> y la utilización de la secuencia en el modelo .....   | 96  |
| <b>Tabla 3.7</b> Secuencia de las regiones transmembranales para la familia de RAPG dopaminérgicos .....   | 98  |
| <b>Tabla 3.8</b> Porcentaje de conservancia para cada una de las hélices transmembranales de los receptores dopaminérgicos .....   | 99  |
| <br>   |     |
| <b>Tabla 4.1</b> Estadísticas de los resultados de los gráficos de Ramachandran para los receptores dopaminérgicos.....  | 117 |
| <b>Tabla 4.2a</b> Interacciones aromáticas entre las cadenas laterales de los residuos para los receptores D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> . .....   | 122 |
| <b>Tabla 4.2b</b> Enlaces por hidrógeno entre los residuos de diferentes hélices para los receptores D <sub>1</sub> y D <sub>2</sub> .....   | 122 |
| <b>Tabla 4.3a</b> Constantes de disociación experimentales (nM) para el receptor D <sub>2</sub> y las energías totales para los complejos droga-receptor con algunos agonistas y ( <i>R</i> )-boldina (kcal/mol) ..... | 129 |
| <b>Tabla 4.3b</b> Constantes de disociación experimental (nM) para el receptor D <sub>2</sub> y las energías totales para los complejos droga-receptor de algunos antagonistas (kcal/mol) .....                        | 130 |
| <b>Tabla 4.4</b> Parámetros geométricos del sitio de unión de agonistas para la interacción electrostática .....   | 136 |
| <b>Tabla 4.5</b> Parámetros geométricos del sitio de unión de agonistas para la interacción aromática .....  | 139 |
| <b>Tabla 4.6</b> Parámetros geométricos en la formación de los enlaces por hidrógeno .....   | 141 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 4.7</b> Energía total del complejo droga-receptor para complejos mutados<br>en los residuos de Ser en la TM5 ..... | 142 |
| <b>Tabla 5.1</b> Distancias (Å) entre los distintos fragmentos de los modelos .....   | 167 |
| <b>Tabla 5.2</b> Energía de interacción ( $\Delta E_{L-R}^{INT}$ ) y dureza química ( $\eta$ ) para cada modelo ..          | 172 |
| <b>Tabla 5.3</b> Energía de desestabilización para los modelos .....  | 173 |
| <b>Tabla 5.4</b> Energía de desestabilización para los modelos<br>en los residuos aromáticos .....                          | 174 |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.1.</b> Rotámetros de la dopamina en su forma N-protonada.....   | 9  |
| <b>Figura 1.2</b> Presencia del esqueleto de la dopamina en agonistas dopaminérgicos .....  | 12 |
| <b>Figura 1.3</b> Comparación de conformeros trans coplanares de DA con análogos<br>de ADTN .....   | 13 |
| <b>Figura 1.4a</b> Perfiles de potencial químico electrónico ( $\Delta\mu$ ) y dureza química ( $\eta$ ) (eV);<br>energía relativa ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) para la rotación del ángulo diedro $\phi$ ( $^\circ$ )<br>en la forma N-protonada de la dopamina con $\theta$ fijo a $0^\circ$ .....   | 21 |
| <b>Figura 1.4b</b> Perfiles de potencial químico electrónico ( $\Delta\mu$ ) y dureza química ( $\eta$ ) (eV);<br>energía relativa ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) para la rotación del ángulo diedro $\phi$ ( $^\circ$ )<br>en la forma N-protonada de la dopamina con $\theta$ fijo a $90^\circ$ .....  | 22 |
| <b>Figura 1.4c</b> Perfiles de potencial químico electrónico ( $\Delta\mu$ ) y dureza química ( $\eta$ ) (eV);<br>energía relativa ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) para la rotación del ángulo diedro $\phi$ ( $^\circ$ )<br>en la forma N-protonada de la dopamina con $\theta$ fijo a $180^\circ$ ..... | 23 |
| <b>Figura 1.5</b> Rotámetros de los orto-metil derivados de la dopamina en<br>su forma N-protonada .....  | 25 |
| <b>Figura 1.6</b> Conformaciones <i>trans</i> $\beta$ para (a) 2-meDA y (b) 6-meDA .....  | 28 |
| <b>Figura 1.7</b> Perfiles de energía relativa AM1 ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) en función de la<br>rotación del ángulo diedro $\phi$ ( $^\circ$ ), para la forma neutra de los compuestos... ..   | 31 |
| <b>Figura 1.8</b> Perfiles de energía relativa AM1 ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) en función de la rotación<br>del ángulo diedro $\phi$ ( $^\circ$ ), para la forma N-protonada de los compuestos .....  | 32 |
| <b>Figura 2.1</b> Comparación de la dopamina y la apomorfina, utilizando la proyección de<br>Newman .....   | 36 |
| <b>Figura 2.2</b> Esqueleto de los compuestos aporfínicos .....   | 37 |
| <b>Figura 2.3</b> Fenómeno de inversión del átomo de nitrógeno de aporfinas .....   | 42 |
| <b>Figura 2.4</b> Mecanismo de intercambio protónico/inversión para la  |    |

|   |    |
|---|----|
| formación de los diastereoisómeros aporfinicos .....  | 43 |
| <b>Figura 2.5</b> Conformeros de la forma neutra de la apomorfina (base libre).....   | 45 |
| <b>Figura 2.6</b> Superposición de conformaciones para la (R)-apomorfina .....  | 49 |
| <b>Figura 2.7</b> Superposición de conformaciones para la (R)-boldina .....   | 50 |
| <b>Figura 2.8</b> Perfiles del ángulo diedro C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) en función del<br>tiempo (ps) de las simulaciones dinámicas .....           | 52 |
| <b>Figura 2.9</b> Perfiles del ángulo diedro C(3a)-C(4)-C(5)-C(N) para la (R)-APO y<br>la (R)-boldina .....                                       | 53 |
| <b>Figura 2.10</b> Diastereoisómeros de apomorfina .....  | 55 |
| <b>Figura 2.11</b> Estructuras optimizadas por HF/6-31G de los diastereoisómeros<br>de (R)-boldina .....  | 56 |
| <b>Figura 2.12</b> Conformaciones del anillo catecol en la apomorfina .....   | 59 |
| <b>Figura 2.13</b> Boldina en la caja de solvente, con 327 moléculas de agua .....  | 60 |
| <b>Figura 2.14</b> Perfiles del ángulo diedro C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) en función del<br>tiempo (ps) de la simulación para la (R)-apomorfina..... | 62 |
| <b>Figura 2.15</b> Perfiles del ángulo diedro C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) en función del<br>tiempo (ps) de la simulación para la (R)-boldina.....    | 63 |
| <b>Figura 2.16</b> Perfiles del ángulo diedro C(3a)-C(4)-C(5)-C(N) para la (R)-APO .....  | 64 |
| <b>Figura 2.17</b> Perfiles del ángulo diedro C(3a)-C(4)-C(5)-C(N) para la (R)-boldina .....  | 65 |
| <b>Figura 2.18</b> Distribución de los ángulos torsionales de los grupos hidroxilos en<br>las posiciones 10 y 11 de (R)-apomorfina .....          | 66 |
| <b>Figura 2.19</b> Distribución de los ángulos torsionales de los sustituyentes del anillo A<br>Para la (R)-boldina .....                         | 69 |
| <b>Figura 2.20</b> Distribución de los ángulos torsionales de los sustituyentes del anillo D<br>para la (R)-boldina .....                         | 70 |
| <b>Figura 2.21</b> Modelo farmacóforo de agonistas dopaminérgicos .....   | 71 |
| <b>Figura 2.22</b> Superposiciones para los diferentes compuestos estudiados .....  | 72 |
| <b>Figura 2.23</b> Estructura y abreviaturas de ligandos selectivos dopaminérgicos .....  | 74 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 3.1</b> Estructura de algunos ligandos dopaminérgicos .....  | 80  |
| <b>Figura 3.2</b> Estructura hipotética de los receptores dopaminérgicos .....   | 83  |
| <b>Figura 3.3</b> Comparación de los perfiles de hidrofobicidad para las proteínas<br>bacteriorodopsina (bRh), rodopsina (rH) y D <sub>2</sub> ..... | 91  |
| <b>Figura 3.4</b> Resultados del Programa PEPLOT para el receptor dopaminérgico D <sub>1</sub> ....  | 92  |
| <b>Figura 3.5</b> Resultados del Programa PEPLOT para el receptor dopaminérgico D <sub>2</sub> ...   | 93  |
| <b>Figura 3.6</b> Representación esquemática de la conservación .....  | 100 |
| <b>Figura 3.7a</b> Representación vertical de la conservación de los residuos<br>en cada transmembrana para el sub-tipo D <sub>1</sub> .....         | 101 |
| <b>Figura 3.7b</b> Representación vertical de la conservación de los residuos en<br>cada transmembrana para el sub-tipo D <sub>2</sub> .....         | 102 |
| <br>   |     |
| <b>Figura 4.1</b> Proyección de densidad de un solo receptor .....   | 107 |
| <b>Figura 4.2</b> Mapa proyectorial de rodopsina a 7,5 Å de resolución en dos zonas .....  | 108 |
| <b>Figura 4.3</b> Conformación del residuo de prolina .....  | 112 |
| <b>Figura 4.4</b> Definición de los ángulos diedros $\phi$ y $\psi$ .....  | 113 |
| <b>Figura 4.5</b> Distorsión de los residuos aromáticos para el receptor D <sub>2</sub> .....  | 116 |
| <b>Figura 4.6</b> Gráfico de Ramachandran para el modelo del receptor<br>dopaminérgico D <sub>1</sub> .....  | 117 |
| <b>Figura 4.7</b> Modelación de las hélices transmembranales .....   | 119 |
| <b>Figura 4.8</b> Modelo del Receptor D <sub>1</sub> visto desde el interior de la membrana,<br>mostrando el grosor aproximado de la membrana .....  | 120 |
| <b>Figura 4.9</b> Comparación de la estructura tridimensional del modelo del receptor<br>D <sub>1</sub> con la proyección de la rH .....             | 121 |
| <b>Figura 4.10</b> Racimo aromático .....  | 125 |
| <b>Figura 4.11</b> Interacción aromática .....   | 126 |
| <b>Figura 4.12</b> Interacción amino-aromática para el receptor D <sub>1</sub> .....   | 127 |
| <b>Figura 4.13</b> Enlace por hidrógeno entre el residuo de Asp 2.14 y Ser 7.14 en<br>ambos modelos de receptores dopaminérgicos .....               | 128 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 4.14</b> Estructura de los compuestos estudiados en los complejos<br>droga-receptor .....  | 130 |
| <b>Figura 4.15</b> Complejo droga-receptor D <sub>2</sub> para la DA.....  | 132 |
| <b>Figura 4.15</b> Complejo droga-receptor D <sub>2</sub> para la DA.....  | 134 |
| <b>Figura 4.16</b> Complejo droga-receptor D <sub>2</sub> para el agonista selectivo N-0437.....   | 135 |
| <b>Figura 4.17</b> Complejo droga-receptor para el agonista 7-OHDPAT .....   | 135 |
| <b>Figura 4.18</b> Orientación del residuo de Asp 3.07 frente a los residuos aromáticos..  | 138 |
| <b>Figura 4.19</b> La hendidura que interacciona con el grupo propilo de los ligandos ...  | 144 |
| <b>Figura 4.20</b> Sitio de unión de antagonista .....   | 146 |
| <b>Figura 4.21</b> Complejo droga-receptor para butaclamol .....   | 147 |
| <b>Figura 4.22</b> Diastereoisómeros de la (R)-apomorfina.....   | 148 |
| <b>Figura 4.23</b> Complejo (R)-APO-D <sub>2</sub> .....   | 149 |
| <b>Figura 4.24</b> Complejo (S)-APO-D <sub>2</sub> , que muestra las características de un sitio<br>de unión de antagonista, residuos de Asp 3.07 y His 6.23 ..... | 150 |
| <b>Figura 4.25</b> Complejo droga-receptor para la (R)-boldina .....   | 153 |
| <b>Figura 4.26</b> Modos de unión para el receptor dopaminérgico D <sub>2</sub> .....  | 155 |
| <br>   |     |
| <b>Figura 5.1</b> Complejo droga-receptor para la dopamina-D <sub>2</sub> .....  | 164 |
| <b>Figura 5.2</b> Modelos moleculares del complejo dopamina-sitio de unión .....   | 165 |
| <b>Figura 5.3</b> Modelos utilizados para calcular la influencia de los enlaces<br>por hidrógeno .....   | 166 |
| <b>Figura 5.4</b> Modelos utilizados para calcular la influencia de los residuos<br>aromáticos secundarios .....   | 168 |
| <b>Figura 5.5</b> Modelos del sitio de unión aniónico .....  | 171 |

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

|      |   |   |
|------|---|---|
| DA   | : | dopamina                                    |
| RAPG | : | receptores acoplados a proteína G           |
| TM   | : | hélice transmembranal                       |
| APO  | : | apomorfinina                                |
| AP   | : | aporfina                                    |
| DFT  | : | Teoría de Funcionales de la Densidad        |
| HSAB | : | Principio de ácidos y bases duros y blandos |
| PMD  | : | Principio de máxima dureza                  |
| SAR  | : | Relaciones Estructura-Actividad             |
| D-1  | : | Tipo de receptor dopaminérgico D-1          |
| D-2  | : | Tipo de receptor dopaminérgico D-2          |
| bRh  | : | bacteriorrodopsina                          |
| rH   | : | rodopsina                                   |

## RESUMEN

En esta tesis, se presenta un estudio de la interacción droga-receptor para los receptores dopaminérgicos, con énfasis en el tipo D<sub>2</sub>. El estudio de la interacción droga-receptor involucra la obtención de estructuras de los complejos droga-receptor, ya sea para agonistas o antagonistas dopaminérgicos. Las estructuras de los complejos se modelaron a través de la obtención de modelos tridimensionales de los receptores dopaminérgicos, y la determinación de estructuras farmacofóricas para algunos ligandos dopaminérgicos. Las interacciones entre el ligando y el sitio de unión son: interacciones electrostáticas, enlaces por hidrógeno y aromáticas. Este estudio permitió postular la importancia de algunos residuos aminoacídicos en la estabilización del complejo droga-receptor.

El estudio de la estructura conformacional y electrónica de algunos ligandos dopaminérgicos, especialmente la dopamina y algunos derivados aporfínicos, permitió la evaluación de las posibles estructuras farmacofóricas, y su relación espacial con el sitio de unión. La selectividad entre ambos tipos de receptores dopaminérgicos viene dada por la variaciones de distancias en el farmacóforo, más que por cambios en las interacciones involucradas.

## SUMMARY

This thesis presents a study of the drug-receptor interaction for dopamine receptors, with emphasis on the D<sub>2</sub> subtype. This work involved acquisition of structures for drug-receptor complexes formed with dopaminergic agonists and antagonists. The structure of the complexes were modeled on the basis of the three-dimensional models of the dopamine receptors, and the determination of pharmacophoric structures for some dopaminergic ligands. The interaction between the ligands and the binding site are: electrostatic interactions, hydrogen bonds and aromatic interactions. This study led to novel proposals regarding the importance of certain amino acid residues in the stabilization of the drug-receptor complex.

The study of the conformational and electronic structure of some dopaminergic ligands, particularly dopamine and aporphines derivatives, allowed possible pharmacophoric structures to be evaluated, as well as their spatial relationship to the binding site. The selectivity between D1 and D2 dopamine receptors is governed by variations in distances within the pharmacophore, rather than by changes in the interactions involved.

## INTRODUCCIÓN

El progreso en química teórica ha permitido que dos nuevas áreas de investigación se hayan desarrollado. Estas son la química computacional y la modelación molecular [1-4]. Ambas incluyen la utilización de la química cuántica, la mecánica molecular, minimizaciones, simulaciones, y otros métodos basados en la computación para entender y predecir el comportamiento de sistemas moleculares. Los avances tecnológicos en el campo de la computación han permitido la aplicación de la química teórica a sistemas moleculares de mayor tamaño y a cálculos más complejos, así como, el estudio o modelación de la interacción entre la droga y el sitio de unión en el receptor, catálisis enzimática, etc.

La modelación de la interacción droga-receptor es un problema muy complejo, debido principalmente a las fuerzas que están involucradas en la asociación intermolecular. El tipo de interacción está determinada por la estructura o superficie de la droga y el receptor e induce cambios o respuestas biológicas. La interacción entre ambos es estereoespecífica en la que el receptor reconoce ciertos grupos en el ligando [3].

El estudio de la estructura del ligando permite caracterizar las propiedades electrónicas del sistema que gobiernan la reactividad química. La obtención de la superficie conformacional de la droga y en especial la determinación de los puntos estacionarios o mínimos globales y locales del sistema en conjunto con el análisis de las propiedades relacionadas a estos estados puede dar cuenta de la reactividad frente a distintos sistemas.

En esta tesis se estudiará la interacción droga-receptor asociada a la dopamina y sus receptores.

Los receptores dopaminérgicos pertenecen a una superfamilia de receptores denominada receptores acoplados a proteína G (RAPG). Algunas de las enfermedades más conocidas causadas por el mal funcionamiento de la neurotransmisión dopaminérgica son la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia. También tiene una base dopaminérgica un sistema de "recompensa" que estaría involucrado en la etiopatogenia de algunas farmacodependencias, particularmente la adicción a la cocaína [4-7].

Los receptores acoplados a proteína G (RAPG) son proteínas insertas en la membrana plasmática de células que transducen señales químicas o lumínicas. Se postula que su estructura presenta siete dominios hidrofóbicos, comúnmente interpretados como 7 hélices transmembranales (TM). Los RAPG están presentes en muchos organismos vivos y su interacción con un agonista o fotón da inicio a una cadena de eventos que amplifican la señal al interior de la célula haciendo posible así una respuesta celular. La activación de los RAPG conduce a la disociación de las proteínas G acopladas, que están ubicadas en el lado citoplasmático del receptor, y a la consiguiente modulación de la síntesis de segundos mensajeros tales como AMP cíclico o inositol1,4,5-trifosfato [5].

Por otra parte, aunque se dispone de muchas secuencias aminoacídicas completas, la estructura tridimensional de este tipo de receptores aún no se conoce. Esto ha impedido que se entienda como funcionan estos receptores al nivel molecular. Muchos de los modelos teóricos actuales de los RAPG han sido construidos a través de la técnica de modelación por homología. Este tipo de modelación se basa en la premisa de que existe una proteína de estructura tridimensional conocida que presenta una alta homología en la secuencia primaria con la proteína bajo estudio, de la cual aún no es posible determinar su estructura terciaria, pero cuya estructura primaria se conoce. Sin embargo, la mayor parte de los modelos existentes se basan en la estructura tridimensional de la bacteriorrodopsina, un receptor que presenta 7 segmentos hidrofóbicos pero que no pertenece a esta familia de receptores acoplados a proteína G [8-12]. La modelación por homología no puede ser aplicada directamente para la modelación de los RAPG, debido a que no existe ningún receptor homólogo cuya estructura se conozca con suficiente grado de detalle. La construcción de los modelos de RAPG también se puede realizar a través de técnicas de

modelación *de novo* [12], es decir, se parte de una serie de hipótesis y se construye el modelo sin utilizar una estructura conocida como plantilla. Esta técnica ha sido utilizada en este ámbito en sólo un modelo de receptores dopaminérgicos [10].

Otro enfoque consiste en utilizar como plantilla la estructura de la rodopsina bovina, un RAPG para el cual a lo menos se conoce la disposición de los siete segmentos transmembranal a una resolución de 9Å. Esta baja resolución sólo permite determinar el arreglo espacial general sin detalles a nivel atómico [13]

Para entender el posible funcionamiento de algunos receptores de dopamina y su interacción con algunos agonistas y antagonistas, en esta tesis se presenta un estudio teórico de las estructuras conformacionales de estos ligandos y se describe la creación de modelos moleculares de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> humanos basados en la estructura de baja resolución de la rodopsina [13]. Para la modelación de los receptores y por consiguiente la obtención de un modelo del complejo molecular droga-receptor, se plantean las siguientes hipótesis:

- 1) Los dominios transmembranales (TM) serían hélices  $\alpha$ .
- 2) Cada TM debe contener 26 aminoácidos como mínimo, para alcanzar una longitud adecuada para cruzar completamente la membrana plasmática (cuya longitud promedio es 30 Å).
- 3) Los segmentos TM de los RAPG involucrados en la neurotransmisión monoaminérgica tienen similar ubicación en una alineación de secuencias múltiples.
- 4) Las regiones superficiales más polares de las hélices  $\alpha$  estarían orientadas hacia el interior del receptor y las regiones más lipofílicas estarían interactuando principalmente con cadenas de ácidos grasos de la bicapa fosfolipídica.

### *Objetivos*

El objetivo general de esta tesis es describir las interacciones droga-receptor a través de la construcción de modelos de complejos moleculares droga-receptor (definidos por las estructuras de las drogas o ligandos rodeadas de los fragmentos considerados pertinentes en la estructura del receptor a través de la modelación del sitio de unión, insertos en un campo eléctrico creado por el resto del receptor). Estas interacciones droga-receptor serán analizadas a través del Principio de Acidos y Bases Duros y Blandos, es decir, el ligando es tratado como un ácido de Pearson y el sitio de unión como base de Pearson.

Para lograr este objetivo general, el desarrollo de esta tesis se divide en dos grandes áreas: la primera es el estudio teórico de algunos ligandos dopaminérgicos a través de metodologías de la química cuántica; en la segunda parte se presenta la construcción de los modelos tridimensionales de los receptores dopaminérgicos  $D_1$  y  $D_2$  y la modelación del sitio de unión a través de metodologías de la mecánica molecular. Finalmente, se analizan algunos complejos moleculares droga-receptor y los correspondientes descriptores químico cuánticos. Se ha definido cada capítulo como una unidad independiente que consta de una introducción al tema estudiado, una descripción de la metodología de trabajo, los resultados y las conclusiones parciales referentes a dicha unidad o capítulo.

Esta tesis está organizada de la siguiente manera:

En el Capítulo 1 se discute el estudio de la estructura conformacional y electrónica de la dopamina y sus derivados metilados en orto con respecto a la cadena aminada. En este estudio se utilizaron dos propiedades globales definidas en el marco de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT): la dureza química ( $\eta$ ) y el potencial químico electrónico ( $\mu$ ). Además, se utilizó el principio de máxima dureza (maximum hardness principle, PMD) [14]. Se relaciona la dureza, índice de reactividad global, de los diferentes conformémeros de la dopamina y algunos derivados para proponer la conformación activa de la DA. Se postula que el conformémero más activo debe ser, con ciertas restricciones, el que presenta la menor dureza, pues éste sería más reactivo frente a interacciones electrostáticas de largo alcance. Se postula una conformación activa para la dopamina, la cual es

corroborada al realizar el estudio conformacional de los derivados orto metilados a través de cálculos semiempíricos.

En el Capítulo 2 se centra la discusión en el estudio de la estructura conformacional y electrónica de algunos ligandos aporfínicos. Especial énfasis se puso en el estudio de los conformeros para las formas básicas y protonada de la apomorfina y la boldina. En este estudio se evalúa la inversión del grupo amino que presenta la estructura de las aporfinas a través de la obtención de los conformeros de la base libre y el estado de transición del proceso de inversión para la apomorfina. Además, se estudiaron los diastereoisómeros que son generados por la protonación del nitrógeno del grupo amino de la aporfinas, poniendo énfasis en su estructura conformacional y su relación con modelos de farmacóforos propuestos. Ambos estudios fueron realizados a través de cálculos *ab initio*. Por otra parte, la flexibilidad de los anillos del esqueleto de las aporfinas fue evaluada a través de simulaciones de dinámica molecular, comparando el comportamiento teórico en el vacío y fase acuosa.

En el Capítulo 3, a partir de la secuencia primaria de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> humanos, se deducen las secuencias insertas en la membrana y la orientación de las hélices en el receptor, que son las bases fundamentales para la construcción de los modelos de tales receptores.

En el Capítulo 4 se aborda la construcción de los modelos tridimensionales de estos receptores realizada a través de técnicas de la mecánica molecular. Para una mayor comprensión de la estructura tridimensional de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> en las zonas que atraviesan la membrana plasmática, se analizaron los diferentes tipos de interacciones dentro de la estructura de los modelos obtenidos. Además, se definieron los sitios de unión de agonistas y antagonistas a través de experimentos de acoplamiento droga-receptor, es decir, obtener diferentes configuraciones espaciales estables de complejos droga-receptor. Esto permitió caracterizar sitios diferentes para agonistas y antagonistas. Especial énfasis se puso en las similitudes y diferencias entre los sitios de unión para agonistas y antagonistas pertenecientes a la familia de las aporfinas.

En el Capítulo 5 se estudia con metodologías de la química cuántica, el proceso de interacción droga-receptor a través de la aplicación del principio de ácidos y bases duros y blandos (hard and soft acids and bases, HSAB) [11]. El HSAB es utilizado para describir en términos de dureza o blandura el sitio de unión, es decir, que la conformación activa de la dopamina o de un agonista (ácido de Pearson) debería tener una dureza semejante a la del sitio de unión (base de Pearson) para lograr una mayor afinidad y lograr una máxima activación. El estudio de la dureza química de la dopamina, los sitios de unión aniónico y el complejo molecular droga-receptor permitieron muestran que la interacción droga-receptor es gobernada por el Principio HSAB. Los modelos del sitio de unión y del complejo droga-receptor están formados por fragmentos que representan los residuos que participan directamente con el receptor (fragmentos primarios) más aquellos que modificarían la reactividad o modelarían el entorno donde ocurre la interacción droga-receptor (fragmentos secundarios). Se estudió la energía de interacción del complejo dopamina-receptor considerando sólo los fragmentos primarios, y luego incluyendo en el sitio de unión los fragmentos secundarios. Además, se analizan teóricamente las variaciones que provoca en la energía de interacción o estabilización la mutación de algunos de los fragmentos primarios y/o secundarios del sitio de unión, para evaluar la contribución de cada residuo a la energía de estabilización del complejo droga-receptor.

Por último, en el Capítulo 6 se exponen las conclusiones generales de esta tesis y se discuten las perspectivas futuras del problema propuesto.

**Referencias:**

- 1.- A. T. Leach, *Molecular Modelling*, Logman, 1996 Singapore.
- 2.- A. K. Rappé y C. J. Casewit, *Molecular Mechanics across Chemistry*, University Science Books, 1996, California.
- 3.- W. Gans, A. Amann y J.C. Boeyen; *Fundamental Principles of Molecular Modelling*, Plenum Press, New York, 1996.
- 4.- C. D. Strader, T. M. Fong, M. R. Tota y D. Underwood, *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101 (1994).
- 5.- *Goodman and Gilman's. the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8<sup>th</sup> ed.; A. Goodman Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies, P. Taylor, Eds.; Pergamon Press: New York, 1990.
- 6.- P. Seeman, *Synapse* **1**, 133 (1987).
- 7.- O. Hornykiewicz, *Pharmacol. Rev.* **18** 825 (1996).
- 8.- S. V. Dahl, O. Edvarsen e I. Sylte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8111 (1991).
- 9.- M. M. Teeter, M. Froimowitz, B. Stecy y C. J. DuRand, *J. Med. Chem.* **37**, 2874 (1994).
- 10.- A. Malberg, G. Nordvall, A. M. Johansson, N. Mohell y V. Hacksell, *Mol. Pharmacol.* **46**, 299 (1994)
- 11.- C. D. Livingstone, P. G. Strange y L. H. Naylor, *Biochem J.* **287**, 277 (1992).
- 12.- D. Donnelly, J. B. C. Findlay y T. L. Blundell, *Receptors & Channels* **2**, 61 (1994).
- 13.- F. X. Schertler, C. Villa, y R. Henderson, *Nature* **362**, 770 (1993).
- 14.- R. G. Parr y W. Yang, *Density-Functional Theory of atoms and molecules*; Ed. Oxford Science Publications; Oxford University Press; 1989; London, New York.

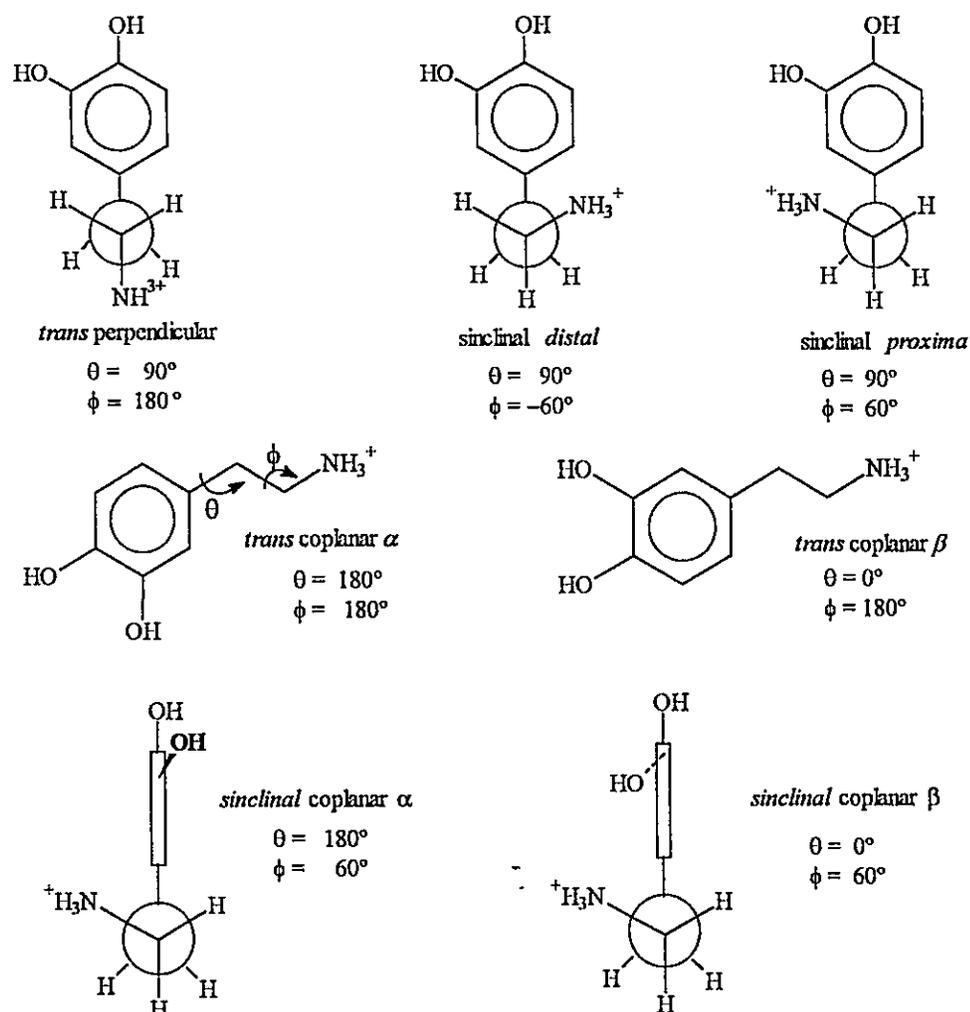
## CAPITULO 1

### ESTRUCTURA CONFORMACIONAL Y ELECTRÓNICA DE LA DOPAMINA Y SUS ORTO METIL DERIVADOS

#### 1.1 INTRODUCCION

La dopamina, el ligando endógeno de los sistemas dopaminérgicos, presenta una gran libertad conformacional en su cadena aminoetilo, por lo cual no ha sido posible hasta el momento determinar cuál(es) (de los) rotámero(s) de la dopamina (DA) está(n) involucrado(s) en la manifestación de la actividad farmacológica. Los estudios conformacionales han sido realizados mediante análisis por cristalografía de rayos X [1,2], espectroscopía de RMN [3,4], y por cálculos químico-cuánticos [5,6].

En teoría, DA puede exhibir las siguientes estructuras conformacionales de mayor estabilidad relativa (ver Fig. 1.1): tres formas *trans* o *anti* y dos formas *sinclinales*. Para las formas *trans* pueden existir dos extremos: con la cadena aminoetilo perpendicular al plano del anillo catecol (*trans* perpendicular), en dos formas enantioméricas, y con la cadena aminoetilo en el mismo plano (*trans* coplanar). Para esta última existen dos rotámeros dependiendo de la orientación del anillo catecol con respecto a la cadena aminoetilo (rotámeros  $\alpha$  y  $\beta$ ). Para las formas *sinclinales* se puede distinguir dos formas perpendiculares como son las *distal* y *proximal*, las cuales se diferencian en la proximidad del grupo amino al grupo hidroxilo en posición meta del anillo catecol.



**Figura 1.1** Rotámeros de la dopamina en su forma *N*-protonada. Los ángulos diedros se definen para los diferentes rotámeros. Los tres primeros corresponden a las formas alternadas en un arreglo perpendicular del anillo catecol con respecto al grupo amino. Los dos siguientes corresponden a los rotámeros *trans* coplanares y finalmente se muestran los rotámeros *sinclinales* coplanares.

Además de estos clásicos rotámeros de la DA se pueden definir dos formas *sinclinales* coplanares, donde los átomos de carbono de la cadena aminoetil quedan en el mismo plano del anillo catecol y el grupo amino se eleva sobre este plano en  $60^\circ$  aproximadamente. El estudio conformacional de la dopamina puede ser realizado considerando la rotación a través de dos ángulos diedros  $\theta$  y  $\phi$  definidos en el rotámero *trans  $\alpha$*  en la Figura 1.1. Según esta notación, los conformeros perpendiculares tienen  $\theta = \pm 90^\circ$  y los coplanares tienen  $\theta = 0^\circ$  ó  $180^\circ$ .

La dopamina en solución puede existir en sus formas *N*-protonada, neutra y/o desprotonada (zwitteriónica, aniónica o dianiónica) en los grupos hidroxilo del anillo catecol. El  $pK_a$  para el primer equilibrio ácido-base (*N*-protonada  $\leftrightarrow$  neutra) de la dopamina es 8,2 [7], por lo cual en plasma sanguíneo ( $pH = 7,4$ ) la forma predominante sería la *N*-protonada y la disociación de los grupos fenólicos sería despreciable ( $pK_a \approx 10$ ). La aplicación de la ecuación de Henderson-Hasselbach para una amina de  $pK_a = 8,2$  a  $pH = 7,4$  predice un grado de protonación de 86%. Por esta razón, el estudio conformacional se realizará sólo para las formas neutra y *N*-protonada de la dopamina.

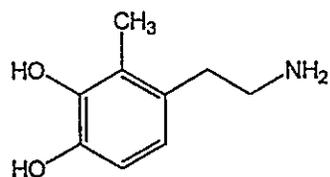
En la conformación cristalográfica del clorhidrato de dopamina la cadena aminoetilo está casi completamente extendida, formando un plano que es aproximadamente ortogonal al plano del anillo aromático ( $\theta = 100,4^\circ$  y  $\phi = 173,2^\circ$ ). El anillo aromático es casi completamente plano, mostrando una desviación de 0,009 Å [2]. En el cristal existen 5 enlaces por hidrógeno en los cuales el anión  $Cl^-$  es el aceptor: con tres moléculas de dopamina a través de sus grupos amonio y dos enlaces con los grupos hidroxilo en posición meta y para de dos moléculas de DA diferentes. Los ángulos aceptor H-donor se desvían en menos de  $30^\circ$  de la linealidad. Solmajer y col. [4], en su estudio de RMN de la influencia del pH en la conformación de catecolaminas, encuentran que a pH bajos (menores que 7,0) existe una mayor población de los rotámeros *sinclinales* (*distal* y *proximal*) y que la población de la forma *anti* aumenta a medida que el pH del medio aumenta, encontrándose sobre el 70% de la población de DA en esta conformación a pH básicos. Estos autores no encontraron ningún indicio de enlace por hidrógeno intramolecular en solución acuosa [4]. Estudios del efecto de la temperatura en la conformación a través del análisis de los espectros de RMN de dopamina muestran que un aumento de la temperatura aumenta la población de las formas *anti* con respecto a las formas *sinclinales*. A  $31^\circ C$  la forma predominante ya sería la *anti* [3], y en un intervalo de  $60^\circ C$  por sobre esta temperatura su población aumenta más aún.

Los estudios mecano-cuánticos a través de metodologías semiempíricas (AM1) [5] y *ab initio* (STO-3G y 6-31\*) [6] muestran que los rotámeros *trans* y *sinclinales* perpendiculares presentan diferencias energéticas menores que 4 kcal/mol. En cuanto a

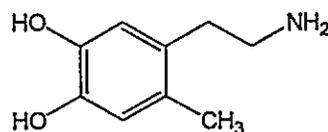
los rotámeros coplanares, éstos son menos estables que los perpendiculares. El estudio del efecto del solvente en la estructura conformacional de la DA a través de la metodología semiempírica AM1-SM1, muestra que el rotámero *anti* es el más estable para las forma neutra y *N*-protonada, siendo los *sinclinales* ligeramente menos estables, ahora con diferencias menores que 1 kcal/mol. Los *trans* coplanares presentan diferencias de energía muy pequeñas con respecto a la *anti* [5].

Estas pequeñas diferencias de energía no permiten decir nada acerca de la(s) conformación(es) que se une(n) a los receptores de DA y las pequeñas barreras energéticas entre éstas indican que su interconversión es muy rápida a temperatura fisiológica. Los datos experimentales de energía libre, entalpía y entropía muestran que la unión DA-receptor está dirigida por un cambio favorable de la entalpía y que el cambio entrópico es desfavorable. Los valores son  $\Delta G = -8,1$  kcal/mol a 37 °C,  $\Delta H = -8,7$  kcal/mol y el factor entrópico es de  $-0,558$  kcal/mol [8]. Esta unión favorecida por la entalpía podría ayudar a la dopamina a poblar conformaciones más energéticas.

Los estudios de relación estructura-actividad (SAR) para derivados de la dopamina y de feniletilaminas en general como ligandos dopaminérgicos, han mostrado que todos los derivados *N*-sustituidos presentaron una menor actividad que la DA, con la excepción de la *N*-metildopamina (epinina) que fue casi equipotente que la DA [9,10]. Las sustituciones en las posiciones 2- y 6- en el anillo catecol mostraron diferentes comportamientos de acción sobre receptores del tipo D<sub>1</sub>. Una disminución drástica de la actividad dopaminérgica es observada para la 2-fenildopamina, pero su análogo metilado 2-metildopamina (2-meDA) presenta la misma potencia que la DA [10]. El isómero 6-metildopamina (6-meDA), por el contrario, no presenta actividad dopaminérgica [10].



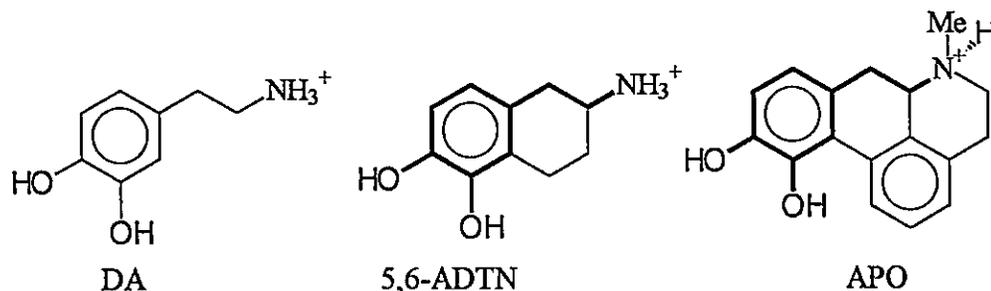
2-metildopamina (2-meDA)



6-metildopamina (6-meDA)

Este hecho ha sido explicado suponiendo un impedimento estérico en el sitio de unión debido a la presencia de zonas lipofílicas [10], pero esta disminución de la afinidad también se podría relacionar con la menor posibilidad de adoptar una conformación farmacofórica. Se plantea estudiar los derivados metilados de la DA en orto con respecto a la cadena aminada, para analizar el efecto de la sustitución en la estabilidad relativa de los diferentes rotámeros e intentar extraer conclusiones con respecto a la estructura del posible farmacóforo.

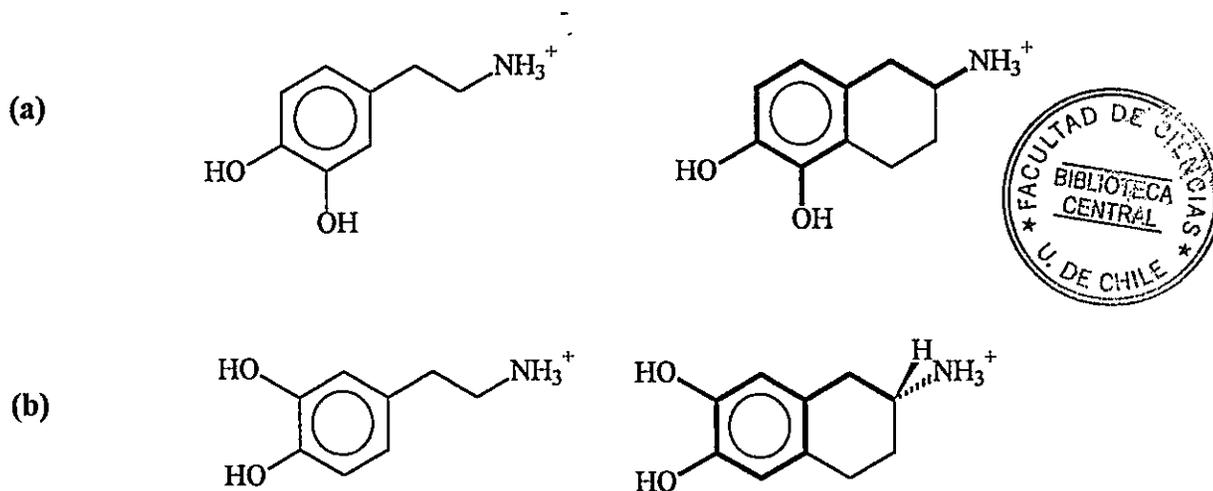
La conformación eficaz (farmacofórica) del ligando al unirse al receptor podría ser diferente para ambos tipos principales de receptores dopaminérgicos. Sin embargo, algunas conclusiones generales serían aplicables a ambos tipos. Todas las pruebas farmacológicas usando análogos rígidos o semirígidos de DA muestran que la conformación preferida sería cercana a una de las formas *trans* coplanares [9,10]. Los indicios más directos en favor de las conformaciones coplanares son que algunos análogos activos con movilidad conformacional fuertemente limitada incluyen en su esqueleto las formas *trans* coplanares. Dos ejemplos son los compuestos 5,6-dihidroxi-2-aminotetralina y apomorfinina (Figura 1.2).



**Figura 1.2** Presencia del esqueleto de la dopamina en agonistas dopaminérgicos. En negro se resalta el esqueleto correspondiente al rotámero *trans*  $\alpha$  de la dopamina en los compuestos 5,6-dihidroxi-2-aminotetralina (5,6-ADTN) y apomorfinina (APO).

¿Cuál de ambas formas *trans* coplanares se aproximaría a la conformación que presenta la actividad dopaminérgica?. Se ha intentado responder a esta pregunta a través de los estudios de las actividades dopaminérgicas de compuestos con diferentes anillos

catecólicos, como por ejemplo en los derivados de la familia de las 2-aminotetralinas, que son los compuestos semirígidos más sencillos (Figura 1.3) [9]. En este estudio el derivado 7,8 dihidroxilado (que no contiene el esqueleto de DA en su estructura) resultó ser inactivo frente a receptores dopaminérgicos. En varios ensayos *in vivo* e *in vitro* los isómeros 5,6- y 6,7-dihidroxilados muestran tendencias diferentes en la actividad agonista dopaminérgica en los receptores del tipo D<sub>1</sub>. *In vivo* el isómero 5,6- presenta una mayor actividad dopaminérgica e *in vitro* el isómero 6,7- es el más potente de ambos. Esta diferencia se debe principalmente a que el isómero 6,7- *in vivo* es más rápidamente metabolizado por la COMT (catecol O-metil transferasa) que el 5,6-. Los resultados *in vitro* serían por lo tanto una mejor guía para inferir una posible conformación farmacofórica. De todos los enantiómeros de dihidroxi-2-amino-tetralinas, el isómero *R*-(+)-6,7- es el que presenta una mayor actividad siendo aproximadamente 4 veces más potente que la misma dopamina y 100 veces más potente que su forma (*S*) [9]. En la figura 1.3 se muestra la relación de estos dos compuestos con los rotámeros coplanares de DA.



**Figura 1.3** Comparación de conforméromos *trans* coplanares de DA con análogos de ADTN. a) rotámero  $\alpha$  de la DA y 5,6-ADTN. b) rotámero  $\beta$  de la DA y 6,7 ADTN.

Vistos los antecedentes conformacionales, espectroscópicos y de relaciones estructura-actividad (SAR) para una de las muchas familias que presentan actividad dopaminérgica, se expone la importancia de no sólo estudiar la estructura

conformacional, sino también analizar las diferencias que generan los cambios conformacionales en propiedades electrónicas del sistema para poder así diferenciar su reactividad frente a un hipotético sitio de unión. Para este objetivo se utilizarán índices de reactividad química global como son el potencial químico electrónico y la dureza química definidos en la Teoría de Funcionales de Densidad.

## 1.2 METODOLOGÍA

La metodología utilizada se basó en cálculos *ab initio* a un nivel de teoría RHF/6-31G utilizando el programa GAUSSIAN94 [11]. Los cálculos semiempíricos AM1 [12] para la dopamina y sus 2- y 6-metil derivados fueron realizados en el programa MOPAC 6.0. Tal como se planteó en la sección anterior, para el estudio conformacional de la dopamina se definieron dos ángulos diedros ( $\theta$  y  $\phi$ ). La misma definición de ángulos se utilizó para los derivados metilados de la DA.

Para cada uno de los conformeros en este estudio, tanto en su forma neutra como protonada, se permitió su optimización total fijando sólo el valor del ángulo diedro  $\theta$ . Para la obtención de los perfiles de potencial químico y dureza se fijó el ángulo diedro  $\theta$  a  $0^\circ$ ,  $90^\circ$  y  $180^\circ$  variando  $\phi$ . Para los perfiles energéticos AM1 también se escogieron tres valores para el ángulo diedro  $\theta$  debido a que representan las estructuras coplanares ( $\theta = 0^\circ$  y  $180^\circ$ ) y perpendiculares ( $\theta = 90^\circ$ ) de la DA. El ángulo  $\phi$ , para cada uno de estos ángulos  $\theta$ , se varió entre  $-180^\circ$  y  $180^\circ$  con incrementos de  $20^\circ$  tanto para los cálculos *ab initio* como AM1.

Los estudios de la estructura electrónica de la dopamina se efectuaron dentro del marco teórico de la Teoría de Funcionales de Densidad (DFT). Los conceptos generales de esta teoría serán revisados en el Apéndice 2.

A continuación se definirán brevemente los conceptos utilizados en este análisis.

Esta teoría provee bases teóricas para definir conceptos como potencial químico electrónico ( $\mu$ ) y dureza química ( $\eta$ ). Ambos índices de reactividad son propiedades globales del sistema. Por otra parte, la DFT ha mostrado ser fructífera en la verificación

del Principio de Máxima Dureza (PMD). Este principio postula que sistemas moleculares, atómicos y/u otros en equilibrio tienden a ocupar estados de alta dureza [13], mientras que los estados de transición tienden a tener durezas mínimas.

El potencial químico electrónico es definido formalmente en DFT [14]:

$$(1.1) \quad \mu = \left[ \frac{\partial E}{\partial N} \right]_{\nu(r)}$$

como la derivada de la energía total electrónica  $E$  con respecto al número total de electrones del sistema  $N$  a potencial externo constante  $\nu(r)$ . El potencial externo  $\nu(r)$ , es el potencial que da cuenta de las interacciones de los electrones y núcleos en el sistema. Utilizando una aproximación de derivada finita, esta cantidad puede ser expresada en términos del Potencial de Ionización  $I$  y la afinidad electrónica  $A$ , respectivamente. Más aún, basados en el teorema de Koopman se puede expresar  $\mu$  en términos de los niveles energéticos monoelectrónicos de los estados HOMO y LUMO,  $\varepsilon_h$  y  $\varepsilon_l$  respectivamente, como se muestra en la ecuación (1.2). El potencial químico electrónico describe los cambios en la energía total del sistema inducidos por cambios en el número de electrones del sistema.

$$(1.2) \quad \mu \cong -\frac{(I + A)}{2} \cong \frac{\varepsilon_h + \varepsilon_l}{2}$$

La dureza química ( $\eta$ ) puede ser descrita como la resistencia de un sistema a cambiar su distribución electrónica [14] y además está relacionada con las interacciones electrostáticas de largo alcance, y la disminución de la dureza en un sistema conlleva un aumento en la reactividad frente a este tipo de interacciones [15]:

$$(1.3) \quad \eta = \left[ \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right]_{\nu(r)}$$

se define como la segunda derivada de la energía electrónica total  $E$  con respecto al número de electrones del sistema  $N$  a potencial externo constante  $v(r)$ .

$$(1.4) \quad \eta \cong \frac{(I - A)}{2} \cong \frac{(\varepsilon_l - \varepsilon_h)}{2}$$

### 1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 1.3.1 Estudio de la dureza química en Dopamina

En la Tabla 1.1 se muestran los ángulos diedros  $\theta$  y  $\phi$  obtenidos en la optimización de la geometría para la dopamina en sus formas neutra y  $N$ -protonada. La mayor perturbación en los ángulos diedros optimizados, como consecuencia de la protonación, fue observada para los rotámeros *anti* y *proximal* entre los rotámeros perpendiculares, aunque también se observa una variación en los rotámeros *sinclinales* coplanares. Sin embargo, estos cambios son pequeños y no superan los  $7^\circ$ . Para el rotámero *distal* y los *trans*  $\alpha$  y  $\beta$  (coplanares) no muestran variación.

**Tabla 1.1** Geometría optimizada HF/6-31G para los ángulos diedros  $\theta$  y  $\phi$  obtenidos para las formas neutra y  $N$ -protonada de la dopamina.

| Rotámero                  | Neutra   |        | $N$ -protonada |        |
|---------------------------|----------|--------|----------------|--------|
|                           | $\theta$ | $\phi$ | $\theta$       | $\phi$ |
| <i>proximal</i>           | 84,4°    | 63,2°  | 82,7°          | 57,7°  |
| <i>distal</i>             | 85,4°    | -63,1° | 85,9°          | -63,3° |
| <i>anti</i>               | 91,4°    | 179,7° | 98,5°          | 177,9° |
| <i>trans</i> $\alpha$     | -179,9°  | 180,0° | -179,9°        | 180,0° |
| <i>sinclinal</i> $\alpha$ | -179,6°  | 74,9°  | -177,3°        | 69,3°  |
| <i>trans</i> $\beta$      | 0,0°     | 180,0° | -0,2°          | 180,0° |
| <i>sinclinal</i> $\beta$  | 0,2°     | 72,4°  | 4,0°           | 69,2°  |

En las formas *sinclinales* coplanares la  $N$ -protonación rompe la coplanaridad, es decir, hace que el enlace C(1)-C(2) se eleve sobre el plano del anillo del catecol en

aproximadamente 3°. Además el otro ángulo diedro  $\phi$  disminuye en aproximadamente 5° con respecto al valor en la forma neutra. La variación de ambos ángulos diedros permite el acercamiento del grupo amonio al anillo.

En las formas *sinclinales*, tanto las perpendiculares como las coplanares, se encuentra siempre un átomo de hidrógeno del grupo amonio orientado hacia la nube electrónica del anillo catecol.

Las energías relativas y las propiedades globales tales como el potencial químico electrónico y la dureza química para ambas formas (neutra y *N*-protonada) de la dopamina son mostradas en la Tabla 1.2

**Tabla 1.2** Energías relativas ( $\Delta E$ ), dureza química ( $\eta$ ) y potencial químico electrónico ( $\mu$ ) para la dopamina; cálculos HF/6-31G.

| Rotámero                             | $\Delta E$ (kcal/mol) | $\eta$ (eV) | $\mu$ (eV) |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------|------------|
| <i>Forma neutra</i>                  |                       |             |            |
| <i>proximal</i>                      | 0,0                   | 6,07        | -2,23      |
| <i>distal</i>                        | 0,0                   | 6,07        | -2,28      |
| <i>anti</i>                          | 0,0                   | 6,07        | -2,21      |
| <i>trans <math>\alpha</math></i>     | 2,2                   | 6,09        | -2,25      |
| <i>sinclinal <math>\alpha</math></i> | 2,7                   | 6,07        | -2,19      |
| <i>trans <math>\beta</math></i>      | 2,1                   | 6,08        | -2,25      |
| <i>sinclinal <math>\beta</math></i>  | 2,9                   | 6,07        | -2,24      |
| <i>Forma N-protonada</i>             |                       |             |            |
| <i>proximal</i>                      | 0,3                   | 5,73        | -6,03      |
| <i>distal</i>                        | 0,0                   | 5,78        | -6,10      |
| <i>anti</i>                          | 3,8                   | 5,37        | -6,02      |
| <i>trans <math>\alpha</math></i>     | 6,8                   | 5,28        | -5,90      |
| <i>sinclinal <math>\alpha</math></i> | 3,9                   | 5,59        | -5,95      |
| <i>trans <math>\beta</math></i>      | 7,6                   | 5,30        | -5,96      |
| <i>sinclinal <math>\beta</math></i>  | 5,7                   | 5,61        | -6,02      |

Para la forma neutra, se encontró que los conformeros de más baja energía son los perpendiculares. Las coplanares son las conformaciones más energéticas, siendo las *sinclinales* más inestables que sus respectivas formas *trans*. La dureza química varía aproximadamente en 0,02 eV (una variación menor a 0,5 kcal/mol), encontrándose esta pequeña diferencia dentro del intervalo de error asociado al nivel de cálculo utilizado, por lo cual no es significativa para evaluar el cumplimiento del PMD. La variación del potencial químico es de alrededor de 2,5 kcal/mol. No se aprecia una relación como la que predice el Principio de Máxima Dureza para las conformaciones de la forma neutra de la dopamina, debido principalmente a la poca diferencia en la estabilidad de los diferentes conformeros.

Los resultados obtenidos para la forma *N*-protonada muestran una marcada diferencia con respecto a la forma neutra, resultando claro el cumplimiento del Principio de Máxima Dureza para esta forma de la DA. Aunque el potencial químico no permanece constante, tiene una variación menor a 0,2 eV, pero si sólo se compara en los conformeros perpendiculares esta variación disminuye a 0,08 eV. Por lo tanto, el potencial químico permanece aproximadamente constante ( $\Delta\mu \approx 0$ ) para estos últimos conformeros. Los resultados obtenidos muestran la misma tendencia en energía que los obtenidos por Urban y col.[6] quienes utilizaron un nivel más alto de teoría (RHF/6.31\*). Sólo se observó una fuerte discrepancia en la energía del rotámero *trans*  $\alpha$ , el cual presenta una mayor inestabilidad en el trabajo de Urban y col.

Los rotámeros más estables son los *sinclinales* perpendiculares (*distal* y *proximal*), siendo el *distal* el más estable de todos. Además, si se utiliza el criterio de dureza como estabilidad, los resultados para la forma *N*-protonada están de acuerdo con este enfoque: el rotámero más duro es el *distal*. El *proximal* es ligeramente menos duro en 0,03 eV. El rotámero *anti* es el más inestable de los rotámeros perpendiculares y posee una menor dureza, con una disminución de 0,4 eV (9,5 kcal/mol aproximadamente) con respecto al *distal*. Los rotámeros coplanares resultaron ser menos estables que los perpendiculares. En la energía relativa de estos rotámeros se aprecia una tendencia opuesta a la mostrada por la forma neutra, donde los rotámeros *sinclinales* coplanares

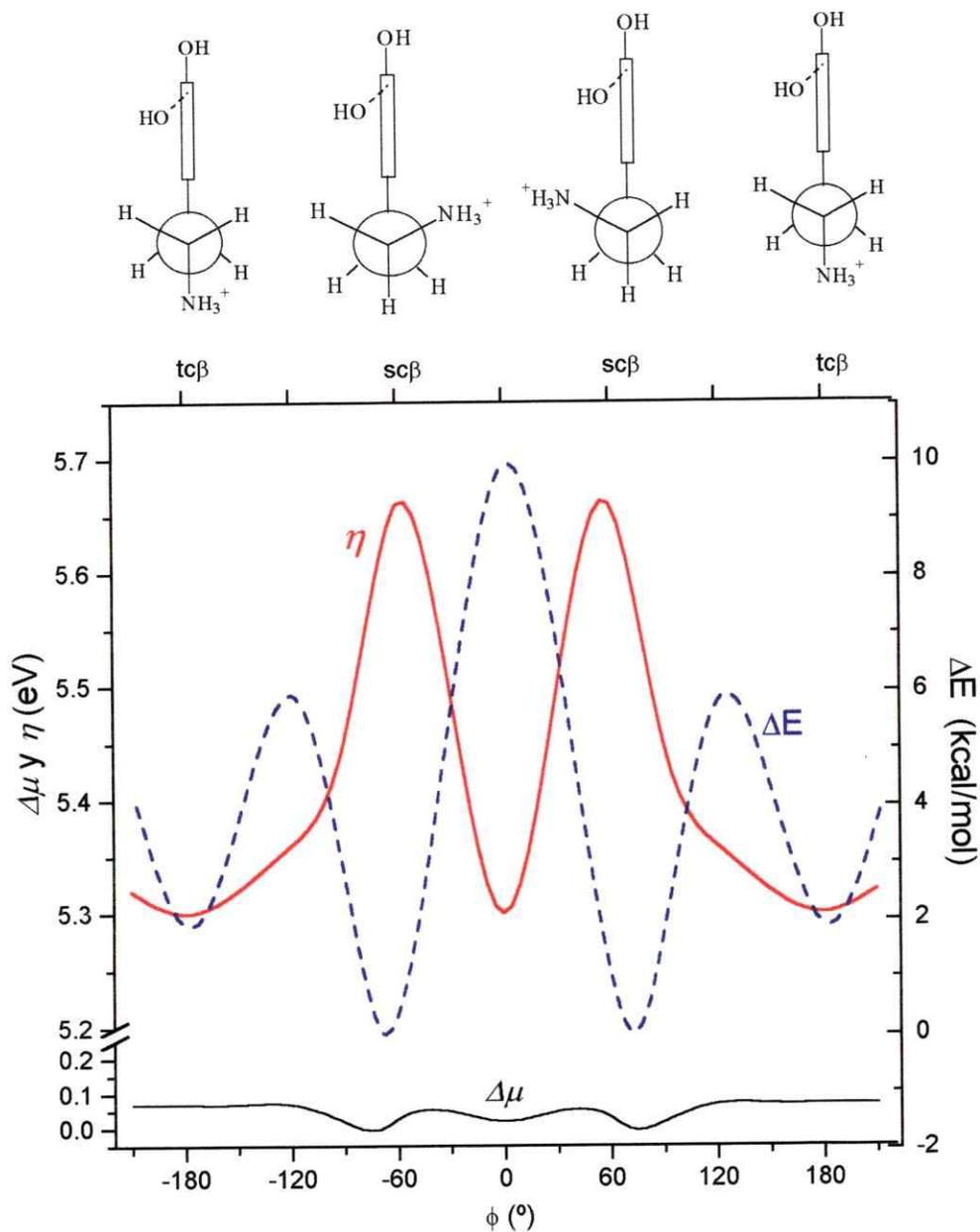
son menos estables que sus respectivas formas *trans*. Para la forma *N*-protonada se produce una inversión de este orden, donde las formas *sinclinales* coplanares se convierten en las más estables, casi isoenergéticas con la *anti*, mientras que las *trans* coplanares son los rotámeros más inestables. Desde otro punto de vista, la dureza de estos rotámeros es mínima con una disminución de 0,5 eV (11,5 kcal/mol) con respecto al rotámero *distal*. Los rotámeros *trans* coplanares serían los más reactivos frente a una interacción electrostática, específicamente con los receptores dopaminérgicos. Además, la dureza por su definición está relacionada con interacciones del tipo no-enlazante, o la formación de enlaces iónicos, por lo cual la utilización de este concepto es válida para explicar la reactividad farmacológica de los rotámeros dopaminérgicos, pues en el complejo droga-receptor sólo existirían interacciones no-enlazantes. Se puede aseverar que la menor dureza que presentan los rotámeros *trans* coplanares está directamente relacionada con su putativa actividad farmacológica. Se postula que las conformaciones que presentan la actividad dopaminérgica en la DA serían aquellas de menor dureza.

La variación de la dureza a lo largo de una coordenada de reacción es definida como el perfil de dureza. Datta [16] ha mostrado que la dureza alcanza un mínimo en los estados de transición correspondientes a la inversión del amoníaco (donde  $\mu$  tiene un máximo en el mismo punto que la energía) y para la transferencia protónica intramolecular en el malonaldehído (donde  $\mu$  permanece prácticamente constante).

Los perfiles de dureza y de potencial químico para la coordenada de reacción ( $\phi$ ) para la dopamina *N*-protonada se presentan en la Figura 1.4. Se obtuvieron los perfiles de dureza para tres ángulos diedros con  $\theta = 0^\circ$  y  $180^\circ$  que representan las rotaciones en  $\phi$  para los rotámeros coplanares y  $90^\circ$  que es la rotación del arreglo perpendicular. Se aprecia el cumplimiento del Principio de Máxima Dureza, debido a que las curvas de energía potencial y dureza presentan un comportamiento contrario, es decir, para un mínimo local (máximo local) en la dureza la energía presenta un máximo local (mínimo local). A pesar de que el potencial químico presenta una variación que puede ser despreciable (menor que 0,08 eV), se encuentra que los mínimos en  $\Delta\mu$  corresponden a

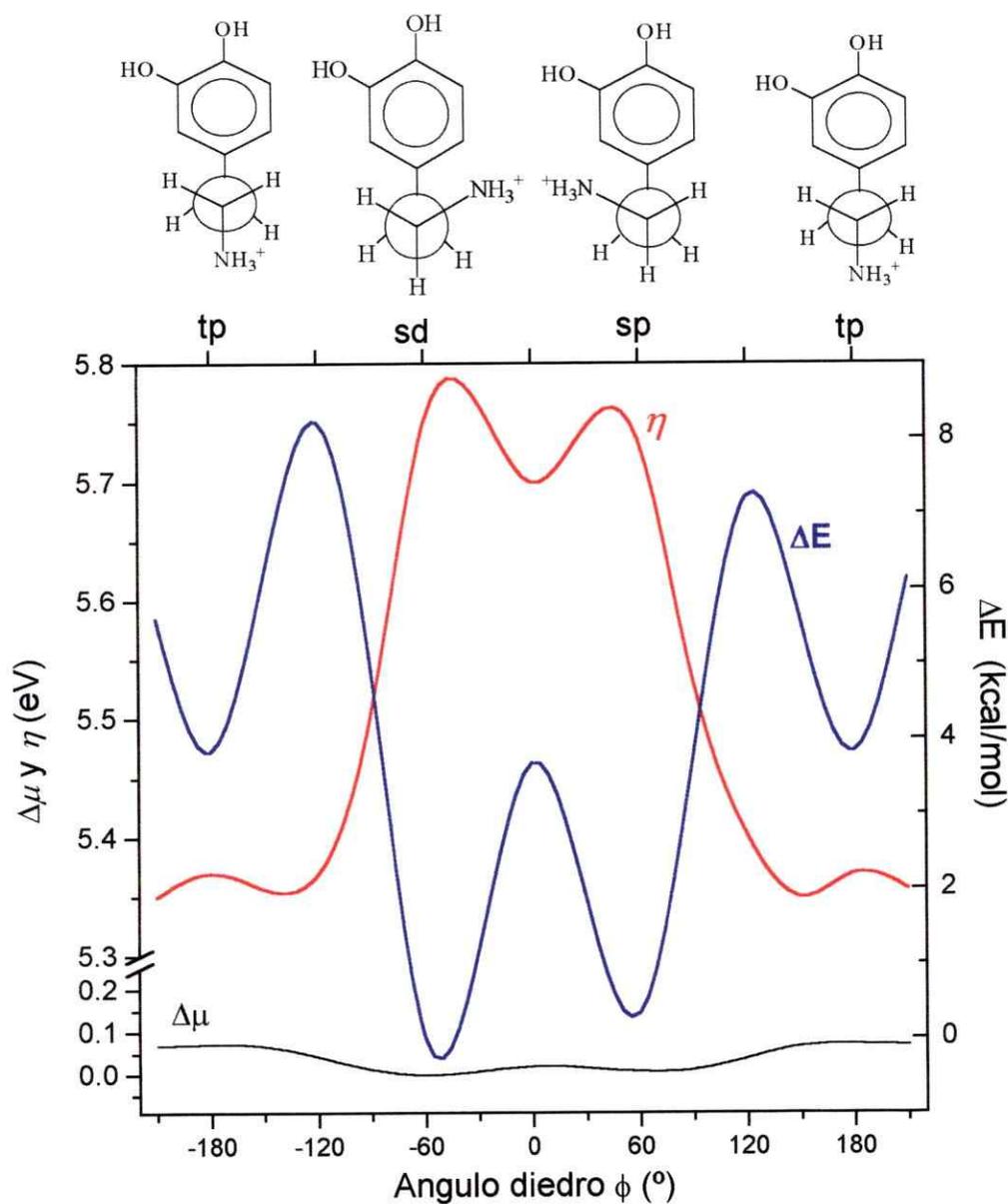
mínimos de la energía relativa y en la energía electrónica, por lo cual bajo estas condiciones se cumple el PMD.

Los resultados para los arreglos coplanares ( $\theta = 0^\circ$  y  $180^\circ$ ) se muestran en la Figura 1.4a y 1.4c. Debido a la simetría que presenta la DA en los rotámeros coplanares se analizará la zona entre  $0^\circ$  a  $180^\circ$ . Se cumple el PMD en la zona donde la energía es mínima ( $70^\circ$ ), la cual presenta una máxima dureza. Este máximo corresponde a la conformación *sinclinal* coplanar, la cual está estabilizada por la interacción catión- $\pi$ . El mínimo en dureza corresponde a dos zonas en los perfiles, correspondientes a conformaciones *cis* y *trans* coplanares. En la zona de los rotámeros *trans* coplanares, la dureza presenta un comportamiento singular: desde  $\phi = 130^\circ$  a  $180^\circ$  permanece casi constante por aproximadamente  $50^\circ$ , con una variación menor a  $0,05$  eV. Al analizar las relaciones estructura-actividad se encuentra que el farmacóforo presentaría una relación *trans* coplanar entre el anillo catecol y el grupo amino. Sin embargo, en muchos de los compuestos semirígidos estudiados la relación no es completamente coplanar, sino que existe una ligera desviación de la planaridad que puede ser menor a  $5^\circ$  como en el caso de la (*R*)-APO o mayores a  $10^\circ$  como es en el de la (*R*)-6,7-ADTN. El resultado mostrado en esta zona por la DA indica que puede existir una desviación de la coplanaridad en el farmacóforo sin una perturbación fuerte en la dureza del ligando.



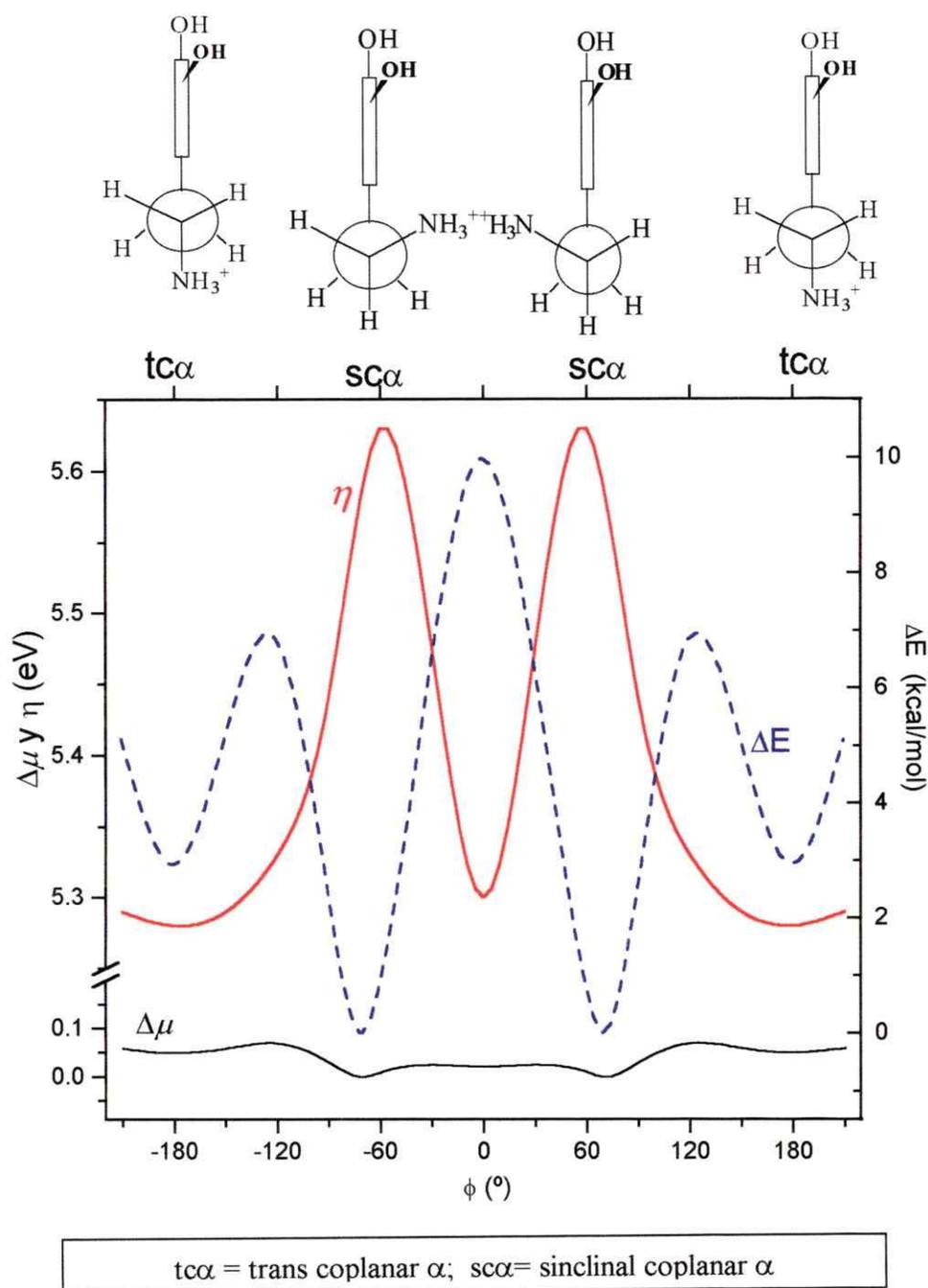
tc  $\beta$  = trans coplanar  $\beta$  ; sc  $\beta$  = sinclinal coplanar  $\beta$

**Figura 1.4a** Perfiles de potencial químico electrónico ( $\Delta\mu$ ) y dureza química ( $\eta$ ) (eV); Energía relativa ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) para la rotación del ángulo diedro  $\phi$  ( $^\circ$ ) en la forma N-protonada de la dopamina con  $\theta$  fijo a  $0^\circ$ . Estos perfiles fueron obtenidos de los resultados de los cálculos RHF/6-31G.



tp = *trans perpendicular (anti)*; sd = *sinclinal distal*; sp = *sinclinal proximal*

**Figura 1.4b** Perfiles de potencial químico electrónico ( $\Delta\mu$ ) y dureza química ( $\eta$ ) (eV); Energía relativa ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) para la rotación del ángulo diedro  $\phi$  (°) en la forma N-protonada de la dopamina con  $\theta$  fijo a 90°. Estos perfiles fueron obtenidos de los resultados de los cálculos RHF/6-31G.



**Figura 1.4c** Perfiles de potencial químico electrónico ( $\Delta\mu$ ) y dureza química ( $\eta$ ) (eV); Energía relativa ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) para la rotación del ángulo diedro  $\phi$  ( $^\circ$ ) en la forma *N*-protonada de la dopamina con  $\theta$  fijo a  $180^\circ$ . Estos perfiles fueron obtenidos de los resultados de los cálculos HF/6-31G.

Para la rotación del ángulo torsional  $\phi$  con  $\theta$  fijo a  $90^\circ$  se observa que el potencial químico alcanza mínimos relativos en los rotámeros *distal*, *anti* y *proximal* (Figura 1.4b). La zona de mayor dureza corresponde a la región donde se ubican las formas sinclinales donde se presentan los mínimos en la energía, desde la *distal* ( $\phi = -60^\circ$ ) hasta la *proximal* ( $\phi = 60^\circ$ ). Estos rotámeros están estabilizados por una interacción catión- $\pi$  [17], entre el grupo amonio (catión) y el fragmento catecol (nube  $\pi$ ). Esta zona corresponde a una región de potencial químico constante, con una variación menor que 0,02 eV. La zona de dureza mínima se observa en la región comprendida entre el rotámero *anti* hasta una de las formas eclipsadas ( $\phi = \pm 120^\circ$ ), que en el perfil de la energía corresponde a una zona de máxima energía.

### 1.3.2 Derivados orto-metilados de DA.

Se realizaron estudios semiempíricos del espacio conformacional de la DA y de sus derivados orto-metilados en sus formas neutra y *N*-protonada. En la Figura 1.5 se presentan los diferentes rotámeros de la 2-metildopamina y la 6-metildopamina. En dicha figura se aprecian los impedimentos estéricos entre el grupo amonio y el grupo metilo para los diferentes rotámeros.

La metilación de la dopamina en sus posiciones *orto* afecta la actividad de sus derivados como fue discutido en la introducción. Esto se debería principalmente a un impedimento estérico en los diferentes rotámeros de los *orto*-metil derivados. Los resultados de las energías relativas para los diferentes compuestos se muestran en la Tabla 1.3.

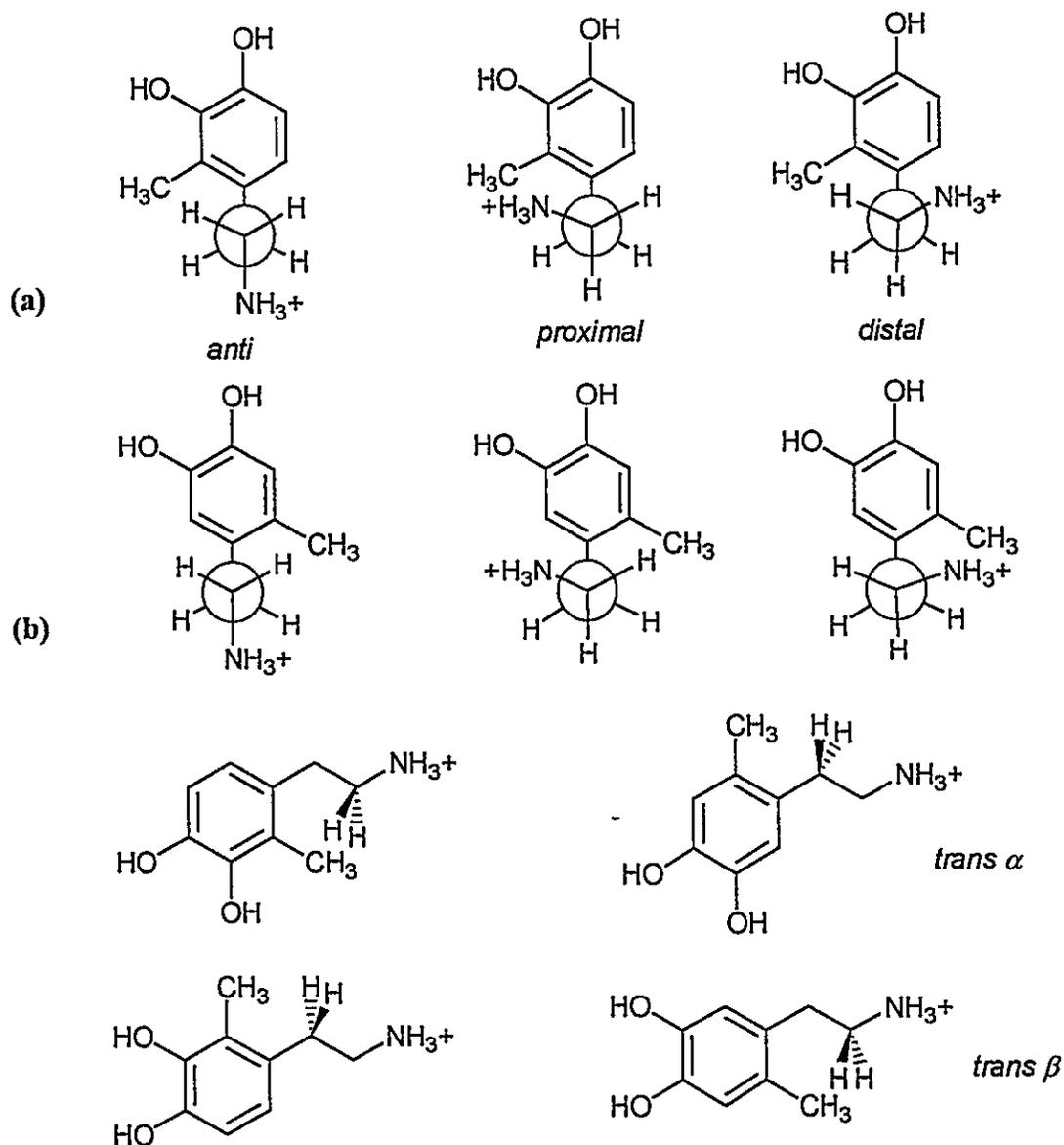
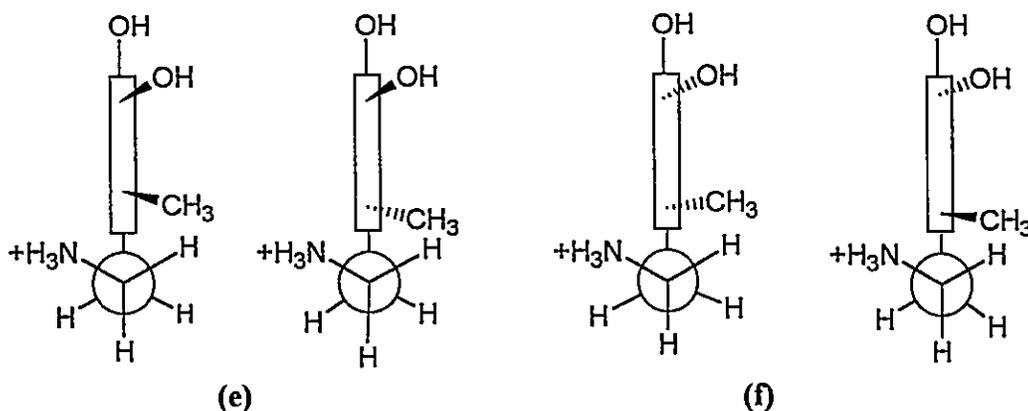


Figura 1.5 Rotámeros de los orto-metil derivados de la dopamina en su forma *N*-protonada: (a) rotámeros perpendiculares de la 2-metildopamina (2-meDA); (b) rotámeros perpendiculares de la 6-metildopamina (6-meDA); (c) rotámero *trans α* de ambos compuestos; (d) rotámero *trans β* de ambos compuestos.



**Figura 1.5 continuación** Rotámeros de los orto-metil derivados de la dopamina en su forma N-protonada: (e) sinclinal coplanar  $\alpha$  y (f) sinclinal coplanar  $\beta$ .

**Tabla 1.3** Energías relativas para orto-metil derivados de dopamina en sus formas neutras y protonadas usando metodología semiempírica AM1.

| Rotámeros                            | DA  | 2-meDA | 6-meDA |
|--------------------------------------|-----|--------|--------|
| <i>Forma neutra</i>                  |     |        |        |
| <i>proximal</i>                      | 0,1 | 1,2    | 0,0    |
| <i>distal</i>                        | 0,0 | 0,0    | 1,4    |
| <i>anti</i>                          | 0,4 | 0,3    | 0,4    |
| <i>trans <math>\alpha</math></i>     | 1,1 | 9,9    | 0,9    |
| <i>sinclinal <math>\alpha</math></i> | 1,3 | 13,1   | 1,4    |
| <i>trans <math>\beta</math></i>      | 1,2 | 1,2    | 9,2    |
| <i>sinclinal <math>\beta</math></i>  | 1,4 | 1,8    | 12,9   |
| <i>Forma N-protonada</i>             |     |        |        |
| <i>proximal</i>                      | 1,1 | 0,1    | 0,0    |
| <i>distal</i>                        | 0,0 | 0,0    | 2,8    |
| <i>anti</i>                          | 3,8 | 2,8    | 3,9    |
| <i>trans <math>\alpha</math></i>     | 5,9 | 13,1   | 5,1    |
| <i>sinclinal <math>\alpha</math></i> | 1,4 | 13,1   | 3,0    |
| <i>trans <math>\beta</math></i>      | 5,9 | 5,3    | 14,2   |
| <i>sinclinal <math>\beta</math></i>  | 3,8 | 4,6    | 15,4   |

Los rotámeros neutros perpendiculares de DA son casi isoenergéticos, mientras que los *trans* coplanares son menos estables en sólo 1 kcal/mol. Aquí se observa la misma tendencia en los resultados *ab initio* donde el rotámero *trans* coplanar es más estable que sus formas *sinclinales*.

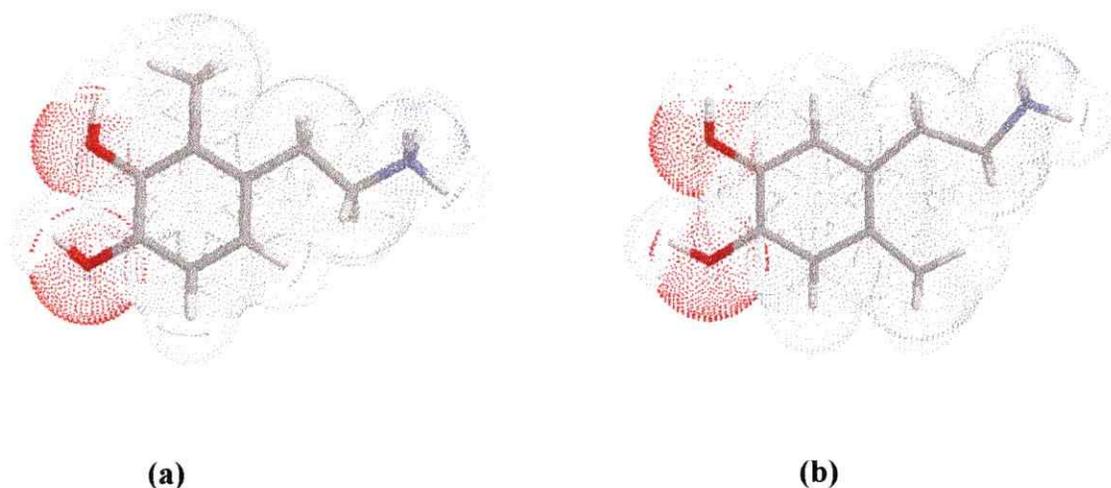
Para los derivados *orto*-metilados en su forma neutra se observa que la forma *anti* tiene aproximadamente la misma energía en ambos compuestos, mientras que los rotámeros *sinclinales* presentan tendencias contrarias: la 2-metildopamina sigue la misma tendencia en energía para las formas perpendiculares que la DA, sólo con un incremento en el rotámero *proximal* debido al acercamiento del grupo amino al grupo metilo en la posición 2. Para la 6-meDA se observa que el rotámero *proximal* es el más estable, con el *distal* más inestable debido a la compresión estérica entre los hidrógenos del grupo metilo y los hidrógenos del grupo amino.

Para los rotámeros *trans* coplanares y *sinclinales* coplanares se observa que los primeros son más estables que sus respectivas formas *sinclinales*. El *trans*  $\alpha$  y su forma *sinclinal* son los rotámeros más inestables para la 2-meDA debido al impedimento estérico entre el grupo amino y el grupo metilo, mientras que los rotámeros  $\alpha$  para la 6-meDA son más estables y presentan el mismo grado de estabilidad que los rotámeros perpendiculares.

Los rotámeros *trans*  $\beta$  presentan la tendencia opuesta a la observada en los rotámeros *trans*  $\alpha$ . Los más inestables son los de la 6-meDA, mientras que los de la 2-meDA presentan un nivel energético similar a los perpendiculares.

Para las formas *N*-protonadas presenta el mismo ordenamiento observado para las formas neutras, con la excepción de que las formas *sinclinales* coplanares son similares en energía a sus respectivas formas *trans*. Para las *sinclinales* se observa en el compuesto 2-meDA que son isoenergéticas y que la *proximal* no presenta una mayor inestabilidad. Para la 6-meDA las formas *sinclinales* se diferencian aún más en energía siendo más estable el rotámero *proximal*. La forma *anti* no presenta una mayor variación en su estabilidad. Para la DA los rotámeros *sinclinales* aumentan su estabilidad con respecto a los *trans* coplanares, siendo el rotámero *sinclinal*  $\alpha$  el que presenta la mayor

estabilización. Para los compuestos 2-meDA y 6-meDA aquellos rotámeros *trans* coplanares que no presentan un impedimento estérico por el grupo metilo siguen el mismo patrón que la DA, mientras que en aquellos que sí presentan este efecto la diferencia en estabilidad entre la forma *trans* y *sinclinal* coplanar es mínima. Con respecto a los resultados en cuanto a la actividad observada para estos compuestos, se puede aseverar que el rotámero *trans*  $\beta$  sería el que presenta la actividad farmacológica, pues para la 2-meDA, que presenta la misma actividad que la DA, es accesible el rotámero  $\beta$ , pero para el compuesto 6-meDA, que no presenta actividad sobre los receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>1</sub>, este rotámero es el más inestable y el compuesto estaría impedido de poblar dicha conformación.



**Figura 1.6** Conformaciones *trans*  $\beta$  para el compuesto (a) 2-meDA y (b) 6-meDA. Para cada conformación se muestran las superficies accesibles al solvente.

En las figuras 1.7 y 1.8 se presentan los perfiles de energía relativa para las formas neutra y *N*-protonada de la DA, 2-meDA y 6-meDA, respectivamente. Los valores de 0° ó 180° para el ángulo torsional  $\theta$  representa la rotación partiendo desde la conformación *trans* coplanar  $\beta$  ó  $\alpha$  ( $\phi = \pm 180^\circ$ ) hacia el rotámero *sinclinal* coplanar  $\beta$  ó  $\alpha$  ( $\phi \approx \pm 60^\circ$ ) para llegar al rotámero *simperiplanar* ( $\phi = 0^\circ$ ). Se observa tanto en los perfiles de las

formas neutras como los de las *N*-protonadas una simetría con respecto a ( $\phi = 0^\circ$ ) debido a que la rotación es simétrica para los rotámeros *trans* coplanares.

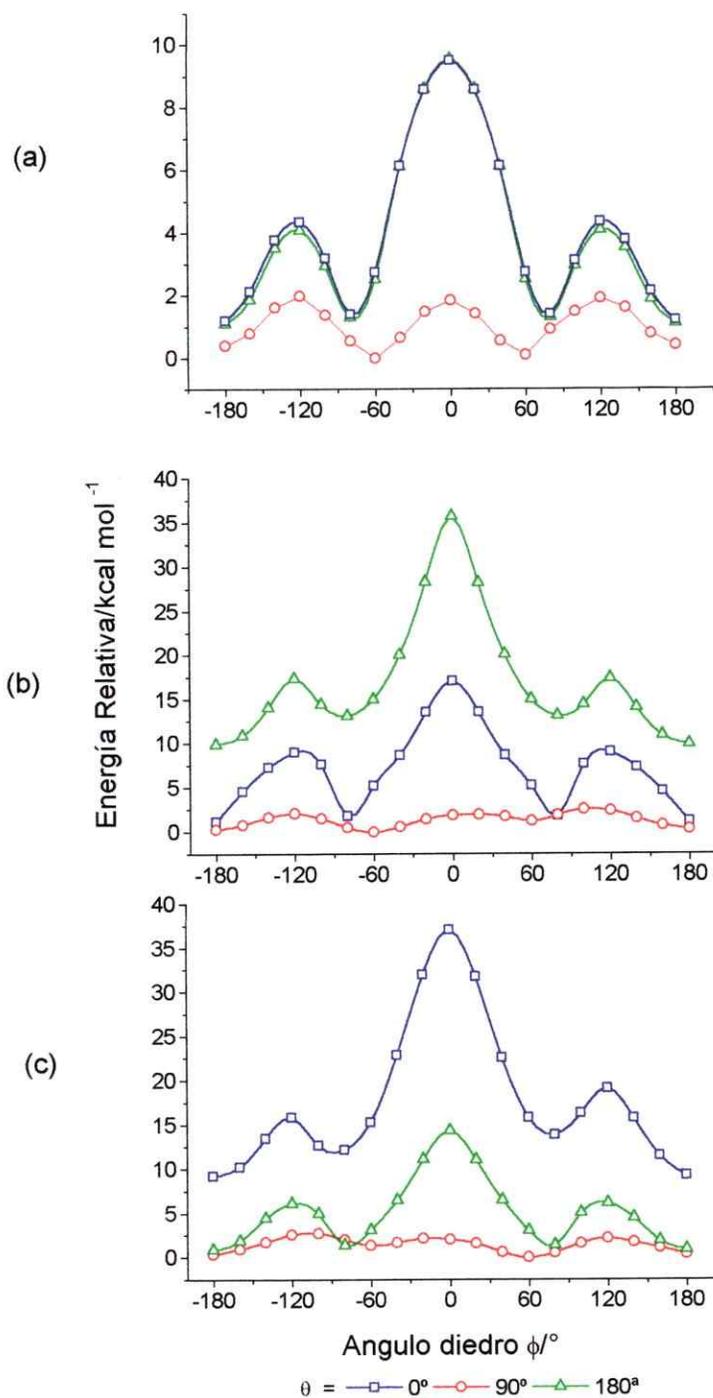
Para la rotación en la forma neutra se aprecia la misma tendencia en ambos compuestos que para la DA, con un aumento de la barrera de rotación para la 6-meDA debido a que el grupo amino se está acercando al grupo metilo en la posición 6 del anillo, hasta alcanzar un valor de 27 kcal/mol. La DA presenta una barrera rotacional menor que 7 kcal/mol, con una barrera entre el rotámero *trans* y el *sinclinal* de 2,5 kcal/mol. La forma *N*-protonada presenta una diferencia en los perfiles de energía, donde la forma más estable es la *sinclinal* coplanar. Este mínimo local está ubicado aproximadamente en los  $70^\circ$ . Se observa la misma tendencia en las barreras rotacionales, pero éstas disminuyen en la forma *N*-protonada desde 27 kcal/mol en la forma neutra a 21 kcal/mol en la forma *N*-protonada de la 6-meDA. Este mismo efecto se aprecia para las barreras de la DA y la 2-meDA.

La DA, en su forma neutra, presenta una barrera inferior a 2 kcal/mol. El perfil es casi simétrico, siendo apenas perceptible la diferencia entre los diferentes mínimos. Esta simetría se pierde al incluir un sustituyente en una posición orto en el anillo, mostrando la diferencia de energía provocada por la metilación para el rotámero distal en la 6-meDA y para el proximal en la 2-meDA. En el resto de la zona los perfiles se asemejan a los de la DA. La protonación también cambia la simetría del perfil de energía para la rotación de  $\phi$  con  $\theta$  fijo a  $90^\circ$  en la DA. Si se compara este perfil con el obtenido para el cálculo *ab initio*, ambos presentan la misma tendencia, es decir, una zona de mínimos de energía en la región *sinclinal*, con la conformación *anti* más energética. La región poblada por los conformeros *anti* es relativamente similar para los tres compuestos, siendo las barreras rotacionales hacia la región *sinclinal* parecidas, con la excepción de la 6-meDA cuya barrera es mayor en la región entre  $\phi -180^\circ$  a  $-120^\circ$ . En la zona *sinclinal* donde se presenta la interacción catión- $\pi$  se observa una tendencia similar y sólo se ve afectado el rotámero en el que se enfrenta el grupo amonio al grupo metilo. Las energías de los estados de transición entre un rotámero *sinclinal* y el otro son inferiores a la energía del rotámero *anti*, es decir, para la forma *N*-protonada los rotámeros *sinclinales* e incluso el

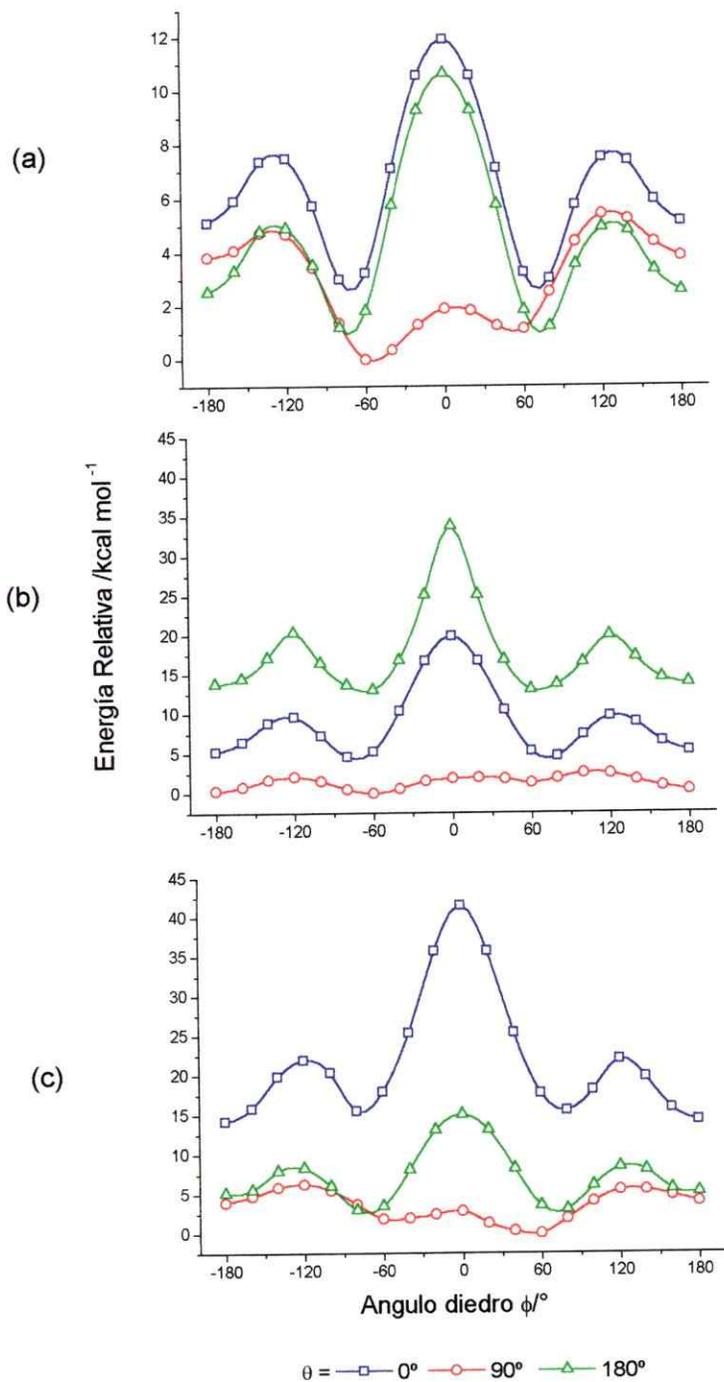
*simperiplanar* son más estables que la conformación *anti*. En esta zona también se aprecia que uno de los hidrógenos del grupo amonio siempre está enfrente al anillo aromático al igual que lo discutido anteriormente para la DA. Este efecto también se aprecia en la rotación de la forma neutra de los rotámeros perpendiculares, donde el par de electrones no-enlazantes del nitrógeno queda siempre orientado manteniéndose máximamente alejado del anillo aromático, lo que hace que un hidrógeno del grupo amino esté relativamente cerca del anillo aromático.

Los perfiles de energía para la rotación del rotámero *trans* coplanar  $\alpha$  se observa la misma tendencia que para el rotámero *trans* coplanar  $\beta$ , con la inversión de las energías relativas entre la 2-meDA y la 6-meDA. En este caso el isómero que presenta mayores barreras rotacionales es la 2-meDA, debido a la compresión estérica causada por el acercamiento del grupo amino u amonio (dependiendo de la forma del compuesto) al grupo metilo en la posición 2 del anillo.

Para la forma neutra, se aprecia el aumento de las barreras rotacionales de la 2-meDA. Además, el rotámero más estable es siempre el *trans* coplanar, siendo el *sinclinal* coplanar menos estable. Esta estabilidad relativa se invierte para la forma *N*-protonada, y es menor en los compuestos metilados que en la DA.



**Figura 1.7** Perfiles de energía relativa AM1 ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) en función de la rotación del ángulo diedro  $\phi$  ( $^\circ$ ) para los compuestos en su forma neutra. (a) DA. (b) 2-meDA y (c) 6-meDA.



**Figura 1.8** Perfiles de energía relativa AMI ( $\Delta E$ ) (kcal/mol) en función de la rotación del ángulo diedro  $\phi$  ( $^\circ$ ) para los compuestos en su forma N-protonada. (a) DA. (b) 2-meDA y (c) 6-meDA.

## 1.4 CONCLUSIONES

El estudio de las estructuras conformacionales y electrónicas apunta a que la conformación activa de la dopamina es la que presenta la menor dureza química, permitiendo una mayor interacción electrostática con el sitio de unión, con restricciones resultantes de interacciones no electrostáticas que se discuten en el Capítulo 4. El estudio de la energía relativa para los diferentes conformeros pone de relieve la importancia de las formas coplanares en la actividad dopaminérgica y en particular el conformero *trans*  $\beta$ , como farmacóforo de los receptores dopaminérgicos del sub-tipo D-1.

## Referencias

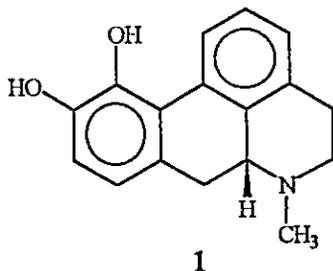
- 1.- R. Bergin y D. Carlström, *Acta Cryst.* **B24**, 1506 (1968).
- 2.- J. Giesecke, *Acta Cryst.* **B36**, 178 (1980).
- 3.- T. M. Bustrad y R. S. Egan, *Tetrahedron.* **27**, 4457 (1971).
- 4.- P. Solmajer, D. Kocjan y T. Solmajer, *Z. Naturforsch.* **38c**, 758 (1983)
- 5.- J. J. Urban, C. J. Cramer y G. R. Famini, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8226 (1992).
- 6.- J. J. Urban y G. R. Famini, *J. Comp. Chem.* **14**, 353 (1993).
- 7.- J. Armstrong y R. B. Barlow, *Br. J. Pharmacol.* **57**, 501 (1976).
- 8.- G. J. Kilpatrick, N. El Tayar, H. van der Waterbeemd, P. Jenner, B. Testa y C. D. Marsden, *Mol. Pharmacol.* **30**, 226 (1986).
- 9.- J. G. Cannon, *Progress in Drug Research* **29**, 303 (1985).
- 10.- A.S. Horn, in *Comparative Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study and Therapeutic Application of Chemical Compounds*, ed. C. Hansch, P.G. Sammes, J.B. Taylor, vol 3, p. 229, Pergamon, Oxford, 1990.
- 11.- M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, P. M. W. Gill, B. G. Johnson, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, T. Keith, G. A. Petersson, J. A. Montgomery, K. Raghavachari, M. A. Al-Laham, V. G. Zakrzewski, J. V. Ortiz, J. B. Foresman, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, A. Nanayakkara, M. Challacombe, C. Y. Peng, P. Y. Ayala, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, E. S. Replonge, R. Comperts, R. L. Martin, D. J. Fox, J. S. Binkley, D. J. Defrees, J. Baker, J. P. Stewart, M. Head-Gordon, C. Gonzalez and J. A. Pople, Gaussian Inc., Pittsburgh PA.
- 12.- M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 3902 (1985)
- 13.- R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.* **64**, 561 (1987).
- 14.- R. G. Parr y W. Yang, *Density-Functional Theory of atoms and molecules*; Ed. Oxford Science Publications; Oxford University Press; 1989; London, New York; ISBN 0-19-504279-4.
- 15.- D. Datta, *J. Phys. Chem.* **96**, 2409 (1992).
- 16.- J. C. Ma y D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **97**, 1303 (1997).

## CAPITULO 2

### ESTUDIO CONFORMACIONAL DE APORFINAS

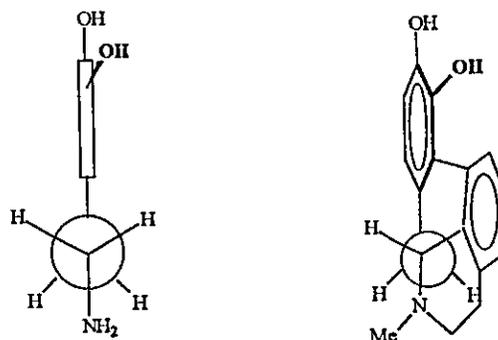
#### 2.1 INTRODUCCIÓN

La (-)-apomorfina (APO) (1) se obtuvo por primera vez en 1869 a través del reordenamiento catalizado por ácido de la (-)-morfina [1]. Así, la apomorfina fue la primera aporfina en ser reconocida estructuralmente [2], aunque no es un producto natural. Los reportes de Ernst [3] llamaron la atención acerca de la similitud estructural de la (-)-APO y la dopamina (ver Figura 2.1) y estimularon la evaluación sistemática de (-)-APO y sus congéneres en relación a su actividad dopaminérgica.



La obtención de nuevos análogos no naturales de apomorfina requirió el desarrollo de métodos prácticos para la obtención del esqueleto aporfínico. Tales

métodos, que además permitieron la síntesis estereoespecífica de aporfinas, tuvieron su origen en los trabajos de Neumeyer y col. a partir de 1967 [4]. Previo a la década de los 80 los trabajos fueron enfocados a delinear las porciones de la estructura molecular de aporfinas asociadas con su actividad dopaminérgica y las interacciones de estos análogos semirígidos de dopamina con los receptores dopaminérgicos. Esto generó una serie de relaciones estructura-actividad (SAR) para la familia de las aporfinas y especialmente en derivados de la apomorfina [5,6].



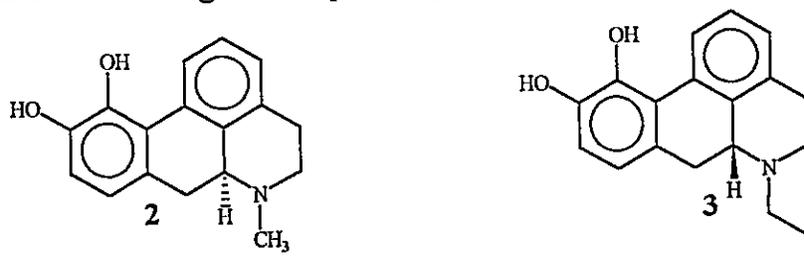
**Figura 2.1** Comparación de la dopamina y la apomorfina, utilizando la proyección de Newman. A la izquierda se muestra la dopamina en su rotámero trans coplanar y a la derecha se muestra la APO.

### *Relaciones Estructura-Actividad Dopaminérgica de Aporfinas*

A partir de los años 70 se comenzó una evaluación sistemática de las aporfinas como un modelo útil para el estudio topográfico de los receptores dopaminérgicos. Este estudio ha generado una amplia gama de relaciones estructura-actividad que han conducido a delinear tres características estructurales básicas que se suponen necesarias para la actividad dopaminérgica de las aporfinas: la configuración molecular, la naturaleza y el largo de la cadena lateral unida al átomo de nitrógeno y, por último, el patrón de sustitución en el esqueleto aporfinico [5,6].

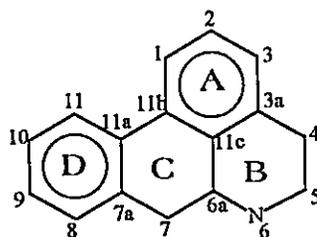
Uno de estos aspectos fundamentales es la configuración absoluta del carbono estereogénico (6a) de esta molécula quiral que determinaría el tipo de actividad (agonista o antagonista). El enantiómero (*R*) de la apomorfina (1) presenta una actividad agonista

dopaminérgica sobre receptores  $D_1$  y  $D_2$ , mientras que su antípoda, el enantiómero (*S*) (2) presenta una actividad antagonista dopaminérgica [7] (ver Tabla 2.1).



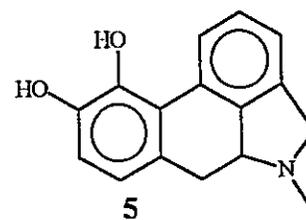
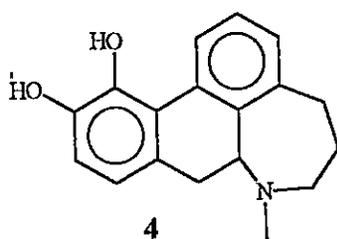
Recientemente, la actividad de la apomorfina y *N-n*-propilnorapomorfina (NPA) (3) fue evaluada sobre 40 sitios de unión de ligandos representativos del sistema nervioso central. Los resultados mostraron que estos compuestos sólo presentan actividad en dos sistemas, es decir, son activos en los receptores dopaminérgicos y  $\alpha$ -adrenérgicos [8].

La apomorfina contiene en su esqueleto una subestructura congruente con el rotámero *trans* coplanar  $\alpha$  de la dopamina, con el anillo catecol casi coplanar con la cadena de aminoetilo (ver Figura 2.1). Se ha postulado que esta conformación es la necesaria para la actividad dopaminérgica, sobre la base del estudio de la expansión o contracción del anillo B nitrogenado (ver Figura 2.2).

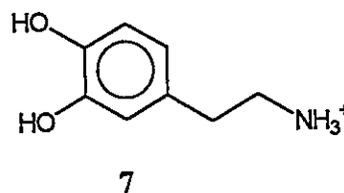
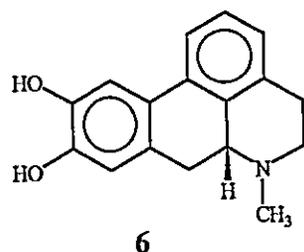


**Figura 2.2** Esqueleto de los compuestos aporfínicos. Muestra la designación de los anillos y la numeración de los átomos.

La expansión del anillo B a un ciclo de 7 átomos genera la fenantro[10,1-*b,c*]azepina (4), la cual no muestra actividad agonista dopaminérgica. Sin embargo, la abeorfina, análogo de 5 miembros en el anillo B, es un potente agonista dopaminérgico (5) [6].



La importancia de la posición de los grupos hidroxilos en el anillo catecol ha sido evaluada a través de la isoapomorfinina (6) que no tiene afinidad significativa por los receptores dopaminérgicos. Este isómero contiene en su estructura el esqueleto del rotámero *trans* coplanar  $\beta$  (7) de la dopamina.



Además, el estudio de aporfinas monohidroxiladas en las posiciones 8, 9, 10 y 11 (en la figura 2.2 se presenta la numeración del esqueleto aporfinico) mostró que los compuestos hidroxilados en 8- y 9- no presentan actividad agonista dopaminérgica, mientras que los isómeros hidroxilados en 10- y 11- sí la presentan (ver tabla 2.1) [6, 9, 10]. Con respecto a estos dos isómeros monohidroxilados, el segundo presenta la mayor actividad agonista dopaminérgica, aunque es menos activo que la apomorfinina sobre receptores del tipo  $D_1$  [9]. Además, la presencia del hidroxilo en la posición 10 se encuentra asociada con una alta afinidad por los receptores dopaminérgicos mientras que se postula que el mismo grupo debe encontrarse en la posición 11 para que los compuestos ejerzan actividad agonista dopaminérgica [10]. Otros trabajos relacionados con el patrón de sustitución indicaron que la presencia de grupos polares como OH,  $NH_2$  o F en la posición (2) aumentan marcadamente la selectividad por los receptores del tipo  $D_2$  sobre el tipo  $D_1$  [11].

Otro de los aspectos fundamentales en la actividad dopaminérgica de estos compuestos es la presencia de la cadena lateral *N*-alquílica. Una cadena de dos a cuatro

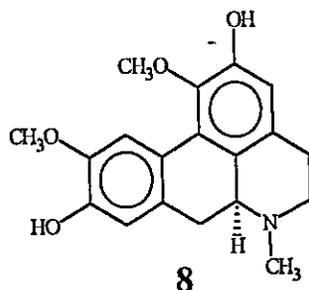
átomos de carbono sobre el nitrógeno de la apomorfina tiene un profundo efecto sobre su capacidad de unión a los receptores dopaminérgicos, como también en sus efectos farmacológicos. En la Tabla 2.1 se muestran las constantes de disociación para derivados *N*-alquilados de norapomorfina. La baja afinidad de esta clase de compuestos, en general, por los receptores D<sub>1</sub> es muy característica, y normalmente muestran una mayor afinidad por los sitios D<sub>2</sub> contrariamente a lo que sucede con la dopamina. Para el caso de los análogos *N*-sustituídos de la apomorfina con configuración 6a(*R*), la presencia de una cadena carbonada de tres átomos de carbono les confiere una mayor afinidad y actividad agonista sobre los receptores del tipo D<sub>2</sub> [12]. Este aumento de la afinidad y selectividad sobre los receptores dopaminérgicos se denomina efecto propilo, que también está presente en otros compuestos que muestran actividad agonista dopaminérgica [5, 6].

**Tabla 2.1** Constantes de disociación (K<sub>i</sub>) para algunos derivados de apomorfina frente a receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.

| Compuesto <sup>a</sup>                     | Actividad   | K <sub>i</sub> (nM) D <sub>1</sub> | K <sub>i</sub> (nM) D <sub>2</sub> | D <sub>2</sub> :D <sub>1</sub> |
|--|-------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| DA <sup>b</sup>                            | --          | 412                                | 1800                               | 0,23                           |
| ( <i>R</i> )-APO <sup>c</sup>              | Agonista    | 236                                | 34                                 | 7                              |
| ( <i>S</i> )-APO <sup>c</sup>              | Antagonista | 2980                               | 140                                | 22                             |
| ( <i>R</i> )-NPA <sup>c</sup>              | Agonista    | 340                                | 3,4                                | 100                            |
| ( <i>S</i> )-NPA <sup>c</sup>              | Antagonista | 1346                               | 105                                | 13                             |
| ( <i>R</i> )-11-OH-AP <sup>c</sup>         | Agonista    | 434                                | 1,1                                | 400                            |
| ( <i>S</i> )-Boldina <sup>d</sup>          | Antagonista | 200                                | 400                                | 0,5                            |
| ( <i>R</i> )-2-F-NPA <sup>e</sup>          | Agonista    | 520                                | 0,0012                             | 57500                          |
| ( <i>R</i> )-2-OH-NPA <sup>e</sup>         | Agonista    | 920                                | 0,053                              | 17400                          |
| ( <i>R</i> )-2-Br-NPA <sup>e</sup>         | Agonista    | 520                                | 0,150                              | 3470                           |
| ( <i>R</i> )-IAP <sup>b</sup>              | Agonista    | >10000                             | 895                                | >110                           |
| ( <i>R</i> )- <i>n</i> -alilo <sup>b</sup> | Agonista    | 615                                | 0,24                               | 2600                           |

a. DA: dopamina; APO: apomorfina; NPA: *N-n*-propilnorapomorfina; (*R*)-11-OH-AP: 11-hidroxinorapomorfina; IAP: *N*-isopropilnorapomorfina; *n*-alilo: *N*-alilnorapomorfina. b. Ref. 11. c. Ref. 8. d. Ref. 13. e. Ref. 12.

En este capítulo se analizan los resultados de estudios conformacionales de los sistemas aporfínicos. Estos estudios están centrados fundamentalmente en las moléculas de apomorfina y boldina. El estudio de la apomorfina se justifica principalmente por la gran cantidad de datos que existen sobre relaciones estructura-actividad de sus análogos. La boldina (**8**) es un compuesto que pertenece a la familia de los alcaloides aporfínicos, con una configuración (*S*) en el carbono quiral, lo que le confiere actividad antagonista dopaminérgica [13] y se distingue por su falta de selectividad por receptores D<sub>2</sub>. Por lo mismo es interesante comparar la conformación de la (*R*)-APO con la del enantiómero (*R*) de la boldina pues se plantea la hipótesis que dicho enantiómero podría presentar una actividad agonista, aunque no posea un hidroxilo en la posición 11, ya que en su estructura se encuentra inserto el esqueleto del rotámero *trans* β de la dopamina, que como se planteó en el capítulo anterior sería el farmacóforo de los receptores dopaminérgicos del subtipo D-1. Estos resultados permitieron caracterizar un farmacóforo para esta familia de compuestos el cual se relacionó también con otros agonistas dopaminérgicos.



## 2.2 METODOLOGÍA

Los estudios conformacionales se realizaron utilizando dos metodologías dentro de la química computacional: la química cuántica y la dinámica molecular. Los cálculos de química cuántica fueron realizados a través del programa GAUSSIAN94. Los cálculos *ab initio* fueron realizados a un nivel de teoría STO 6-31G. Se permitió la optimización total para cada uno de los conformeros estudiados, tanto en la forma neutra como en la protonada.

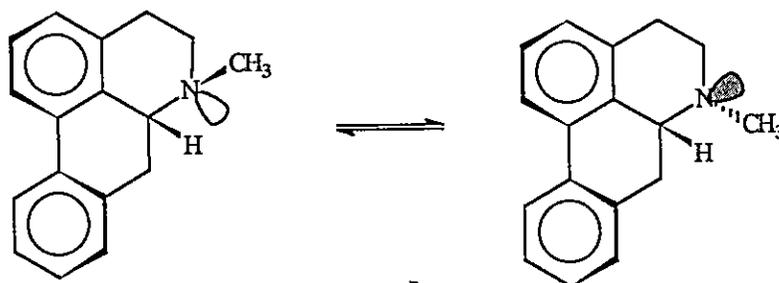
Las simulaciones de dinámica molecular para el análisis de las fluctuaciones de las conformaciones en el tiempo fueron realizadas con el programa Discover 3, que está implementado en el paquete de programas gráficos Insight II. Se realizaron simulaciones para las formas neutra y protonadas de las aporfinas estudiadas. El procedimiento de las simulaciones en el vacío comenzó con una minimización usando el algoritmo de "conjugate gradient", con un criterio de convergencia de 0.001 kcal/mol Å, fijando el número máximo de iteraciones en 3000. Una vez minimizada la estructura de partida, se inició la simulación de la dinámica molecular, utilizando los primeros 5 picosegundos (ps) para que el sistema alcanzara el equilibrio térmico desde 0,1 K a la temperatura de la simulación. Luego se realizaron simulaciones de 99 ps, con una etapa de integración de 1 fs (0,001ps). El campo de fuerza utilizado fue el CVFF "Consistent Valence Force Field" [14] implementado en el programa Discover 3. Las temperaturas de la simulación fueron 298 K (25 °C) y 320 K (47 °C). Las simulaciones en solución acuosa, es decir, aquellas que incluyen el solvente de manera explícita, sólo fueron realizadas para los confórmers protonados de los compuestos estudiados. Se definió una caja de solvatación de 22 Å, utilizando el método PBC (Periodicity Bounded Condition). Una vez definido el sistema de trabajo, es decir, el ligando más las moléculas de solvente, se realizó una minimización con 5000 iteraciones, utilizando primero el algoritmo de "steepest descent" (2000 iteraciones), para luego continuar con "conjugate gradient" (3000 iteraciones), con un criterio de convergencia de 0,001 kcal/mol Å. Luego, una dinámica molecular de 50 ps a 298 K (25 °C), en la cual los primeros 5 ps fueron utilizados para alcanzar el equilibrio térmico del sistema. El campo de fuerza utilizado fue el CVFF. Para realizar los cálculos de las minimizaciones se partió de geometrías optimizadas a nivel *ab initio* y AM1.

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1 Estudio conformacional del proceso de inversión

#### *del nitrógeno en aporfinas como bases libres.*

La familia de las aporfinas presenta el fenómeno de inversión parcial del anillo B, a través de la inversión del átomo de nitrógeno (ver Figura 2.3). Los compuestos pertenecientes a la familia de las aporfinas presentan una rápida inversión en la escala de tiempo de la espectroscopía de RMN denominado FEL (fast exchange limit) [15], por cuyo motivo no ha sido evaluada la barrera energética para este proceso.

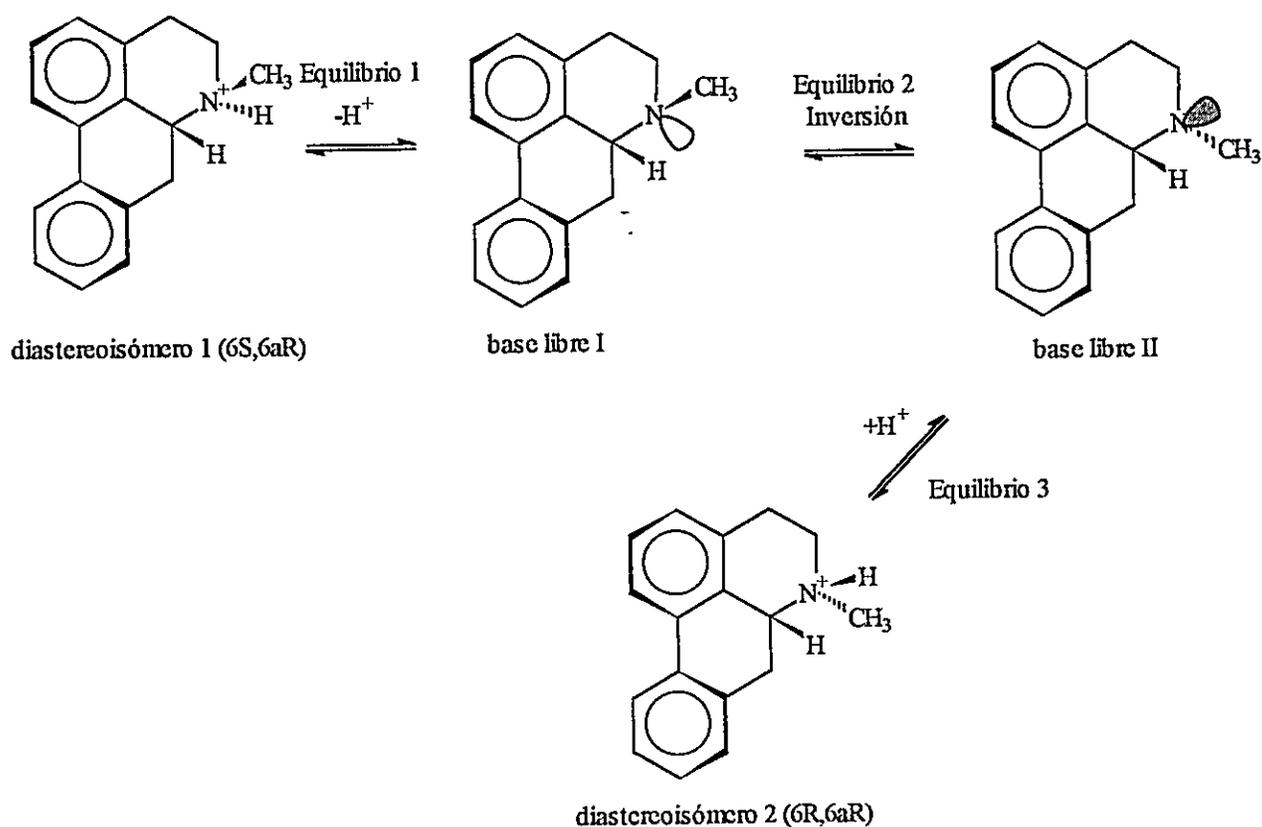


**Figura 2.3** Fenómeno de inversión del átomo de nitrógeno de aporfinas.

La (*R*)-apomorfina puede presentar dos diastereoisómeros con configuraciones (*6R*, *6aR*) y (*6S*, *6aR*), los cuales se encuentran, como se mencionó, en un equilibrio rápido a temperatura ambiente. Este fenómeno también ha sido observado en otros compuestos, como por ejemplo la cocaína y la morfina, que también incorporan un anillo de piperidina en sus estructuras [16,17]. La configuración de los átomos estereogénicos de los compuestos aporfinicos permanece sin variación en este proceso de inversión y los cambios estructurales se deben al cambio de la orientación axial/ecuatorial de los sustituyentes presentes en el anillo B, como también al cambio de la esteoquímica del átomo de nitrógeno.

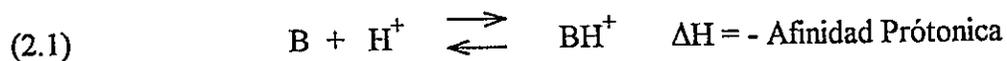
El mecanismo del proceso en solución acuosa se denomina intercambio protónico/inversión (Figura 2.4) [15]. La apomorfina protonada puede existir como

ambos diastereoisómeros. Cualquiera de ellos puede desprotonarse, es decir, perder un protón para generar la base libre correspondiente (primer equilibrio del esquema). Este equilibrio corresponde a un equilibrio ácido-base que está regido por la constante de acidez de la función amina, cuyo  $pK_a$  es 7,08 para la apomorfinina [18]. Este valor representa un promedio de los  $pK_a$  de ambos diastereoisómeros debido al rápido equilibrio en solución. La base libre formada es la aporfina neutra, que sufre el fenómeno de inversión del nitrógeno, al igual que moléculas pequeñas como el amoníaco. Esta etapa es gobernada por el segundo equilibrio. Una vez ocurrido este proceso de inversión se protona la forma neutra generando el otro diastereoisómero, lo que corresponde al tercer equilibrio en el esquema del mecanismo.



**Figura 2.4** Mecanismo de intercambio protónico/inversión para la formación de los diastereoisómeros aporfínicos.

El estudio de este fenómeno en fase gaseosa fue realizado para la (*R*)-apomorfinina. En el vacío, el primer y el tercer equilibrio del mecanismo corresponden a la afinidad protónica, cuya definición es mostrada en la ecuación 2.1:



La afinidad protónica no ha sido obtenida experimentalmente para sistemas tan complejos como los estudiados aquí. Sin embargo, para sistemas más pequeños como son el amoníaco, las metilaminas y la piperidina se han obtenido los valores experimentales (ver Tabla 2.2). Los resultados de la afinidad protónica calculada al nivel *ab initio* 3-21G muestran la misma tendencia de los valores experimentales, con una sobrestimación de un 10%. A pesar de la sobrestimación de los valores absolutos, los valores relativos de afinidad protónica ( $\Delta AP$ ) muestran la misma tendencia. Debido al tamaño de los sistemas en estudio no fue posible mejorar el sistema de cálculo empleado, aunque cálculos más complejos con bases tales como MP4/6-31G\*\*//6-31G\*\* bajan esta sobrestimación a un 2% [19].

**Tabla 2.2** Afinidades protónicas (kcal/mol) calculadas y experimentales.

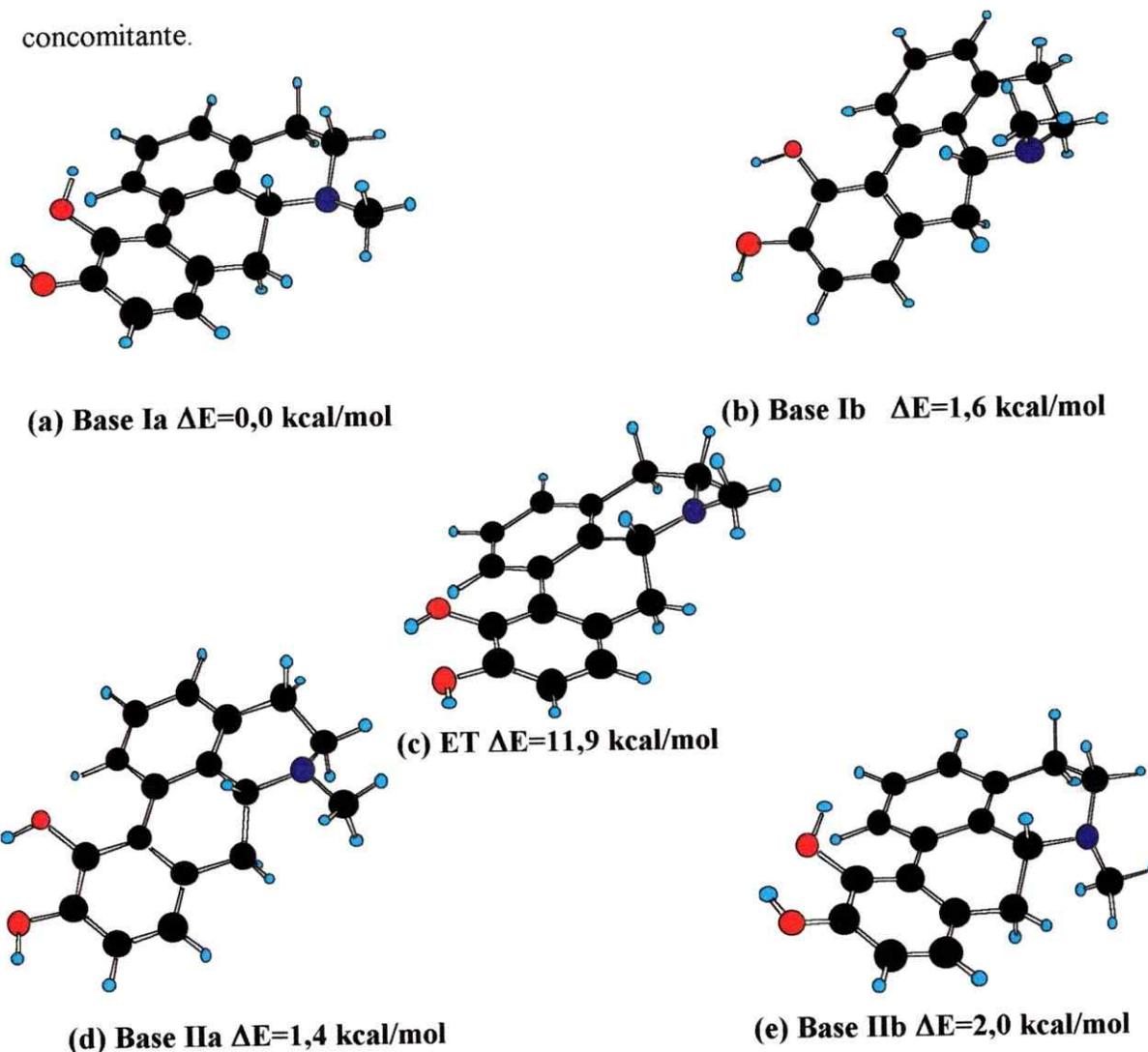
| Compuesto                          | 6-31G | $\Delta AP_{teo}$ | Experimental <sup>a</sup> | $\Delta AP_{exp}$ |
|------------------------------------|-------|-------------------|---------------------------|-------------------|
| NH <sub>3</sub>                    | 225   | 0,0               | 204                       | 0,0               |
| CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>    | 235   | 10,0              | 214,1                     | 10,1              |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH | 240   | 15                | 220,6                     | 16,6              |
| (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N  | 243   | 18,0              | 225,1                     | 21,1              |
| Piperidina                         | 245,6 | 20,6              | 226,4                     | 22,4              |
| Apomorfinina                       | 253,8 | 28,8              | --                        | --                |

a. Referencia [20].

El proceso de inversión del nitrógeno en la apomorfinina genera dos conformaciones preferenciales, donde el anillo B adopta formas de semisilla torcidas: base libre I y base libre II. En la figura 2.5 se muestran las estructuras optimizadas y las

energías relativas para la (*R*)-apomorfina. Las conformaciones más estables para cada base libre presentan una orientación del par electrónico pseudoaxial.

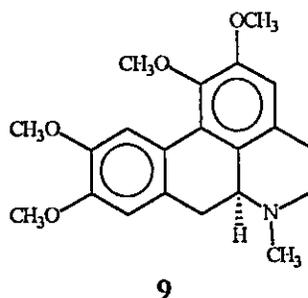
En conjunto con la inversión del grupo amino, se produce un cambio conformacional del anillo B, cambiando la orientación del par electrónico desde una posición pseudoaxial a una pseudoequatorial. Esta inversión del anillo produce los conformeros Ib y IIb, que son ligeramente menos estables. Ambos procesos, es decir, la inversión del nitrógeno y el cambio de conformación del anillo B, ocurren de forma concomitante.



**Figura 2.5** *Conformeros de la forma neutra de la apomorfina (base libre). Base libre I con el grupo N-metilo en (a) posición pseudoequatorial y (b) pseudoaxial. (c) El estado de transición. Base libre II: (d) metilo pseudoequatorial y (e) pseudoaxial. Energías relativas ( $\Delta E$ ) HF/6-31G.*

El proceso de inversión del nitrógeno genera un estado de transición plano en el anillo B, proceso que ocurre a través de un cambio de hibridación del nitrógeno, desde  $sp^3$  a  $sp^2$ . Como referencia, la barrera de inversión experimental del amoníaco es de 6 kcal/mol y para sistemas *N*-metilados es de 13,8 kcal/mol [21]. La utilización de bases más sofisticadas ó la inclusión de cálculos con configuración de interacción permiten obtener una barrera energética muy cercana a la experimental para el amoníaco. En este caso la utilización de dichas metodologías está fuera del alcance computacional debido al tamaño de las moléculas en estudio.

Kerr y col. [22], a través de espectroscopía de resonancia magnética nuclear, determinaron la existencia de dos confórmeros en la base libre de la glaucina (9), pero no analizaron sus poblaciones ni la barrera de inversión del proceso que se analiza para la apomorfina. Los confórmeros de glaucina muestran el proceso de inversión del nitrógeno, pero estos autores describen una forma semibote para uno de ellos, lo que no está de acuerdo con nuestras conclusiones.



Cada base libre de la apomorfina presenta por los menos dos conformaciones semisilla del anillo B. La conformación más estable para ambas bases corresponde a aquella donde el par electrónico tiene una orientación pseudoaxial (conformaciones Ia y IIa). Además de esta conformación, el anillo B se invierte generando una orientación pseudoecuatorial del par electrónico relativamente desfavorable. La base libre más estable es el confórmero Ia, debido a la menor repulsión estérica que presenta el grupo *N*-metilo en una orientación pseudoecuatorial con los hidrógenos de los carbonos 5 y 7. Para la base libre II estas repulsiones son mayores debido a la disminución de las distancias entre

los hidrógenos del grupo *N*-metilo y los hidrógenos unidos a los átomos de carbono 5 y 7.

Existen tres elementos estereogénicos en la estructura de aporfinas: la torsión del grupo bifenilo, el centro quiral y la conformación del anillo B, análogo a un ciclohexeno. La torsión presentada por el grupo bifenilo puede ser analizada a través de dos ángulos torsionales ( $\angle C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11)$  y  $\angle C(7a)-C(11a)-C(11b)-C(11c)$ ), o por el promedio de ambos. Para las cinco estructuras estudiadas estos ángulos permanecen casi constantes y muy similares a los mostrados en el cristal del clorhidrato de apomorfinina, donde dos moléculas distintas tienen valores de 22,8° y 24,7° [22,23]. La diferencia entre ambas moléculas se debe principalmente a la variación del ángulo C(7a)-C(7)-C(6a)-N. Estos resultados muestran que la inversión del nitrógeno que produce un cambio conformacional del anillo B no tiene una mayor repercusión en la torsión del grupo bifenilo.

El anillo B representa otro elemento estereogénico, cuya conformación queda definida por tres ángulos diedros, que son C(3a)-C(4)-C(5)-N, C(4)-C(5)-N-C(6a) y C(5)-N-C(6a)-C(11c). Los conformeros estudiados presentan conformaciones de semisillas torcidas, las cuales se denominarán P y M. El descriptor que define la designación es el valor del ángulo C(3a)-C(4)-C(5)-N: un valor negativo de este ángulo define una conformación P y un valor positivo una conformación M. Las bases libres Ia y Ib presentan una conformación M del anillo B, y las bases libres IIa y Ib presentan una conformación P en dicho anillo. Los resultados para estos tres ángulos diedros en la estructura del estado de transición muestran la casi coplanaridad de este anillo cuando el nitrógeno se invierte. Además, la inversión hace que los anillos A y B de la apomorfinina sean casi coplanares. Se debe resaltar que tanto la inversión del nitrógeno como el cambio conformacional del anillo B (inversión de la orientación de los sustituyentes) para la base libre I genera un cambio en el signo de este ángulo.

Los ángulos diedros H(6a)-C(6a)-N-C(C-N) y C(4)-C(5)-N-C(C-N) muestran el cambio en la posición del grupo *N*-metilo, e indirectamente dan cuenta del cambio en la posición del par electrónico del nitrógeno. En la base libre Ia se tiene siempre una

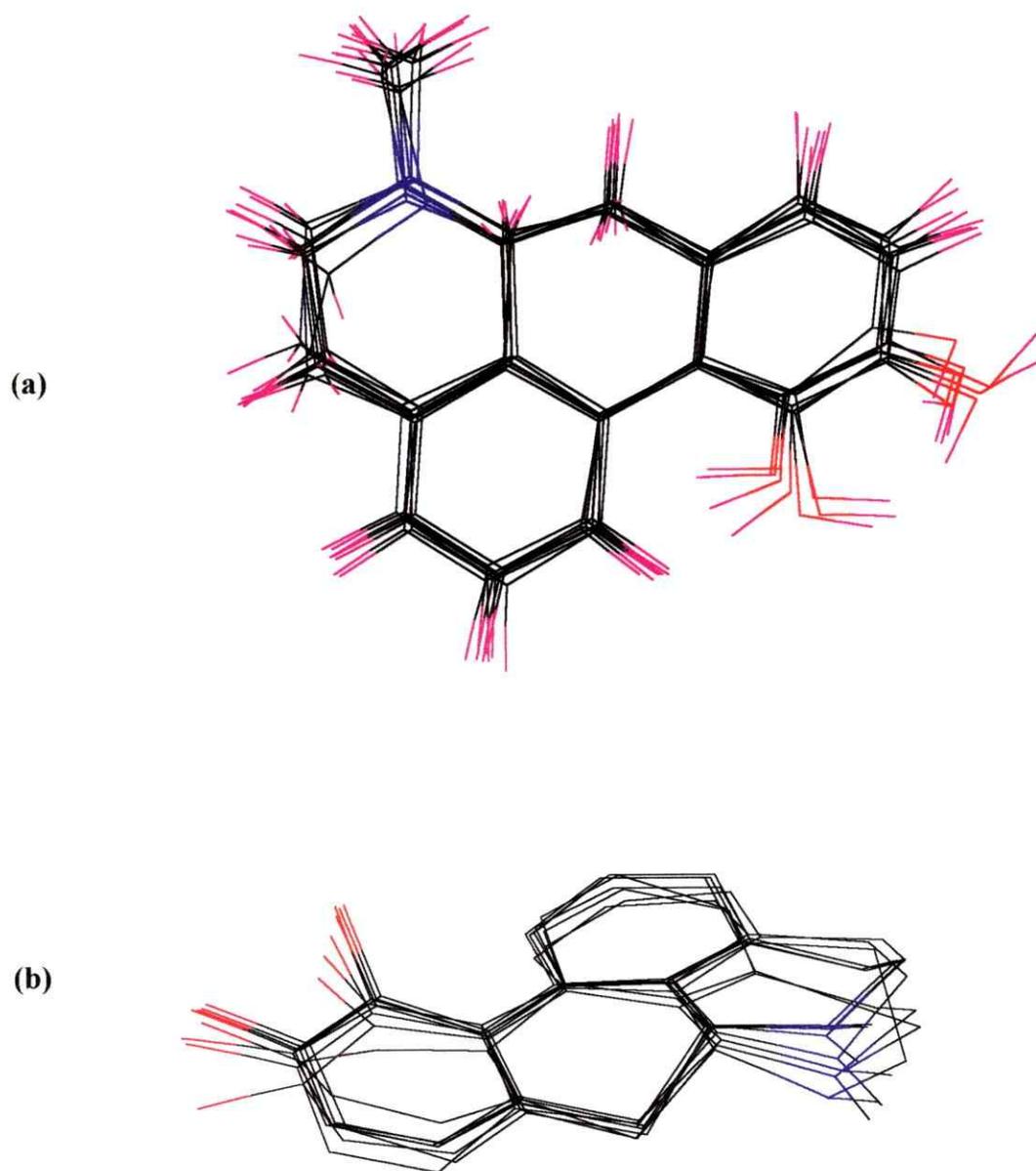
relación *cis* (entre el H-6a y el C del grupo N-metilo) en el conformero más estable, mientras que en la base libre II existe una relación *synclinal* entre el hidrógeno 6a y el par electrónico provocando una mayor repulsión.

Los ángulos de enlace centrados en el nitrógeno muestran el cambio de hibridación, desde  $sp^3$  a  $sp^2$  en el estado de transición, para volver a una configuración  $sp^3$ . Los valores para estos ángulos son sólo cercanos a los de un  $sp^3$  para la base libre I, para el estado de transición presentan valores correspondientes a una hibridación  $sp^2$ , mientras que en la base libre II los ángulos son muy cercanos a los que corresponden a esta última hibridación. Estos resultados sugieren que en la base libre II el átomo de nitrógeno posee mayor carácter p.

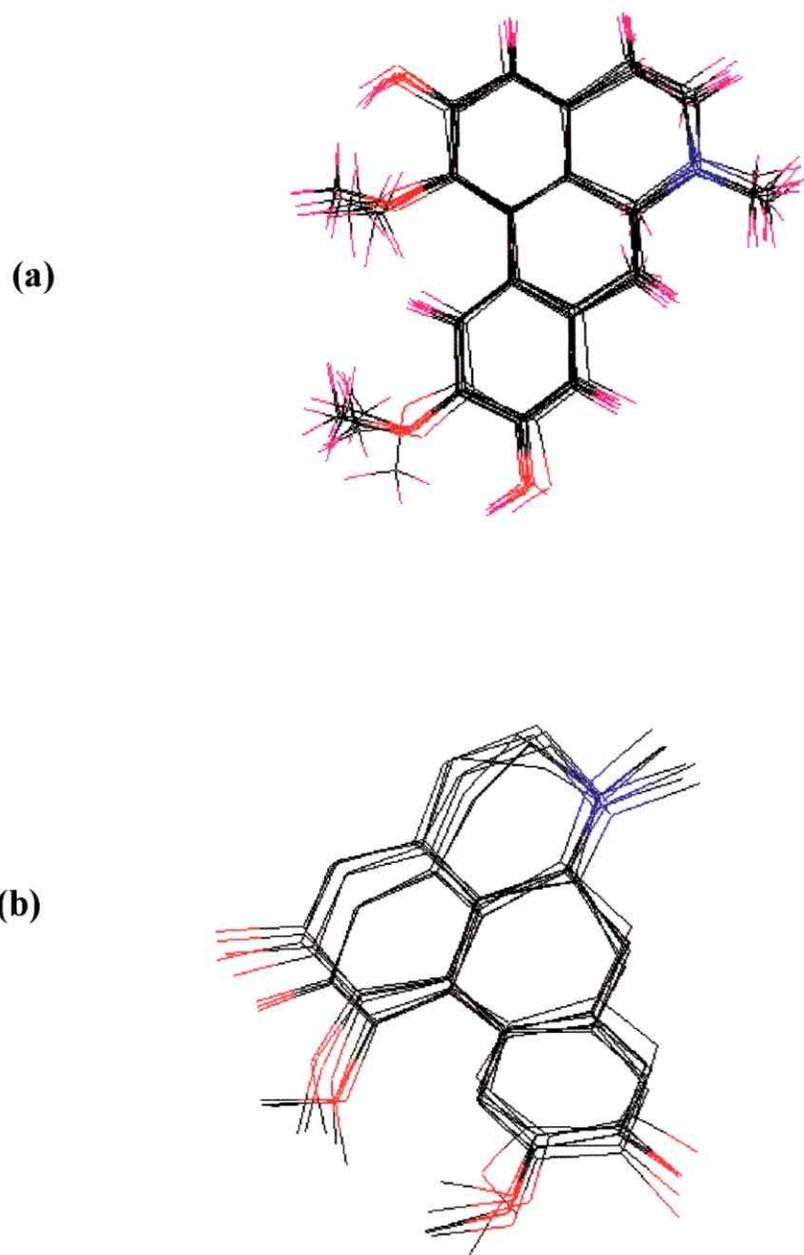
### 2.3.2 Estudio de simulaciones dinámicas para el proceso de inversión.

El estudio de la dinámica del proceso de inversión se realizó a través de simulaciones dinámicas en fase gaseosa. Los resultados de los cambios provocados en las fluctuaciones de la estructura para la (*R*)-apomorfina y la (*R*)-boldina son mostrados en las Figuras 2.6 y 2.7. Para la apomorfina se muestra la superposición a 25 °C y para la boldina a 42 °C.

El estudio de los cambios estructurales dinámicos es analizado a través de la fluctuación que muestran dos de los elementos estereogénicos del esqueleto aporfínico. El primero de ellos es la torsión presentada por el grupo bifenilo, que es representada por el ángulo torsional C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11); el segundo elemento es la conformación del anillo B, cuya inversión genera las estructuras semisillas torcidas, a través del ángulo torsional C(3a)-C(4)-C(5)-N. Como se ha discutido anteriormente, tanto el proceso de inversión del grupo amino como el cambio conformacional del anillo B para el mismo conformero se producen a valores similares de este ángulo, por lo cual, al analizar las fluctuaciones de este ángulo en el tiempo de la simulación se tendrán los dos procesos presentes.



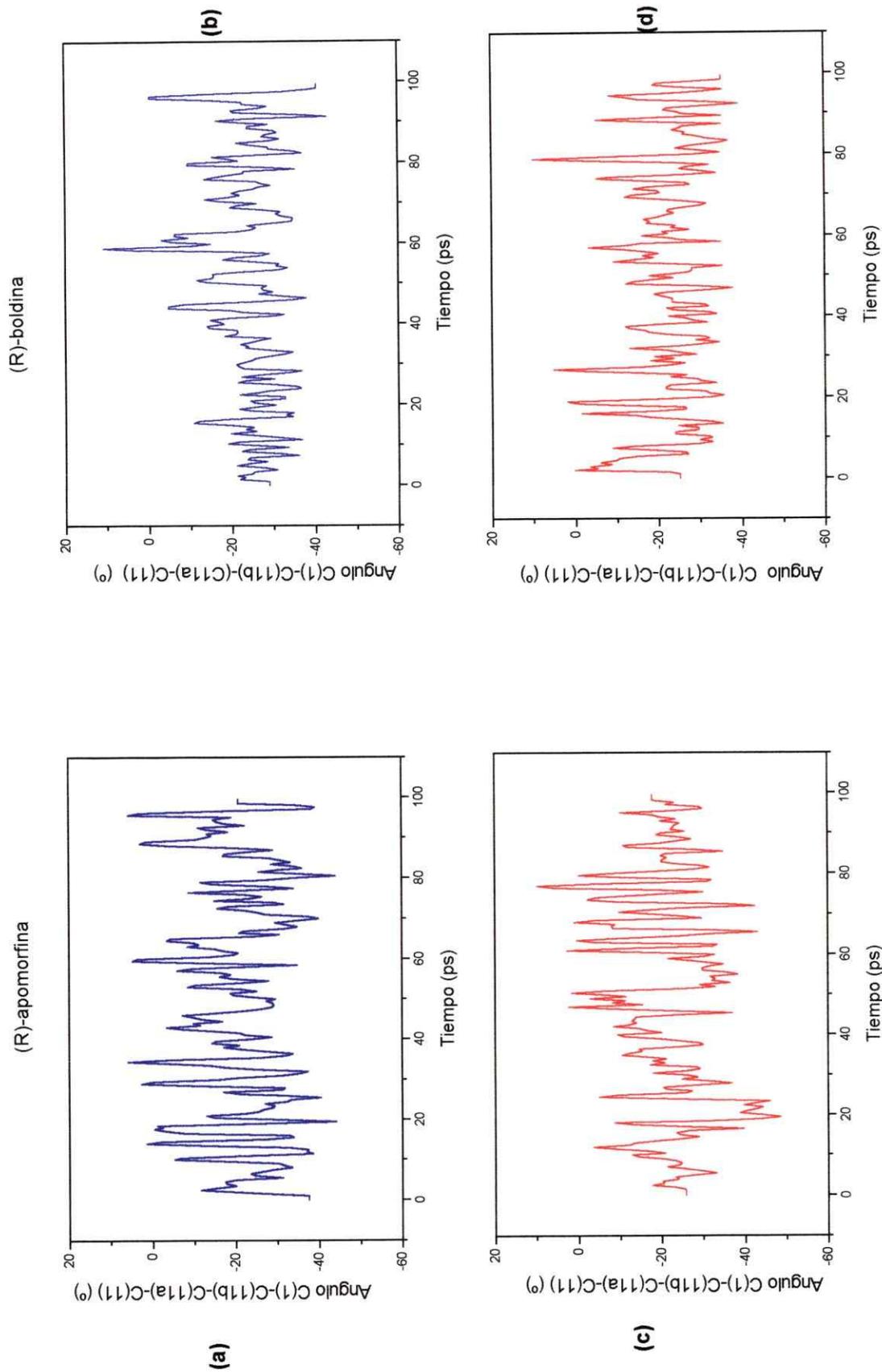
**Figura 2.6** Superposición de conformaciones para la (R)-apomorfina. Conformaciones obtenidas cada 10 ps durante el período de la simulación realizada a 298 K. Se utilizó como punto de superposición la posición de los átomos de carbono 11a y 11b. (a) vista con todos los átomos de hidrógeno de la molécula y (b) vista mostrando sólo los átomos pesados; se aprecian claramente los cambios conformacionales del anillo B.



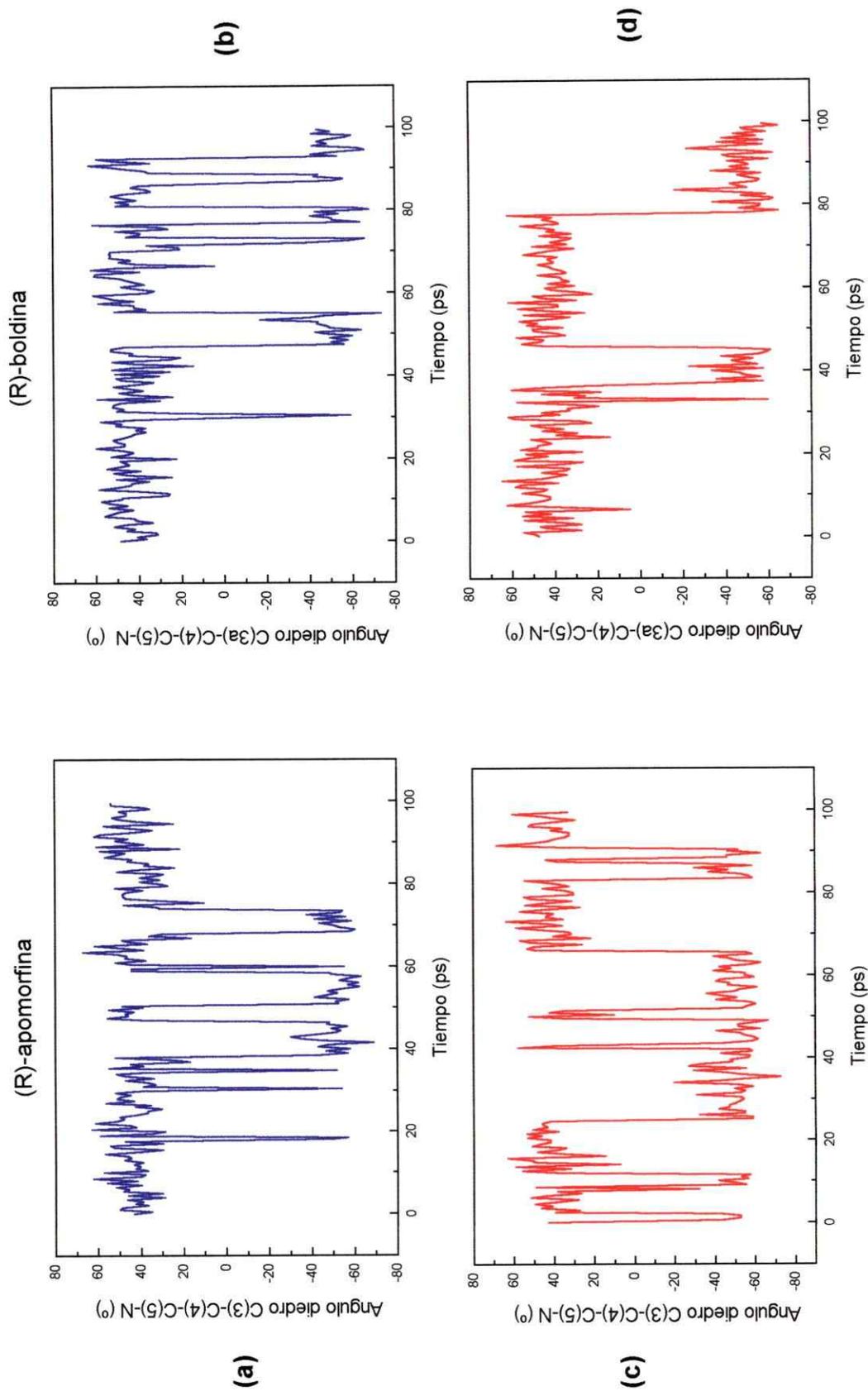
**Figura 2.7** Superposición de conformaciones para la (R)-boldina. Conformaciones obtenidas cada 10 ps durante el periodo de la simulación realizada a 320 K. Se utilizó como punto de superposición la posición de los átomos de carbono 11a y 11b. (a) vista con todos los átomos de hidrógeno de la molécula y (b) vista mostrando los átomos pesados; se aprecian claramente los cambios conformacionales del anillo B.

En la figura 2.8 se muestran los efectos de la temperatura en la torsión que presenta el grupo bifenilo en la apomorfina y la boldina. Los promedios obtenidos para el ángulo C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) fueron de  $-20,8^\circ$  ( $25^\circ\text{C}$ ) y  $-21,7^\circ$  ( $42^\circ\text{C}$ ) para la apomorfina y de  $-24,9^\circ$  ( $25^\circ\text{C}$ ) y  $-19,8^\circ$  ( $42^\circ\text{C}$ ) para la boldina. Los resultados de las simulaciones muestran que, a baja temperatura, el efecto principal observado es una compresión estérica entre los grupos unidos a los carbonos 1 y 11 en la apomorfina. Al aumentar la temperatura se aumenta la energía cinética del sistema, por lo cual este impedimento estérico se ve disminuido y el grupo bifenilo presenta una mayor libertad conformacional. Para la (*R*)-boldina existe una mayor influencia del efecto estérico en la conformación debido a la presencia de un grupo metoxilo (más voluminoso) en la posición 1. A bajas temperaturas la torsión del grupo bifenilo es mayor debido a un fuerte efecto estérico. A mayor temperatura este efecto se compensa con una mayor energía cinética del sistema lo que implica una mayor posibilidad de que el sistema bifenílico disminuya su torsión, por lo cual el promedio disminuye.

Los resultados de las simulaciones de dinámica molecular de la apomorfina y la boldina muestran la inversión del nitrógeno en el anillo B, en conjunto con el cambio conformacional del anillo B (ver Figura 2.9). Las fluctuaciones del ángulo torsional C(3a)-C(4)-C(5)-N muestran que a valores positivos (aproximadamente de  $60^\circ$ ) se tendrán las conformaciones de semisilla torcida M, que representan los conformeros Ia y IIb, mientras que a valores negativos ( $-60^\circ$ ) existirán las conformaciones semisilla P, que están presentes en los conformeros de la base libre IIa y Ib. Las simulaciones de dinámica molecular para la apomorfina y la boldina muestran que coexisten ambos procesos. Un exhaustivo análisis de las conformaciones cada 5 ps mostró que ocurre con una mayor frecuencia el cambio conformacional del anillo B, pero que el fenómeno de inversión del grupo amino también está presente. Se aprecia que pueden existir ambas conformaciones del anillo B, con un lapso de 75 ps en la forma M del anillo y un lapso de 25 ps en la forma P. La relación del tiempo de permanencia de la molécula en cada una de estas conformaciones del anillo B es de 3:1, pero se vuelve 1:1 al aumentar la temperatura a  $42^\circ\text{C}$ .



**Figura 2.8** Perfiles del ángulo diedro C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) en función del tiempo (ps) de las simulaciones dinámicas, para la (R)-APO (a y c) y la (R)-boldina (b y d) obtenidas a dos temperaturas: a 298 K (a y b) y a 320 K (c y d).



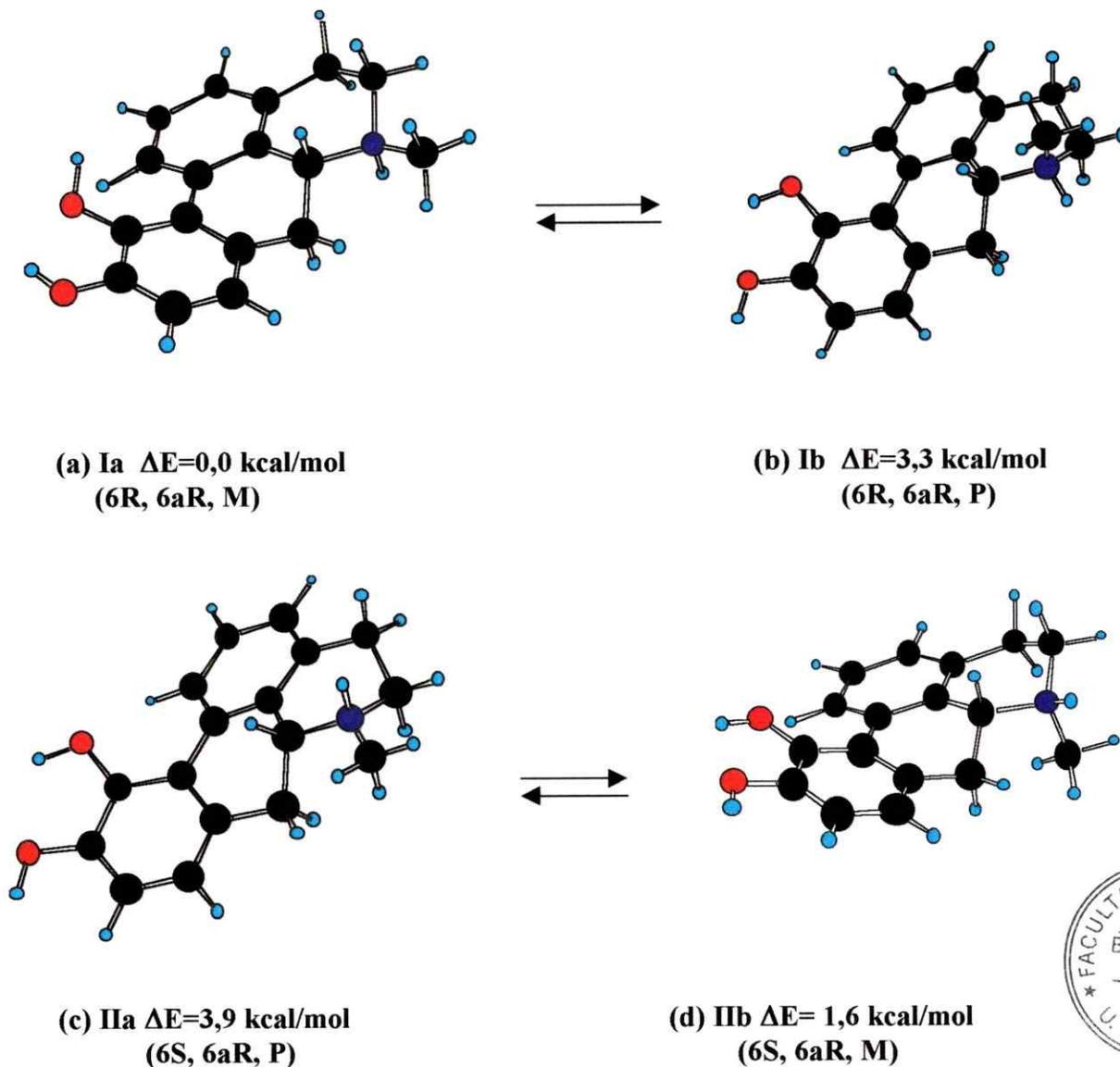
**Figura 2.9** Perfiles del ángulo diedro C(3a)-C(4)-C(5)-C(N) para la (R)-APO (a y c) y la (R)-boldina (b y d). Obtenidos durante las simulaciones dinámicas a dos temperaturas: (a) y (b) a 298 K, y (c) y (d) a 320 K.

El análisis del ángulo diedro C(3a)-C(4)-C(5)-N para la boldina muestra resultados similares, con una relación de 3:1 entre ambas conformaciones del anillo a 25 °C y de 2:1 a 42 °C. En tiempo, se tiene una permanencia de 76 ps en la conformación M del anillo B y de 24 ps en la P a 25 °C, valores que pasan a 68,5 ps y 31,5 respectivamente a mayor temperatura. Estudios de RMN para la glaucina muestran que el confórmero predominante en solución apolar presenta al anillo B como semisilla torcida, con el *N*-metilo en una orientación pseudoecuatorial [21]. En el trabajo citado no se discuten poblaciones relativas de ambos confórmeros, pero sus resultados muestran la misma tendencia que los cálculos teóricos realizados para el proceso de inversión, con una conformación semisilla torcida como la más estable en el anillo B.

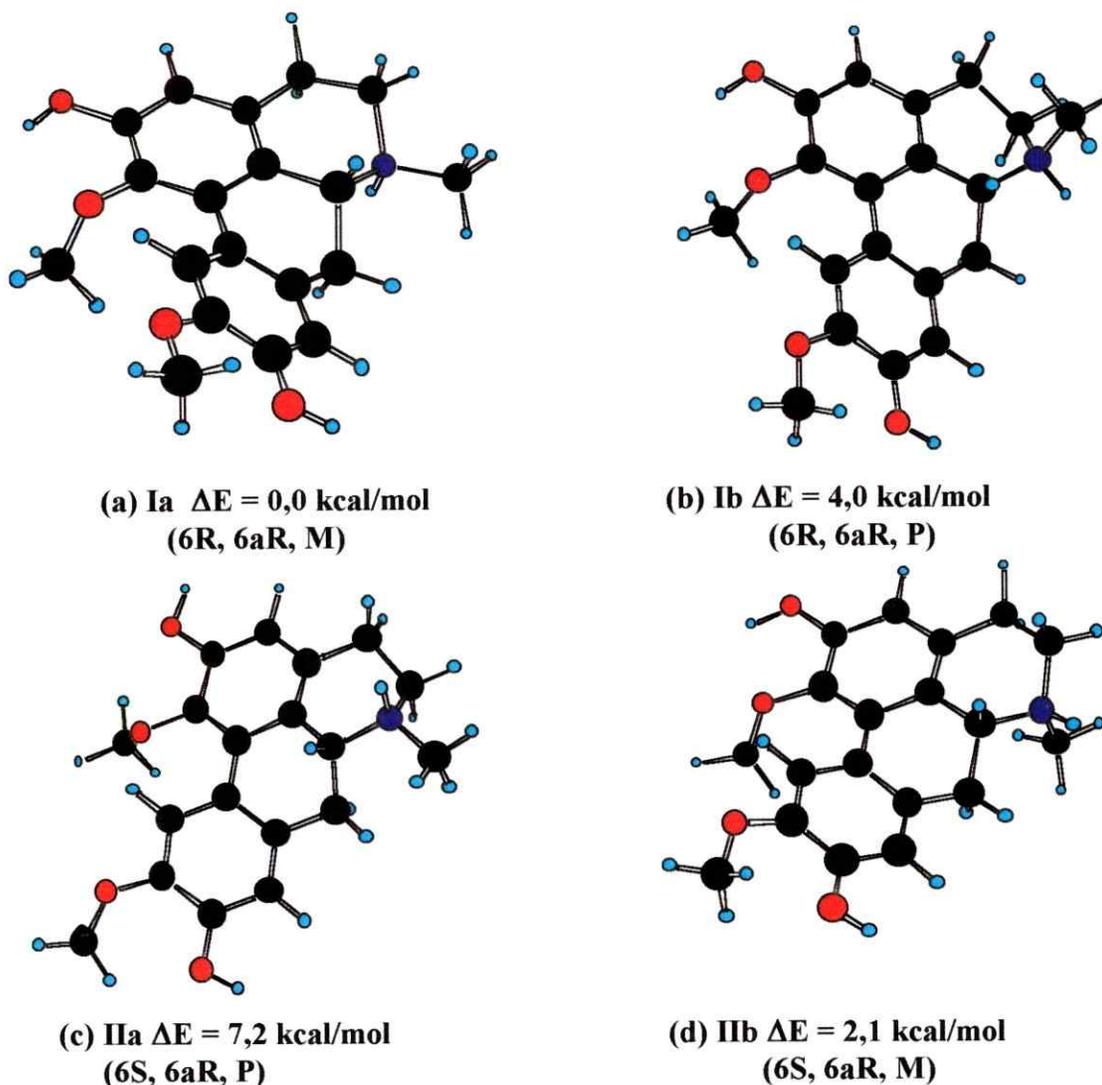
### 2.3.3 Estudio conformacional de los diastereoisómeros de aporfinas. *(R)*-apomorfina y *(R)*-boldina.

El proceso de inversión de la base libre puede generar dos diastereoisómeros, con configuraciones en los centros quirales (6*R*, 6*aR*) y (6*S*, 6*aR*). Se estudiaron las estabildades relativas de los diastereoisómeros de la *(R)*-apomorfina y la *(R)*-boldina, a través de cálculos *ab initio* y semiempíricos. Las estructuras estudiadas de los diastereoisómeros y sus energías relativas se muestran en las figuras 2.10 y 2.11 para la apomorfina y la boldina, respectivamente. Se denomina diastereoisómero I al que presenta una configuración (6*R*, 6*aR*) y diastereoisómero II al que tiene (6*S*, 6*aR*). El diastereoisómero I proviene de la protonación de la base libre I (con un N quiral R) en una conformación semisilla, mientras que el diastereoisómero II proviene de la base libre II, con un nitrógeno S. Para ambas moléculas estudiadas, aunque a un nivel diferente de teoría, se observa la misma tendencia en estabilidad relativa, siendo la más estable en ambos diastereoisómeros una conformación semisilla torcida con el grupo *N*-metilo en una posición pseudoecuatorial (ver Figuras 2.10a y 2.11a). Para el diastereoisómero I la forma más estable es una conformación semisilla con el grupo *N*-metilo en una orientación pseudoecuatorial (confórmero Ia), mientras que para el diastereoisómero II el

conformero IIb es el más estable, que presenta el grupo *N*-metilo en una orientación pseudoecuatorial



**Figura 2.10** Diastereoisómeros de apomorfin. Conformaciones con el grupo *N*-metilo en una orientación pseudoecuatorial para cada diastereoisómero (a) Ia y (c) IIa. Conformaciones con el grupo *N*-metilo en una orientación pseudoaxial para cada diastereoisómero (b) Ib y (d) IIb. Energías relativas ( $\Delta E$ ) HF/6-31G en kcal/mol. Para cada diastereoisómero se muestra la configuración del nitrógeno, del carbono y la conformación del anillo B.



**Figura 2.11** Estructuras optimizadas para los diastereoisómeros de (*R*)-boldina. Conformación semisilla con el grupo *N*-metilo con una orientación pseudoecuatorial (a) Ia y (c) IIa. Conformaciones para los diastereoisómeros con una orientación del grupo *N*-metilo pseudoaxial (b) Ib y (d) IIb. Energías relativas HF/6-31G en kcal/mol. Se informa la configuración de los átomos estereogénicos 6 y 6a, y la conformación del anillo B.

Sin embargo, la conformación del anillo B es la misma en ambos diastereoisómeros. La conformación M, como fue discutido anteriormente, es representada por los signos de los ángulos diedros C(3a)-C(4)-C(5)-N; C(4)-C(5)-N-C(6a) y C(5)-N-C(6a)-C(11c). El conformero más inestable estudiado para ambas

moléculas fue el diastereoisómero que correspondería a la protonación de la base libre IIa, que para la forma neutra es el conformero más estable de esa base. La inestabilidad de este conformero es causada principalmente por la orientación *synclinal* de los átomos de hidrógeno 6 y 6a, unida a la compresión estérica entre los átomos de hidrógeno del grupo *N*-metilo y los átomos de hidrógeno unidos a C(5) y C(7).

Estudios de 2D-RMN para los diastereoisómeros de la (*S*)-glaucina muestran dos especies en solución en una relación de 3:1 [15]. Las dos especies corresponderían a una misma forma semisilla torcida del anillo B. La especie mayoritaria tendría el grupo *N*-metilo en una posición pseudoecuatorial, con una relación 1,2-diaxial entre los H-6 y H-6a, que correspondería en este estudio al conformero Ia. La especie menos abundante correspondería a una conformación del otro diastereoisómero de la glaucina con una orientación pseudoaxial del grupo *N*-metilo [15].

La estructura cristalográfica de la apomorfina presenta una orientación del grupo *N*-metilo pseudoecuatorial, con una relación 1,2 diaxial entre los H-6 y H-6a [22]. Resulta más complejo determinar la conformación del anillo B, debido a la presencia de dos conformaciones diferentes en la estructura cristalográfica. La estructura cristalográfica del clorhidrato de (*S*)-boldina muestra también una orientación pseudoecuatorial del grupo *N*-metilo, con una relación 1,2-diaxial al igual que la apomorfina. La conformación cristalográfica de la (*S*)-boldina es una imagen especular del conformero Ia [24].

En las tablas 2.3 y 2.4 se muestran algunos parámetros geométricos para los diastereoisómeros de apomorfina y boldina, respectivamente.

**Tabla 2.3** Selección de parámetros geométricos obtenidos de la optimización total *ab initio* 6-31G para los diastereoisómeros de la forma protonada de la apomorfina. La numeración de los átomos está consignadas en la figura 2.2.

| Ángulos diedros                   | Ia     | Ib     | IIa     | IIb    |
|-----------------------------------|--------|--------|---------|--------|
| $\angle$ C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) | -25,0° | -24,9° | -25,4°  | -23,3° |
| $\angle$ C(3a)-C(4)-C(5)-N        | 51,5°  | -57,0° | -58,0°  | 46,3°  |
| $\angle$ C(4)-C(5)-N-C(6a)        | -68,3° | 60,8°  | 66,1°   | -68,3° |
| $\angle$ C(5)-N-C(6a)-C(11c)      | 48,1°  | -30,0° | -36,7°  | 52,9°  |
| $\angle$ C(3a)-C(11c)-C(6a)-H(6a) | 101,9° | 113,9° | 116,1°  | 96,6°  |
| $\angle$ C(4)-C(5)-N-C(C-N)       | 167,3° | 177,9° | -48,2°  | 58,7°  |
| $\angle$ C(4)-C(5)-N-H(N)         | 48,6°  | -64,8° | -164,6° | 176,5° |
| $\angle$ H(6a)-C(6a)-N-C(Met)     | 51,0°  | -23,3° | -40,3°  | 168,1° |
| $\angle$ H(6a)-C(6a)-N-H(N)       | 170,6° | 93,0°  | 76,3°   | 49,5°  |

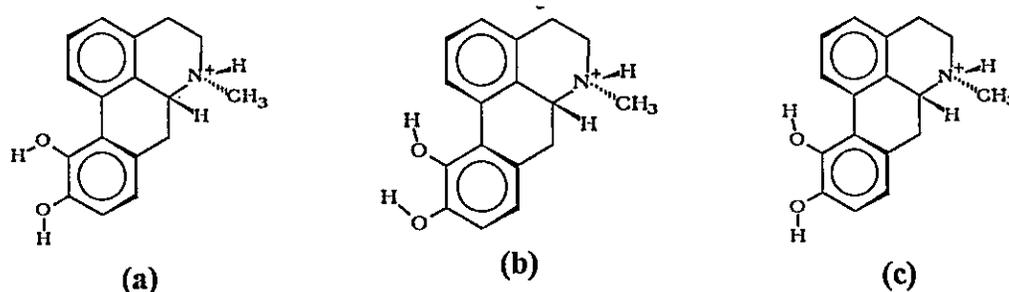
**Tabla 2.4** Selección de ángulos diedros obtenidos de la optimización total HF/6-31G para los diastereoisómeros de la (*R*)-boldina. La numeración de los átomos está consignada en la figura 2.2.

| Ángulos diedros                   | Ia    | Ib    | IIa    | IIb    |
|-----------------------------------|-------|-------|--------|--------|
| $\angle$ C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) | -26,1 | -24,4 | -27,5  | -25,3  |
| $\angle$ C(3a)-C(4)-C(5)-N        | 46,5  | -54,3 | -53,7  | 43,7   |
| $\angle$ C(4)-C(5)-N-C(6a)        | -63,8 | 56,2  | 62,0   | -62,6  |
| $\angle$ C(5)-N-C(6a)-C(11c)      | 47,4  | -25,3 | -34,7  | 49,0   |
| $\angle$ C(3a)-C(11c)-C(6a)-H(6a) | 99,6  | 111,5 | 116,5  | 96,2   |
| $\angle$ C(4)-C(5)-N-C(C-N)       | 172,6 | -68,7 | -170,5 | 62,6   |
| $\angle$ C(4)-C(5)-N-H(N)         | 53,5  | 173,8 | -53,0  | -178,8 |
| $\angle$ H(6a)-C(6a)-N-C(C-N)     | 51,8  | -18,7 | 113,1  | 167,4  |
| $\angle$ H(6a)-C(6a)-N-H(N)       | 171,4 | 98,7  | -36,2  | 48,6   |
| $\angle$ H-O-C(2)-C(1)            | 6,7   | 8,2   | 178,4  | 5,7    |
| $\angle$ C-O-C(1)-C(11b)          | -89,2 | -91,7 | -122,2 | -83,8  |
| $\angle$ H-O-C(9)-C(8)            | -3,6  | -5,0  | -60,0  | -9,2   |
| $\angle$ C-O-C(10)-C(9)           | 0,3   | -3,8  | -0,95  | -1,3   |

El fragmento bifenilo no es un elemento estereogénico independiente, ya que debido a la fusión de los anillos B y C su configuración depende de la quiralidad del carbono tetraédrico 6a. Los valores calculados para el ángulo C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) son similares a los que muestran las estructuras cristalográficas de los clorhidratos de apomorfina y boldina, respectivamente.

La conformación del anillo B queda descrita por los signos de los ángulos C(3a)-C(4)-C(5)-N; C(4)-C(5)-N-C(6a) y C(5)-N-C(6a)-C(11c). La conformación M como fue discutido anteriormente, es representada por los signos (+,-,+), mientras que la conformación P presenta los signos (-,+,-).

La relación vecinal de los átomos H-6 y H-6a es descrita por el ángulo H(6a)-C(6a)-N-H(N), y la relación entre el grupo *N*-metilo y el hidrógeno del átomo de carbono 6a por el ángulo H(6a)-C(6a)-N-C(C-N). Para el conformero más estable se tiene una relación *trans diaxial* entre ambos hidrógenos, mientras que para el diastereoisómero II en su forma más estable se tiene una relación *cis*.

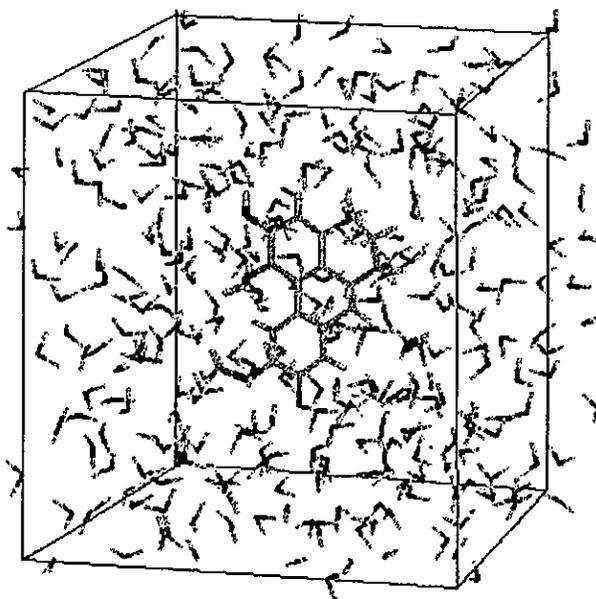


**Figura 2.12** Conformaciones del anillo catecol en la apomorfina. (a) rotámero *syn-syn*, (b) rotámero *anti-anti* y (c) rotámero *syn-anti*.

Otro grupo estereogénico de la molécula de apomorfina es la posición de los sustituyentes en los carbonos 10 y 11. Para este compuesto es necesario analizar la conformación de los grupos hidroxilos. Estos grupos pueden tener las siguientes orientaciones *syn-syn*, *anti-anti* y *syn-anti* (ver Figura 2.12). Los resultados muestran una tendencia de estos grupos a permanecer en el mismo plano del anillo aromático, en una relación *syn-syn* ( $0^\circ$ ) o *anti-anti* ( $180^\circ$ ), siendo ambas conformaciones isoenergéticas en

ambos diastereoisómeros estudiados. El rotámero *syn-anti* solo muestra una pequeña inestabilidad relativa de 3,3 kcal/mol.

Las simulaciones dinámicas de cada compuesto fueron realizadas para cada uno de los diastereoisómeros en fase gaseosa y en solvente. Para simular el efecto del solvente se empleó una caja cúbica de 22 Å de lado, que se muestra en la figura 2.13 para la boldina. Esta caja contiene la molécula en estudio y 327 moléculas de agua. Para la apomorfina la caja correspondiente contiene 328 moléculas de agua.



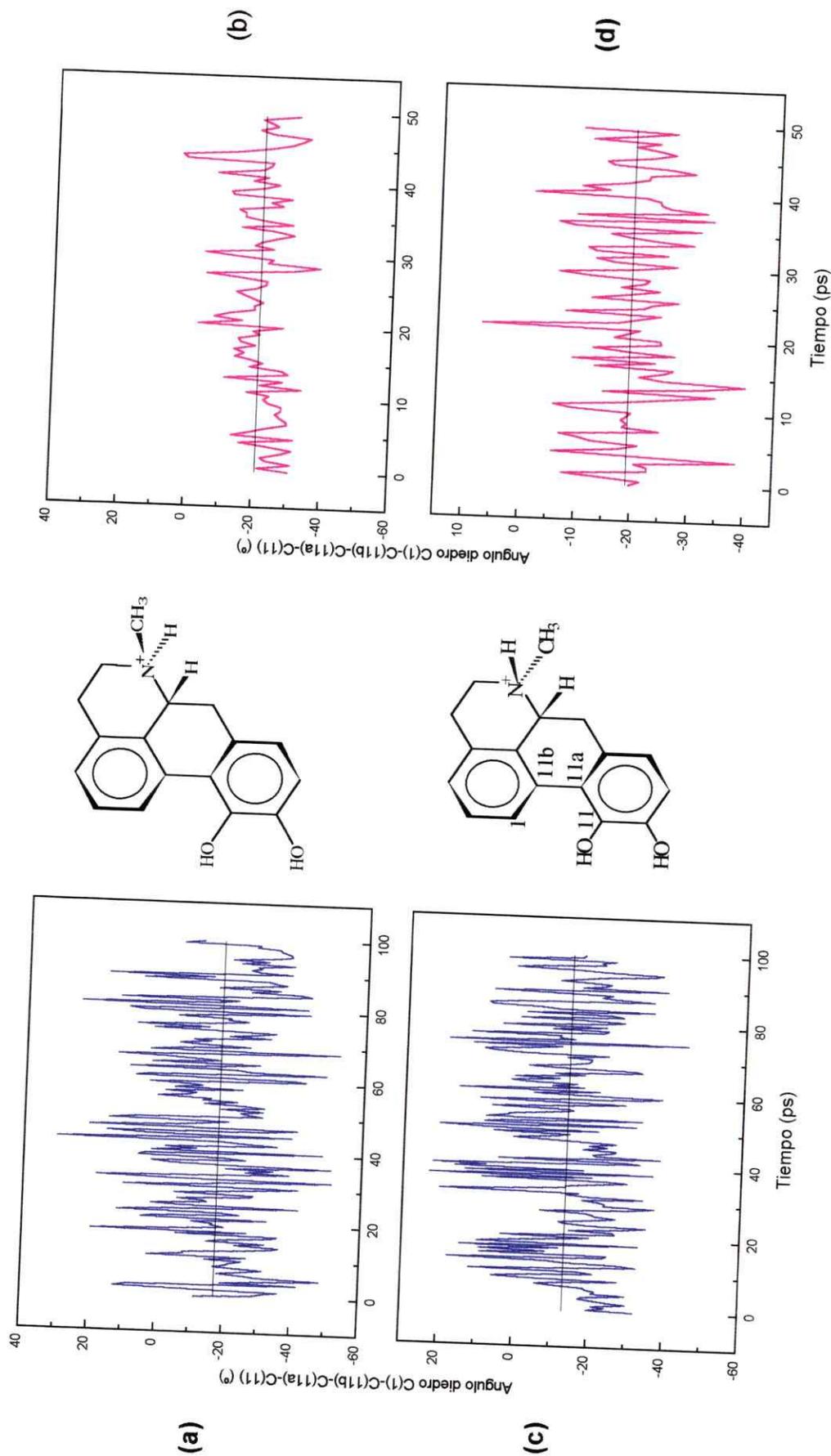
**Figura 2.13** Boldina en la caja de solvente, con 327 moléculas de agua.

Los resultados de los análisis conformacionales para los diastereoisómeros de la (*R*)-apomorfina y la (*R*)-boldina se muestran desde la figura 2.14 a la 2.20.

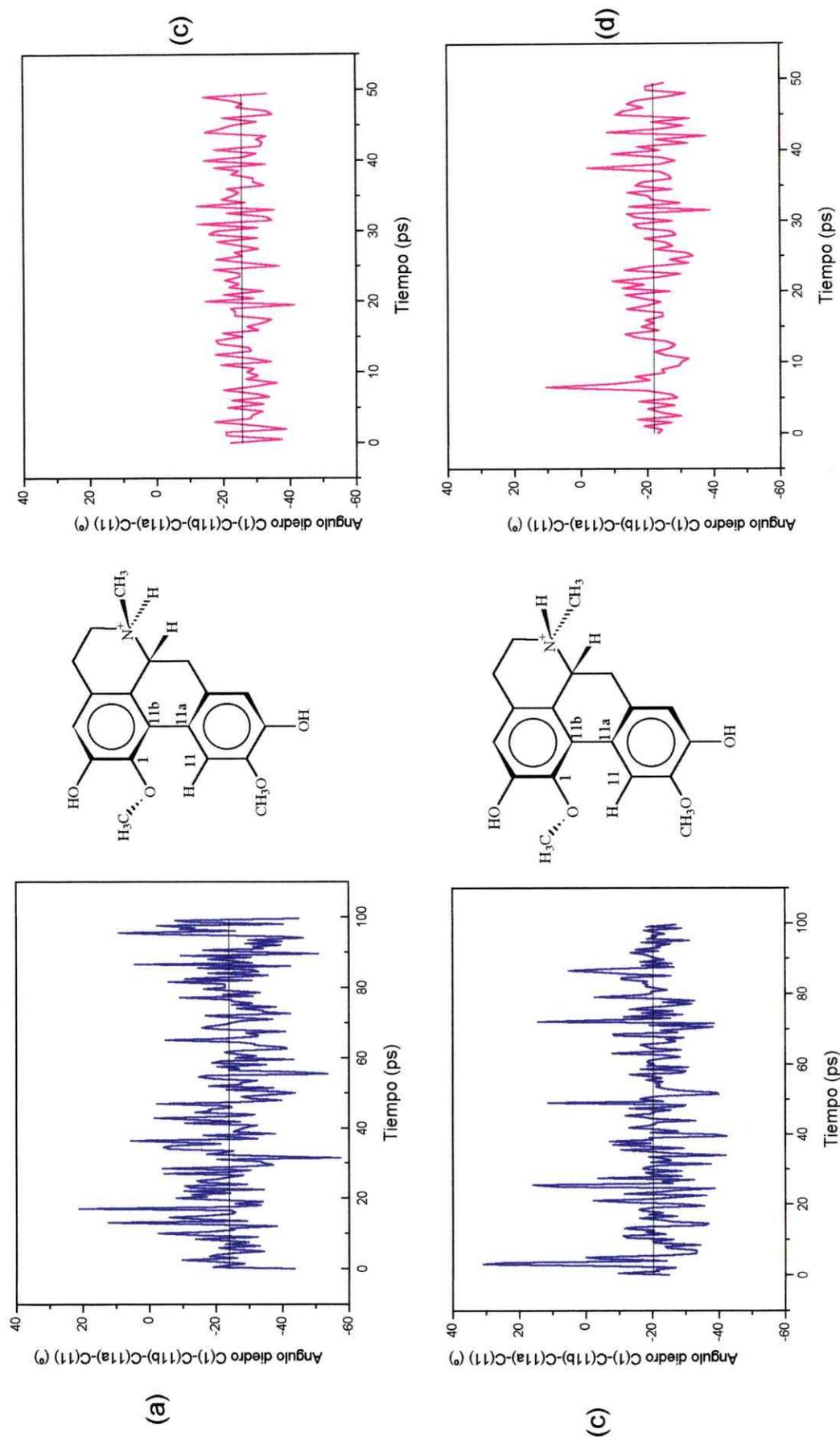
Al igual que para las bases libres se analizó el ángulo diedro C(1a)-C(11b)-C(11c)-C(11a) que define la torsión en el grupo bifenilo. Los resultados se muestran en las figuras 2.14 y 2.15. La fluctuación de este ángulo para el diastereoisómero I de la (*R*)-apomorfina va desde  $-50$  a  $+30$  grados con un promedio de  $-17,3^\circ$  en fase gaseosa. En medio acuoso da un promedio de  $-20,9^\circ$ , con una menor fluctuación en este medio entre  $-40^\circ$  a  $0^\circ$ . Para el diastereoisómero II se tiene una situación similar con un promedio

menor, de  $-13,3^\circ$ , con fluctuaciones desde  $-40^\circ$  a  $20^\circ$ ; en medio acuoso las fluctuaciones disminuyen su amplitud pero el promedio aumenta a  $-19,1^\circ$ . La (*R*)-boldina presenta una variación similar en este ángulo diedro, mostrando la misma tendencia de aumento del promedio del ángulo diedro al pasar desde medio gaseoso a medio acuoso. Para el diastereoisómero I se tiene promedios de  $-24,1^\circ$  y  $-25,6^\circ$ , para la fase gaseosa y acuosa, respectivamente. Para el diastereoisómero II los valores son de  $-20,3^\circ$  y  $-21,9^\circ$ , en fase gaseosa y acuosa respectivamente.

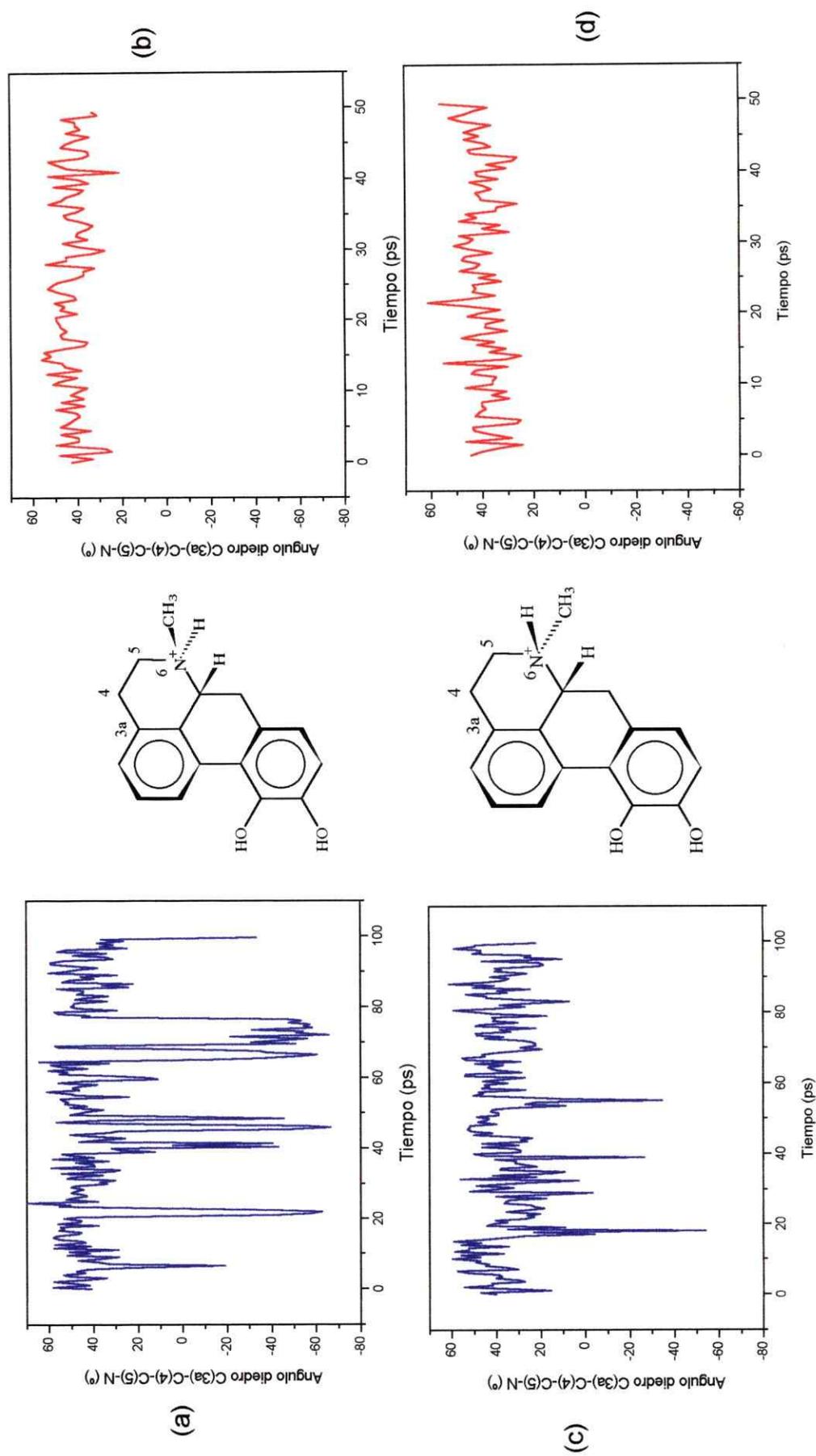
En las figuras 2.16 y 2.17 se presentan los resultados para la variación del ángulo torsional C(3a)-C(4)-C(5)-N, que muestra la flexibilidad del anillo B. En este caso, por estar los compuestos protonados, no existe el fenómeno de inversión del grupo amino, sino sólo el proceso de inversión del anillo B cambiando la orientación pseudoaxial del *N*-metilo a pseudoecuatorial y viceversa, por lo cual para la forma *N*-protonada de las aporfinas estudiadas este ángulo representa directamente la población de cada conformero en función del tiempo. El valor de este ángulo determina la presencia de las conformaciones Ia y Ib ó IIa y IIb para cada diastereoisómero en cuestión. Los resultados obtenidos están de acuerdo con las estabildades conformacionales obtenidas a través de cálculos químico-cuánticos. Para la apomorfina, en ambos diastereoisómeros la conformación más estable presenta valores positivos de este ángulo, que representa la conformación M del anillo B, correspondiente a las conformaciones Ia y IIb. Para la (*R*)-apomorfina sólo el diastereoisómero I presenta ambas conformaciones en fase gaseosa, con una relación 5:1, mientras que en medio acuoso sólo estaría presente la forma más estable de cada diastereoisómero. La (*R*)-boldina muestra la misma tendencia que la apomorfina, con un aumento en la relación de 7:1 entre ambos conformeros del diastereoisómero I. En solución sólo se observa para ambos casos la presencia de las conformaciones más estables de cada diastereoisómero. Los resultados de simulaciones dinámicas están de acuerdo con los datos experimentales de RMN para la glaucina, que corresponden a los conformeros Ia y IIb [15].



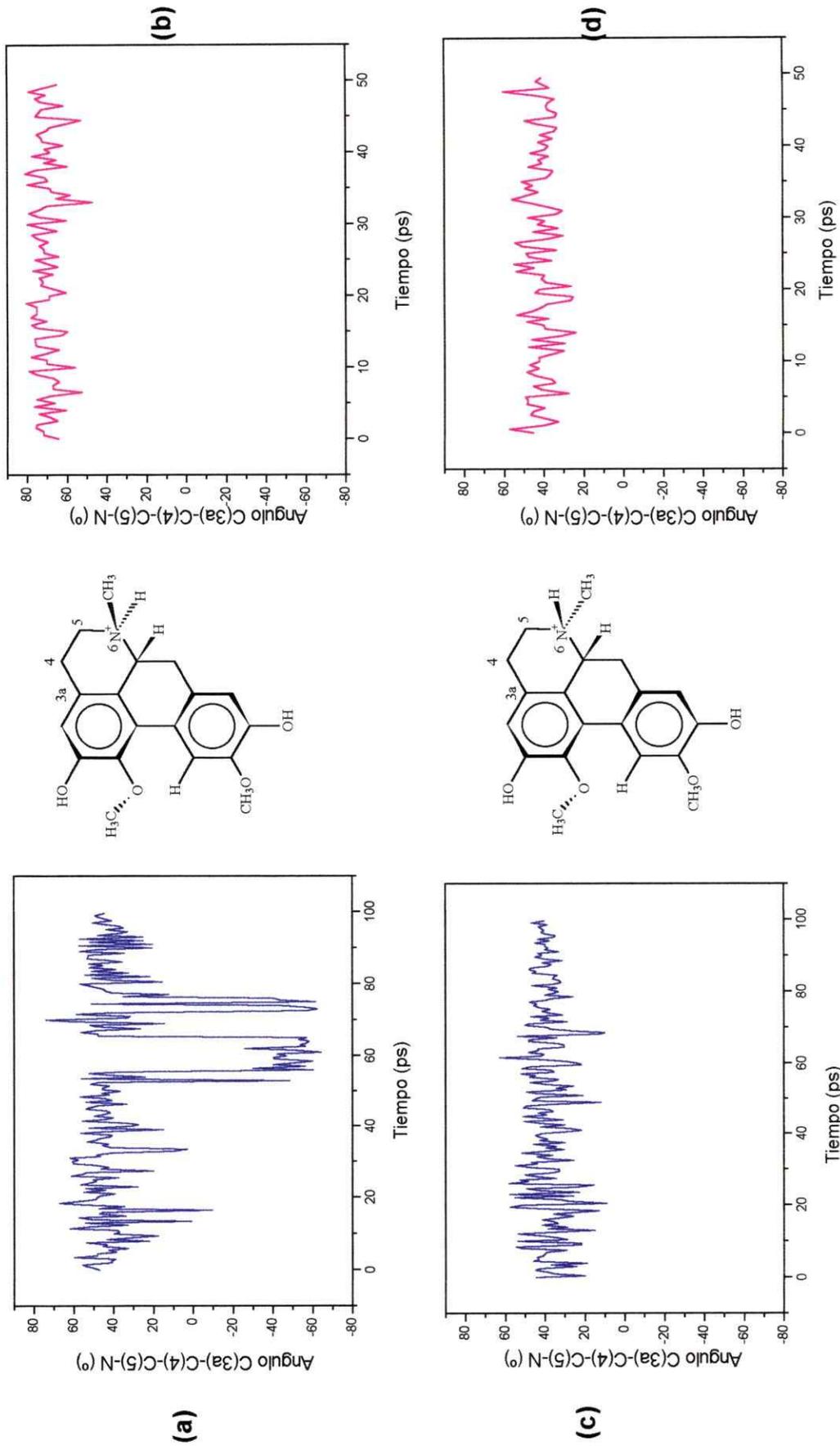
**Figura 2.14** Perfiles del ángulo diedro C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) en función del tiempo (ps) de la simulación para la (R)-apomorfina. Diastereoisómero I (a) en fase gaseosa y (b) en solvente. Diastereoisómero II (c) en fase gaseosa y (d) en fase acuosa. La línea de color negro indica el promedio para este ángulo a lo largo de toda la simulación.



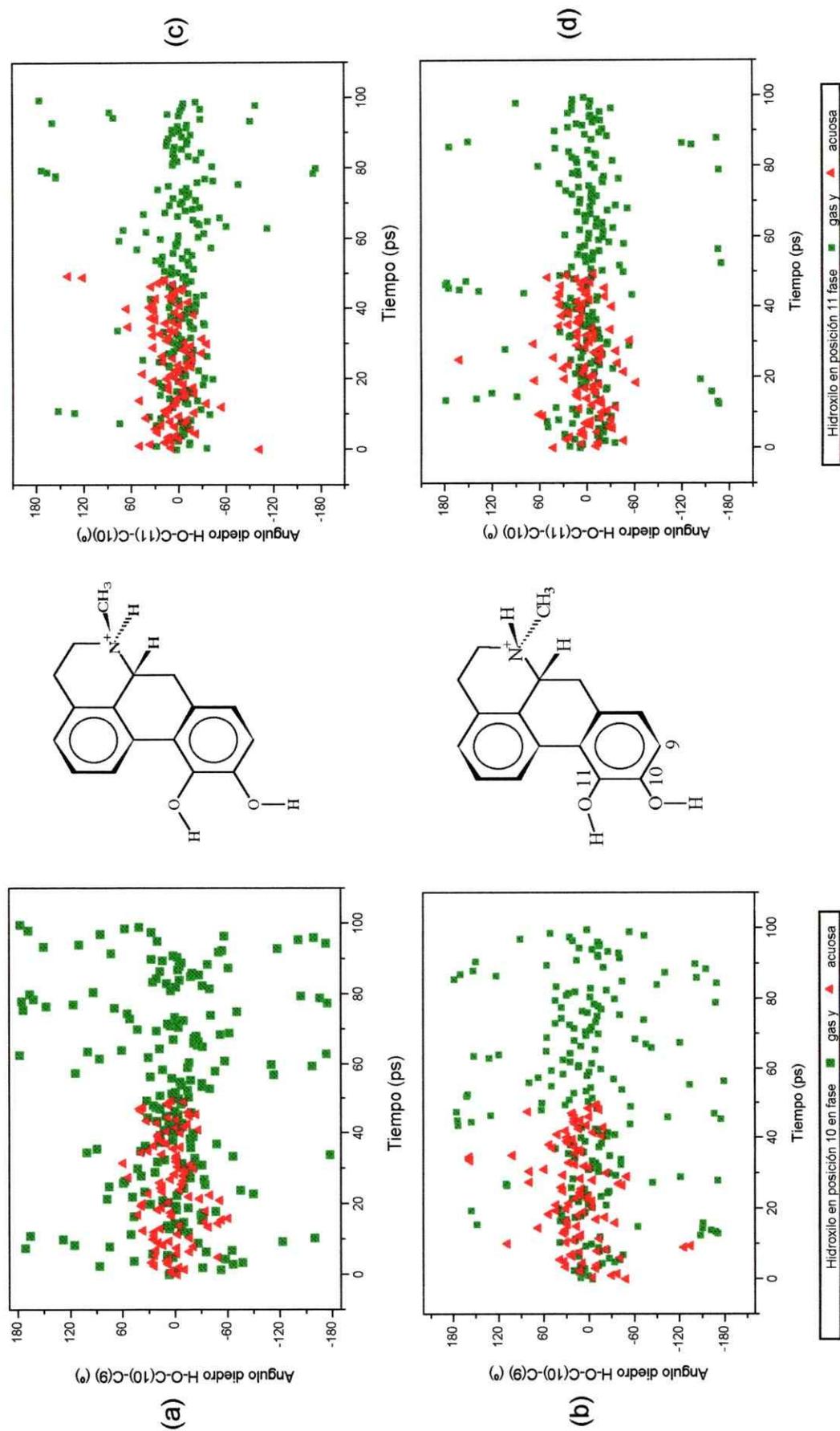
**Figura 2.15** Perfiles del ángulo diedro C(1)-C(11b)-C(11a)-C(11) en función del tiempo (ps) de la simulación para la (R)-boldina. Diastereoisómero I (a) en fase gaseosa y (b) en solvente. Diastereoisómero II (c) en fase gaseosa y (d) en fase acuosa. La línea de color negro indica el promedio para este ángulo a lo largo de toda la simulación.



**Figura 2.16** Perfiles del ángulo diedro C(3a)-C(4)-C(5)-C(N) para la (R)-APO. Diastereoisómero I (a) fase gaseosa y (b) fase acuosa. Diastereoisómero II (c) en fase gaseosa y (d) en fase acuosa a 298 K (25 °C).



**Figura 2.17** Perfiles del ángulo diedro C(3a)-C(4)-C(5)-C(N) para la (R)-boldina. Diastereoisómero I (a) fase gaseosa y (b) fase acuosa. Diastereoisómero II (c) en fase gaseosa y (d) en fase acuosa a 298 K (25 °C).



**Figura 2.18** Distribución de los ángulos torsionales de los grupos hidroxilos en las posiciones 10 y 11 de (R)-apomorfina. Hidroxilo en posición 10, ángulo torsional  $\text{H-O-C(10)-C(9)}$ (°) en (a) diastereoisómero I y (b) diastereoisómero II en fase gas y acuosa. Hidroxilo en posición 11, ángulo torsional  $\text{H-O-C(11)-C(10)}$  (°) en (c) diastereoisómero I y (d) diastereoisómero II en fase gas y en fase acuosa.

Interesa el análisis de la libertad conformacional de los sustituyentes de los anillos aromáticos para ambos compuestos, debido a las probables interacciones de estos sustituyentes con el receptor. Para hacer esto se consideraron los sustituyentes de la boldina en los anillos A y D y para la apomorfina los grupos hidroxilos en las posiciones 10 y 11.

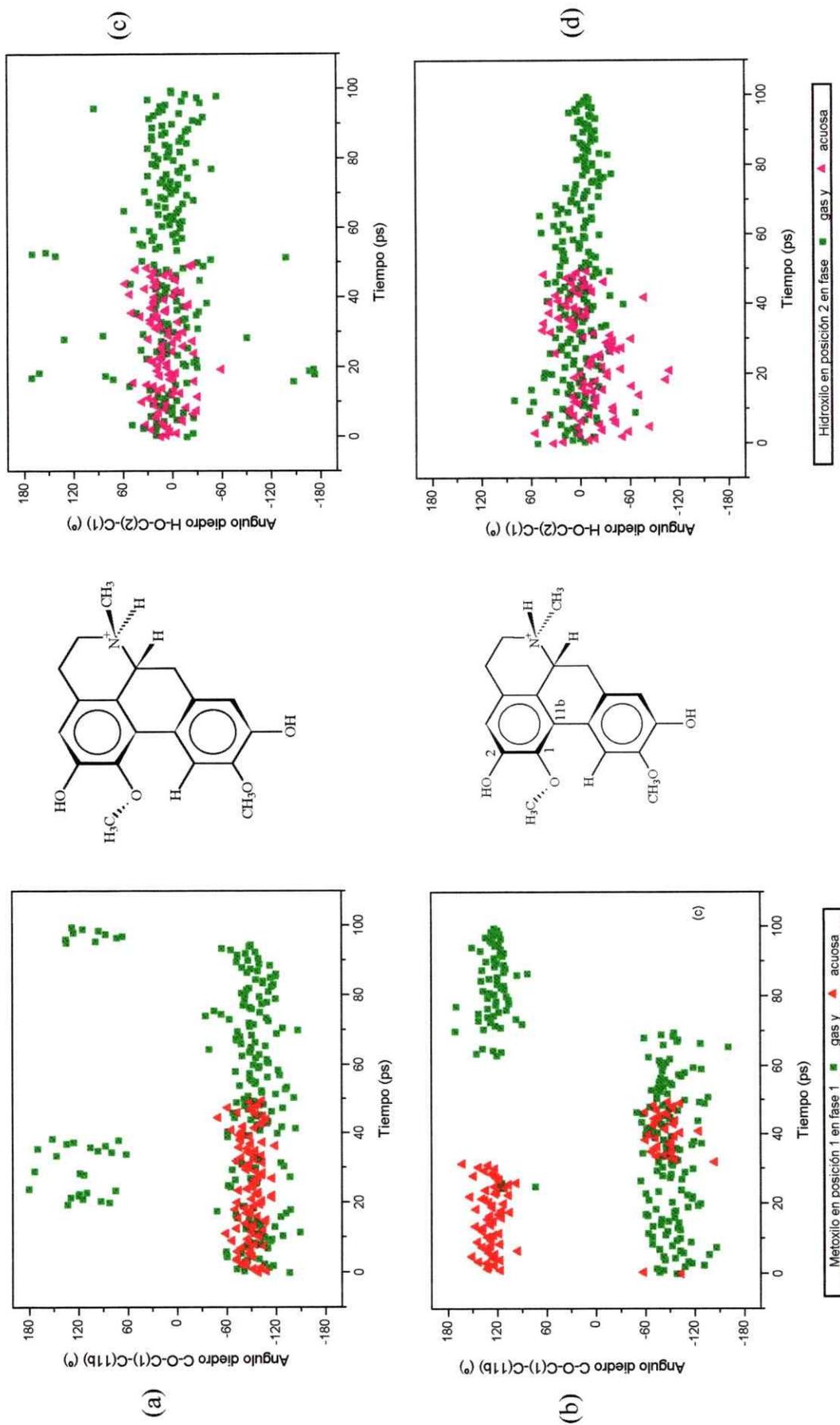
En la figura 2.18 se muestran los resultados para los sustituyentes del anillo D de la apomorfina en ambos diastereoisómeros a través del análisis de los ángulos H-O-C(10)-C(9) y H-O-C(11)-C(10). El primero de éstos representa al hidroxilo unido al C-10 y el segundo al C-11. Los resultados muestran que en ambos diastereoisómeros, tanto en fase gaseosa como acuosa, el hidroxilo unido al C-10 presenta una mayor libertad conformacional. El hidroxilo unido al C-11 presenta restricciones en su movimiento, manteniendo una orientación tal que le permite formar un enlace por hidrógeno intramolecular con el otro grupo, actuando el grupo hidroxilo en posición 11 como un dador de enlaces y el grupo en posición 10 como un aceptor. Se puede atribuir esta preferencia por una conformación *syn* al hecho que en la *anti* existe impedimento estérico con el hidrógeno del C-1.

Los resultados para los sustituyentes de los anillos de la (*R*)-boldina se muestran en las figuras 2.19 y 2.20. El carbono del grupo metoxilo en la posición 1 del diastereoisómero I se encuentra siempre fuera del plano del anillo aromático con una orientación *trans* con respecto al H-6a, formando un ángulo de  $-60^\circ$  a  $-150^\circ$  con respecto al plano del anillo A, similar al mostrado en la estructura cristalográfica. La permanencia del grupo metoxilo en dicha conformación se debe principalmente a una compresión estérica que ocurre entre los hidrógenos del grupo metilo y el hidrógeno en la posición 11. Este impedimento fija las conformaciones de ambos sustituyentes del anillo A, ya que la distancia entre el O del grupo metoxilo y el hidrógeno en posición 11 es de 2,1 Å. Los resultados muestran que el carbono del grupo metoxilo no se encuentra casi nunca en el plano del anillo ( $0^\circ$  ó  $180^\circ$ ). En el diastereoisómero II de la boldina existen dos orientaciones preferenciales del metoxilo unido al C-1, una de ellas similar a la adoptada para el diastereoisómero I durante casi todo el tiempo, y otra en la región que va desde

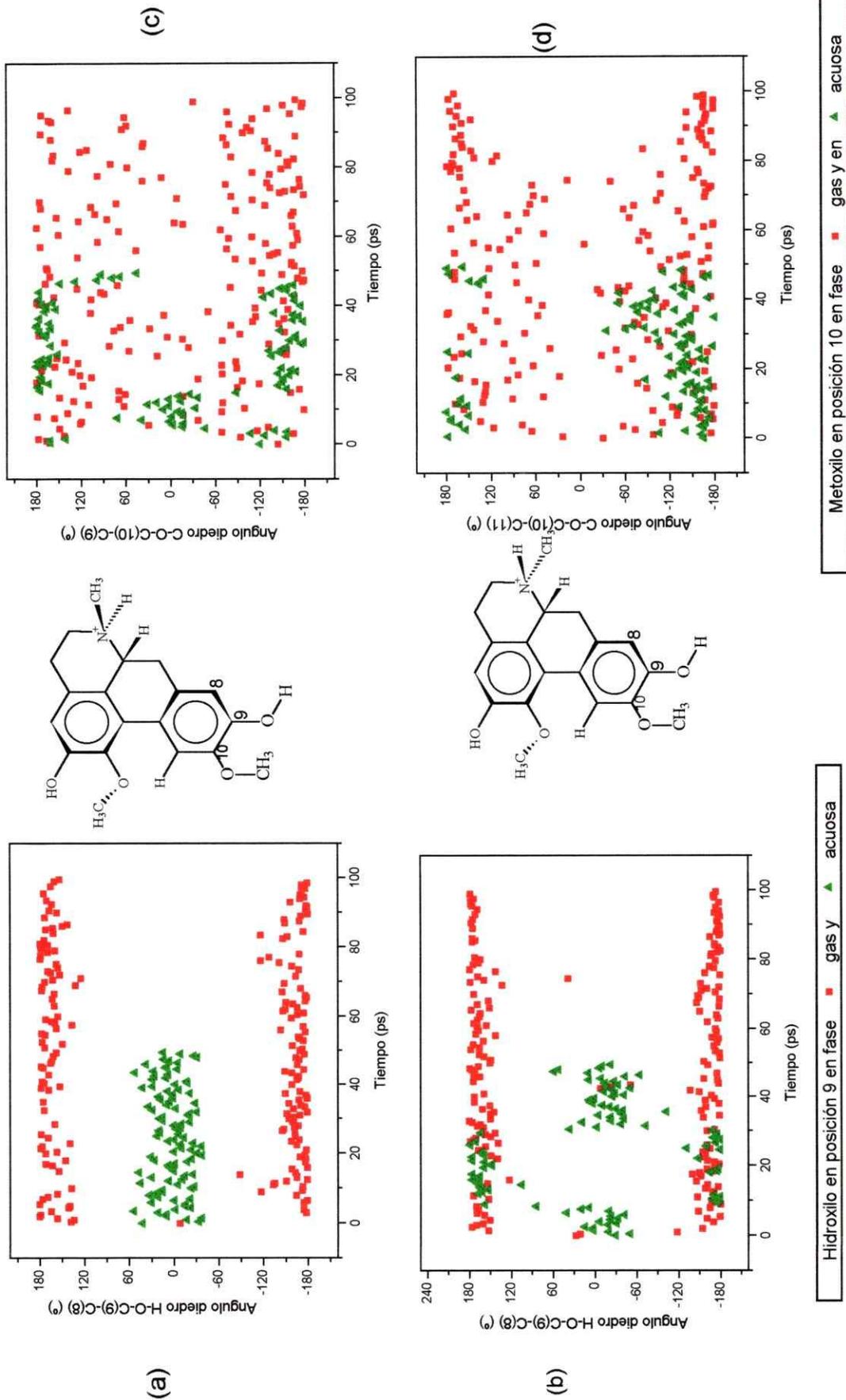
120° a 150°. Esto se suma al hecho que para el diastereoisómero II la torsión del grupo bifenilo sea menor. El grupo hidroxilo unido al C-2 está en una orientación que permite la formación de un enlace por hidrógeno intramolecular con el grupo metoxilo unido al C-1. Por el contrario, los sustituyentes en el anillo D presentan una mayor movilidad (ver Figura 2.20).

Los resultados para los sustituyentes en el anillo D se muestran en la Figura 2.20. Estos muestran claramente una diferencia entre las orientaciones de los sustituyentes unidos a C-9 y C-10 en fase gaseosa con respecto a la fase acuosa, mientras que para los sustituyentes en el anillo A se encuentra una misma orientación que no depende de la influencia del solvente. El grupo hidroxilo en posición 9 en ambos diastereoisómeros presenta el mismo comportamiento en fase gaseosa, permaneciendo casi todo el tiempo de la simulación en el plano del anillo D. El grupo hidroxilo unido al C-9 está en una orientación que permite la formación de un enlace por hidrógeno intramolecular con el grupo metoxilo unido al C-10. El grupo metoxilo unido al C-10 presenta un rango amplio de orientaciones, con sus movimientos restringidos sólo a una pequeña región del espacio conformacional, que es la zona entre  $-60^\circ$  a  $60^\circ$ . En dichas regiones el metilo del grupo metoxilo se encuentra muy cercano al oxígeno del grupo hidroxilo unido al C-9.

La inclusión del solvente en las simulaciones dinámicas muestra un efecto mayor en los sustituyentes del anillo D de la boldina. Los resultados muestran que para ambos diastereoisómeros compite una estabilización intramolecular con la solvatación. La orientación del grupo hidroxilo unido al C-9 muestra la pérdida del enlace por hidrógeno con el grupo metoxilo unido al C-10, observándose la permanencia del átomo de carbono del metoxilo en orientaciones cercanas al plano del anillo D.



**Figura 2.19** Distribución de los ángulos torsionales de los sustituyentes del anillo A para la (R)-boldina. Metoxilo en posición 1, ángulo torsional C-O-C(1)-C(11b)(°) en (a) diastereoisómero I y (b) diastereoisómero II en fase gas y acuosa. Hidroxilo en posición 2, ángulo torsional H-O-C(2)-C(1) (°) en (c) diastereoisómero I y (d) diastereoisómero II fase gas y en fase acuosa.



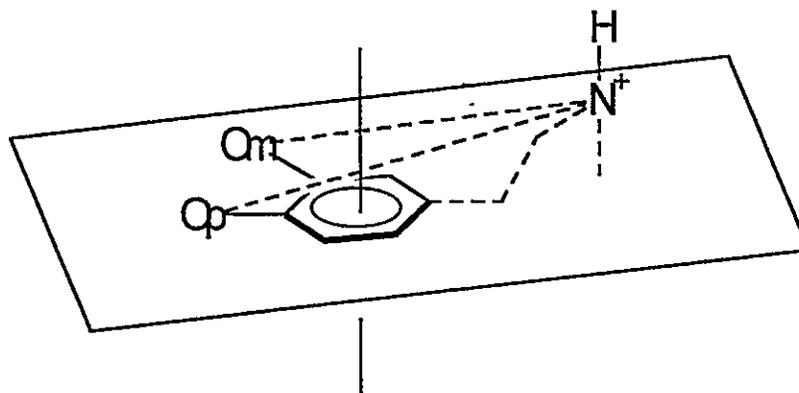
**Figura 2.20** Distribución de los ángulos torsionales de los sustituyentes del anillo D para la (*R*)-boldina. **Hidroxilo en posición 9, ángulo torsional H-O-C(9)-C(8) (°) en (a) diastereoisómero I y (b) diastereoisómero II fase gas y en fase acuosa. Metoxilo en posición 10, ángulo torsional C-O-C(10)-C(9) (°) en (c) diastereoisómero I y (d) diastereoisómero II en fase gas y acuosa.**

### 2.3.4 Estudio del farmacóforo para compuestos agonistas dopaminérgicos.

El estudio de modelos farmacofóricos permite racionalizar algunos rasgos estructurales de ligandos para describir sus posibles sitios de unión. Este estudio se llevó a cabo para algunos derivados de las familias de aporfinas y 2-aminotetralinas.

El farmacóforo se obtuvo comparando los conformeros *trans* coplanares de la dopamina con los siguientes compuestos: los diastereoisómeros Ia y IIb de la (*R*)-apomorfina, el diastereoisómero Ia de la (*R*)-boldina, la (*S*)-5-hidroxi-N,N-di-*n*-propil-2-aminotetralina y la (*R*)-7-hidroxi-N,N-di-*n*-propil-2-aminotetralina.

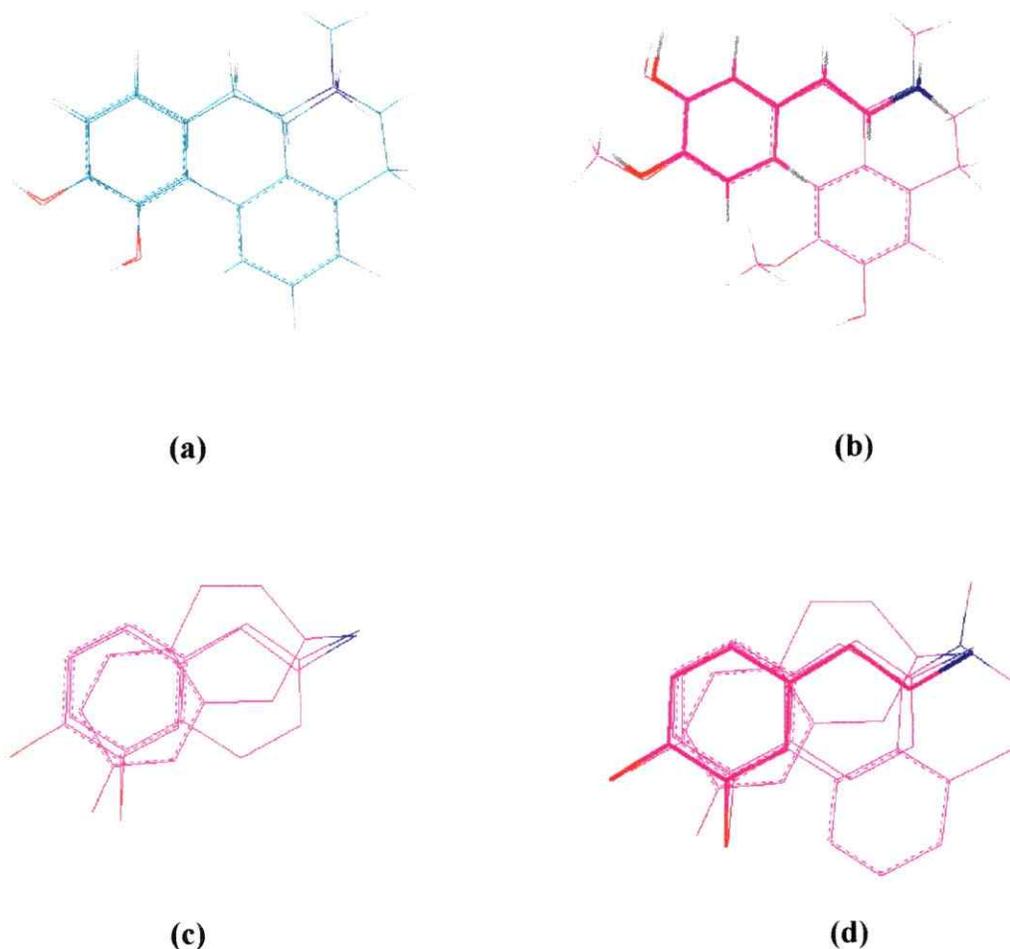
En la mayoría de los estudios de farmacóforos de agonistas dopaminérgicos se establecen tres puntos principales comunes: un anillo aromático, un átomo de nitrógeno protonado y por los menos un grupo hidroxilo [25,26]. En la Figura 2.21 se muestra un farmacóforo dopaminérgico y las distancias entre los diferentes puntos de interés.



**Figura 2.21** Modelo farmacofórico de agonistas dopaminérgicos. Tres distancias son características: la distancia entre el nitrógeno y el O en posición meta  $D(N-O_m)$ ; la distancia entre el nitrógeno y el oxígeno en posición para  $D(N-O_p)$  y finalmente la distancia desde el nitrógeno hacia un plano que contiene el anillo aromático  $D_N$ .

Los resultados de las superposiciones de estructuras se muestran en la figura 2.22 y la distancias y ángulos del farmacóforo en la Tabla 2.5. Estos resultados muestran una distancia de 6,5 Å entre el nitrógeno y el oxígeno u otro átomo en una posición análoga a la del oxígeno del grupo hidroxilo en posición *meta* (O<sub>m</sub>) y una distancia de 7,9 Å entre el

nitrógeno y el oxígeno del grupo hidroxilo en posición *para* ( $O_p$ ). El ángulo torsional que define la relación entre el anillo aromático y el grupo amonio fue de  $170,0^\circ$ , lo cual indica que es factible que este grupo pueda apartarse de la coplanaridad, pero con desviaciones menores a  $30^\circ$ . Los resultados muestran que la distancia  $O_m-N$  determinaría la selectividad por los diferentes receptores dopaminérgicos.



**Figura 2.22** Superposiciones para los diferentes compuestos estudiados. (a) Entre el rotámero *trans*  $\alpha$  de la dopamina y la (R)-apomorfina, (b) entre el rotámero *trans*  $\beta$  de la dopamina y la (R)-boldina, (c) del 5- y 7-OHDPAT y (d) una superposición de todos los compuestos estudiados donde se aprecia la relación entre la dopamina y sus ligandos; en esta superposición se han excluido los hidrógenos.

**Tabla 2.5** Parámetros estructurales de ligandos dopaminérgicos que definen el farmacóforo.

| Ligando                  | D (N-O <sub>p</sub> ) Å | D (N-O <sub>m</sub> ) Å | D <sub>N</sub> Å | D (C-C-C-N) (°) |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|-----------------|
| α-DA                     | 7,9                     | 6,5                     | --               | 180             |
| β-DA                     | 8,0                     | 7,3                     | --               | 180             |
| (R)-APO Ia               | 7,8                     | 6,6                     | 1,54             | 179,6           |
| (R)-APO IIb              | 7,3                     | 6,4                     | 1,60             | 171,4           |
| 7-OHDPAT                 | -                       | 6,9                     | --               | 172,1           |
| 5-OHDPAT                 | -                       | 6,5                     | --               | 171,1           |
| N-0437                   | -                       | 6,5                     | --               | 170,0           |
| Quinpirol <sup>a,b</sup> | 6,0                     | 5,6                     | 0,44             | --              |
| Cl-BP <sup>a,c</sup>     | 6,7                     | 6,9                     | 1,04             | --              |
| Br-APB <sup>a,c</sup>    | 6,7                     | 7,0                     | 1,17             | --              |
| (R)-boldina              | 7,8                     | 7,3                     | 1,56             | 176,4           |

a.- referencia 25, estructura y abreviaciones se muestran en la figura 2.23. b.- agonista selectivo D<sub>2</sub>. c.- agonista selectivo D<sub>1</sub>

Mottola y col. [26], en su estudio de farmacóforos de agonistas dopaminérgicos D<sub>1</sub>, postula una relación *trans* coplanar entre el grupo aromático y el nitrógeno que es descrita por el rotámero *trans* β de la dopamina, con una distancia (N-O<sub>m</sub>) de 7,8 Å. Wilcox y col. [25] presentan un estudio farmacofórico para un conjunto de agonistas dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Sus resultados de 3D-QSAR (relaciones estructura-actividad cuantitativa tridimensional) a través de CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) son mostrados en la Tabla 2.5, para los compuestos (quinpirol, Cl-BP y Br-APB) y corroboran los resultados presentados. Los resultados para compuestos que presentan una alta afinidad por receptores D<sub>1</sub> presentan una distancia D(N-O<sub>m</sub>) entre 6,9 a 7,0 Å, mientras que la misma distancia disminuye para el farmacóforo de receptores del tipo D<sub>2</sub> a 5,1 Å. Otra fuerte diferencia entre ambos farmacóforos es la distancia entre el nitrógeno

y el plano del anillo aromático  $D_N$ : la distancia para el tipo  $D_1$  varía entre 1,24-1,32 Å, pero para el tipo  $D_2$  es mucho menor, entre 0,39 y 0,60 Å.

Para el farmacóforo agonistas del tipo  $D_1$  se propone una mayor distancia entre el nitrógeno y el O del grupo hidroxilo en posición *meta* [25], mientras que para el tipo  $D_2$  esta distancia es menor en 1,8 – 1,9 Å. En la Tabla 2.5 se muestran los rasgos para ligandos selectivos de ambos tipos de receptores dopaminérgicos, comparando quinpirol, con Cl-BP y Br-APB se tiene un  $\Delta D(N-O_m)$  de 1,3 - 1,4 Å. Este resultado avala lo ya propuesto en las conclusiones del Capítulo 1: que ambos rotámeros coplanares de la dopamina serían las conformaciones biológicamente activas.

La apomorfina presenta un distancia  $N-O_m$  intermedia entre las que corresponden a farmacóforos  $D_1$  y  $D_2$ , lo que explicaría su escasa selectividad entre ambos tipos de receptores dopaminérgicos, con una razón de 7 veces entre las constantes de disociación. Estudios *in vitro* de la (*S*)-boldina muestran un moderado comportamiento de antagonista dopaminérgico. Una alternativa propuesta para su actividad sugiere que la boldina pueda actuar como un agonista parcial sobre los receptores dopaminérgicos [13]. Este hipotético comportamiento de agonista parcial se podría explicar a través de la distancias  $D(N-O_m)$ , que es cercana a la que correspondería al farmacóforo  $D_1$ , aunque la boldina tiene un grupo metoxilo en dicha posición. Estos resultados permitirían postular una actividad agonista dopaminérgica, posiblemente con una mayor actividad sobre los receptores del tipo  $D_1$ .

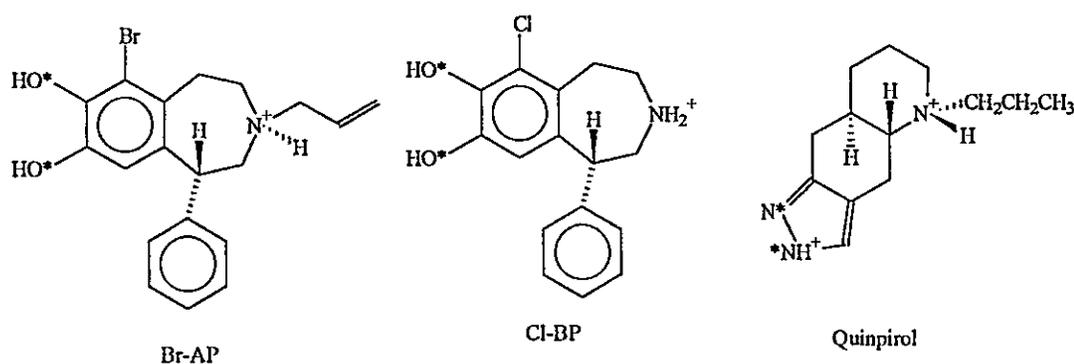


Figura 2.23 Estructura y abreviaturas de ligandos selectivos dopaminérgicos.

## 2.4 CONCLUSIONES

El estudio de las estructuras conformacionales para la aporfina y la boldina muestran que coexisten dos procesos asociados a cambios conformacionales del anillo B, que no pueden ser analizados por separado. Estos procesos son la inversión del nitrógeno y la inversión/cambio conformacional del anillo. El primero de éstos genera los diferentes diastereoisómeros de los compuestos aporfínicos, y el segundo cambia solamente las orientaciones de los sustituyentes del anillo B. El estudio de la barrera de inversión del átomo de nitrógeno muestra valores similares a los experimentales. Los estudios de las energías relativas muestran que en ambos diastereoisómeros de apomorfina y boldina siempre es preferida una conformación semisilla para el anillo B.

Según lo expuesto en el capítulo 1 las conformaciones biológicamente activas serían aquellas que presentan una relación *trans* coplanar entre los elementos farmacofóricos, que son un nitrógeno cuaternario, un anillo aromático y por lo menos un grupo hidroxilo en una posición *meta* de manera preferencial. Las estructuras propuestas para los farmacóforos dopaminérgicos muestran marcadas diferencias en las distancias entre los diferentes elementos. La apomorfina presenta distancias intermedias, lo que implicaría su falta de selectividad entre los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos, mientras que la boldina, por las relaciones geométricas mostradas en su esqueleto, debería presentar una mayor afinidad por los receptores dopaminérgicos del tipo D<sub>1</sub>.

### Referencias

- 1.- A. Matthiessen y C. R. A. Wright, *Proc. R. Soc.* **17**, 337 (1869).
- 2.- R. Pschorr, B. Jaecke y H. Fecht, *Chem. Ber.* **35**, 4377 (1902).
- 3.- A. M. Ernst, *Psychopharmacologia* **10**, 316 (1966).
- 4.- J. L. Neumeyer, B. R. Neustadt, J. W. Weintraub, *Tetrahedron Lett.* **32**, 3107 (1967).
- 5.- J. L. Neumeyer, en J. D. Phillipson, M. F. Roberts y M. H. Zenk eds., "The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids". Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg; 1985.
- 6.- H. E. Katerinopoulos y D. I. Schuster, *Drugs of the Future* **12**, 225 (1987).
- 7.- W. S. Saari, S. W. King y V. J. Lotti, *J. Med. Chem.* **16**, 171 (1973).
- 8.- R. J. Baldessarini, N. S. Kula, R. Zong y J. L. Neumeyer, *Eur. J. Pharmacol.* **254**, 199 (1994).
- 9.- Y. Gao, R. Zong, A. Campbell, N. S. Kula, R. J. Baldessarini y J. L. Neumeyer, *J. Med. Chem.* **31**, 1392 (1988).
- 10.- J. M. Schaus, R. D. Titus, M. M. Foreman, N. R. Mason y L. L. Truex, *J. Med. Chem.* **33**, 600 (1990).
- 11.- R. J. Baldessarini, N. S. Kula, Y. Gao, A. Campbell y J. L. Neumeyer, *Neuropharmacol.* **30**, 97 (1991).
- 12.- Y. Gao, V. J. Ram, A. Campbell, N. S. Kula, R. J. Baldessarini y J. L. Neumeyer, *J. Med. Chem.* **33**, 39 (1990).
- 13.- M. Asencio, B. Delaquerrière, B. K. Cassels, H. Speisky, E. Comoy y P. Protais, *Pharmacol. Biochem. & Behav.* **62**, 7 (1999).
- 14.- P. Dauber-Osguthorpe, V. A. Roberts, D. J. Osguthorpe, J. Wollff, M. Genest y A. T. Hagler, *Proteins: Structure, Functions and Genetics* **4**, 31 (1988)
- 15.- R. Glaser y M. A. Bernstein, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 2047 (1991).
- 16.- R. Glaser, Q.-J. Peng y A. S. Perlin, *J. Org. Chem.* **53**, 2172 (1988).
- 17.- J. Glasel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **102**, 703 (1981).
- 18.- J. Armstrong y R. B. Barlow, *Br. J. Pharmac.* **57**, 501 (1976).
- 19.- S. G. Lias, J. F. Liebman y R. D. Levin *J. Phys. Chem. Ref. Data* **13**, 1 (1984).

- 20.- W. J. Hehre, L. Radom, P. v. R. Schleyer y J. A. Pople, Wiley & Sons, 1986, New York.
- 21.- S. F. Nelsen J. T. Ippoliti, T. B. Frig y P. A. Petillo, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1776 (1989).
- 22.- K. M. Kerr, A. M. Kook y P. J. Davis, *J. Nat. Prod.* **49**, 576 (1986).
- 23.- J. Giesecke, *Acta Cryst.* **B29**, 1785 (1973).
- 24.- M. Asencio, B. K. Cassels, V. Manriquez y D. Boys, *Acta Cryst.* **C52**, 1581 (1996).
- 25.- R. E. Wilcox, T. Tseng, M.-Y. K. Brusniak, B. Ginsburg, R. S. Pearlman, M. Teeter, C. DuRand, S. Starr y K. A. Neve, *J. Med. Chem.* **41**, 4385 (1998).
- 26.- D. M. Mottola, S. Laiter, V. J. Watts, A. Tropsha, S. D. Wyrick, D. E. Nichols, y R. B. Mailman, *J. Med. Chem.* **39**, 285 (1996).

## **CAPITULO 3**

### **ANÁLISIS DE LA SECUENCIA AMINOACIDICA PARA LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS**

#### **3.1 INTRODUCCIÓN**

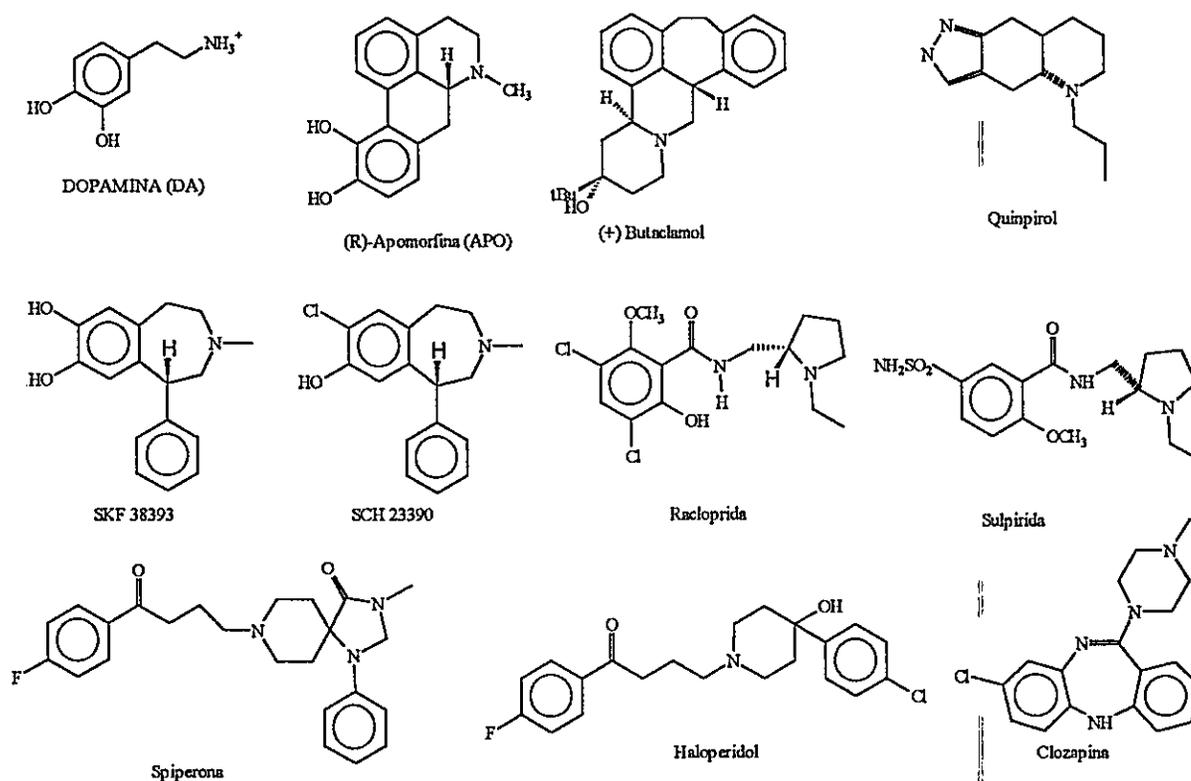
Desde el reconocimiento de la dopamina como un neurotransmisor independiente, el conocimiento de su función y mecanismos de acción han sido de gran interés debido a su relación con algunas enfermedades importantes del sistema nervioso central. El estudio de los receptores dopaminérgicos a través de técnicas bioquímicas, farmacológicas y fisiológicas mostró hace ya más de dos décadas que existían por lo menos dos tipos de receptores para este neurotransmisor. Las denominaciones propuestas para estos receptores fueron D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> [1], con propiedades farmacológicas y bioquímicas diferentes (ver Tabla 3.1). Esta aparente simplicidad de la familia de los receptores dopaminérgicos terminó cuando fue posible obtener las secuencias aminoacídicas de los mismos a través de técnicas de la biología molecular. En la actualidad, se han clonado por lo menos cinco receptores dopaminérgicos (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> y D<sub>5</sub>) humanos y sus análogos en otras especies [2,3]. Se plantea actualmente una nueva terminología para clasificar estos receptores sobre la base de su biología molecular y sus funciones. El tipo D-1 queda

compuesto por los receptores  $D_{1A}$  y  $D_{1b}$  ó  $D_5$ ; el tipo D-2 queda compuesto por los receptores  $D_{2A}$ ,  $D_3$  y  $D_4$ .

**Tabla 3.1** Tipos de receptores definidos a través de estudios farmacológicos, bioquímicos y fisiológicos [2,3].

|  | Tipo D-1              | Tipo D-2  |
|--|-----------------------|---|
| <b>Características Farmacológicas</b>                                |                       |   |
| Agonista selectivo   | SKF38393 <sup>a</sup> | Quinpirol <sup>1</sup> ; N-0437 <sup>a</sup>  |
| Antagonista selectivo  | SCH23390 <sup>a</sup> | (-)-sulpirida <sup>a</sup>  |
| <b>Función Fisiológica</b>   |                       |   |
| Aspectos del funcionamiento motriz (cerebro), función cardiovascular |                       | Aspectos del funcionamiento motriz y comportamiento (cerebro), control de la secreción de la prolactina y la hormona melanocito-estimulante (MSH) desde la hipófisis, función cardiovascular. |
| <b>Respuesta bioquímica</b>  |                       |   |
| Activa la adenilato ciclasa  |                       | Inhibe la adenilato ciclasa.  |
| Activa la fosfolipasa C  |                       | Inhibe canales de $Ca^{+2}$<br>Estimula canales de $K^+$  |
| <b>Tamaño del receptor (kDa)</b>                                     |                       |   |
|  | 72                    | 85 – 150  |

a.- ver formulas en Figura 3.1



**Figura 3.1** Estructura de algunos ligandos dopaminérgicos.

Los receptores del tipo D-1 o "D<sub>1</sub>-like" aún quedan definidos como aquellos que estimulan la actividad de la adenilato ciclasa y posiblemente la fosfolipasa C (el receptor que activaría esta última señal aún no se conoce), mientras que los del tipo D-2 o "D<sub>2</sub>-like" inhiben la adenilato ciclasa y algunos canales de Ca<sup>+2</sup> y estimulan ciertos canales de K<sup>+</sup>.

Algunas características farmacológicas de ambos tipos de receptores se muestran en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2** Resumen de las afinidades de algunos ligandos por los subtipos de receptores dopaminérgicos [2]. En la Figura 3.1 se presentan las estructuras de estos compuestos.

|                           | $K_D$ (nM) |          |             |
|---------------------------|------------|----------|-------------|
|                           | $D_{1A}$   | $D_{1B}$ | $D_5$       |
| <b>Agonistas</b>          |            |          |             |
| DA                        | 2300-12000 | 3900     | 228-235     |
| APO                       | 210-680    | 240      | 152-363     |
| NPA                       | 1540-1816  | 1050     | 1130        |
| SKF 38393 <sup>a</sup>    | 87-150     | 100      | 43-100      |
| <b>Antagonistas</b>       |            |          |             |
| Clozapina                 | 141        | 343      | 250-336     |
| SCH 23390 <sup>a</sup>    | 0,11-0,66  | 0,11     | 0,3-0,54    |
| Haloperidol               | 27-203     | 35       | 48-151      |
| Siperona                  | 220        | 2600     | 4500        |
| (-)Sulpirida <sup>b</sup> | 20400      | 21210    | 11000-29000 |
|                           | $D_2$      | $D_3$    | $D_4$       |
| <b>Agonistas</b>          |            |          |             |
| DA (alta afinidad)        | 2,8-474    | 25       | 28          |
| DA (baja afinidad)        | 1705-2490  | 27       | 450         |
| APO                       | 24         | 20       | 4,1         |
| SKF 38393 <sup>a</sup>    | 9560       | 5000     | 1800        |
| Quinpirol <sup>b</sup>    | 576        | 5,1      | 46          |
| <b>Antagonistas</b>       |            |          |             |
| (+) Butaclamol            | 0,8        | --       | 40          |
| Clozapina                 | 56-138     | 180      | 9           |
| Siperona                  | 0,03-0,07  | 0,6      | 0,08        |
| (-)Sulpirida <sup>b</sup> | 4,8-46     | 25       | 52          |
| Racloprida <sup>b</sup>   | 1,8-10,5   | 3,5      | 237         |

a. Agonista y antagonista selectivos para el tipo  $D_1$ . b. Agonista y antagonista selectivos para el tipo  $D_2$ .

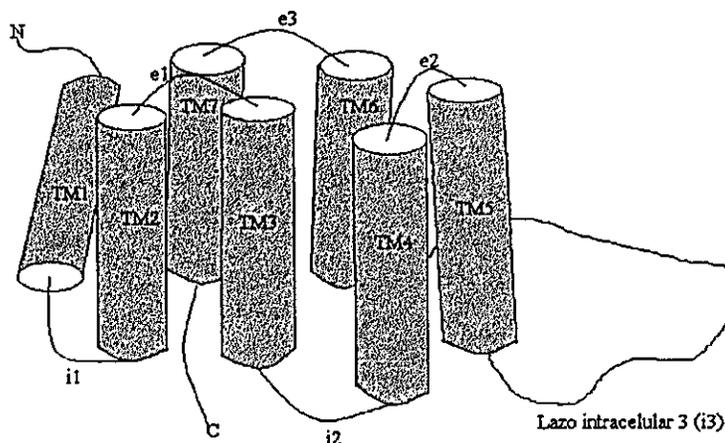
El primer receptor del tipo D-1 ("D<sub>1</sub>-like") en ser clonado fue el D<sub>1</sub> con 446 aminoácidos [4-7]. Luego fueron clonados el receptor D<sub>5</sub> (humano) y el correspondiente D<sub>1B</sub> (rata) [8,9]. Las propiedades de D<sub>5</sub>/D<sub>1B</sub> son muy similares a las de D<sub>1</sub> excepto que D<sub>5</sub> muestra una afinidad 10 veces mayor por la DA (ver Tabla 3.2). Además, el receptor humano y el de rata muestran afinidades bajas para ciertos antagonistas. Cada uno de estos receptores exhibe las características clásicas de unión de ligandos del tipo D<sub>1</sub>. Los

receptores mostraron afinidades parecidas para los agonistas y antagonistas selectivos dopaminérgicos. Se ha planteado la hipótesis de la existencia de otro receptor perteneciente a este tipo que no ha sido aún identificado, ya que en las áreas de neurotransmisión dopaminérgica, además de ser activada la enzima adenilato ciclasa, existe una estimulación de la fosfolipasa C [10]. Las principales diferencias entre los receptores del tipo D-1 se encuentran en su distribución en el cerebro y la cantidad presente en cada área. El D<sub>1</sub> se encuentra en neostriado, nucleus accumbens y tubérculo olfatorio mientras que el D<sub>5</sub>/D<sub>1B</sub> se encuentra en el hipocampo y el hipotálamo, con muy pocos receptores en el estriado. El nivel de receptores D<sub>5</sub>/D<sub>1B</sub> es muy menor al de los D<sub>1</sub> basados en la comparación de los niveles de sus respectivos ARN mensajeros [3]. Además, el receptor D<sub>1</sub> está más ampliamente distribuido en el área del cerebro que tradicionalmente se asocia con la actividad dopaminérgica.

La familia D-2 ("D<sub>2</sub>-like") es notable por la complejidad de sus genes y la existencia de variantes en cada gen. El primer gen fue obtenido en 1988 y correspondió al receptor D<sub>2</sub> con 415 aminoácidos [11]. Después, dos nuevos receptores pertenecientes a esta familia fueron clonados (D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>) [12,13]. Este tipo presenta muchas variantes para cada subtipo de receptor, basándose la diferencia entre una variante y otra principalmente en el largo del lazo intracelular 3. Por ejemplo, para el receptor D<sub>2</sub> tenemos dos variantes, una denominada D<sub>2</sub>(corto) y la otra D<sub>2</sub>(largo), donde la diferencia radica en 29 aminoácidos que se insertan en el tercer lazo intracelular. Para los receptores D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> estas variaciones son más complejas que las presentadas por el D<sub>2</sub>, especialmente para D<sub>4</sub> donde las variantes son múltiplos de secuencias repetidas de 16 aminoácidos en el lazo intracelular 3 [3]. Esta complejidad se presenta en uno de los lazos más importantes en estos receptores, pues es el sitio de unión con el efector de la respuesta neurológica que es la proteína G. Esta complejidad conlleva que los receptores pertenecientes a la familia D-2 presentan una mayor diversidad de respuestas farmacológicas (ver Tabla 3.2), encontrándose la mayor diferencia en el receptor D<sub>4</sub>. Este receptor muestra afinidades bajas por la mayoría de los antagonistas dopaminérgicos, como por ejemplo raclopride. Sin embargo, exhibe altas afinidades por neurolépticos atípicos como la clozapina, lo que

ha estimulado en la industria farmacéutica una intensa búsqueda de antagonistas selectivos  $D_4$  como posibles fármacos antipsicóticos. El receptor  $D_2$  se encuentra en altas concentraciones en las regiones dopaminérgicas típicas del cerebro tales como el neostriado (caudado/putamen), nucleus accumbens y tubérculo olfatorio, como también en regiones que contienen células neuronales dopaminérgicas, es decir, sustantia nigra y área tegmental ventral [14]. Los niveles del ARN mensajero en rata para los receptores  $D_3$  y  $D_4$  son más bajos comparados con los niveles que presenta el ARNm correspondiente a los  $D_2$ . La distribución del ARN mensajero para estos receptores también es diferente. Los receptores  $D_3$  y  $D_4$  muestran una ubicación más límbica, indicando un rol preferencial en los aspectos emocionales/cognitivos de la neurotransmisión dopaminérgica [13, 15].

Los receptores acoplados a proteínas G presentarían características similares en sus estructuras secundarias y terciarias, fundamentalmente la presencia de siete segmentos hidrofóbicos que adoptarían la forma de hélices  $\alpha$  y atravesarían la membrana plasmática, estando conectados por lazos intra y extracelulares (ver Figura 3.2) [16].



**Figura 3.2.** Estructura hipotética de los receptores dopaminérgicos. Representación desde el interior de la membrana plasmática, que muestra la numeración de las hélices, y los lazos intra (i) y extracelulares (e).

Debido a que no se ha obtenido una estructura cristalográfica para este tipo de receptores, el análisis de la secuencia aminoacídica es de gran pertinencia para el conocimiento de la estructura secundaria, desde la cual se pueden inferir algunas características de la estructura tridimensional del receptor en la zona de la membrana.

La predicción de la estructura secundaria de los receptores se puede dividir en cuatro categorías de problemas. Estas son:

- 1.- La región de las secuencias insertas en la membrana.
- 2.- La topología básica de estas hélices.
- 3.- La orientación general de las hélices dentro del receptor.
- 4.- La posición relativa de cada hélice dentro del receptor

La primera de estas categorías puede ser resuelta a través de las metodologías conocidas de predicción de estructura secundaria. Los algoritmos involucrados en estos programas se pueden agrupar en (1) información estadística; (2) propiedades fisicoquímicas; (3) patrones de secuencia; (4) redes neuronales y (5) conservancia evolutiva. En cuanto a la orientación y posición relativa de las hélices, éstas son preguntas más complejas de responder. La orientación de las hélices puede ser analizada como un problema de la diferencia de polaridad entre una cara de la hélice y otra, por lo cual definimos una hélice anfifílica como aquella que presentará una zona, fase o cara polar y otra apolar. También se puede utilizar el concepto de conservancia, es decir aquellos residuos que fueron conservados a través del proceso evolutivo, ya sea como parte fundamental del sitio de unión o como requisitos para mantener la estructura secundaria. Un ejemplo de este fenómeno sería la conservación de un residuo de Asp en la TM3 que formaría parte del sitio de unión para los receptores adrenérgicos [17] y dopaminérgicos [18], y que también está presente en la mayor parte de los receptores aminérgicos [18]. La conservación de los residuos en el sitio de unión permite utilizar conceptos como variabilidad, polaridad y conservancia en la determinación de la orientación de las hélices en la estructura tridimensional del receptor [19,20].

### 3.2 METODOLOGÍA

La homología fue determinada utilizando el comando GAP implementado en el programa GCG (Wisconsin Genetics Computer Group) [21]. Este programa fue aplicado a los receptores mostrados en la Tabla 3.3. El programa GAP utiliza el método de alineación de Needleman y Wunsch [22].

**Tabla 3.3** Receptores utilizados en la determinación de la homología.

| RAPG           | Nº SWISS-PRO <sup>a</sup> |
|----------------|---------------------------|
| Rodopsina      | p02699                    |
| o              | P21728                    |
| D <sub>2</sub> | p14416                    |
| D <sub>3</sub> | p35462                    |
| D <sub>4</sub> | p21917                    |
| D <sub>5</sub> | p21918                    |

a. Número de la secuencia en la base de datos "Swiss Protein Data Bank".

Los perfiles de hidrofobicidad se obtuvieron a través del comando PEPLOT en el programa GCG [21]. Los perfiles de hidrofobicidad de la estructura primaria de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, rodopsina (rH) y bacteriorrodopsina (bRh) fueron construidos utilizando dos escalas diferentes. Estas fueron las de Kyte y Doolittle o KD [23] y la de Goldman, Engelman y Steize o GES [24].

La predicción de las estructuras secundarias se realizó a través de metodologías basadas en redes neuronales utilizando el programa "*Profile Network Prediction Heidelberg*" (PHD). Este programa predice estructuras secundarias (PHDsecondary) para proteínas globulares con un porcentaje de certeza sobre un 70% [25,26]. Para la predicción de hélices transmembranales se cuenta con una variación de este programa (PHDtopology) que muestra una certeza de 95% en la predicción de TM [27]. El primer programa se utilizó para determinar la estructura secundaria en la zona de los lazos de

estos receptores. El segundo fue aplicado para la predicción de las hélices transmembranales en los receptores dopaminérgicos, como también en receptores D<sub>2</sub> mutados.

La predicción de "turns" (vueltas) fue realizada con el algoritmo de Chou y Fasman [28,29] implementado en el programa PEPLOT.

La determinación de las fases y orientaciones de las hélices dentro del receptor se realizó a través de los gráficos "Helical Wheel" [30], el número de variabilidad [31] y el momento de conservancia [19,20]. Los gráficos "Helical Wheel" determinan las fases para una hélice anfifílica, es decir, las caras polares y apolares basadas en la definición de la polaridad para cada residuo de aminoácido en la hélice.

La conservancia se define para cada residuo en la ecuación 3.1

$$(3.1) \quad C = \frac{Z}{V_j}$$

donde  $Z$  es el número total de secuencias en la alineación (es decir 20 en este estudio) y  $V_j$  es el número de variabilidad (el número de diferentes residuos observados en cada posición ( $j$ ) en la hélice hipotética a través de una alineación múltiple). El momento de conservancia se define como la suma de los vectores individuales de conservancia. El momento de conservancia se define en la ecuación 3.2 como [19,20]:

$$(3.2) \quad C(\omega) = \left\{ \left[ \sum_{j=1}^N c_j \text{sen}(j\omega) \right]^2 + \left[ \sum_{j=1}^N c_j \text{cos}(j\omega) \right]^2 \right\}^{1/2}$$

donde  $c_j$  es la conservancia del residuo  $j$  y  $\omega$  corresponde al ángulo entre una cadena lateral y la cadena siguiente en la secuencia (aproximadamente 100°).

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La homología en la secuencia de aminoácidos entre los receptores dopaminérgicos, la bacteriorodopsina y la rodopsina es mostrada en la Tabla 3.4a. Se aprecia la baja homología entre los receptores dopaminérgicos y la bacteriorodopsina. Al realizar la comparación con rodopsina se ve un aumento sustancial en la homología. En La Tabla 3.4b se muestran los resultados para el análisis de la homología de la secuencia en las hélices transmembranales.

**Tabla 3.4a** Porcentajes de homología (%) basados en la secuencia aminoacídica obtenidos para los diferentes receptores.

| %   | bRh | rH  | D1  | D5  | D2  | D3  | D4  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| bRh | 100 | 22  | 20  | 17  | 18  | 15  | 13  |
| rH  | 22  | 100 | 23  | 25  | 27  | 25  | 24  |
| D1  | 20  | 23  | 100 | 60  | 42  | 37  | 34  |
| D5  | 17  | 25  | 60  | 100 | 40  | 37  | 35  |
| D2  | 18  | 27  | 42  | 40  | 100 | 57  | 43  |
| D3  | 15  | 25  | 39  | 37  | 60  | 100 | 42  |
| D4  | 13  | 24  | 34  | 35  | 43  | 42  | 100 |

**Tabla3.4b** Porcentajes de homología (%) de las hélices transmembranales basados en la secuencia aminoacídica

|         | TM1 | TM2 | TM3 | TM4 | TM5 | TM6 | TM7 |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| rH/D-1  | 23  | 23  | 11  | 8   | 19  | 27  | 19  |
| rH/D-2  | 19  | 27  | 11  | 19  | 35  | 23  | 23  |
| bRh/D-1 | 15  | 4   | 0   | 0   | 8   | 4   | 0   |
| bRh/D-2 | 8   | 0   | 0   | 0   | 8   | 4   | 0   |

**Tabla 3.4C** Porcentajes de homología<sup>a</sup> con respecto al tipo de aminoácido (%) de las hélices transmembranales basados en la secuencia

|          | TM1 | TM2 | TM3 | TM4 | TM5 | TM6 | TM7 |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| rH       | 42  | 50  | 54  | 42  | 38  | 61  | 38  |
| bRh      | 34  | 13  | 19  | 19  | 34  | 7   | 15  |
| Dopamina | 42  | 75  | 77  | 42  | 68  | 65  | 46  |

a. comparadas con respecto a los receptores dopaminérgicos

La baja homología en la secuencia que presentan los receptores dopaminérgicos con respecto a la bRh no permite la utilización de la estructura terciaria de esta última como plantilla confiable en la modelación de los receptores acoplados a proteína G, pese a lo cual la literatura científica registra un número importante de modelos construidos sobre esta base insegura. Este resultado está de acuerdo a lo discutido ampliamente en la literatura [31], cuando se argumenta que no se utilice la estructura de bRh como plantilla en la modelación de RAPG, pues esta proteína no pertenece a la misma superfamilia, lo que a su vez se ve reflejado en las diferencias presentadas en una proyección estructural de baja resolución para la rodopsina, que presenta claras diferencias en el arreglo espacial de ambos receptores [32]. Hay que destacar, sin embargo, que la rH presenta porcentajes de homología con los receptores dopaminérgicos apenas superiores a los que muestra la bRh (Tabla 3.4a). Además, cabe notar que al comparar sólo las zonas de la secuencia inserta en la membrana (Tabla 3.4b) se aprecia la nula similitud entre la bRh y los receptores dopaminérgicos mientras que la rH presenta una homología considerable. Estos resultados confirman la hipótesis de la utilización de la estructura tridimensional de rodopsina como plantilla para la modelación de los receptores dopaminérgicos.

En la Tabla 3.4c se informan los porcentajes de homología si solo se considera el tipo de aminoácidos, es decir, se evalúa para cada posición de la secuencia que forma las hélices transmembranales el carácter aromático, polar, apolar, básico o ácido de los residuos. De nuevo se aprecian los mismos resultados que para la comparación de la

homología según la sustitución en cada posición. La comparación entre la rodopsina y los receptores dopaminérgicos muestran casi los mismos porcentajes que al comparar los receptores dopaminérgicos entre sí, esto indica claramente la importancia del tipo de residuo en cada posición de las hélices, especialmente la posición de algunos residuos como son los residuos de prolina en la secuencia aminoacídica entre la rH y los receptores dopaminérgicos.

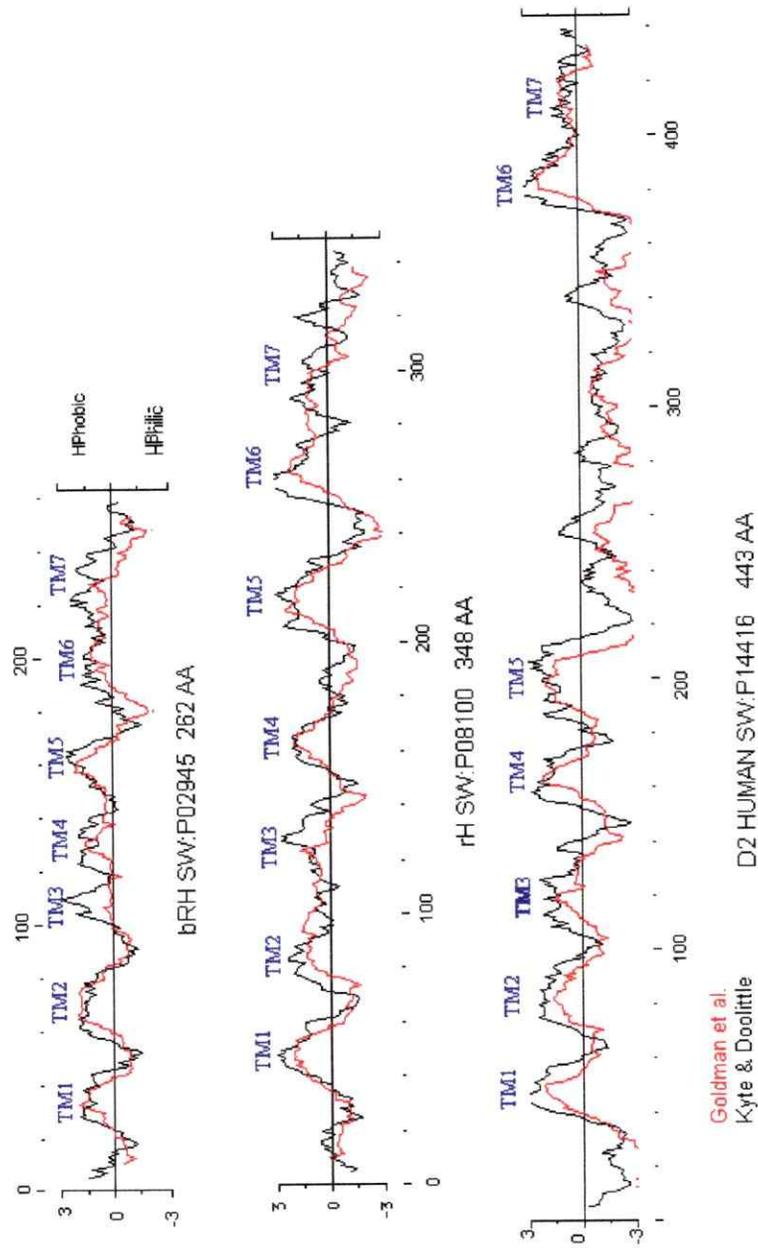
Al comparar los receptores dopaminérgicos entre sí (Tabla 3.4a), se aprecia claramente la diferencia entre los tipos D-1 y D-2. La homología entre ambos tipos de receptores dopaminérgicos sólo alcanza un 42 %, lo que subraya la división entre los dos tipos. El tipo D-1 presenta una mayor homología entre las secuencias de sus receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, mientras los receptores del tipo D-2 (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>) presentan una menor homología. En la Tabla 3.5 se presenta la homología o identidad para las regiones transmembranales. La homología aumenta al 82% para el tipo D-1 sólo comparando estas zonas y una muestra valores de entre 52% y 77% para el tipo D-2. El aumento de la homología en los segmentos transmembranales para este último tipo de receptores es menor al que presenta el tipo D-1, alcanzando sólo un 10% para el D<sub>4</sub> y aproximadamente un 16% para el D<sub>3</sub>. Esta menor homología en las zonas transmembranales podría dar cuenta de las desviaciones mostradas por el receptor D<sub>4</sub> en sus propiedades farmacológicas con respecto a los otros receptores del tipo D-2. Las diferencias se encuentran sobre todo en las hélices donde estarían los residuos del sitio putativo de unión como son las TM2, TM3 y TM5. Por otra parte, la homología de las TMs depende fuertemente del largo asignado a la TM analizada. A mayor número de aminoácidos utilizados en el análisis, menor es la homología. En este caso se utilizó 26 residuos como largo de la TM. La disminución de la homología se debería principalmente a que aquellos residuos que estarían al comienzo y al final de cada hélice  $\alpha$  están menos conservados dentro de las secuencias.

**Tabla 3.5** Porcentajes de identidad en la comparación de los distintos receptores dopaminérgicos para cada segmento de la transmembrana.

|              | TM1 | TM2 | TM3 | TM4 | TM5 | TM6 | TM7 |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>D1/D2</b> | 46  | 69  | 65  | 26  | 35  | 38  | 38  |
| <b>D1/D5</b> | 65  | 77  | 92  | 61  | 92  | 92  | 92  |
| <b>D1/D3</b> | 38  | 58  | 57  | 15  | 34  | 31  | 35  |
| <b>D2/D3</b> | 50  | 96  | 96  | 65  | 73  | 81  | 77  |
| <b>D2/D4</b> | 35  | 65  | 65  | 42  | 42  | 42  | 69  |
| <b>D3/D4</b> | 38  | 65  | 65  | 38  | 42  | 38  | 77  |

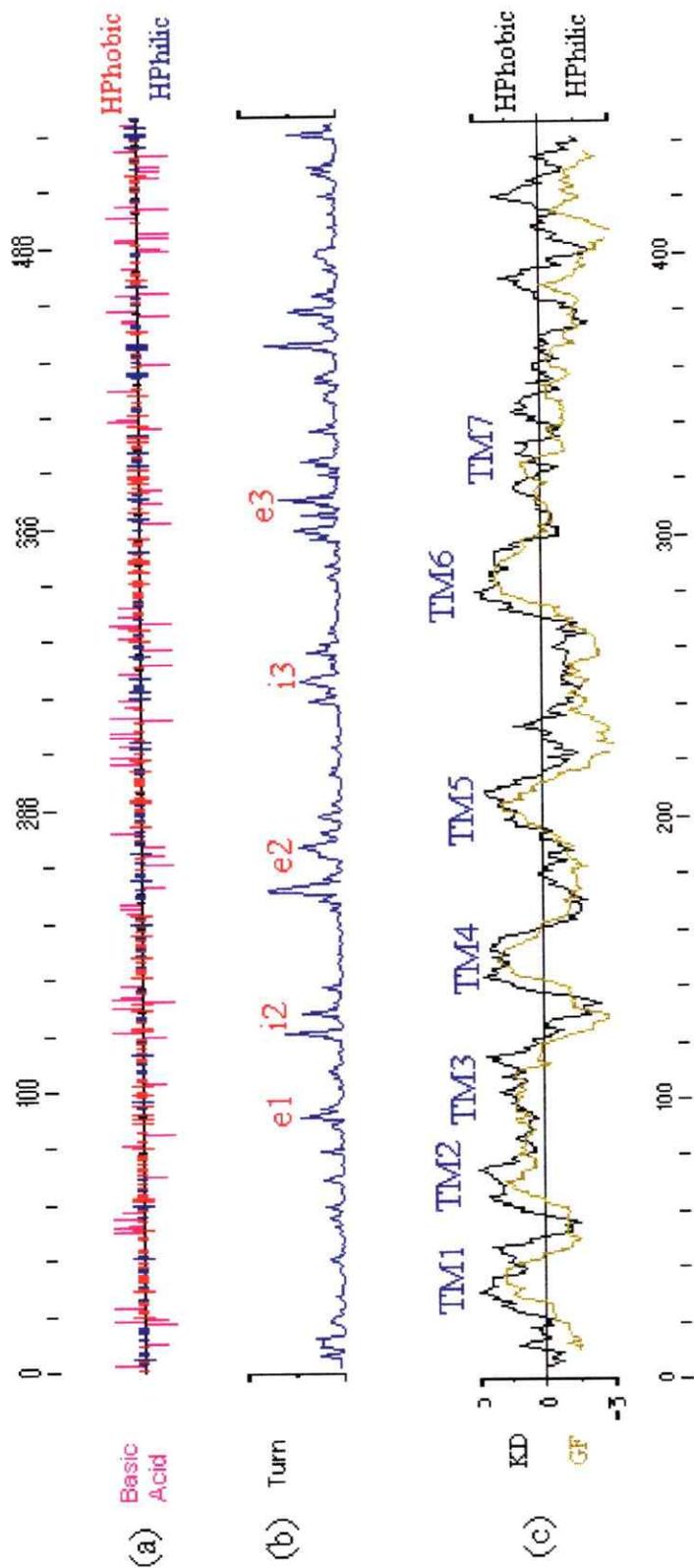
La comparación de los perfiles de hidrofobicidad para la bRh, rH y el receptor D<sub>2</sub> se muestra en la figura 3.3. Los perfiles de rH y bRh presentan 7 segmentos hidrofóbicos de largo suficiente para formar hélices  $\alpha$  transmembranales. Para el receptor D<sub>2</sub> sólo se observa 6 picos bien definidos; el último de estos segmentos, que correspondería a la TM7, poseería un bajo carácter hidrofóbico, por lo cual no se destaca claramente en el perfil. La comparación de estos perfiles de hidrofobicidad muestra que existiría una topografía similar para estos receptores debido a la presencia de 7 segmentos hidrofóbicos.

Las figuras 3.4 y 3.5 muestran los resultados obtenidos al aplicar el programa PEPLOT a la estructura primaria de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2A</sub>, respectivamente. Los perfiles de hidrofobicidad muestran claramente 6 picos, que corresponderían a los seis primeros segmentos putativamente transmembranales. El último de estos segmentos presenta un menor grado de hidrofobicidad.



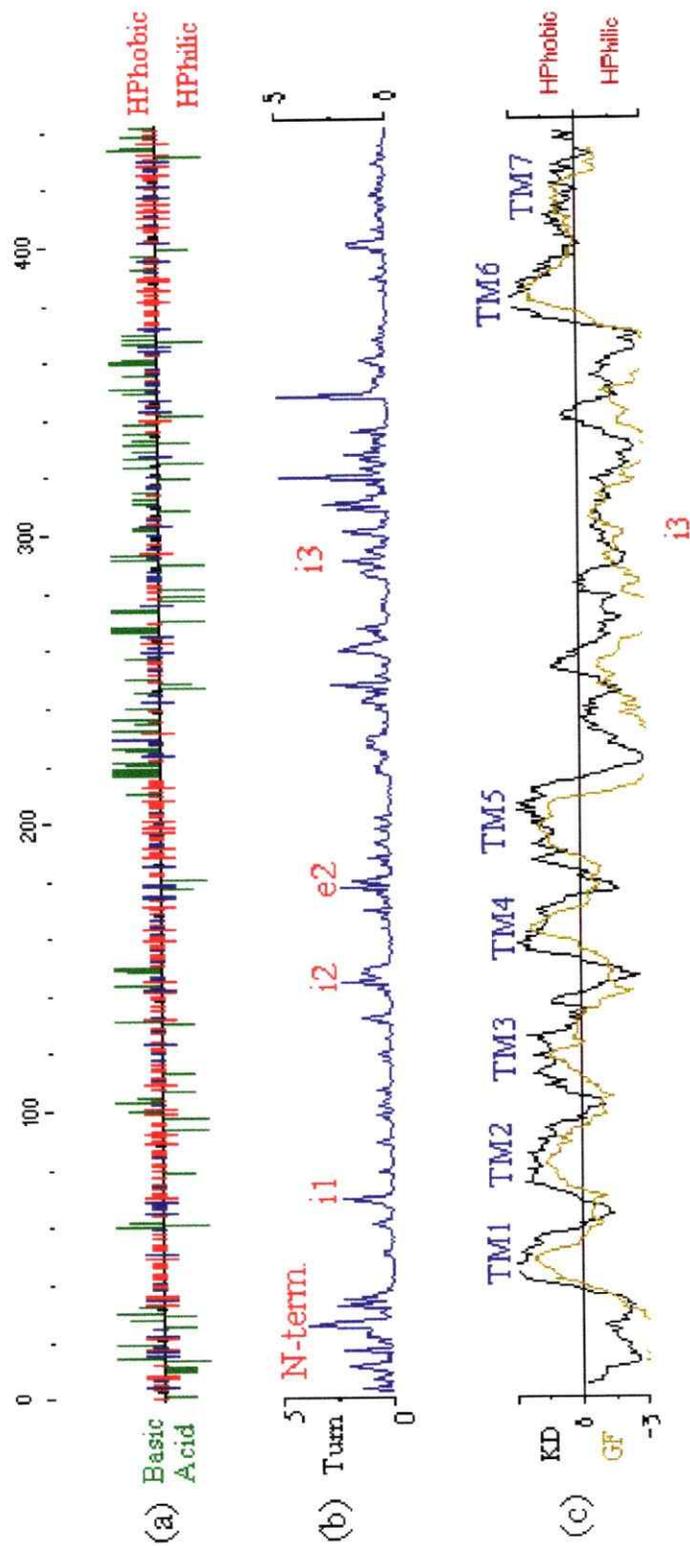
**Figura 3.3** Comparación de los perfiles de hidrofobicidad para las proteínas bacteriorodopsina (bRh), rodopsina (rH) y D<sub>2</sub>. Estos perfiles fueron obtenidos usando dos escalas: Goldman y col [22] y Kyte y Doolittle [23]. También se muestra el número de la secuencia en la base de datos “Swiss-Protein Data Bank” y el largo de la secuencia con el número de residuos de aminoácidos (AA).

PEPLOT of sw.p21728 1 a 446  
 P21728 homo sapiens (human). receptor dopaminérgico d1(1a)



**Figura 3.4** Resultados del Programa PEPLOT para el receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>. (a) Distribución a lo largo de la secuencia de aminoácidos ácidos y básicos, hidrofílicos e hidrofóbicos. (b) Predicción de la vuelta realizada a través del algoritmo de Chou y Fasman; se muestran las zonas de los lazos que corresponderían a las vueltas predichas. (c) Perfil de hidrofobicidad: se muestra cada una de las zonas de las TM, obtenidas usando dos escalas: Goldman y col. [22] y Kyte y Doolittle [23].

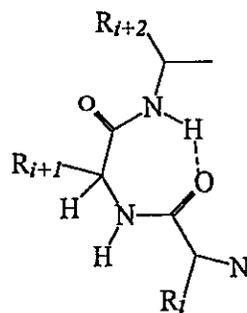
PEPLOT of sw:p14416 1 to 443  
 P14416 homo sapiens (human). d(2) dopamine receptor



**Figura 3.5** Resultados del Programa PEPLOT para el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>. (a) Distribución a lo largo de la secuencia de aminoácidos ácidos y básicos, hidrofílicos e hidrofóbicos. (b) Predicción de la vuelta realizada a través del algoritmo de Chou y Fasman; se muestran las zonas de los lazos que corresponderían a las vueltas predichas. (c) Perfil de hidrofobicidad: se muestra cada una de las zonas de las TM, obtenidas usando dos escalas: Goldman et al [22] y Kyte y Doolittle [23].

El perfil para el receptor  $D_1$  presenta un corto lazo intracelular 3, lo que se ve reflejado en una pequeña separación entre los segmentos 5 y 6. También presenta un largo segmento carboxilo-terminal, lo cual es característico de este tipo de receptor. Para el  $D_2$  se aprecia una mayor separación entre las TM5 y TM6 que corresponde al lazo intracelular 3 y también un corto segmento carboxilo-terminal. Esto no sólo muestra la división de ambas familias en cuanto a la estructura de los receptores individuales, sino que muestra la división de sus funciones. El lazo intracelular 3 de los RAPG se encuentra en la región de unión a la proteína G, por lo cual ambas subfamilias dopaminérgicas interactuarían en forma diferente con dicha proteína G. En general, los receptores del tipo  $D_1$  interactúan con la proteína  $G_s$  y los del tipo  $D_2$  con las  $G_i/G_o$  [2], lo que produce diferentes respuestas farmacológicas.

También en las Figuras 3.4b y 3.5b se muestra la predicción de un rasgo de las estructuras secundarias como son las vueltas. Una vuelta es una unión entre dos segmentos próximos de la estructura secundaria y puede estar formado por 3 (ver 1) ó 4 residuos de aminoácidos. Estas estructuras generalmente se encuentran en la superficie de la proteína. La vuelta con tres residuos aminoácidos se denomina "vuelta  $\gamma$ " y la que contiene 4 residuos se denomina vuelta  $\beta$ .



1

Para el receptor  $D_1$  estas vueltas se predicen en los lazos extra- e intracelulares, existiendo un gran número en el segmento carboxi-terminal. Por el contrario, para el receptor  $D_2$  el amino-terminal está constituido en su mayoría por este tipo de estructura secundaria a pesar de su corto tamaño, de sólo 36 aminoácidos. El segmento carboxi-terminal no presentó ninguna vuelta en el receptor  $D_2$ . Para los lazos conectivos, sólo un

lazo extracelular (e2) presenta una vuelta, pero este rasgo se encuentra en los tres lazos intracelulares. En el lazo intracelular 3 (i3) hay una gran cantidad de este tipo de estructura, por lo cual sería casi la única estructura secundaria presente.

La predicción de estructura secundaria para proteínas insertas en la membrana es bastante reciente en el área de la biología molecular. En las tablas 3.6a y 3.6b se muestran los resultados obtenidos para la predicción de la secuencia transmembranal de los receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. El programa PHDTopology predice siete TM para ambos receptores. Los resultados muestran los residuos involucrados en las TM. Sin embargo, las TMs predichas son cortas, con sólo 22 residuos por TM, ya que el programa disminuye el largo de aquellas hélices muy largas. Además la predicción del principio y el fin de las hélices no está definida debido a su carácter más polar con respecto al resto de la transmembrana. Esto se explica por las interacciones entre los residuos de aminoácidos en las posiciones terminales con las cabezas polares de los fosfolípidos que integran la membrana como también su interacción con el medio extra- o intracelular. Se ha planteado la hipótesis que las TMs deberían tener como mínimo un total de 26 residuos aminoácidos, dado que una hélice de este largo (aproximadamente 35 Å) permitiría cruzar la membrana. Las regiones transmembranales mejor predichas son las TM4 y TM7, siendo la TM1 la que tiene el menor porcentaje de probabilidad. El mayor porcentaje de probabilidad para la TM7 contrasta con el bajo carácter hidrofóbico presentado en su perfil de hidrofobicidad. En conjunto con los resultados de la predicción de la estructura, el programa entrega como resultado una alineación múltiple de secuencias, desde las que poseen un mayor a menor porcentaje de homología.

**Tabla 3.6a** Predicción de los segmentos transmembranales para el receptor D<sub>1</sub> y la utilización de la secuencia en el modelo.

| TM | Predicción de TM <sup>a</sup> | Probabilidad porcentual <sup>b</sup> | Secuencia de la TM <sup>c</sup> |
|----|-------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 1  | 26 - 47 (22)                  | 66.9                                 | 24 - 49                         |
| 2  | 63 - 84 (22)                  | 77.4                                 | 60 - 85                         |
| 3  | 99 - 119 (21)                 | 80.9                                 | 97 - 122                        |
| 4  | 142 - 159 (18)                | 83.9                                 | 138 - 163                       |
| 5  | 196 - 215 (20)                | 70.5                                 | 193 - 218                       |
| 6  | 276 - 293 (18)                | 73.6                                 | 270 - 295                       |
| 7  | 312 - 330 (18)                | 86.7                                 | 311 - 336                       |

a. ( ) indica el número de aminoácidos predichos para cada TM. b. Probabilidad porcentual de la predicción para cada TM obtenida con el programa PHDTopology. c. Indica el segmento de la secuencia que compone cada transmembrana para el modelo del receptor D<sub>1</sub>.

**Tabla 3.6b.** Predicción de los segmentos transmembranales para el receptor D<sub>2</sub> y la utilización de la secuencia en el modelo.

| TM | Predicción de TM <sup>a</sup> | Probabilidad Porcentual <sup>b</sup> | Secuencia de la TM <sup>c</sup> |
|----|-------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 1  | 37 - 58 (22)                  | 64.8                                 | 35 - 60                         |
| 2  | 73 - 92 (20)                  | 75.1                                 | 67 - 92                         |
| 3  | 110 - 129 (20)                | 78.6                                 | 108 - 133                       |
| 4  | 153 - 170 (18)                | 84.5                                 | 150 - 175                       |
| 5  | 191 - 211 (21)                | 68.5                                 | 187 - 212                       |
| 6  | 378 - 395 (18)                | 71.7                                 | 371 - 396                       |
| 7  | 407 - 424 (18)                | 81.6                                 | 405 - 430                       |

a. ( ) indica el número de aminoácidos predichos para cada TM. b. Probabilidad porcentual de la predicción para cada TM obtenida con el programa PHDTopology. c. Indica el segmento de la secuencia que compone cada transmembrana para el modelo del receptor D<sub>2A</sub>.

Se utilizó esta alineación para determinar el principio y fin de cada segmento. Además, se utilizaron los resultados presentados por Baldwin [33], quien alineó todas las secuencias de los receptores acoplados a proteína G que estaban disponibles en las bases de datos (alrededor de 200 secuencias), incluso de aquellos receptores para los que se desconoce el ligando. Baldwin utilizó un conjunto de 105 secuencias únicas, en las cuales definió dos clases de residuos entre todos los tipos que existen, clase A: los residuos que pueden estar en contacto con la membrana, y clase B: aquellos que estarían orientados hacia el interior del receptor, es decir, polares y cargados. Los siete segmentos fueron determinados por perfiles de hidrofobicidad y el principio y final se determinó cuando la homología en la alineación múltiple de la secuencia era mayor a un 85%. Los resultados obtenidos con los programas PHD fueron consecuentes con los presentados por Baldwin en la posición de los segmentos, por lo cual al principio y al final de cada segmento se incluyó el número de aminoácidos necesarios para formar un segmento de 26 residuos.

En la Tabla 3.7 se muestra la múltiple alineación de secuencias obtenida al realizar el programa PHDtopology. Esta alineación se utilizó para determinar el número de variabilidad y el momento de conservación para cada TM de los receptores. Además, se obtuvieron los gráficos de conservación basados en estos resultados.

Los receptores acoplados a proteínas G presentan hélices anfifílicas por estar insertos en la membrana. Estas hélices estarían expuestas a diferentes ambientes: una zona o cara de la TM está expuesta a la membrana altamente hidrofóbica, otra al interior del receptor y una porción que participa en la interacción con las hélices adyacentes. Se puede definir como una fase de la hélice aquella zona de ésta que está expuesta al mismo medio o que presenta la misma característica, ya sea hidrofóbica o hidrofílica.

**Tabla 3.7** Secuencia<sup>a</sup> de las regiones transmembranales para la familia de RAPG dopaminérgicos. En negro se muestran los residuos conservados en toda la secuencia. En azul se presentan los residuos conservados sólo en el tipo D-1 y en rojo los residuos conservados en el tipo D-2

|         |  | TM1   | TM2  |
|---------|--|---|--|
| D1 Hum. |  | IL <b>TAC</b> FLS <b>LL</b> IL <b>STLL</b> GN <b>TLVCAAVI</b>   | KVTN <b>F</b> VI <b>S</b> LA <b>VSD</b> LL <b>VAVLVMPWKA</b>   |
| D5 Hum. |  | V <b>V</b> T <b>AC</b> LL <b>LL</b> II <b>WTLL</b> GN <b>VLVCAAIV</b>   | NMTN <b>V</b> F <b>I</b> V <b>S</b> LA <b>VSD</b> LF <b>VAVLVMPWKA</b>   |
| D2 Rat. |  | NY <b>Y</b> AT <b>LL</b> LL <b>LI</b> AV <b>IVF</b> GN <b>VLVCM</b> AV <b>S</b>   | <b>TT</b> T <b>N</b> Y <b>LI</b> <b>V</b> S <b>LAVAD</b> LL <b>VAVLVMPWV</b>   |
| D3 Hum. |  | AY <b>Y</b> AL <b>S</b> Y <b>C</b> AL <b>IL</b> AI <b>I</b> F <b>G</b> N <b>GLVCAA</b> VL   | <b>TT</b> T <b>N</b> Y <b>LL</b> <b>V</b> S <b>LAVAD</b> LL <b>VAVLVMPWV</b>   |
| D4 Hum. |  | AA <b>L</b> V <b>G</b> V <b>L</b> L <b>I</b> GA <b>V</b> LA <b>G</b> N <b>SLVC</b> VS <b>VA</b>   | <b>T</b> P <b>T</b> N <b>S</b> F <b>I</b> <b>V</b> S <b>LAAAD</b> LL <b>LALLVLP</b> LF <b>V</b>  |
|         |  | 12345678901234567890123456  | 12345678901234567890123456   |
|         |  | TM3   | TM4  |
| D1 Hum. |  | NI <b>W</b> V <b>A</b> F <b>D</b> IM <b>C</b> ST <b>AS</b> IL <b>N</b> LC <b>V</b> IS <b>V</b> DR <b>Y</b>  | KA <b>A</b> F <b>I</b> L <b>I</b> S <b>V</b> A <b>W</b> T <b>L</b> S <b>V</b> L <b>I</b> S <b>F</b> I <b>P</b> V <b>Q</b> L <b>S</b> W         |
| D5 Hum. |  | D <b>V</b> W <b>V</b> A <b>F</b> DI <b>M</b> C <b>S</b> T <b>AS</b> IL <b>N</b> LC <b>V</b> IS <b>V</b> DR <b>Y</b>                                     | RM <b>A</b> L <b>M</b> M <b>V</b> GL <b>A</b> W <b>T</b> L <b>S</b> I <b>L</b> I <b>S</b> F <b>I</b> P <b>V</b> Q <b>L</b> N <b>W</b>          |
| D2 Hum. |  | <b>D</b> I <b>F</b> V <b>T</b> LD <b>V</b> M <b>M</b> C <b>T</b> AS <b>ILN</b> LC <b>A</b> IS <b>I</b> DR <b>Y</b>                                      | <b>RR</b> V <b>T</b> VM <b>I</b> S <b>I</b> V <b>W</b> V <b>L</b> S <b>F</b> T <b>I</b> S <b>C</b> PL <b>L</b> F <b>G</b> L <b>N</b>           |
| D3 Rat. |  | <b>D</b> V <b>F</b> V <b>T</b> LD <b>V</b> M <b>M</b> C <b>T</b> AS <b>ILN</b> LC <b>A</b> IS <b>I</b> DR <b>Y</b>                                      | <b>RR</b> V <b>A</b> VM <b>I</b> T <b>A</b> V <b>W</b> V <b>L</b> A <b>F</b> AV <b>S</b> C <b>P</b> L <b>L</b> F <b>G</b> F <b>N</b>           |
| D4 Hum. |  | <b>D</b> AL <b>M</b> AM <b>D</b> V <b>M</b> L <b>C</b> T <b>AS</b> I <b>F</b> N <b>L</b> C <b>A</b> IS <b>V</b> DR <b>F</b>                             | <b>RR</b> Q <b>L</b> L <b>L</b> I <b>G</b> AT <b>W</b> V <b>L</b> S <b>A</b> AV <b>A</b> A <b>P</b> V <b>L</b> C <b>G</b> L <b>N</b>           |
|         |  | 12345678901234567890123456  | 12345678901234567890123456   |
|         |  | TM5   | TM6  |
| D1 Hum. |  | <b>TY</b> A <b>I</b> SS <b>S</b> V <b>I</b> S <b>F</b> Y <b>I</b> P <b>V</b> A <b>Y</b> M <b>I</b> V <b>T</b> Y <b>T</b> R <b>I</b> Y                   | <b>VL</b> K <b>T</b> L <b>S</b> V <b>I</b> M <b>G</b> V <b>F</b> V <b>C</b> W <b>L</b> P <b>F</b> F <b>I</b> L <b>N</b> C <b>I</b> L           |
| D5 Hum. |  | <b>TY</b> A <b>I</b> SS <b>S</b> L <b>I</b> S <b>F</b> Y <b>I</b> P <b>V</b> A <b>I</b> M <b>I</b> V <b>T</b> Y <b>T</b> R <b>I</b> Y                   | <b>VL</b> K <b>T</b> L <b>S</b> V <b>I</b> M <b>G</b> V <b>F</b> V <b>C</b> W <b>L</b> P <b>F</b> F <b>I</b> L <b>N</b> C <b>M</b> V           |
| D2 Hum. |  | AF <b>V</b> Y <b>S</b> S <b>I</b> V <b>S</b> F <b>Y</b> V <b>P</b> F <b>I</b> V <b>T</b> LL <b>V</b> Y <b>I</b> K <b>I</b> Y                            | <b>A</b> T <b>Q</b> M <b>L</b> A <b>I</b> V <b>L</b> G <b>V</b> F <b>I</b> C <b>W</b> L <b>P</b> F <b>F</b> I <b>T</b> H <b>I</b> L <b>N</b>   |
| D3 Rat. |  | DF <b>V</b> I <b>Y</b> S <b>S</b> V <b>V</b> S <b>F</b> Y <b>V</b> P <b>F</b> G <b>V</b> T <b>V</b> L <b>V</b> Y <b>A</b> R <b>I</b> Y                  | <b>A</b> T <b>Q</b> M <b>V</b> V <b>I</b> V <b>L</b> G <b>V</b> F <b>I</b> V <b>C</b> W <b>L</b> P <b>F</b> F <b>L</b> T <b>H</b> V <b>L</b> N |
| D4 Hum. |  | D <b>Y</b> V <b>V</b> Y <b>S</b> S <b>V</b> C <b>S</b> F <b>L</b> P <b>C</b> P <b>L</b> M <b>L</b> L <b>L</b> Y <b>W</b> A <b>T</b> F                   | <b>A</b> M <b>R</b> V <b>L</b> P <b>V</b> V <b>G</b> A <b>F</b> F <b>L</b> C <b>W</b> T <b>P</b> F <b>F</b> V <b>V</b> H <b>I</b> T <b>Q</b>   |
|         |  | 12345678901234567890123456  | 12345678901234567890123456   |
|         |  | TM7   |  |
| D1 Hum. |  | N <b>T</b> F <b>D</b> V <b>F</b> V <b>W</b> F <b>G</b> W <b>A</b> N <b>S</b> S <b>L</b> N <b>P</b> I <b>I</b> Y <b>A</b> F <b>N</b> A <b>D</b>          |  |
| D5 Hum. |  | <b>T</b> T <b>F</b> D <b>V</b> F <b>V</b> W <b>F</b> G <b>W</b> A <b>N</b> S <b>S</b> L <b>N</b> P <b>V</b> I <b>I</b> Y <b>A</b> F <b>N</b> A <b>D</b> |  |
| D2 Hum. |  | V <b>L</b> Y <b>S</b> A <b>F</b> T <b>W</b> L <b>G</b> Y <b>V</b> N <b>S</b> A <b>V</b> N <b>P</b> I <b>I</b> Y <b>T</b> F <b>N</b> I                   |  |
| D3 Rat. |  | E <b>L</b> Y <b>R</b> A <b>T</b> T <b>W</b> L <b>G</b> Y <b>V</b> N <b>S</b> A <b>L</b> N <b>P</b> V <b>I</b> Y <b>T</b> F <b>N</b> V                   |  |
| D4 Hum. |  | R <b>L</b> V <b>S</b> A <b>V</b> T <b>W</b> L <b>G</b> Y <b>V</b> N <b>S</b> A <b>L</b> N <b>P</b> V <b>I</b> Y <b>T</b> V <b>F</b> N <b>A</b>          |  |
|         |  | 12345678901234567890123456  |  |

a.- Se presentan sólo las secuencias de los receptores dopaminérgicos humanos, con la excepción del D<sub>3</sub>. No se muestra el resto de las secuencias de receptores dopaminérgicos conocidas.

En la Tabla 3.8 se analiza el porcentaje de conservancia para cada TM. Como ya se ha discutido, las que presentarían una mayor conservancia sería las TM 2, 3 y 5. Pero la mayor diferencia se basa en que las TM 2 y 3 no poseen una cara o fase conservada, sino más bien los aminoácidos conservados se encuentran sobre todas las caras de la hélice. Para la TM 5, que presenta el mayor porcentaje de conservancia, existe claramente una cara conservada. Para la TM 4, que posee el menor porcentaje, esto implicaría que muy pocos de sus residuos estarían participando en la interacción droga-receptor, lo que daría cuenta de que la TM 4 estaría más expuesta al ambiente lipídico de la membrana que el resto de las hélices. Esto se ilustra en la proyección estructural de la rH donde esta hélice está más expuesta al medio.

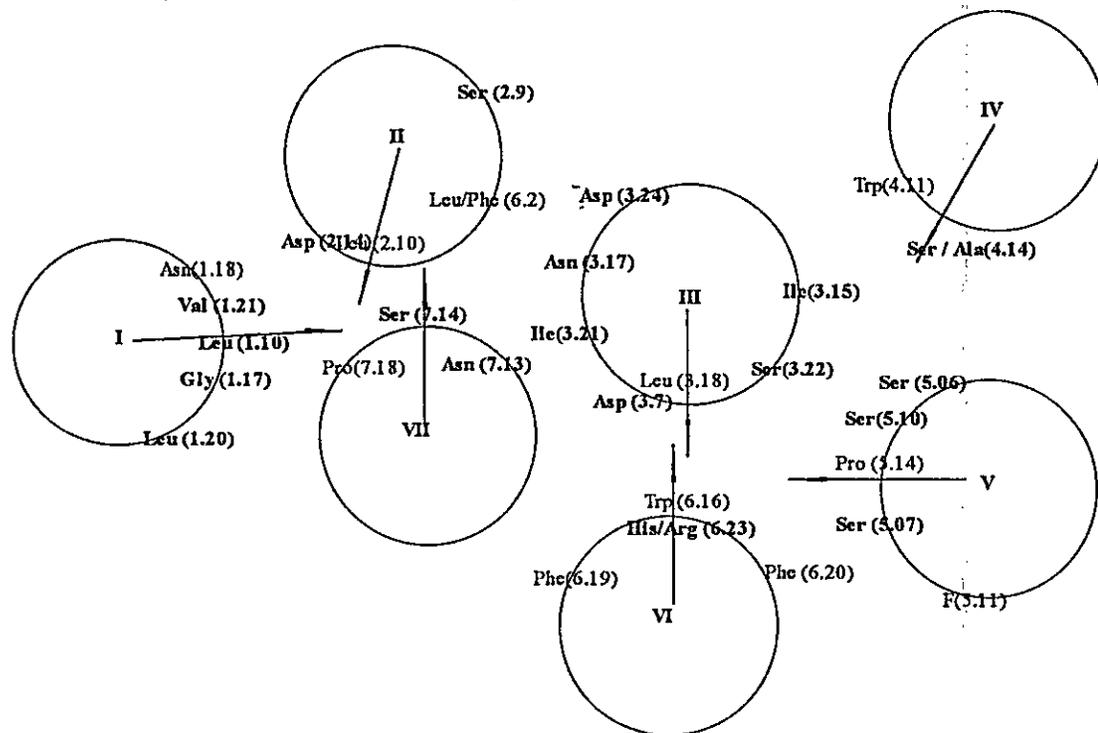
**Tabla 3.8** Porcentaje de conservancia para cada una de las hélices transmembranales de los receptores dopaminérgicos.

| %  | TM1 | TM2 | TM3 | TM4 | TM5 | TM6 | TM7 |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cj | 27  | 42  | 46  | 8   | 50  | 27  | 27  |

Las hélices 1, 4, 6 y 7 son hélices anfifílicas, y además exhiben una menor conservancia, es decir, una mayor variabilidad en cada posición de la secuencia. Si analizamos esta definición desde la conservación de los residuos dentro de la múltiple secuencia, esto significa que para las hélices 2 y 3, los residuos no están conservados sobre una fase sino sobre todas las fases de la hélice. Esto implica que las distintas caras de las hélices 2 y 3 pueden estar expuestas a la capa lipídica en diferentes conformaciones del receptor (ver Figura 3.6). Para la TM5, que exhibe una mayor conservancia que las hélices 2 y 3, los residuos conservados están sólo sobre una cara de la hélice creando una fase conservada. Para las hélices 1, 6 y 7 los residuos conservados también se encuentran sobre una cara de la hélice generando una fase conservada. La TM4 sólo presenta un residuo conservado en todo el largo de la secuencia de la transmembrana, lo que evidencia que esta TM estaría más expuesta a la membrana que el resto del receptor, por lo cual los residuos no son conservados y se observa una mayor variabilidad de éstos al

interactuar con la membrana. Entonces la pregunta es cómo orientar todas las hélices dentro del receptor. No es suficiente la hipótesis planteada inicialmente, es decir, la orientación de las hélices dentro del receptor hace que las zonas o caras polares estén orientadas hacia el centro (corazón) del receptor. Una hipótesis adicional razonable es que la cara de la hélice con mayor conservancia debe estar orientada hacia el interior del receptor, o bien el momento de conservancia debe apuntar hacia el interior del receptor (ver figura 3.6).

En las Figuras 3.7a y b se muestran las orientaciones relativas verticales entre las TMs para ambos tipos de receptores. Además de mostrar la orientación relativa entregan información sobre la posición de los residuos polares, apolares y aromáticos dentro de cada una de las TM para ambos receptores, y además muestran la posición donde el receptor D<sub>3</sub> difiere en su secuencia del tipo D<sub>2</sub>.



**Figura 3.6** Representación esquemática de la conservancia. La región de la transmembrana de los receptores dopaminérgicos es vista desde el lado intracelular. El arreglo de las TMs sigue la dirección de los punteros del reloj. Se muestran aquellos residuos que son conservados en todas los receptores dopaminérgicos. La numeración de los residuos indica a que transmembrana pertenecen y luego su posición en ella.

|     |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|-----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| TM1 |    |    | *T | A  | *C |    | L  |   | L  | L  | I  |    |    | *T | L  | L  | *G | *N |    | L  | V  | *C | A  | A  |    |    |   |
| TM2 |    |    | *T | *N |    | #F |    |   |    | *S | L  | A  | V  | *S | -D | L  |    | V  | A  | V  | L  | V  | M  | P  | #W | +K | A |
| TM3 |    |    | #W | V  | A  | #F | -D | I | M  | *C | *S | *T | A  | *S | I  | L  | *N | L  | *C | V  | I  | *S | V  | -D | +R | *Y |   |
| TM4 |    |    | A  | #  |    |    |    |   |    | A  | #W | *T | L  | *S |    | L  | I  | *S | #F | I  | P  | V  | *Q | L  |    | #W |   |
| TM5 | *T | *Y | A  | I  | *S | *S | *S |   | I  | *S | #F | *Y | I  | P  | V  | A  |    | M  | I  | V  | T  | *Y | *T | +R | I  | *Y |   |
| TM6 | V  | L  | +K | *T | L  | *S | V  | I | M  | *G | V  | F  | V  | *C | *C | #W | L  | P  | #F | #F | I  | L  | *N | *C |    |    |   |
| TM7 |    | *T | #F | -D | V  | #F | V  | W | #F | *G | #W | A  | *N | *S | *S | L  | *N | P  |    | I  | *Y | A  | #F | *N | A  | -D |   |

Figura 3.7a Representación vertical de la conservación de los residuos en cada transmembrana para el sub-tipo D1. \* Indica residuos polares, + o - indica residuos cargados, # indica residuos aromáticos. En la figura se muestran los residuos conservados en este tipo (corresponden a los mostrados en azul en la Tabla 3.7) y en negrilla se indican los residuos conservados para ambos tipos.

|     |    |     |     |     |     |    |     |    |   |    |     |   |    |    |     |     |    |    |   |   |   |   |    |     |     |    |     |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|---|----|-----|---|----|----|-----|-----|----|----|---|---|---|---|----|-----|-----|----|-----|
| TM1 |    | &   | &   | &   |     |    |     |    |   | L  | I   |   |    |    |     | # & | *G | *N |   | L | V | C |    | &   | V   |    |     |
| TM2 | T  |     | *T  | *N  | # & |    | # & | V  | S | L  | A   | & | A  | -  | L   | L   | &  | A  | V | L | V | & | P  | # & | # & | V  |     |
| TM3 | -D |     | # & | * & | * & | -D | V   | M  | & | *C | *T  | A | S  | I  | # & | *N  | L  | C  | A | I | S | & | -D | +R  | # & |    |     |
| TM4 | R  | R   | &   |     | &   | &  | I   |    |   | &  | #W  | V | L  |    | &   |     |    | &  | & | P |   | L | #  | *G  |     | *N |     |
| TM5 |    | # & | V   |     | *Y  | *S | *S  |    | & | *S | F   | & | &  | P  | &   | # & |    | &  | & |   | L | & | *Y |     |     | &  | # & |
| TM6 | A  | &   | &   | &   |     |    | &   | V  | & | *G | &   | F | &  |    | *C  | W   | &  | P  | F | F | & | & | *H |     | &   | &  |     |
| TM7 |    | L   | # & |     | A   |    | *T  | #W | L | *G | #*Y | V | *N | *S | A   |     | *N | P  |   | I | Y | T | &  | #F  | *N  |    |     |

Figura 3.7b Representación vertical de la conservación de los residuos en cada transmembrana para el tipo D<sub>2</sub>. \* Indica residuos polares, + o - indica residuos cargados, & indica que sólo difiere en residuo de aminocácido del receptor D4 y # indica residuo aromático. En la figura se muestran los residuos conservados en este tipo (corresponden a los mostrados en azul en la Tabla 3.7) y en negrilla se indican los residuos conservados para ambos tipos.

### 3.4 CONCLUSIONES

En este capítulo se determinaron, a través de las secuencias primarias de los receptores dopaminérgicos, las zonas de la secuencia que están insertas en la membrana y que corresponderían a las hélices transmembranales para los dos receptores estudiados. Estas hélices transmembranales fueron obtenidas con un porcentaje de probabilidad mayor al 80%, que corresponde a cerca de 20 aminoácidos dentro de la hélice.

La topografía y orientación de las hélices transmembranales se determinaron a través de todas las secuencias disponibles para estos receptores, fuesen ellos humanos y/o de otras especies. La orientación preferida mostró que los aminoácidos conservados a lo largo de las secuencias se encontraban hacia el interior del receptor donde estarían ubicados los posibles sitios de unión.

La información obtenida en este capítulo es la base fundamental para la modelación de los receptores dopaminérgicos conjuntamente con la información con respecto a las estructuras de receptores transmembranales y a la modelación de hélices aisladas para realizar la modelación por homología de los receptores dopaminérgicos.

### Referencias

- 1.- J. W. Keibian y D. B. Calne, *Nature* 277, 93 (1978).
- 2.- J. A. Gingrich y M. G. Caron, *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 299 (1993).
- 3.- P. G. Strange, en "*CNS Neurotransmitters and Neuromulators. Dopamine*", Capítulo 4, páginas 64-76. T. W. Stone ed., CRC press, Inc. 1996, USA.
- 4.- F. J. Mosman Jr., L. C. Mahan, L. D. McVittie, C. R. Gerfen, y D. R. Sibley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 6723 (1990)
- 5.- A. Dearry, J. A. Gingrich, P. Falardeau, R. T. Fremeau Jr., M. D. Bates y M. G. Caron, *Nature* 347, 72 (1990).
- 6.- Q. Y. Zhou, D. K. Grandy, L. Thambi, J. A. Kushner, H. H. M van Tol, R. Cone, D. Pribnow, J. Salon, J. R. Bunzow y O. Civelli, *Nature* 347, 72 (1990).
- 7.- R. K. Sunahara, H. B. Niznik, D. M. Weiner, T. M. Stormann, M. R. Brann, J. L. Kennedy, J. E. Gelenter, R. Rozmahel, Y. Yang, Y. Israel, B. F. O'Dowd y P. Seeman, *Nature* 347, 80 (1990).
- 8.- R. K. Sunahara, H. C. Guan, B. F. O'Dowd, P. Seeman, L. G. Naurier, S. R. George, J. Torchia, H. H. M. van Tol y H. B. Niznik, *Nature* 350, 614 (1991).
- 9.- M. Tiberi, K. R. Jarvie, C. Silvia, P. Falardeau, J. A. Gingrich, N. Godinot, L. Bertrand, T. L. Yang-Feng, R. T. Fremeau Jr. y M. G. Caron, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 7491 (1991).
- 10.- P.H. Andersen, J.A. Gingrich, M.D. Bates, A. Dearry, P. Falardeau, S. E. Senogles y M. G. Caron, *TIPS* 11, 231 (1990).
- 11.- J. R. Bunzow, H. H. M. van Tol, D. K. Grand, P. Albert, J. Salon, M. Christie, C. A. Machida, K. A. Neve y O. Civelli, *Nature* 336, 783 (1988)
- 12.- P. Sokoloff, B. Giros, M. P. Martres, M. L. Bouthenet y J. C. Schwartz, *Nature* 347, 146 (1990).
- 13.- H. H. M. van Tol, J. R. Bunzow, H. C. Guan, R. K. Sunahara, P. Seeman, H. B. Niznik, *Nature* 350, 610 (1991)
- 14.- J. H. Meador-Woodruff, A. Mansour, J. R. Bunzow, H. H. M. van Tol, S. J. Watson Jr. y O. Civelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 7625 (1989)

- 15.- M. L. Bouthenet, E. Souil, M. P. Martres, P. Sokoloff, B. Giros, y J. C. Schwartz, *Brain Res.* **564**, 203 (1991).
- 16.- C. D. Strader, T. M. Fong, M. R. Tota y D. Underwood, *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101 (1994).
- 17.- C. D. Strader, R. A. Dixon, A. H. Cheung, M. R. Candelore, A. D. Blake y I. S. Sigal, *J. Biol. Chem* **262**, 16439 (1987)
- 18.- A. Manson, F. Meng, J. H. Meador-Woodruff, L. P. Taylor, O. Civelli y H. Abil, *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 205 (1992).
- 19.- D. Donnelly, M. S. Johnson, T. L. Blundell y J. Saunders, *FEBS Lett.* **251**, 109 (1989).
- 20.- D. Donnelly, J. B. C. Findlay y T. L. Blundell, *Receptors & Channels* **2**, 61 (1994).
- 21.- J. Deveraux, P. Haeberli y O. Smithies, *Nucleic Acid Res.* **12**, 387 (1984).
- 22.- S. B. Needleman y C. D. Wunsch, *J. Mol. Biol.* **48**, 443 (1970).
- 23.- J. Kyte y R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* **157**, 105 (1982).
- 24.- D. M. Engelman, T. A. Stertz y A. Goldman, *Ann. Rev. Biophys Chem.* **15**, 321 (1986).
- 25.- B. Rost y C. Sauder, *J. Mol. Biol.* **232**, 584 (1993).
- 26.- B. Rost y C. Sauder, *Proteins Structure Function and Genetics* **19**, 55 (1994).
- 27.- B. Rost, R. Casadio, P. Fariselli y C. Sander, *Protein Sci.* **4**, 521 (1995).
- 28.- P. Y. Chou y G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.* **115**, 135 (1977).
- 29.- P. Y. Chou y G. D. Fasman, *Biophys. J.* **26**, 367 (1979).
- 30.- M. F. Hibert, S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoflack y A. Bruinvels *TIPS* **14**, 7 (1993).
- 31.- F. X. Schertler, C. Villa, y R. Henderson, *Nature* **362**, 770 (1993).
- 32.- J. M. Baldwin, *EMBO J.* **12**, 1693 (1993).

## **CAPITULO 4**

### **MODELOS TRIDIMENSIONALES DE LOS RECEPTORES**

#### **DOPAMINÉRGICOS**

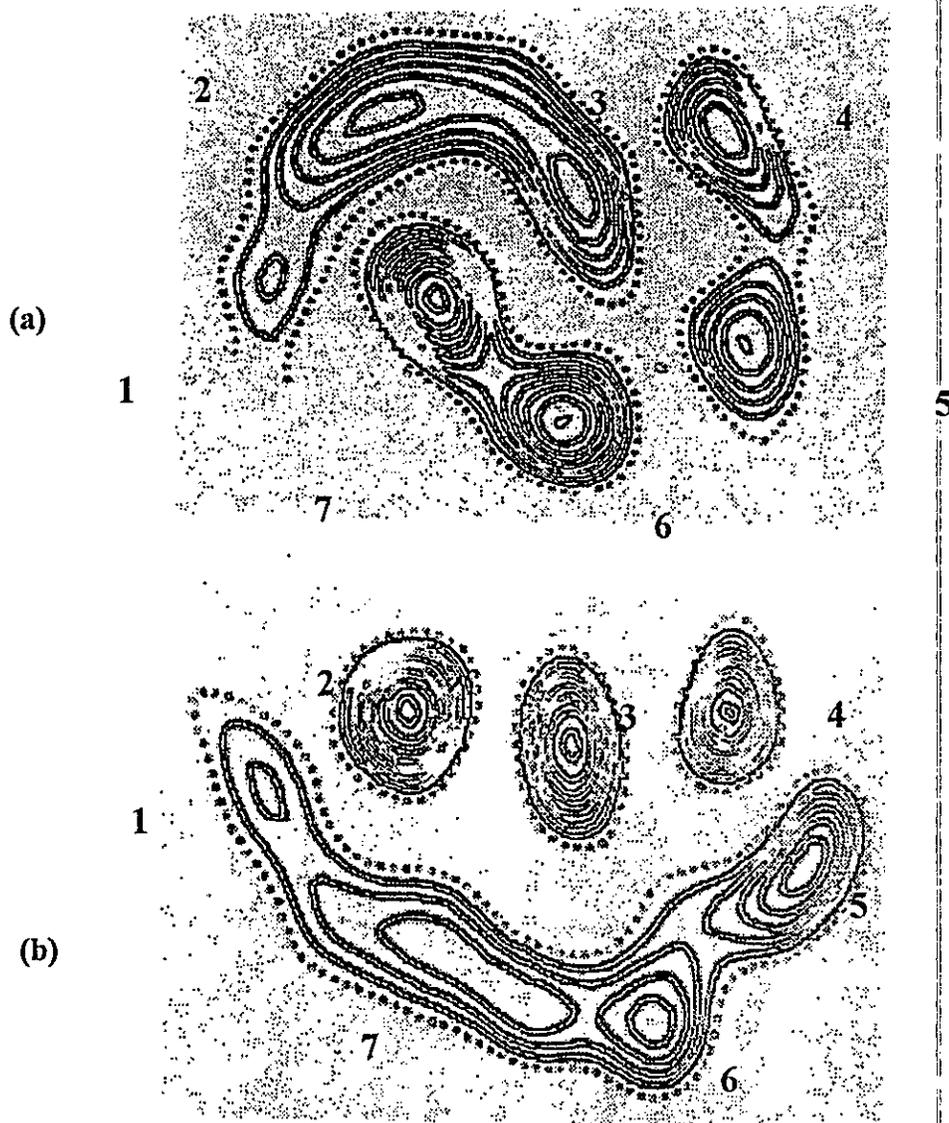
#### **INTERACCION DROGA-RECEPTOR.**

##### **4.1 INTRODUCCIÓN**

La inexistencia de una estructura cristalográfica de RAPG ha llevado a la utilización de la modelación por homología para poder desarrollar modelos estructurales tridimensionales. La utilización de esta técnica es sólo posible cuando exista un receptor o proteína de estructura tridimensional conocida (plantilla), con suficiente homología con el receptor en estudio, para su directa utilización como modelo de partida. Para los RAPG no existe aún una plantilla que posea una suficiente homología que permita aplicar esta técnica con un buen nivel de confiabilidad.

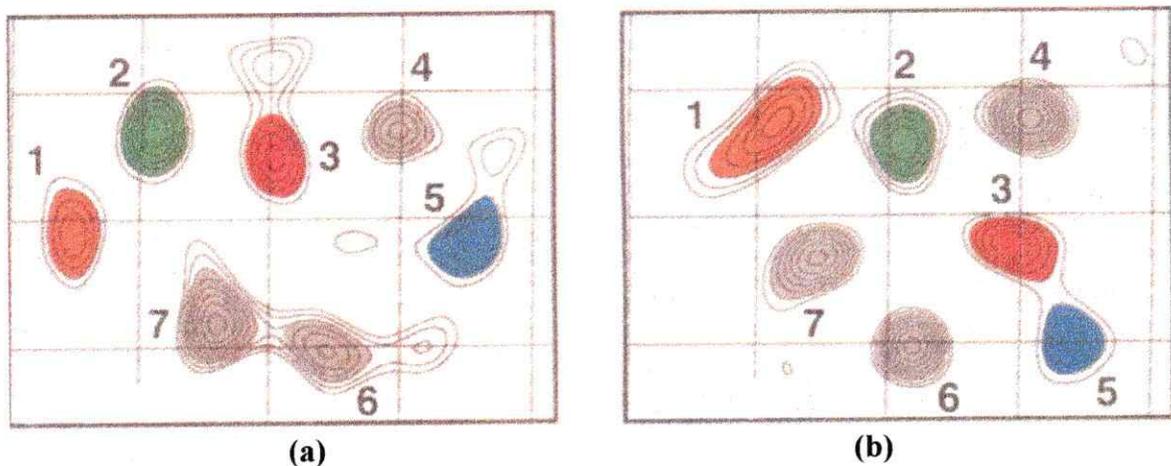
La estructura tridimensional de la bacteriorrodopsina (bRh) ha sido utilizada como plantilla para la modelación de varios RAPG, debido a que es una proteína inserta en una membrana bacteriana y presenta 7 segmentos hidrofóbicos [1]. Sin embargo, la bRh no está acoplada a una proteína efectora, y presenta una muy baja homología con los RAPG. La obtención de un mapa proyeeccional de baja resolución de la rodopsina bovina (rH, que sí es un RAPG) [2], conjuntamente con análisis de las secuencias aminoacídicas para esta superfamilia de receptores, ha puesto en duda la validez de seguir utilizando la

bRh como plantilla [3,4]. Una diferencia que es probablemente importante es que el conjunto de las hélices en rH es más compacto que el encontrado en la bRh (ver Fig. 4.1).



**Figura 4.1** Proyección de densidad de un solo receptor. (a) rodopsina a una resolución de 9Å y (b) bacteriorrodopsina a 7Å vistos desde el lado intracelular de la membrana [2]. La numeración de las hélices corresponde a la hipótesis planteada por Baldwin [3] para la rodopsina y a la planteada por Henderson para la bacteriorrodopsina [1]

La estructura obtenida para la rH no permite su utilización como plantilla a nivel atómico debido a su baja resolución. Sin embargo, el mapa proyeccional indicaría la posición relativa de las hélices en un arreglo espacial más general, por lo cual se ha utilizado su estructura como plantilla para definir el arreglo espacial de las hélices en la membrana, determinándose que las hélices 1, 4 y 5 estén más expuestas al entorno lipídico y que la hélice 3 esté localizada más cerca del núcleo del receptor, con 4 hélices perpendiculares a la membrana (4, 5, 6 y 7) y tres de ellas con un cierto grado de inclinación (1, 2 y 3). La numeración de las hélices se basa en la hipótesis planteada por Baldwin [3]. Después del desarrollo de los modelos dopaminérgicos presentados en esta tesis, Unger y col. [5] obtuvieron un mapa de la rodopsina con una resolución de 7,5 Å en el plano de la membrana y 16,5 Å en el plano normal a ésta (ver Fig. 4.2).



**Figura 4.2** Mapa proyeccional de rodopsina a 7,5 Å de resolución en dos zonas. (a) cercana al lado citoplasmático y (b) al lado extracelular [5]. Las líneas representan longitudes de 10 Å.

Los picos de densidad representan las siete hélices transmembranales, considerando la asignación de las hélices realizada por Baldwin [3], pero no fue posible confirmar la asignación de dichos picos. La proyección confirma que por lo menos tres de las hélices, las 4, 6 y 7, son las más perpendiculares al plano medio de la membrana (con un menor

grado de inclinación) y que las cuatro hélices restantes, que no habían sido asignadas en la proyección previa, están inclinadas.

Se define el ángulo de inclinación ( $\phi$ ) como el ángulo que se forma entre el eje de la hélice y una recta perpendicular al plano medio de la membrana. Los ángulos de inclinación para las hélices 4, 6 y 7 son de  $3,8^\circ$ ;  $7,4^\circ$  y  $13,4^\circ$  respectivamente. Para las hélices 1, 2, 3 y 5, los ángulos de inclinación son  $28,4^\circ$ ;  $27,2^\circ$ ;  $29,6^\circ$  y  $22,7^\circ$ . En la Figura 4.2 se muestra las proyecciones de la rodopsina hacia los lados extracelular y citoplasmático del receptor rH: se aprecia que el lado extracelular muestra la misma orientación que el mapa a  $9 \text{ \AA}$ ; la diferencia se produce en el lado intracelular del receptor donde se aprecia un acercamiento entre las hélices 3 y 5. Las hélices están más empaquetadas y menos organizadas hacia el lado intracelular, y sólo hacia el lado extracelular estarían formando la cavidad de unión del ligando las hélices 3, 4, 5, 6 y 7 [5]. La proyección observada en el lado extracelular es muy parecida a la utilizada en la construcción del modelo, por lo cual la modelación de los receptores dopaminérgicos realizada en esta tesis conserva su validez.

La estructura tridimensional de estos receptores crearía un espacio interior, en el cual los ligandos serían reconocidos (sitio de unión) a través de residuos de aminoácidos, los cuales han sido identificados a través de mutaciones sitio-dirigidas de receptores clonados. Estas mutaciones para el receptor  $D_2$  humano han determinado que: el residuo de Asp 114 en el segmento hidrofóbico 3 (TM3) estaría involucrado tanto en el sitio de unión de agonistas como en el de antagonistas, como también los residuos de Ser 194 y 197 en el segmento hidrofóbico 5 (TM5) formarían parte del sitio de unión [6,7].

Las interacciones involucradas en el complejo droga-receptor serían hidrofóbicas, electrostáticas (incluidos los enlaces por hidrógeno), de dispersión y de van der Waals. Las interacciones hidrofóbicas proveen la mayor parte de la energía de unión, mientras que las electrostáticas y los enlaces por hidrógeno proveen la especificidad en el sitio de unión [8]. La afinidad es aumentada por la optimización de las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals, las cuales dependen de la complementariedad entre las conformaciones que puedan adoptar el ligando y el receptor al interactuar.

Simultáneamente a esta optimización, los enlaces por hidrógeno y las interacciones electrostáticas aseguran la especificidad en el sitio de unión.

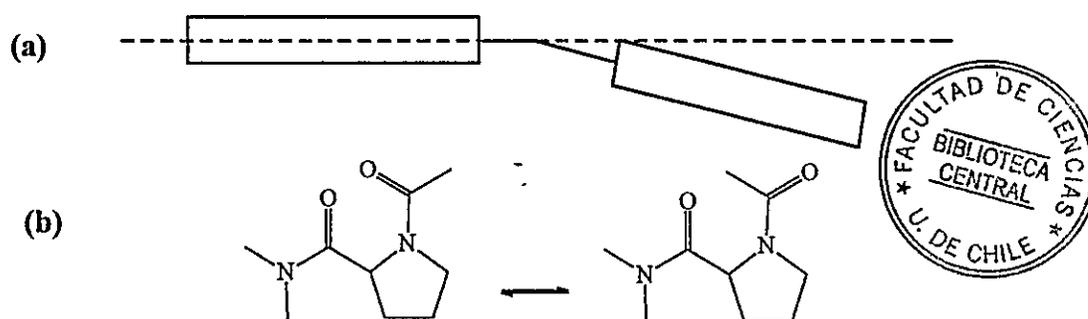
La modelación molecular de receptores dopaminérgicos ha generado una serie de diferentes modelos tridimensionales [9-12]. Estos modelos están basados en diversas metodologías. Ellas se diferencian fundamentalmente en la determinación de las zonas insertas en la membrana, la modelación de las hélices y la utilización de la modelación por homología. El modelo propuesto por Livingstone y col. [9] presenta una gran diferencia con el resto de los modelos en la alineación de la secuencia; la idealización de las hélices, por ejemplo, no considera el doblamiento que puede producirse en éstas debido a la presencia de los residuos de prolina, uno de los cuales, al estar en la mitad de la hélice 5, puede causar una diferencia importante en la posición de los residuos de serina que se saben involucrados en la unión de ligandos y se encontrarían presentes en esta hélice. La diferencia en la alineación produce problemas en el sitio de unión, no existiendo distancias apropiadas para la interacción del ligando con el Asp-114, la Ser-194 y la Ser-197. Dahl y col. [10] no utilizan la modelación por homología, sino que construyen hélices ideales que ordenan inicialmente en una disposición circular, llegando a la estructura tridimensional a través de dinámica molecular. Los dos modelos siguientes [11 y 12] usan la modelación por homología para construir sus modelos. Estos utilizan como plantilla la estructura de la bRh, describiendo sitios de unión de acuerdo con los datos experimentales existentes [6,7].

Un modelo teórico debe ser capaz de explicar los hechos experimentales más relevantes, como también poseer un carácter predictivo para orientar nuevos experimentos. Con el modelo tridimensional se realizará un estudio de la interacción droga-receptor a través del procedimiento de "docking" (ataque) o acoplamiento manual del modelo de la droga dentro del modelo del receptor. En concordancia con los datos experimentales obtenidos a través de mutaciones sitio-dirigidas [6,7], se eligió como primer punto de unión el aspartato 3.07 (TM3 posición 7) (ubicado en la posición 114 en la secuencia completa del receptor D<sub>2</sub>). Como se ha planteado anteriormente, la estructura secundaria de los receptores dopaminérgicos está compuesta por los

segmentos hidrofóbicos y los lazos conectivos. En este modelo se planteó solamente la modelación de los segmentos hidrofóbicos, es decir, las hélices transmembranales. Estas hélices presentan una disposición antiparalela (ver Figura 3.2), que es definida por el sentido de los enlaces por hidrógeno que estabilizan la estructura secundaria de la cadena principal; una manera más general de definir la orientación de una hélice sería considerar la dirección de la cadena polipeptídica desde el segmento amino-terminal hacia el segmento carboxi-terminal.

El medio en que se encuentran las hélices transmembranales hace que su estructura difiera de la de una hélice perteneciente a una proteína globular. La principal diferencia es el largo de los enlaces por hidrógeno de la estructura secundaria, que son más cortos en la zona expuesta a la capa lipídica y más extendidos en la zona hidrofílica [13]. Además, es un rasgo inusual en proteínas globulares la presencia de residuos de prolina en el medio de la hélice. Si tales residuos estuvieran presentes en una hélice  $\alpha$  en una ubicación posterior a tres residuos del segmento amino-terminal, causarían el rompimiento de la estructura secundaria. En contraste con las proteínas globulares, el residuo de prolina es frecuentemente observado en hélices apolares de proteínas membranales. Una de las consecuencias estructurales importantes es el doblamiento que pueda producir en las hélices la presencia de este residuo [14]. La estructura tridimensional del centro de reacción fotosintética de *Rhodospseudomonas viridis* (conocida con una resolución de 2,3 Å) muestra un residuo de prolina en una de sus 11 hélices membranales y éste se encuentra mirando hacia el interior de la proteína [15]. Henderson y col. [1] encuentran tres residuos de prolina en la bRh, dos de los cuales están mirando hacia el interior del receptor estando el otro expuesto a la membrana. Residuos de prolina están presentes en los receptores dopaminérgicos en las hélices 2, 5, 6 y 7, pero sólo en la TM5 se encuentra uno en medio de la secuencia que compone la TM. Este residuo puede generar un doblamiento de la TM, que produciría dos hélices cortas con un corto lazo entre ellas (ver Figura 4.3) [16]. La presencia de prolina hace que el grupo carbonilo del residuo  $i-4$  (posición del cuarto residuo anterior a la prolina) de la secuencia carezca del enlace por hidrógeno característico con el grupo amino del

aminoácido, ya que la prolina no posee un grupo dador NH, y pueda entonces establecer alguna nueva interacción con el sitio de unión. La modelación molecular de hélices  $\alpha$  que contienen un residuo de prolina en la mitad de la secuencia en un medio de baja polaridad, muestra diferentes conformaciones, siendo una de ellas la denominada *Trans 1* [16]. Aunque la prolina puede generar desviaciones de las conformaciones de las hélices sobre la base de la transición entre conformaciones locales casi isoenergéticas (ver Figura 4.3b), las hélices resultantes de estas conformaciones locales no poseen la misma energía relativa, siendo la hélice más estable aquella que presenta una menor distorsión de la estructura secundaria [16]. Para las TM2, TM6 y TM7, el residuo de prolina está presente al final de las hélices, por lo cual el efecto en la distorsión de las hélices es menor.



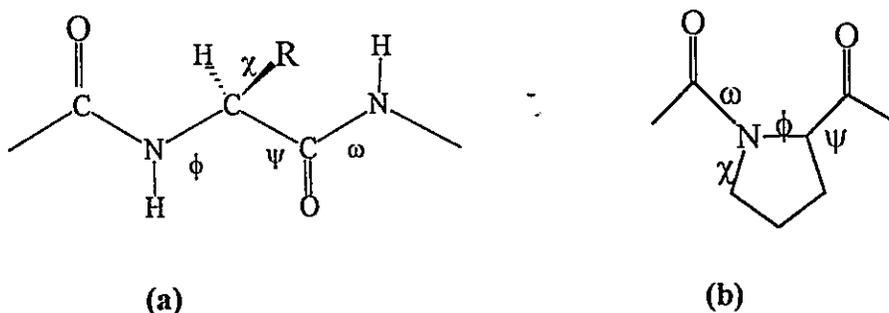
**Figura 4.3** Conformación del residuo de prolina. (a) La conformación *Trans 1* de una hélice  $\alpha$  que contiene una prolina en la mitad de su secuencia [16] y (b) equilibrio conformacional *cis-trans* que presenta un residuo de prolina.

Con los resultados del capítulo precedente y los datos experimentales para algunas hélices transmembranales, además de los antecedentes discutidos previamente con relación al residuo de prolina, se construyeron los modelos estructurales de los receptores  $D_1$  y  $D_{2A}$ , utilizando para la modelación la secuencia humana (ver Tabla 3.8). Luego de construidos los modelos, se realizó el procedimiento de “docking” para determinar los sitios de unión de agonistas y antagonistas. También se realizaron

mutaciones puntuales dentro del receptor para evaluar la importancia de los residuos de serina de la TM5 en la afinidad de agonistas dopaminérgicos.

## 4.2 METODOLOGÍA

La estructura secundaria para las proteínas queda definida por dos ángulos diedros  $\phi/\psi$  (ver Fig. 4.4a). En los presentes modelos estos ángulos fueron de  $-59^\circ/-44^\circ$  correspondientes a una hélice  $\alpha$  en un medio apolar, utilizándose para todas las hélices, con la excepción de los segmentos constituidos por los residuos de prolina [13]. La TM5 fue modelada usando los ángulos diedros obtenidos en el trabajo de Sankararamakrishnan y *col.* [17]. Los residuos de prolina presentes en las TM2, TM6 y TM7 fueron modelados utilizando los ángulos diedros  $\phi = -75^\circ/\psi = -39^\circ$  (ver Figura 4.4b), valores que corresponden a una conformación de prolina “doblada hacia abajo”, la cual genera una menor distorsión en la hélice [14,16,17].



**Figura 4.4** Definición de los ángulos diedros  $\phi$  y  $\psi$  (a) en la estructura de la cadena principal de una proteína.  $\phi$ : ángulo torsional C-N-C $\alpha$ -C y  $\psi$ : ángulo torsional N-C $\alpha$ -C-C-N.  $\omega$ : ángulo torsional del enlace peptídico, normalmente *trans* y (b) definiciones en el residuo de prolina.

Las cadenas laterales (R) fueron modeladas con las conformaciones observadas en las estructuras proteicas. Estas conformaciones se obtienen al analizar todas las estructuras de proteínas que posean una resolución a nivel atómico y las cuales son implementadas en distintas bases de datos y en los programas de Mecánica Molecular.

El programa utilizado para la construcción de los modelos de los receptores fue SYBYL 6.0 [18] en una estación de trabajo SGI. El modelo fue realizado a partir de cada TM individualmente construida y minimizada. Luego éstas fueron acopladas manualmente una tras otra minimizando el modelo parcial obtenido en cada etapa. Al final, el modelo total fue minimizado utilizando las mismas condiciones de las etapas anteriores. Los modelos imitan la proyección de baja resolución de la rodopsina a través del arreglo general proporcionado por un modelo del receptor  $\beta$ -adrenérgico desarrollado por Donnelly y col. [19]. Se utilizaron dos métodos sucesivos de minimización: primero se utilizó la opción "Color Force" que permite encontrar rápidamente los malos contactos entre las cadenas y luego se utilizó "Conjugate Gradient", con el campo de fuerzas y cargas de Kollman [20] para una minimización completa. La constante dieléctrica escogida fue 4, para simular el efecto del ambiente apolar de la membrana celular. La distancia de corte para las interacciones no-enlazantes de van der Waals y electrostáticas fue de 12 Å, y el factor de escalamiento para las interacciones del tipo 1-4 fue 0,5 (ver Apéndice 3 para la definición de estos factores).

El programa PROCHECK fue utilizado para evaluar la calidad estereoquímica de los modelos generados [21]. Las conformaciones normalmente observadas del esqueleto de la cadena peptídica generan ciertos valores estéricamente permitidos, que se representan a través de los gráficos de Ramachandran, es decir, al graficar los valores de  $\psi$  y  $\phi$  para la cadena polipeptídica [22]. También se analizó la distorsión de las distancias y ángulos de enlace. Además, para los anillos aromáticos se midió la deformación de éstos a través de la desviación promedio de cada átomo del plano del anillo (RMS, Root Mean Square).

Para la modelación del complejo droga-receptor se utilizó el procedimiento de "docking" o ataque. Este procedimiento se realizó con el modelo del receptor minimizado y el ligando en su conformación optimizada (que correspondía al posible farmacóforo). Este proceso fue repetido con orientaciones diferentes del ligando con respecto al receptor, con el fin de aumentar la probabilidad de obtener un mínimo global más que un mínimo local. Durante este proceso de minimización, se permitió la variación

(optimización) de cada distancia, ángulo de enlace y ángulo de torsión. Se utilizó el programa SYBYL con un campo de fuerzas inicial del tipo "Color Force". Luego, se utilizó un campo de fuerzas del tipo AMBER. El método de convergencia empleado fue "Conjugate Gradient" con una precisión de 0,1 kcal/mol, utilizando los siguientes parámetros: constante dieléctrica  $\epsilon=4$ , corte de interacción no-enlazante de 12 Å y un factor de escala para las interacciones 1-4 de 0,5. La conformación inicial de la droga y/o ligando se obtuvo de cálculos semiempíricos AM1 obtenidos en el mismo paquete de programas, utilizando la conformación optimizada y las cargas obtenidas.

### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

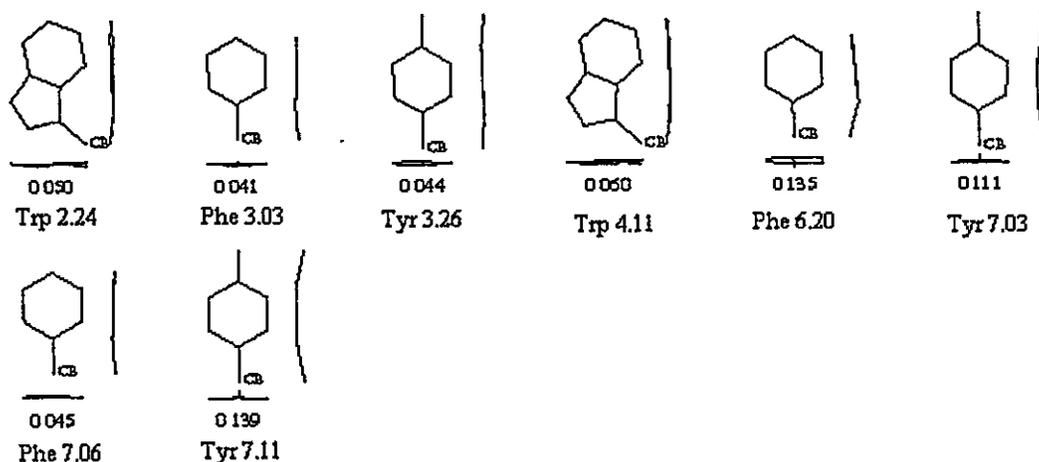
Los resultados y discusión se dividirán en dos partes: la primera corresponde a la obtención y análisis de la geometría de los modelos desarrollados. En la segunda se analizarán los complejos droga-receptor obtenidos y sus implicaciones en un posible mecanismo de interacción droga-receptor.

#### 4.3.1 Modelos tridimensionales de los receptores dopaminérgicos

Los primeros análisis para los modelos obtenidos permitieron verificar la calidad estereoquímica y las posibles distorsiones de distancias y ángulos de enlace para la cadena principal como también en las cadenas laterales. Además, se analizaron las distorsiones de los anillos aromáticos de las cadenas laterales.

Los resultados mostraron que en los modelos obtenidos en la minimización no existen distorsiones en las distancias y ángulos de enlace, y sólo se presentaron desviaciones de la planaridad de algunos anillos de residuos aromáticos. Los resultados obtenidos para este último aspecto fueron los siguientes: en el receptor D<sub>1</sub> muestran distorsiones los anillos de Trp 2.24, Phe 6.19, Phe 6.20 y Phe 7.03 y para el receptor D<sub>2</sub> los de Trp 2.24, Phe 3.03, Tyr 3.26, Trp 4.11, Phe 6.20, Tyr 7.03, Phe 7.06 y Tyr 7.11. Las distorsiones que presentan en su estructura los residuos aromáticos del modelo D<sub>2</sub>

son mostradas en la Figura 4.5. La razón principal para este comportamiento se debe a las interacciones que estabilizan las estructuras secundaria y terciaria de los modelos.



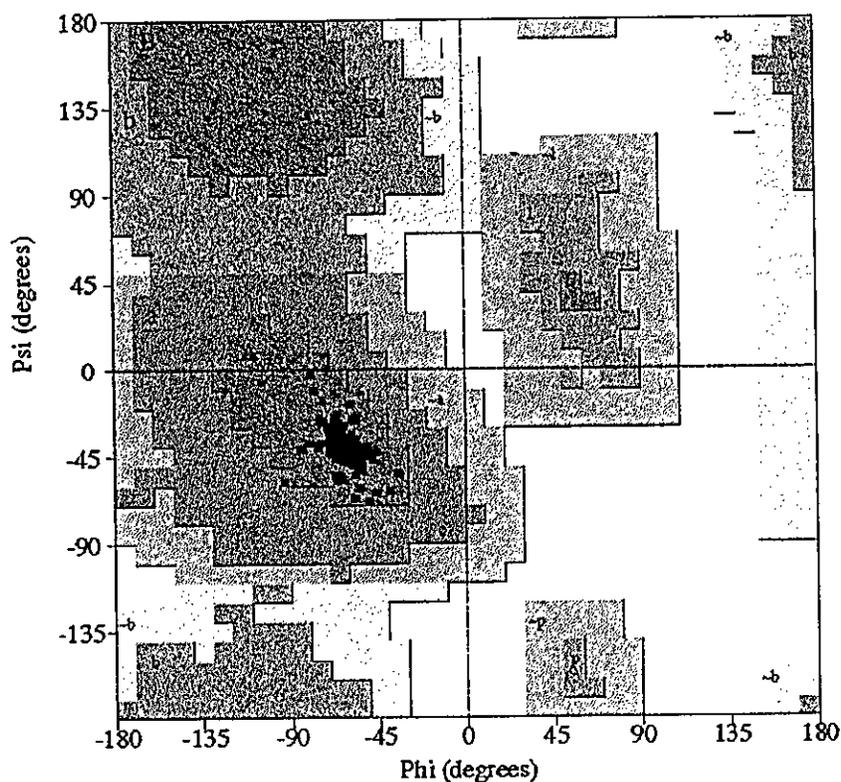
**Figura 4.5** Distorsión de los residuos aromáticos para el receptor  $D_2$ . Valores mostrados en RMS distancia.

El análisis de la estructura secundaria a través de los gráficos de Ramachandran ( $\phi$  vs.  $\psi$ ) es presentado en la Tabla 4.1 para ambos modelos y en la Figura 4.6 se muestra el gráfico para el modelo del receptor  $D_1$ . En un gráfico bidimensional de los ángulos que definen la estructura secundaria ( $\phi$  y  $\psi$ ), la zona correspondiente a una hélice  $\alpha$  se encuentra mayoritariamente en el tercer cuadrante definiéndose subzonas A, a y  $\sim a$  de distorsión creciente. Una lámina  $\beta$  se representa centrada en el cuarto cuadrante definiéndose también tres subzonas B, b y  $\sim b$ . También existe un área para los lazos flexibles (L) y los residuos de prolina (p). Las subzonas X, x y  $\sim x$  se definen en función de las variaciones que pueden sufrir los ángulos  $\phi$  y  $\psi$ . Para las subzonas de distorsión mínima (A, B, etc.) la variación de estos ángulos es inferior a  $10^\circ$  y para las subzonas de distorsión menor (a, b, l, etc.) la variación está entre  $10$  y  $20^\circ$ . En estas dos subzonas se deben encontrar los residuos que tienen una buena estereoquímica. Las siguientes subzonas ( $\sim a$ ,  $\sim b$ ,  $\sim p$ ) tienen una variación mayor a  $40^\circ$  de uno o de ambos ángulos y, cualquier residuo que se encuentre en esta zona debe ser reconstruido [21].

**Tabla 4.1** Estadísticas de los resultados de los gráficos de Ramachandran para los receptores dopaminérgicos.

| Estadística por residuos <sup>a</sup>       | D <sub>1</sub> |     | D <sub>2</sub> |      |
|---|----------------|-----|----------------|------|
|   | Residuos       | %   | Residuos       | %    |
| En regiones favorecidas (A, a, B, b)        | 160            | 100 | 157            | 97,8 |
| En regiones permitidas con generosidad (~a) | 0              | 0   | 2              | 1,2  |
| En regiones desfavorables                   | 0              | 0   | 0              | 0    |
| Nº de residuos que no son Pro y Gly.        | 160            | 100 | 159            | 100  |
| Nº de residuos terminales                   | 14             |     | 14             |      |
| Nº de glicinas                              | 3              |     | 4              |      |
| Nº de prolinas                              | 5              |     | 5              |      |
| <b>Nº Total de Residuos</b>                 | <b>182</b>     |     | <b>182</b>     |      |

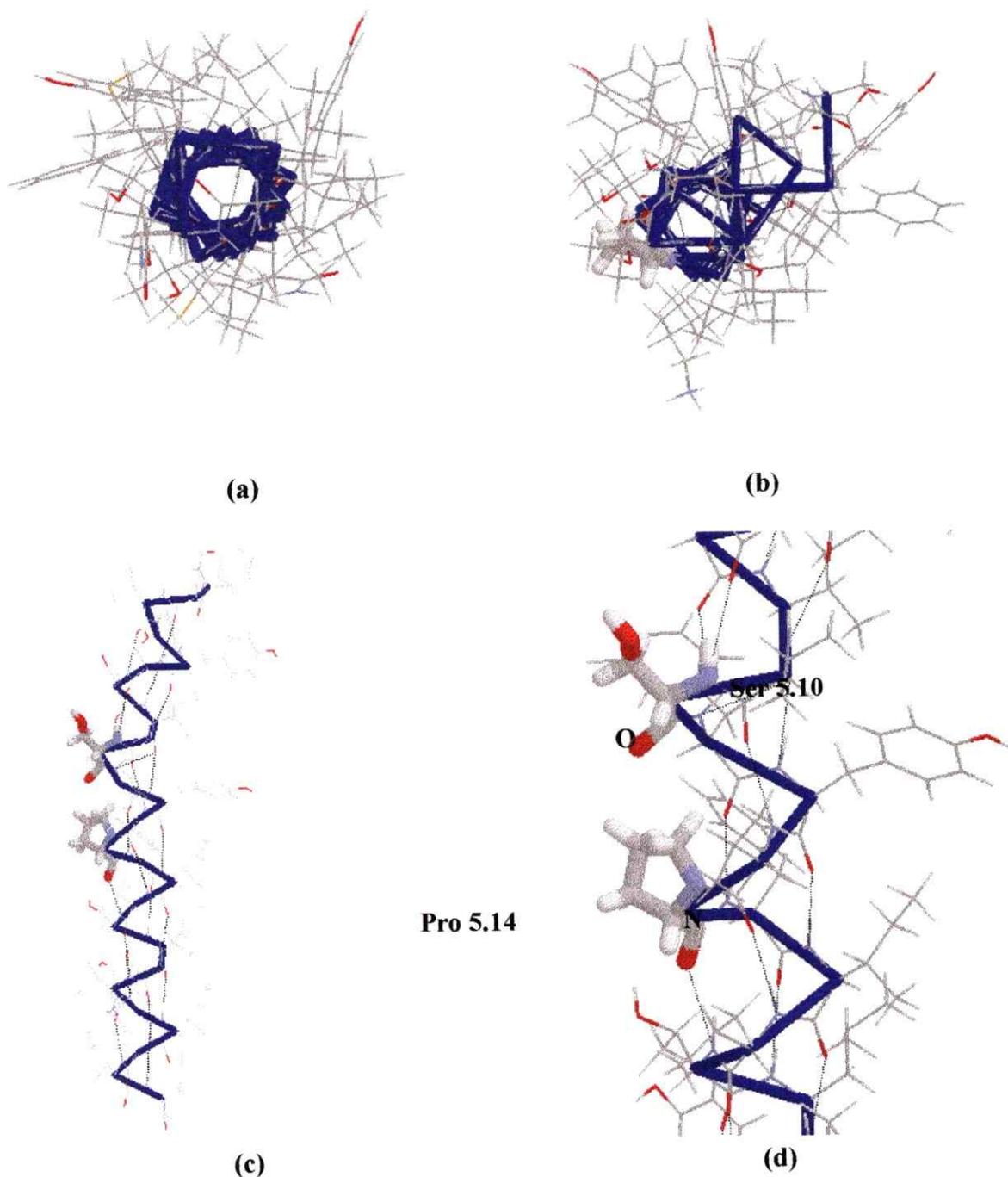
a. A y B variación menor a 10° en los ángulos  $\phi$  y  $\psi$ ; a, b, etc. 20° < variación < 40° y ~a, ~b, etc. variación mayor que 40°



**Figura 4.6** Gráfico de Ramachandran para el modelo del receptor dopaminérgico D<sub>1</sub>. A y B variación menor a 10° en los ángulos  $\phi$  y  $\psi$ ; a, b, etc. 20° < variación < 40° y ~a, ~b, etc. variación mayor que 40°

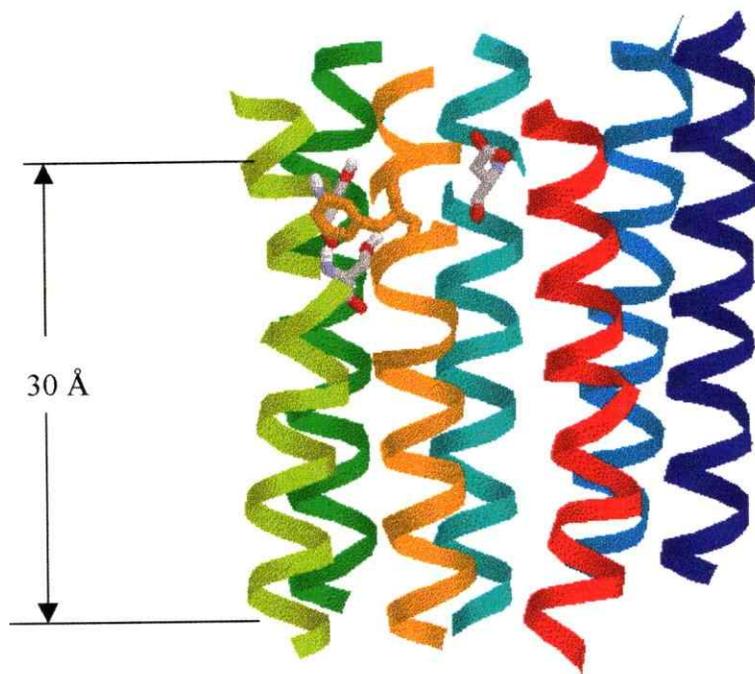
Para los receptores modelados se encontró que sobre el 98% de los residuos que componen ambos modelos se encuentran en zonas permitidas para una estructura secundaria y, tratándose de hélices  $\alpha$ , la gran mayoría de los residuos están ubicados en el tercer cuadrante. En estas estadísticas no se incluyen los residuos de glicina y prolina, los primeros porque presentan una mayor flexibilidad y los segundos por tener un anillo de 5 miembros que no puede alcanzar los ángulos típicos de la estructura secundaria. Este resultado no es de gran relevancia debido a que los programas de modelación están contruidos para generar una buena estructura secundaria, y se acepta que un modelo posee una buena calidad estereoquímica si presenta sobre el 95% de los residuos aminoacídicos en zonas permitidas [21,22].

La modelación de las hélices se muestra en la Figura 4.7. La hélice 1 (TM1) no presenta residuos de prolina en su secuencia y es una hélice casi perfecta que sólo exhibe una pequeña curvatura producto de los enlaces por hidrógeno más cortos en la zona expuesta a la membrana (ver Figura 4.7a). En la Figura 4.7b se muestra la TM5 donde el residuo de Pro 5.14 se ha modelado de tal manera que produce un ligero doblamiento de la TM, lo que hace que los primeros 13 residuos formen una hélice con un ángulo de desviación con respecto al resto de los residuos que componen la TM. Las TMs con residuos de prolina tienen tendencia a orientarse con su lado convexo hacia el interior y el cóncavo hacia el entorno lipídico [13]. En las Figuras 4.7c y 4.7d se muestra el efecto causado por la presencia de esta prolina en el grupo de serina que ocupa la posición 10 de la TM. Este residuo está formando parte del sitio de unión y su mutación afecta principalmente la unión con los agonistas. El posible rol de este residuo de prolina en la estructura del receptor, especialmente en la TM5, sería guiar al ligando hacia el sitio de unión al producir pequeños cambios conformacionales que resultarían en la activación del receptor y/o la apertura de un segundo sitio de unión para agonistas [10, 23]. Se ha planteado que las TMs que contienen residuos de prolina en su estructura estarían oscilando entre distintas conformaciones. Estos cambios conformacionales en las TMs producidos por los residuos de prolina permitirían la activación del receptor [23].

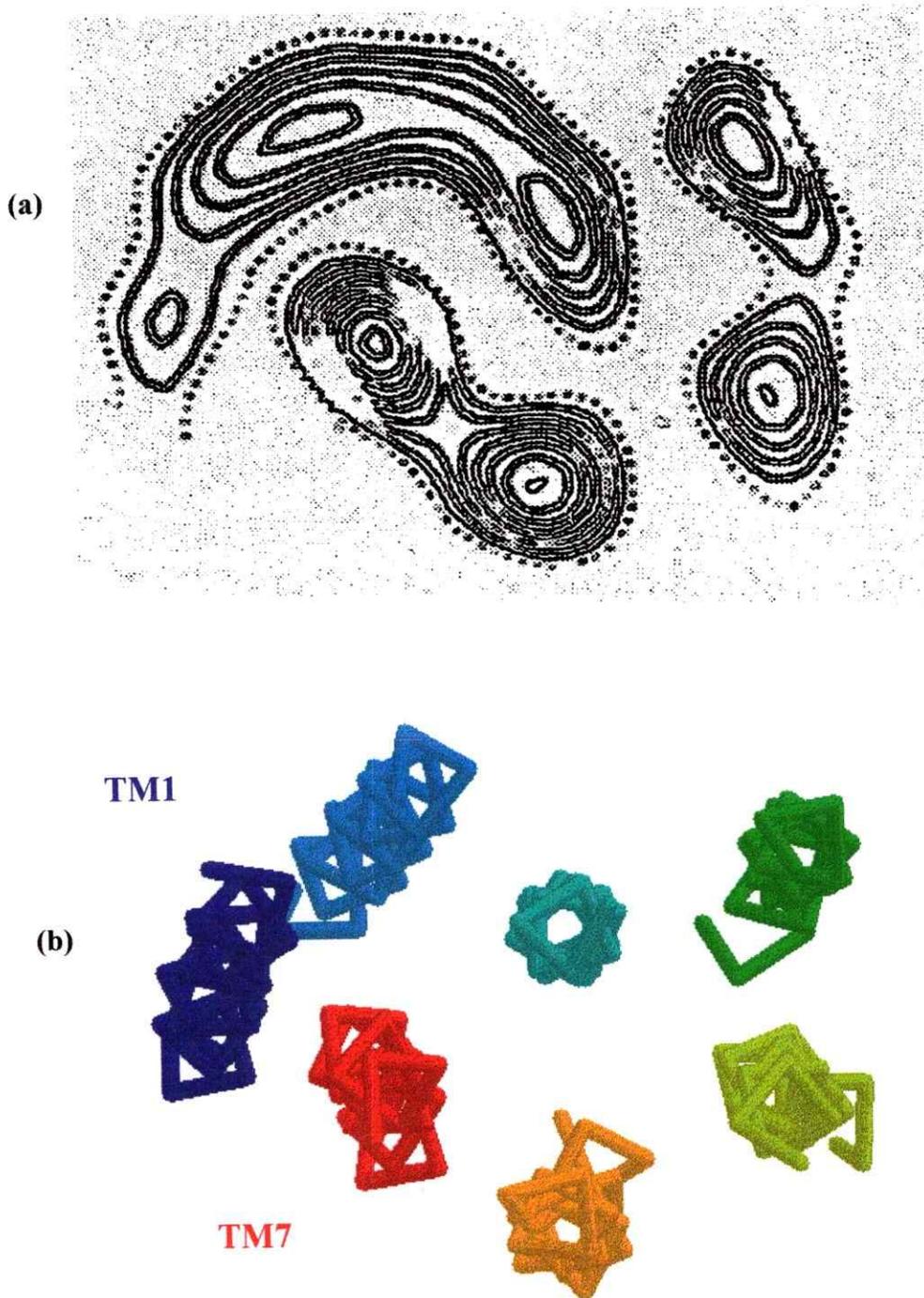


**Figura 4.7** Modelación de las hélices transmembranales. Vistas desde el lado extracelular mostrando (a) la TM1 que presenta un cilindro perfecto y (b) la TM5 mostrando la perturbación que ésta puede sufrir cuando existe un residuo de prolina en la mitad (esqueleto de la cadena principal mostrado en azul). (c) TM5 vista desde el interior de la membrana, mostrando los enlaces por hidrógeno (línea punteada) de la estructura secundaria y (d) Vista de los residuos de Pro5.14 y Ser 5.10 donde se aprecia claramente la falta de enlace por hidrógeno entre el grupo carbonilo de la Ser (rojo) y el nitrógeno del anillo de la prolina (azul).

En la Figura 4.8 se muestra el modelo del receptor  $D_1$  visto desde el interior de la membrana, indicando el grosor aproximado de la membrana plasmática (alrededor de 30 Å). Algunas de las hélices alcanzan longitudes superiores a 38 Å como distancia promedio entre su principio y su fin, siendo las más cortas aquellas que poseen un residuo de prolina, como por ejemplo la TM5 con 36,1 Å de largo. También se muestra el sitio de unión putativo formado por los residuos de Asp 3.07, Phe 6.20, Ser 5.07 y Ser 5.10. En la Figura 4.9 se compara la estructura de uno de los modelos obtenidos con la proyección de la rH a 9,0 Å para mostrar la semejanza entre el modelo y la estructura de la plantilla.



**Figura 4.8** Modelo del Receptor  $D_1$  visto desde el interior de la membrana, mostrando el grosor aproximado de la membrana. Se muestran los residuos de Asp 3.07, Ser 5.07, Ser 5.10 y Phe 6.20. TM1 en azul, TM2 en celeste, TM3 en verde oscuro, TM4 en verde claro, TM5 en verde muy claro, TM6 en naranja y TM7 en rojo.



**Figura 4.9** Comparación de la estructura tridimensional del modelo del receptor  $D_1$  con la proyección de la rH [2]. (a) Estructura de la rH a 9Å de resolución y (b) modelo del receptor dopaminérgico visto desde el lado intracelular; se muestran sólo los esqueletos de las hélices; la numeración sigue la dirección de los punteros del reloj.

En los modelos de los receptores dopaminérgicos construidos se analizaron las interacciones entre los diferentes residuos de las cadenas laterales, especialmente entre residuos de diferentes hélices que estarían estabilizando la estructura terciaria encontrada en la minimización de los modelos. Se encontraron entre éstas interacciones aromáticas de apilamiento ("stacking"), del tipo amonio-aromática y/o catión- $\pi$ , además de enlaces por hidrógeno. Estos resultados se muestran en las Tablas 4.2a y 4.2b, y en las Figuras de la 4.10 a 4.13.

**Tabla 4.2a** Interacciones aromáticas entre las cadenas laterales de los residuos para los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.

| Interacción Aromática          |   |
|--------------------------------|---|
| D <sub>1</sub>                 | D <sub>2</sub>                            |
| Trp 3.03 - Phe 7.06 - Trp 2.24 | Phe 7.06 - Tyr 7.03 - Phe 3.03 - Trp 2.24 |
| Phe 6.19 - Phe 7.09            |   |
| Phe 5.11 - Phe 6.20            | Phe 5.11 - Phe 6.20                       |

**Tabla 4.2b** Enlaces por hidrógeno entre los residuos de diferentes hélices para los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.

| Enlaces por Hidrógeno |                                |
|-----------------------|--------------------------------|
| D <sub>1</sub>        | D <sub>2</sub>                 |
| Asp 2.14 - Ser 7.14   | Asp 2.14 - Ser 7.14 y Asn 1.18 |

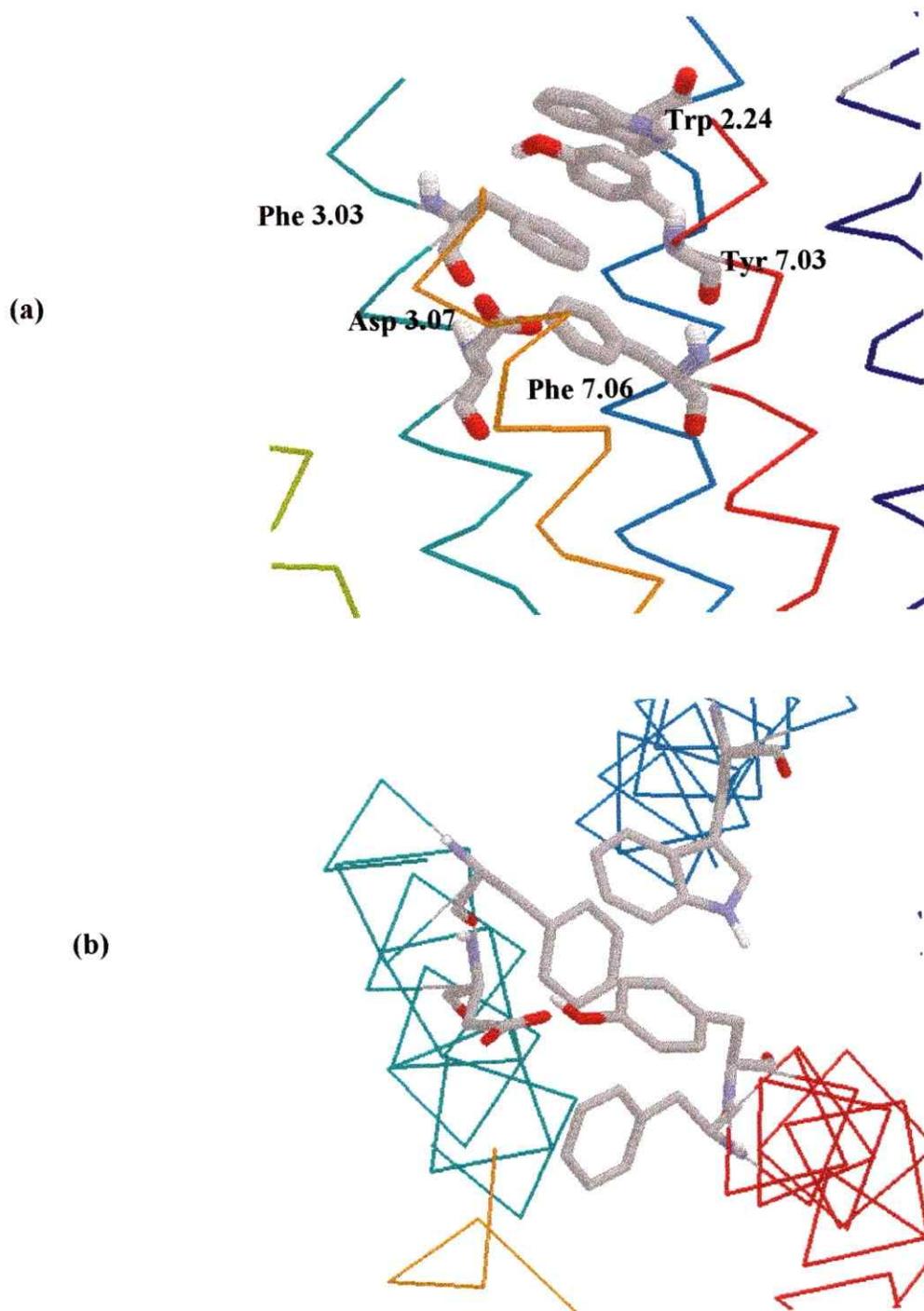
Las interacciones de anillos aromáticos entre hélices son importantes porque ayudan a estabilizar la estructura terciaria del receptor. Para los modelos D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> se tiene una interacción de apilamiento entre tres residuos aromáticos a distancias bastante cercanas, entre 4 a 5Å, (ver Figura 4.10). Esta interacción estaría uniendo las hélices 2, 3 y 7 estabilizando posiblemente la estructura terciaria del receptor. Estos tres residuos aromáticos se encuentran altamente conservados en los receptores que interactúan con ligandos catiónicos [24]. Este racimo de anillos aromáticos se encuentra en la vecindad inmediata del residuo de Asp 3.07 y su función principal sería reforzar la energía de

interacción del par iónico formado por el ligando en su forma catiónica y el anión del residuo de Asp 3.07. Este tipo de racimo aromático que rodea un grupo carboxilato está presente en otros tipos de proteínas [25]. Como se discutió en el Capítulo 1, la función principal de estos anillos aromáticos sería disminuir la dureza química de la base, es decir, del sitio de unión completo, lo que será más ampliamente discutido en el Capítulo 5 utilizando el principio de ácidos y bases duros y blandos propuesto por Pearson. También existen otras dos interacciones de este tipo donde la más fuerte sería entre los residuos de Phe 6.19 y 7.09 para el receptor D<sub>1</sub>, que se encuentran a una distancia promedio de 4,5 Å (ver Fig. 4.11a) que permite la interacción entre las TM6 y TM7. Esta interacción está sólo presente en el receptor D<sub>1</sub>, debido a que el residuo de Phe 7.09 está presente en este tipo de receptores solamente. La última de estas interacciones es la que involucra uno de los candidatos para el sitio de unión que es el Phe 6.20, que estaría interactuando con el residuo de Phe 5.11 contiguo al residuo de Ser 5.10, que también está involucrado en el sitio de unión (Figura 4.11b).

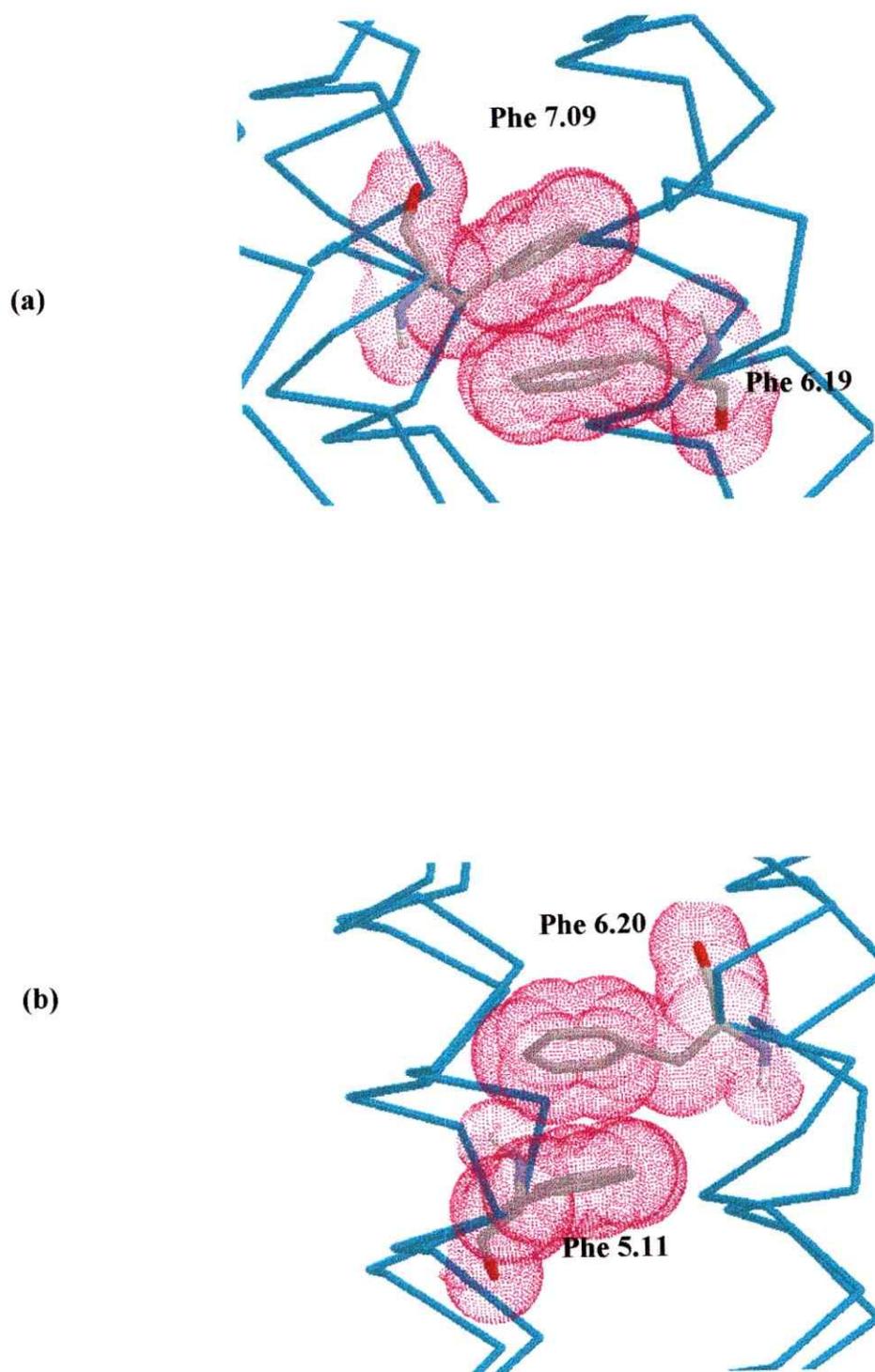
Las interacciones amino-aromáticas ocurren frecuentemente en proteínas [26, 27]. Un análisis estadístico de la distribución de los residuos aromáticos y residuos que contienen un grupo catiónico en la cadena lateral mostró que existe una distancia de interacción que varía entre los 4 a 6 Å [26]. En los receptores estudiados sólo el receptor D<sub>1</sub> presenta este tipo de interacción entre los residuos de Arg 5.24 y Phe 4.04, donde la distancia promedio entre el átomo de carbono al cual están unidos los nitrógenos en el residuo de arginina y el centro del anillo aromático del residuo de fenilalanina es de 4,5 Å (ver Figura 4.12).

Los enlaces por hidrógeno entre hélices son frecuentes en las hélices transmembranales, pero su promedio es menor a 1 por TM en los RAPG [28]. En la estructura de baja resolución de la bRh sólo son posibles tres de estos enlaces [1]. En los modelos tridimensionales de los receptores se analizó este tipo de interacción para estudiar la naturaleza de los enlaces formados por residuos altamente conservados, ya que éstos podrían jugar un rol en la estabilización de la estructura terciaria del receptor. Los resultados se muestran en la Tabla 4.2b y en la Figura 4.13. Los modelos de

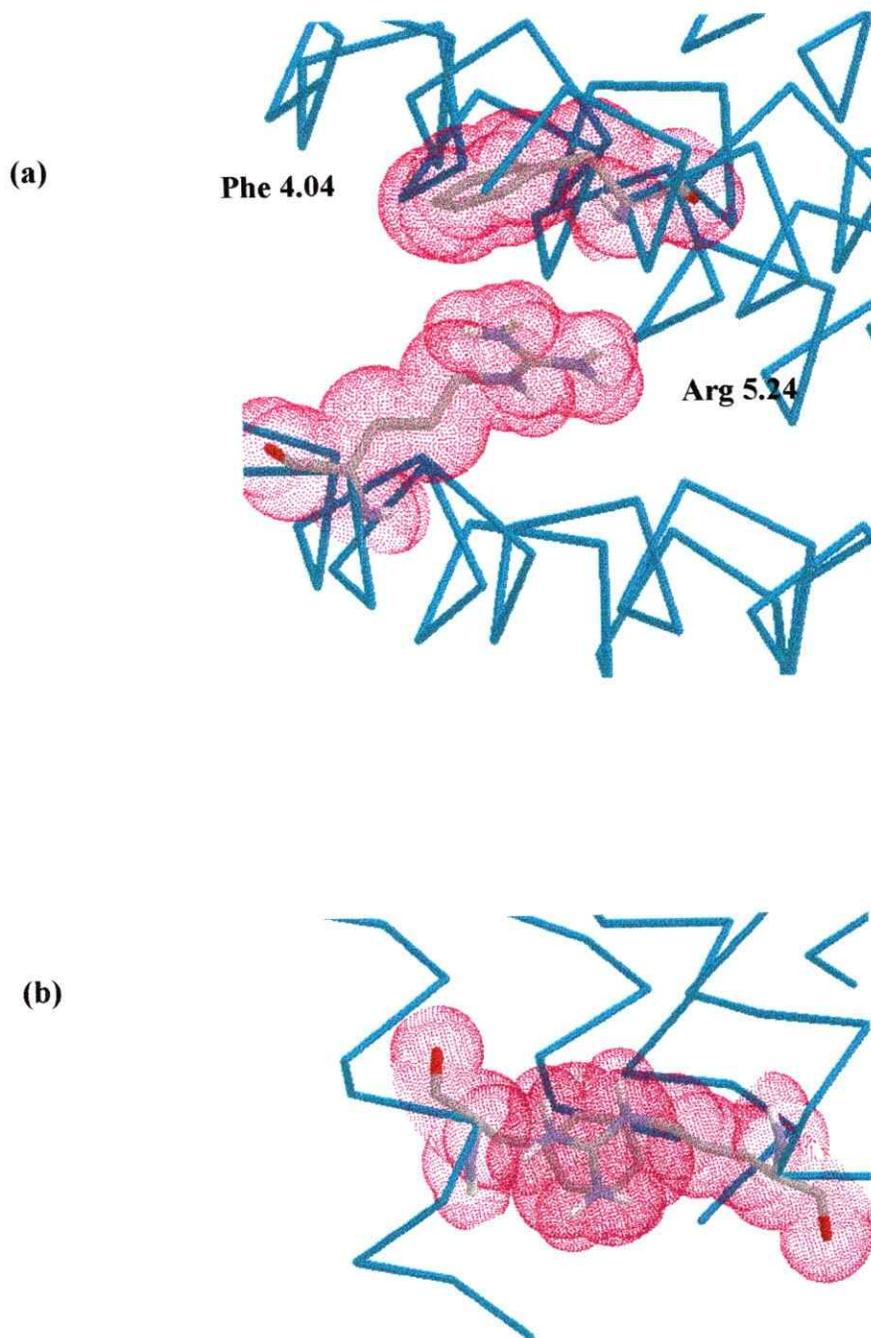
receptores dopaminérgicos sólo presentan un enlace por hidrógeno en común, el cual es formado por los residuos de Asp 2.14 y Ser 7.14. Mutaciones sitio dirigidas experimentales del residuo de aspartato 2.14 muestran que la modificación de este residuo sólo afecta la unión de agonistas dopaminérgicos [29], por lo cual algunos autores han sugerido que existiría un segundo sitio de unión para los agonistas [23]. La migración del ligando entre el primer sitio de unión (formado por el Asp 3.07 y las Ser 5.07 y 5.10) hacia el segundo sitio de unión produciría la activación. C. D. Wood [30] en sus modelos de receptores dopaminérgicos encuentra enlaces por hidrógeno similares a los propuestos, además de otros enlaces por hidrógeno, que en los modelos propuestos en esta tesis no pueden existir.



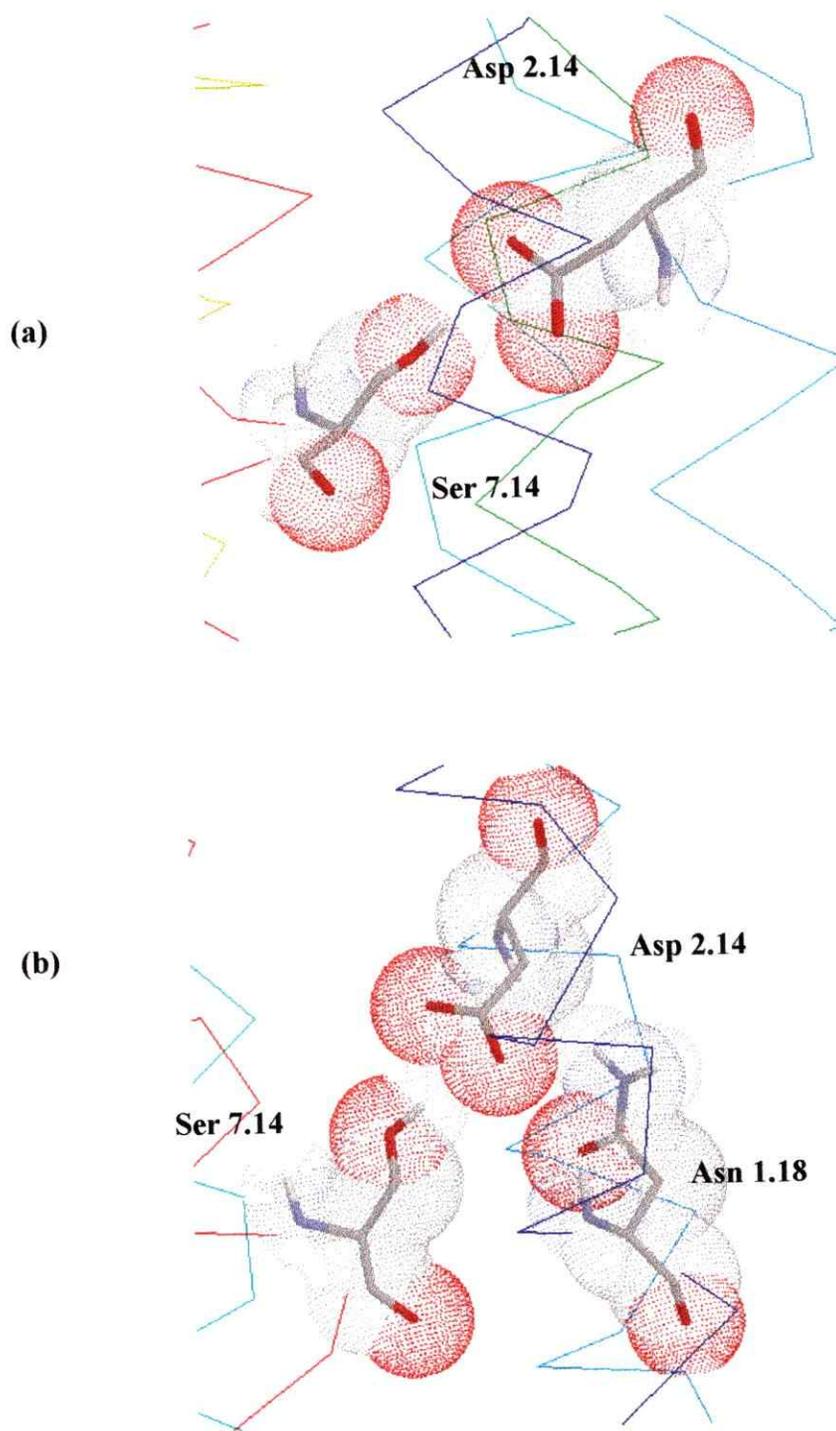
**Figura 4.10** *Racimo aromático.* Este racimo está formado por los residuos Phe 3.03, Phe 7.06, Trp 2.24 y Tyr 7.03 para el receptor  $D_2$ , (a) vista desde el lado interior de la membrana y (b) vista desde el lado extracelular.



**Figura 4.11** Interacción aromática. (a) Interacción entre los residuos Phe 6.19 y Phe 7.09 para el receptor  $D_1$  y (b) entre los residuos de Phe 6.20 y Phe 5.11 para el receptor  $D_2$ , vista desde el interior de la membrana. La parte superior de la figura corresponde al sentido del lado extracelular; el esqueleto de la cadena es mostrado en azul. En fucsia se muestra la superficie de van der Waals de los residuos.



**Figura 4.12** Interacción amonio-aromática para el receptor  $D_1$ . Esta interacción ocurre entre los residuos de Arg 5.24 y Phe 4.04, que se ubican hacia el lado citoplasmático del receptor. (a) Vista desde el interior del receptor y (b) desde el interior de la membrana: en primer plano el residuo Arg 5.24, detrás de éste el residuo de Phe 4.04. Se aprecia que el catión está enfrente completamente el anillo aromático. El esqueleto de la cadena principal es mostrado en celeste y la superficie de van der Waals de los residuos en fucsia.



**Figura 4.13** Enlace por hidrógeno entre el residuo de Asp 2.14 y Ser 7.14 en ambos modelos de receptores dopaminérgicos. (a) En el receptor  $D_1$  y (b) en el receptor  $D_2$ .

### 4.3.2 Energía de unión droga-receptor.

La afinidad entre una droga y un receptor se puede relacionar con la energía total del complejo droga-receptor. El complejo más estable encontrado en este trabajo fue aquél modelado para la 2-F-N-n-propilnoramoporfina (2F-NPA), que es el agonista más afin, y el receptor D<sub>2</sub>. Se obtuvo el siguiente orden en energía para agonistas (ver Tabla 4.3a): 2F-NPA < N-0437 < NPA < (R)-7OH-DPAT < (R)-APO < DA (las abreviaturas y estructuras de estos compuestos son mostradas en la Figura 4.14). Este orden está indicando la tendencia de la afinidad por el receptor, la cual corresponde a la tendencia de las afinidades experimentales de estos compuestos por el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>. Se modeló el complejo entre el receptor D<sub>2</sub> y la (R)-boldina, no natural, que se supone podría ser un agonista dopaminérgico. La energía calculada indica que este compuesto podría ser un agonista menos potente que el (R)-7OH-DPAT pero más que la DA.

Para antagonistas se encontró el siguiente orden en energías: raclopride < butaclamol < (S)-APO < (S)-Boldina (ver Tabla 4.3b).

**Tabla 4.3a** Constantes de disociación experimentales (nM) para el receptor D<sub>2</sub> y las energías totales para los complejos droga-receptor con algunos agonistas y (R)-boldina (kcal/mol).

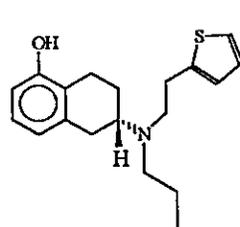
| Ligando                  | Constante de Disociación<br>K <sub>d</sub> (nM) | Energía Total del Complejo<br>(kcal/mol) |
|--------------------------|---|--|
| 2F-NPA                   | 0,012   | -702,51                                  |
| N-0437                   | 0,88  | -700,95                                  |
| (R)-NPA                  | 0,82  | -683,28                                  |
| (R)-APO                  | 11,1  | -672,94                                  |
| (R)-7OH-DPAT             | 43,1  | -665,69                                  |
| (R)-boldina <sup>a</sup> | ---   | -660,04                                  |
| DA                       | 152   | -647,44                                  |

a. No ha sido aún medida su afinidad por los receptores dopaminérgicos.

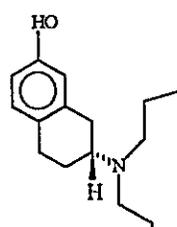
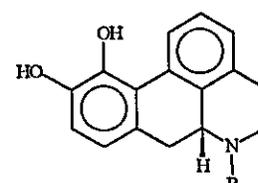
**Tabla 4.3b** Constantes de disociación experimentales (nM) para el receptor D<sub>2</sub> y las energías totales para los complejos droga-receptor de algunos antagonistas (kcal/mol).

| Ligando     | Constante de Disociación<br>K <sub>i</sub> (nM) | Energía Total del<br>Complejo (kcal/mol) |
|-------------|---|--|
| Raclopride  | 0,166   | -681,01                                  |
| Butaclamol  | 0,23  | -673,73                                  |
| (S)-APO     | 115,0   | -663,60                                  |
| (S)-boldina | 400   | -662,39                                  |

## (a) Agonistas

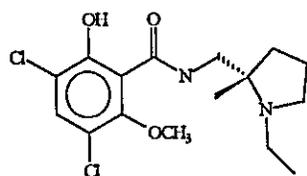


N-0437 (agonista selectivo)

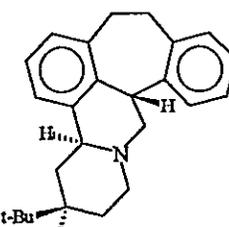
7-hidroxi- *N,N*-di-*n*-propil-2-aminotetralina  
7-OHDPAT

| R                 | Compuesto                             |
|-------------------|---------------------------------------|
| metilo            | apomorfina (APO)                      |
| <i>n</i> -propilo | <i>N-n</i> -propilnorapomorfina (NPA) |

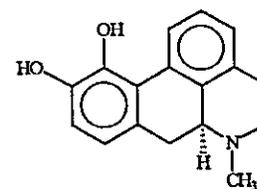
## (b) antagonistas



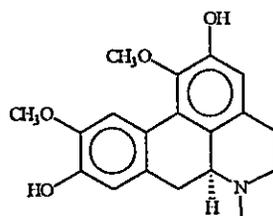
raclopride (antagonista selectivo)



Butaclamol



(S)-apomorfina

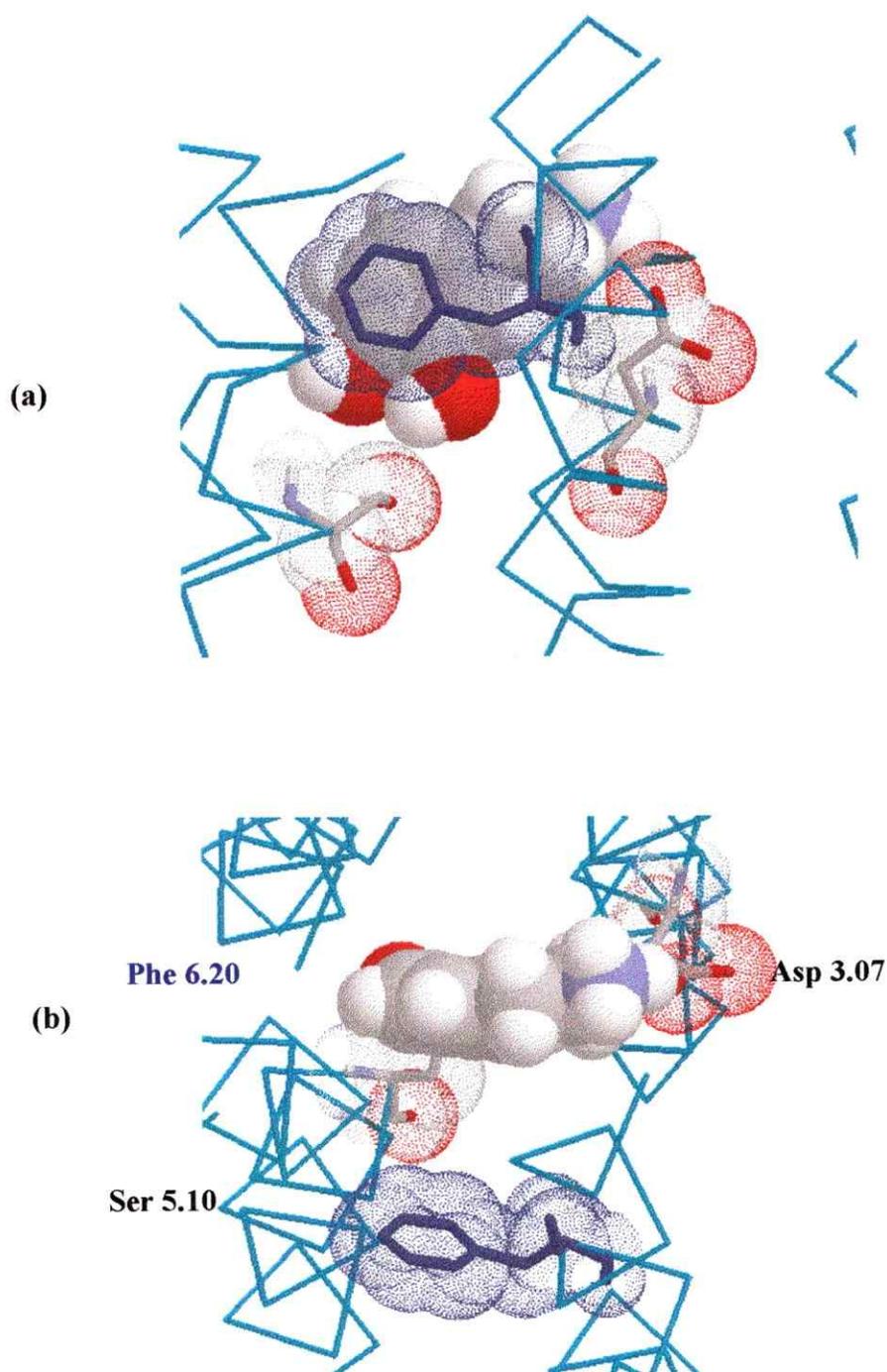


(S)-boldina

**Figura 4.14** Estructura de los compuestos estudiados en los complejos droga-receptor. (a) dopamina (ligando endógeno) (b) agonistas dopaminérgicos y (c) antagonistas dopaminérgicos.

### *4.3.3 Estructura del complejo agonista-receptor*

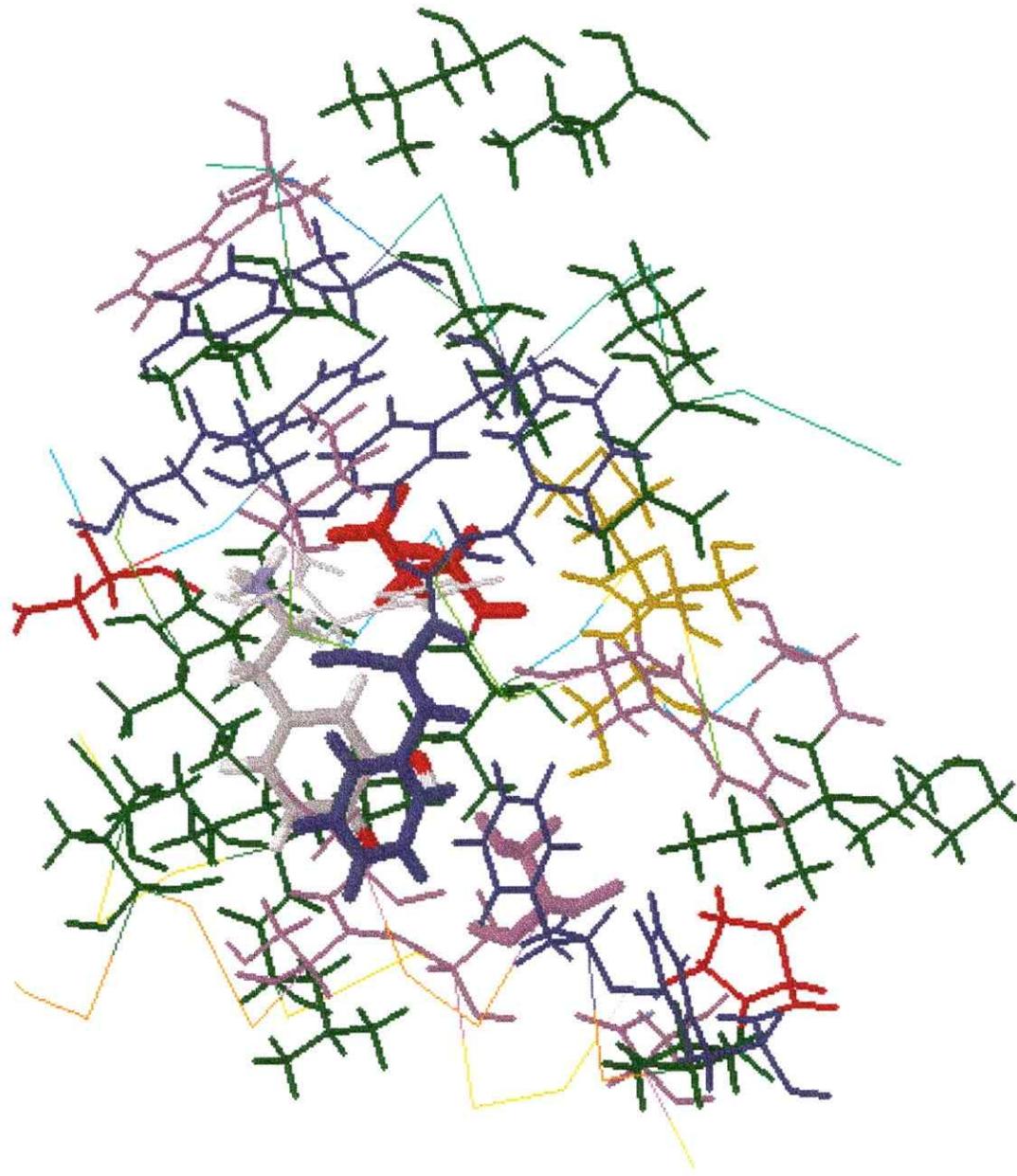
En la estructura del complejo droga-receptor para agonistas se encontraron tres tipos de interacciones: interacción electrostática, de transferencia de carga y/o aromática y de enlaces por hidrógeno. En las figuras 4.15 a 4.17 se muestran los complejos droga-receptor para algunos de los ligandos estudiados. La obtención de los complejos agonista-receptor definió el sitio de unión de agonistas, o como se denominó en el capítulo I el sitio de unión aniónico. En este sitio están involucrados los residuos de Asp 3.07, Ser 5.07, Ser 5.10 y Phe 6.20. Los residuos que están participando directamente en interacciones con el ligando se denominarán residuos primarios. Además de éstos, existen otros residuos cercanos, pero que no están formando interacciones no-enlazantes, sino más bien débiles interacciones de van der Waals. Estos últimos residuos definen el tamaño y la forma del sitio de unión. También definen las características polares o apolares del sitio y se denominarán residuos secundarios, estos residuos modifican las reactividades de los residuos que interactúan con el ligando. En la figura 4.15 se muestra el complejo droga-receptor para el ligando endógeno dopamina. En la figura 4.15a se muestra el complejo droga-receptor con los residuos primarios Asp 3.07, Ser 5.10 y Phe 6.20. En la figura se aprecian las superficies de van der Waals de la dopamina y de los residuos aminoacídicos. En cuanto a la interacción electrostática se aprecia el contacto entre un hidrógeno del grupo amonio y un oxígeno del grupo carboxilato perteneciente a la cadena lateral del residuo de aspartato.



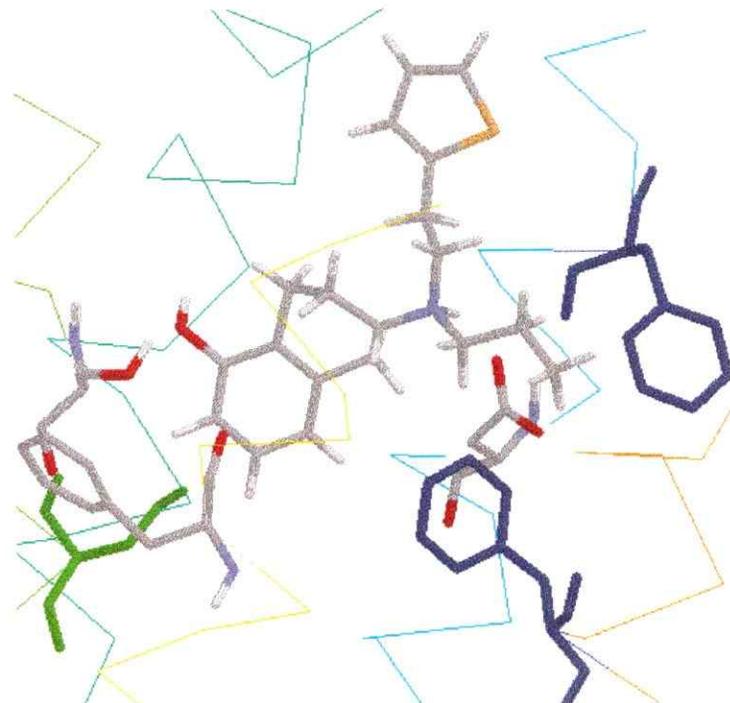
**Figura 4.15** Complejo droga-receptor  $D_2$  para la DA. Se muestran solo los residuos primarios del sitio de unión, como son Asp 3.07, Ser 5.10 y Phe 6.20. (a) Vista desde el interior de la membrana. (b) Vista desde el lado extracelular del receptor. Las superficies del van der Waals son mostradas para el ligando en sólido y para los residuos en forma de puntos.

En la Figura 4.15c se muestran algunos residuos en un radio de 12 Å alrededor de la dopamina. Sólo se muestran los residuos que están orientados hacia el interior del receptor. Estos se dividen en tres categorías: residuos polares, apolares y aromáticos. Los residuos apolares son: Leu 1.07, 1.10, 2.20, 3.06, 3.16, 4.21, 4.22, 4.25, 7.02 y 7.09; Val 2.17, 3.04, 3.08, 5.03 y 5.13; Ile 3.15 y 6.24 y, Pro 5.14 (representados en verde en la figura 4.15c). Los residuos aromáticos son: Trp 2.24 (representado en violeta), Phe 3.03, 5.11, 6.19, 7.06 y Tyr 7.03. (representados en azul en la Figura 4.15c). Los polares (no cargados): serina 3.14, 4.14, 5.06, 5.07 y 5.10 (representadas en color violeta), cisteína 3.11, metionina 3.09 y 3.10 (representadas de color amarillo). Los residuos cargados negativamente son Asp 3.01, Asp 3.07 (representados en rojo) y el residuo cargado positivamente es His 6.23 (representado en gris). El análisis de los residuos que conforman el sitio de unión muestra un alto porcentaje de residuos apolares y con agrupaciones de los residuos aromáticos y polares cercanos a las zona de la TM3.

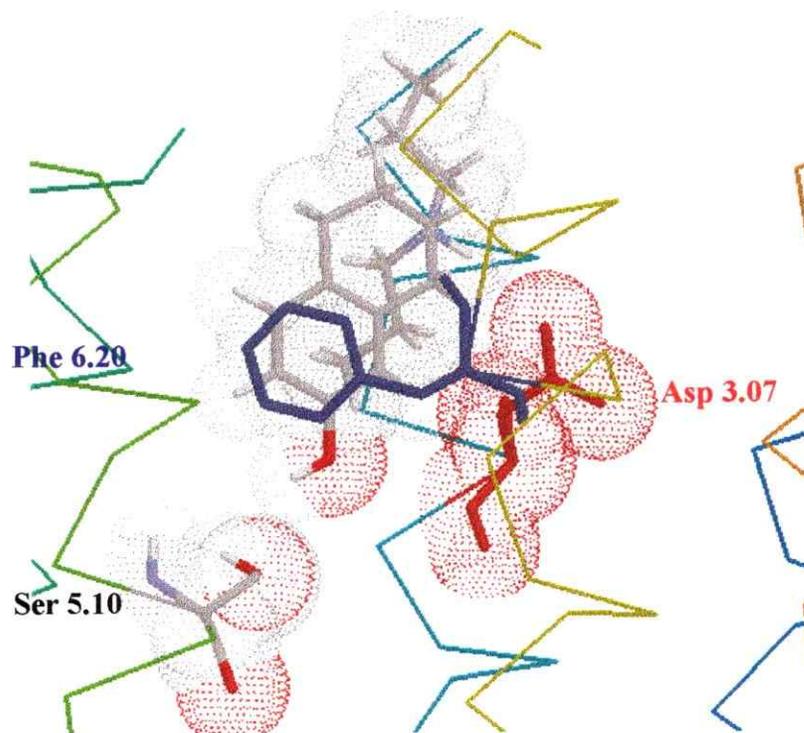
La primera de las interacciones a considerar es la **Interacción Electroestática** o "Reinforced Ionic Bond" [31], que requiere de la presencia de un hidrógeno en el grupo amino de los ligandos. Esta interacción ocurre entre el centro catiónico de los ligandos *N*-protonados y el residuo de Asp 3.07, a una distancia promedio de 3.0 Å (intervalo entre 2.75 y 3.37 Å) entre el N y uno de los O del grupo carboxilo de dicho residuo (ver Tabla 4.4). Esta interacción ocurre tanto para agonistas como antagonistas dopaminérgicos. El residuo de Asp 3.07 está conservado ampliamente en RAPG (98%) [19]. La mutación de este residuo afecta la afinidad de los receptores dopaminérgicos [6,7] y adrenérgicos [32] por sus ligandos. La mutación del residuo de Asp 3.07 por asparagina o glicina en los receptores dopaminérgicos provoca una pérdida total de la afinidad por ligandos dopaminérgicos, es decir, no existe unión entre el receptor mutado y el agonista [6,7].



**Figura 4.15 continuación** Complejo droga-receptor  $D_2$  para la DA. (c) Se indican los residuos primarios y secundarios de aminoácidos que están formando el sitio de unión. En verde residuos apolares, en violeta residuos polares (serinas y también tripófano), en amarillo residuos polares (metioninas y cisteínas), en azul aromáticos, en rojo residuos cargados negativamente (aspartato y también prolina). La estructura para la dopamina y los residuos primarios se muestra con una línea más gruesa.



**Figura 4.16** Complejo droga-receptor  $D_2$  para el agonista selectivo N-0437. Se indican los residuos de aminoácidos que están formando el sitio de unión. Se muestran sólo los residuos primarios del sitio de unión, como son Asp 3.07, Ser 5.07 y Phe 6.20 y los residuos secundarios Phe 3.03 y 7.06 (azul) vista desde el plano de la membrana.



**Figura 4.17** Complejo droga-receptor para el agonista 7-OHDPAT. Se indican los residuos de aminoácidos que están formando el sitio de unión. Se muestran sólo los residuos primarios del sitio de unión, como son Asp 3.07 (rojo), Ser 5.10 y Phe 6.20 (azul). Se muestra la superficie de van der Waals para el ligando, el Asp 3.07 y Ser 5.10.

**Tabla 4.4** Parámetros geométricos calculados del sitio de unión de agonistas para la interacción electrostática.

| Ligando                 | Parámetros geométricos |                       |                      |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
|                         |                        |                       |                      |
|                         | Distancia N·····O (Å)  | Distancia H·····O (Å) | Angulo N-H·····O (°) |
| DA <sup>a</sup>         | 2,91                   | 2,02                  | 147,4                |
| (R)-2F-NPA <sup>b</sup> | 2,95                   | 1,81                  | 143,0                |
| (R)-NPA <sup>b</sup>    | 2,98                   | 2,13                  | 139,0                |
| (R)-APO <sup>b</sup>    | 3,37                   | 2,67                  | 142,1                |
| N-0437 <sup>c</sup>     | 2,75                   | 1,79                  | 156,3                |
| 7-OHDPAT <sup>c</sup>   | 2,95                   | 2,04                  | 143,0                |

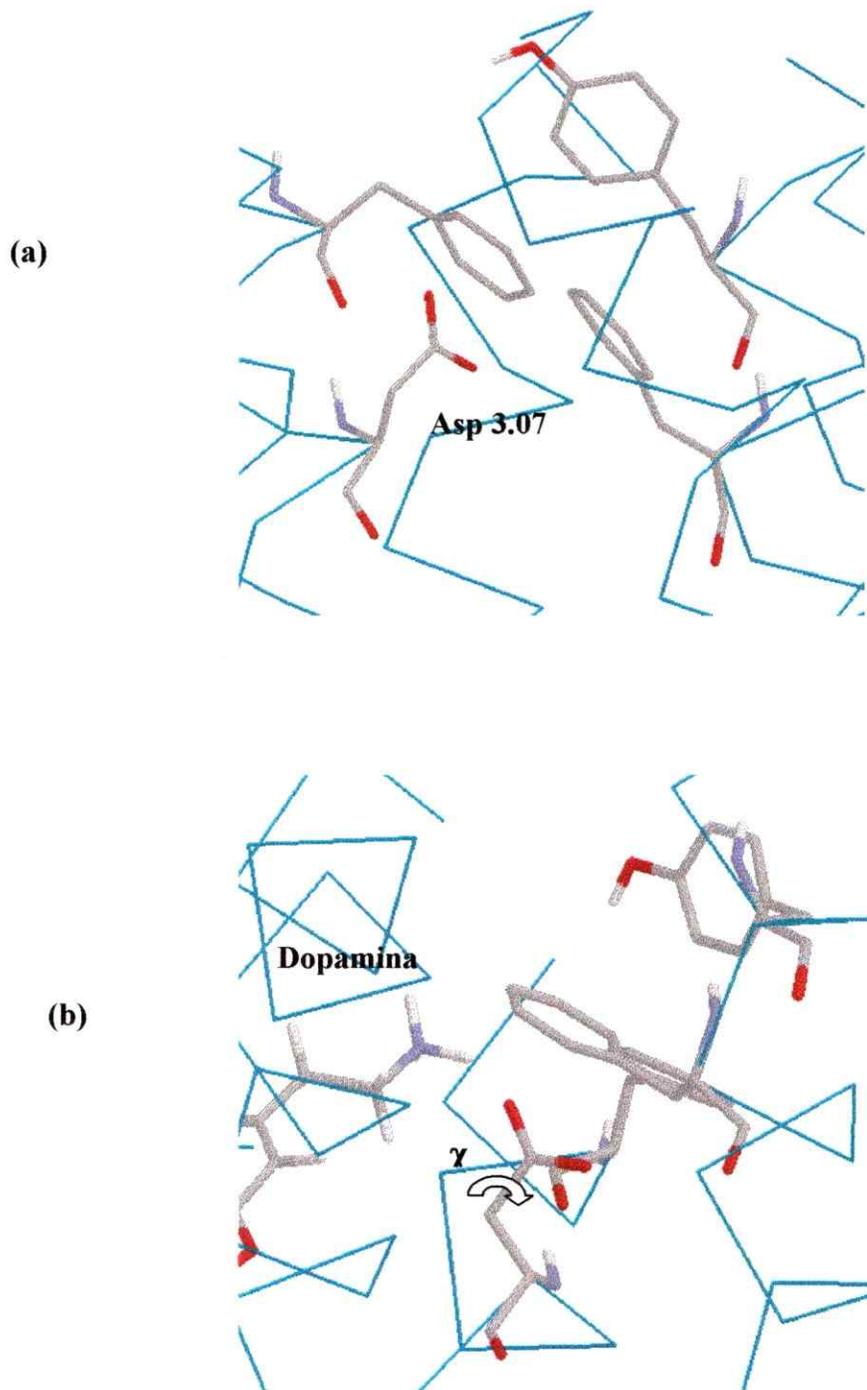
a. ligando endógeno. b. ligandos pertenecientes a la familia de aporfinas y c. ligandos pertenecientes a la familia de 2-aminotetralinas.

En las inmediaciones de este residuo se encuentran 4 residuos aromáticos: Phe 3.03, Phe 6.19, Tyr 7.03 y Phe 7.06. De éstos, los residuos más cercanos al grupo carboxilato son los de Phe 3.03 y Phe 7.06, a una distancia promedio entre el carbono del grupo carboxilato y el centro de los anillos aromáticos de 4,3 Å. Estos residuos están ampliamente conservados en los RAPG y su mutación afecta significativamente la afinidad de los agonistas por el sitio de unión [33]. Estos residuos podrían estar estabilizando la carga positiva del ligando, reforzando la interacción electrostática, ya sea generando un medio apolar que facilite un traspaso de carga entre los iones involucrados en la interacción, o por una interacción electrostática entre el  $\delta^+$  de los sustituyentes del grupo amino y el  $\delta^-$  de los anillos aromáticos (ver Figuras 4.15 y 4.16). Además de esta hipótesis, en esta tesis se plantea la modificación de la reactividad del residuo de aspartato. Específicamente como se discutió en el Capítulo 1, este racimo de anillos aromáticos modifica la dureza del anión carboxilato transformándolo en una base más blanda y por lo tanto más reactiva para una transferencia de carga, y aumentando la

polarizabilidad de la nube electrónica. Este cambio en la reactividad permitiría la activación del receptor.

En la Figura 4.18 se muestra la posición del residuo de Asp 3.07 antes y después del proceso de "docking" de la dopamina. Se aprecia que en el modelo del receptor el grupo carboxilato del residuo de aspartato está orientado hacia los anillos aromáticos de los residuos de fenilalanina (7.06 y 3.03). Ambos oxígenos del grupo carboxilato están orientados hacia los anillos aromáticos, mientras que en el complejo dopamina-receptor cambia la orientación del residuo Asp 3.07, y sólo uno de estos oxígenos queda orientado hacia los dos anillos aromáticos más cercanos y el otro está más lejos, participando en la interacción electrostática. Este cambio en la orientación permitiría una transferencia de carga desde el grupo carboxilato hacia el grupo amonio del ligando, unido a una transferencia de carga desde los anillos aromáticos. Esta transferencia podría producir los cambios necesarios para la apertura del hipotético segundo sitio de unión o el cambio conformacional que iniciaría una serie de cambios conformacionales que activarían la respuesta en la neurotransmisión [23]. La variación del ángulo torsional ( $\chi$ ) va de  $156,2^\circ$  en el receptor a  $145,8^\circ$  en el complejo droga-receptor  $D_2$  para la dopamina.

La interacción hidrofóbica o aromática ocurre entre el fragmento aromático de los agonistas y el residuo Phe 6.20 en la TM6. Este residuo está altamente conservado en todos los receptores cuyos ligandos presentan un anillo aromático [19]. Para los agonistas más potentes, la distancia entre los centros del fragmento aromático y el centro del anillo aromático del residuo disminuye desde  $9,0 \text{ \AA}$  a  $7,5 \text{ \AA}$  (ver Tabla 4.5).



**Figura 4.18** Orientación del residuo de Asp 3.07 frente a los residuos aromáticos. (a) Conformación del residuo de Asp 3.07 en el modelo antes del proceso de “docking” y (b) en el complejo droga-receptor. Sólo se muestran los residuos aromáticos más cercanos al residuo de aspartato; en celeste se muestra el esqueleto principal. Se define el ángulo torsional  $\chi$ .

**Tabla 4.5** Parámetros geométricos del sitio de unión de agonistas para la interacción aromática.

| Ligando                 | Distancia entre anillos (Å) |
|-------------------------|-----------------------------|
|                         |                             |
| DA <sup>a</sup>         | 7,4                         |
| (R)-2F-NPA <sup>b</sup> | 6,9                         |
| (R)-NPA <sup>b</sup>    | 7,0                         |
| (R)-APO <sup>b</sup>    | 7,5                         |
| N-0437 <sup>c</sup>     | 6,4                         |
| 7-OHDPAT <sup>c</sup>   | 7,1                         |

a. ligando endógeno. b. ligandos pertenecientes a la familia de aporfinas y c. ligandos pertenecientes a la familia de 2-aminotetralinas

Los planos de los anillos aromáticos no están completamente paralelos, pero el atraque de un agonista más potente provoca un mayor cambio conformacional en el residuo de fenilalanina 6.20. Por ser éste un modelo estático del complejo droga-receptor, el estricto paralelismo entre los dos anillos aromáticos no poseería una mayor relevancia. Cabe destacar la disminución de la distancia entre los centros de los anillos aromáticos al aumentar la afinidad del ligando. En las diferentes figuras se aprecia la relación entre el fragmento aromático de los agonistas y el residuo de Phe 6.20.

La tercera interacción presente en el sitio de unión es la formación de enlaces por hidrógeno entre el receptor y los grupos hidroxilos de los ligandos. Esta interacción puede producirse con tres residuos de serina ubicados en la TM5: Ser 5.06, Ser 5.07 y Ser 5.10. Los estudios de relaciones estructura-actividad muestran que para los agonistas dopaminérgicos es esencial la presencia de un grupo hidroxilo, el que correspondería a la posición *meta* en la DA. En contraposición, en los receptores adrenérgicos se necesitan ambos hidroxilos del anillo catecol [34]. En los complejos droga-receptor se aprecian los

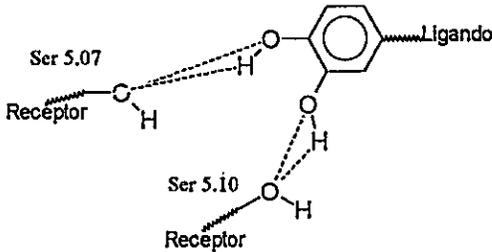
enlaces por hidrógeno formados entre los diferentes ligandos y los residuos de Ser 5.07 y Ser 5.10. Por su ubicación en el modelo del receptor, el residuo de Ser 5.06 no se encuentra a una distancia adecuada para la formación de enlaces por hidrógeno con los grupos hidroxilos de los ligandos estudiados.

Los datos experimentales resultantes de la mutación puntual de estas tres serinas muestran una disminución de la afinidad para agonistas dopaminérgicos, pero esta disminución depende de la familia a la cual pertenece el ligando y del residuo mutado [6,7]. Estos estudios muestran que, para los ligandos estudiados en esta tesis, la afinidad disminuye en mayor grado al mutar el residuo de Ser 5.10. El agonista selectivo N-0437 no sufre disminución de su afinidad por el receptor al mutar cualquiera de las serinas, pero al mutar ambos residuos la afinidad desaparece completamente. La dopamina, la apomorfinina y la *N-n*-propilnorapomorfinina muestran disminuciones en su afinidad por el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub> de 48, 32 y 9 veces, respectivamente, al mutar la Ser 5.10 por alanina y sólo de 3 veces al cambiar la Ser 5.07. Los resultados de la modelación de la interacción droga-receptor en cuanto a la formación de los enlaces por hidrógeno muestra que el hidroxilo en posición *para* en la DA y en su posición análoga en la APO y en la NPA está interactuando con el residuo de Ser 5.07 y el hidroxilo en posición *meta* con el residuo de Ser 5.10. Los estudios de estructura-actividad para compuestos monohidroxilados en el anillo D aporfínico, muestran que el isómero 11 hidroxilado es el más potente, pero menos que la apomorfinina hidroxilada en 10 y 11. Este isómero presenta un sistema *meta* hidroxilado con respecto a la cadena nitrogenada [35]. Otros estudios de relaciones estructura-actividad muestran que el hidroxilo en la posición 10 del esqueleto aporfínico está involucrado en la afinidad, mientras que el hidroxilo en posición 11 está relacionado con la actividad agonista de esta familia de compuestos sobre receptores del tipo D<sub>1</sub> [36].

En la Tabla 4.6 se muestran los parámetros geométricos para esta interacción. En los complejos formados por los agonistas más potentes se aprecia una disminución de la distancia entre los átomos de oxígeno que forman la interacción, aunque el ángulo de interacción se aleja de la linealidad. La interacción entre el hidroxilo en posición *meta* en

los ligandos con respecto a la misma posición en la dopamina con el residuo de Ser 5.10, muestra un aumento de la linealidad para el ligando más potente como es en este caso la NPA.

**Tabla 4.6** Parámetros geométricos calculados en la formación de los enlaces por hidrógeno.

| Ligando  | Parámetros geométricos |                |                      |                |                |                      |
|--|------------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------|----------------------|
|  |                        |                |                      |                |                |                      |
|  | Ser 5.07               |                |                      | Ser 5.10       |                |                      |
|  | $d(O\cdots O)$         | $d(H\cdots O)$ | $\angle(OH\cdots O)$ | $d(O\cdots O)$ | $d(H\cdots O)$ | $\angle(OH\cdots O)$ |
| DA   | --                     | --             | --                   | 3,73           | 2,60           | 162,9°               |
| (R)-2F-NPA   | 2,79                   | 2,15           | 142,5°               | 3,36           | 2,65           | 132,5°               |
| (R)-NPA  | --                     | --             | --                   | 3,54           | 2,59           | 172,9°               |
| (R)-APO  | 3,49                   | 2,05           | 168,8°               | 4,12           | 3,22           | 160,0                |
| N-0437   | 2,65                   | 1,75           | 157,6°               | --             | --             | --                   |
| 7-OHDPAT   | --                     | --             | --                   | 3,51           | 2,77           | 135,6°               |

Los enlaces por hidrógeno, al igual que la interacción electrostática, están relacionados con la especificidad del sitio de unión, pero los efectos causados por la mutación de los residuos de serina de la TM5 no afectan tan drásticamente la afinidad de los agonistas. Para analizar este efecto en el sitio de unión, se construyeron los modelos con mutaciones puntuales, donde se cambiaron los residuos de Ser 5.07 y 5.10 por alanina en el modelo del receptor  $D_2$ . Esta mutación se realizó bajo las mismas

condiciones de construcción de los modelos de los receptores dopaminérgicos nativos o “wild”. La energía total de los receptores mutados es similar a la del receptor nativo, con una variación menor a 3 kcal/mol, por lo cual se puede afirmar que la disminución de la energía potencial total del complejo droga-receptor viene dada principalmente por la pérdida de esta interacción. En la práctica, la mutación de un residuo puede también actuar de una manera indirecta, alterando la posición y conformación de residuos adyacentes en la estructura terciaria. Específicamente en los RAPG, el residuo puede afectar la habilidad de la proteína para interconvertirse entre los estados de “alta” y “baja” afinidad [37].

Los modelos de los complejos droga-receptor se obtuvieron utilizando la misma metodología descrita para el proceso de “docking” con el modelo nativo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.7. La energía de estabilización asociada a la formación de un enlace por hidrógeno varía entre 1 a 30 kcal/mol, aunque en la mayoría de los sistemas se encuentra en un rango entre 4 a 10 kcal/mol [38]. En este caso sólo la disminución de la energía para el complejo droga-receptor del agonista selectivo N-0437 se ubica en este rango, es decir, la mutación del residuo de serina 5.07 no afecta fuertemente la energía de estabilización droga-receptor. El aumento de la energía del complejo droga-receptor para la dopamina y la (*R*)-NPA indica una mayor desestabilización de ambos complejos, de aproximadamente 15 kcal/mol. El residuo de serina que se ha mutado estaría participando en la formación de la interacción más fuerte de este tipo entre el ligando y el receptor.

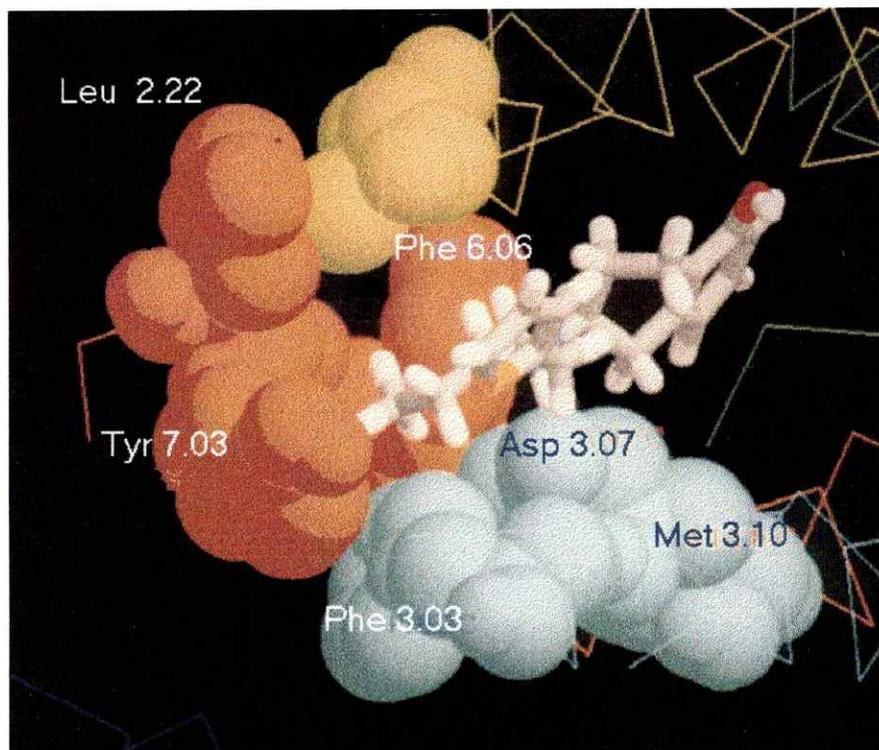
**Tabla 4.7** Energía total del complejo droga-receptor para complejos mutados en los residuos de Ser en la TM5.

| Ligando                       | Constante de disociación <sup>c</sup> (nM) | Energía Total del Complejo (kcal mol <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------|--|--|
| DA <sup>a</sup>               | 1270 (152,0)                               | -632,6 (-647,49)                                     |
| N-0437 <sup>b</sup>           | 0,91 (0,88)                                | -694,7 (-700,95)                                     |
| ( <i>R</i> )-NPA <sup>a</sup> | 39,6 (0,82)                                | -665,5 (-683,28)                                     |

a.- Mutación de Ser 5.10 a Ala. b.- Mutación Ser 5.07 a Ala. c.- () La constante de afinidad para el receptor dopaminérgico D2 sin mutaciones. d. Valor entre paréntesis corresponde al receptor D<sub>2</sub> nativo.

Por último, otra importante interacción en el sitio de unión denominada efecto propilo, postulado en los estudios de relaciones estructura-actividad para agonistas dopaminérgicos, se produciría a través de interacciones de van der Waals entre el agonista y una hendidura lipofílica que existiría en el sitio de unión. La *N*-sustitución en aporfinas y otras familias de ligandos dopaminérgicos conduce a un aumento de la afinidad y selectividad  $D_2$  vs.  $D_1$ , conocido como efecto propilo [39]. En las aporfinas, la *N*-alquilación de aporfinas produce una disminución de la afinidad por receptores  $D_1$ . Para los receptores  $D_2$ , este aumento de la afinidad y selectividad alcanza sus valores máximos para sustituyentes como el *N*-alilo y *N*-*n*-propilo; para sustituyentes más voluminosos o ramificados existe una pérdida de éstas [39]. Una de las hipótesis propuestas para explicar este fenómeno es que para el receptor  $D_1$  una interacción de este tipo no sería necesaria para la unión, o bien en el sitio de unión no existiría una hendidura hidrofóbica complementaria del grupo *N*-alquilo de ligandos. También se ha discutido la importancia de la orientación del par no enlazante del nitrógeno de las aporfinas en su afinidad por los receptores dopaminérgicos [39]. Aunque la interacción ocurre entre el receptor y la forma protonada de la apomorfinas, la orientación del par electrónico del nitrógeno orienta el sitio de protonación, ya sea pseudoecuatorial o axial, lo que genera el diastereoisómero que interactúa con el sitio de unión. Este mecanismo de protonación/inversión ha sido discutido en el capítulo 2. Además, la orientación del hidrógeno de la apomorfinas protonada determina distancias entre los diferentes puntos del sitio de unión. Como se discute también más adelante en este capítulo la posición de este hidrógeno modifica fuertemente la estructura del complejo droga-receptor. La hipótesis que se plantea es que la orientación de este hidrógeno sería pseudoecuatorial al interactuar con los receptores del tipo  $D_1$  y pseudoaxial al interactuar con los receptores del tipo  $D_2$ . En los modelos de complejos droga-receptor, se encuentra que el grupo *N*-alquilo de las aporfinas está interactuando con el receptor a través de una hendidura lipofílica dentro de éste (ver Fig. 4.19), que va desde el Asp 3.07 en la TM3 hacia las TM2 y TM7, y está formada por los residuos de Met 3.10; Thr 6.22; Leu 7.02, Tyr 7.03, Phe 7.06. Si se comparan los resultados obtenidos para la APO y NPA, se

encuentra que el grupo propilo estaría fijando el ligando al receptor y reforzaría la interacción electrostática por un acortamiento de la distancia entre el grupo amino y el Asp 3.07, disminuyendo la distancia desde 3.37 a 2.98 Å.



**Figura 4.19** La hendidura que interacciona con el grupo propilo de los ligandos. Los residuos involucrados en esta hendidura son: Tyr 7.03, Thr 6.22, Met 3.10, Phe 3.03 y Phe 6.19.

#### 4.3.4 Complejos antagonista-receptor

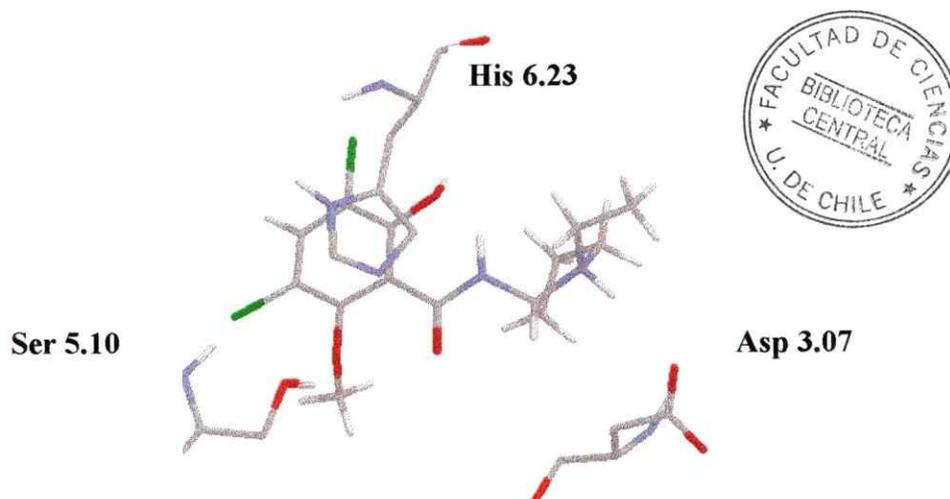
El trabajo de modelación indica que la interacción con antagonistas ocurre en una zona del receptor que se encuentra más hacia el lado extracelular del receptor que en la interacción con agonistas. Los resultados muestran que los residuos involucrados en el sitio de unión son los de Asp 3.07 e His 6.23. En las figuras 4.20 y 4.21 se muestran los complejos droga-receptor para el antagonista selectivo raclopride y el antagonista butaclamol, respectivamente.

La interacción electrostática está presente en el sitio de unión de antagonistas y el Asp 3.07 es el único residuo primario que está involucrado en ambos sitios de unión. Los datos experimentales de mutaciones sitio-dirigidas del residuo de Asp 3.07 por glicina o arginina muestran una pérdida de la afinidad [6]. La distancia entre el nitrógeno del ligando y los oxígenos del grupo Asp 3.07 es aproximadamente de 3,4 Å.

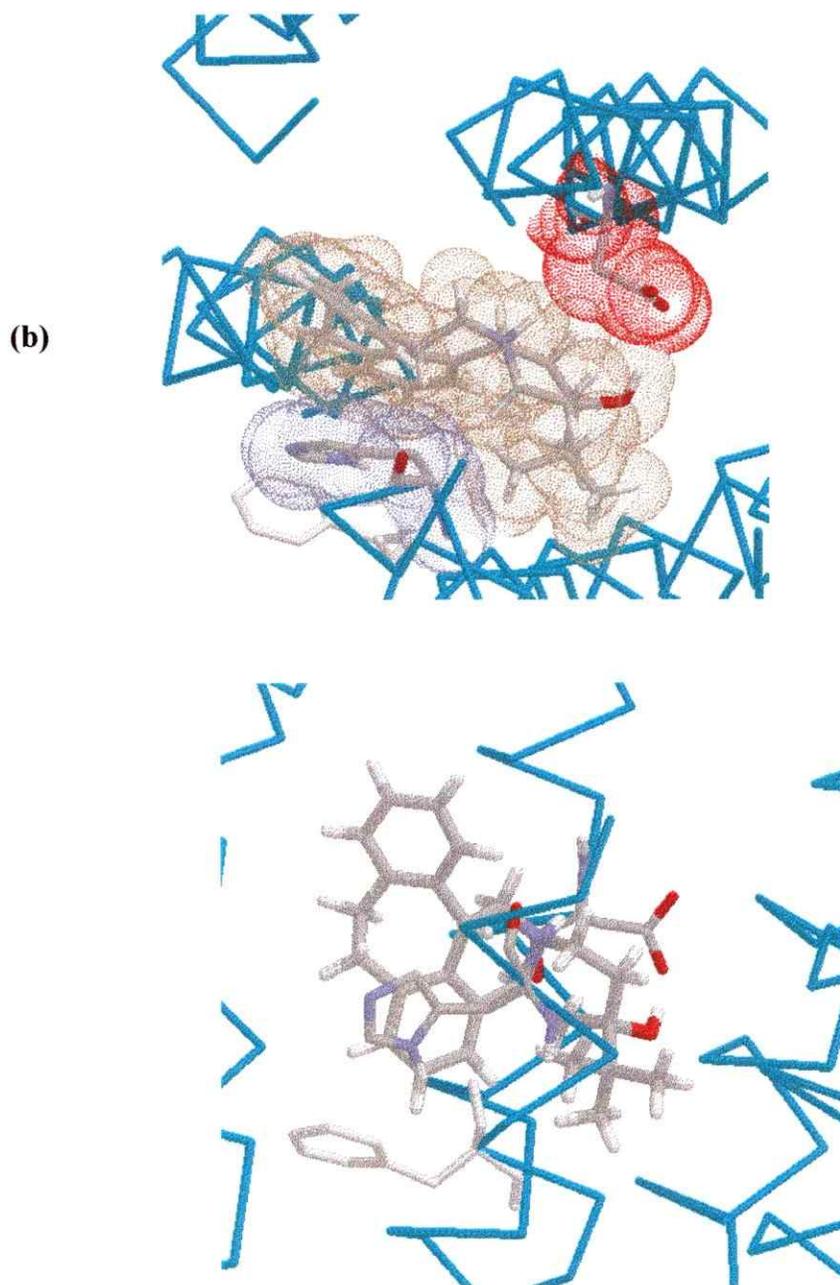
Se observa una interacción aromática entre el fragmento aromático de los antagonistas y el residuo de His 6.23, que está aproximadamente una vuelta de hélice más arriba en la hélice TM6 que el Phe 6.20, quedando más cerca del lado extracelular del receptor. En la figura 4.20 se aprecia la diferencia en la orientación de ambos residuos. El residuo de His 6.23 sólo está conservado en esta posición en el tipo D<sub>2</sub> de los receptores dopaminérgicos. En el tipo D<sub>1</sub> se tiene un residuo catiónico de arginina. Esto indicaría una diferencia en los sitios de unión entre ambos tipos de receptores a través de la diferencia en el carácter de las interacciones involucradas de naturaleza aromática para los receptores del tipo D<sub>2</sub> y catión- $\pi$  para el tipo D<sub>1</sub>. Recientemente, Woodward y col. [40] realizaron mutaciones sitio dirigidas de este aminoácido. Sus resultados muestran diferentes tendencias en cuanto a la unión de antagonistas dependiendo a la familia que pertenezcan. Los agonistas que presentaron una disminución de la afinidad fueron compuestos que pertenecen a la misma clase del antagonista selectivo raclopride. Este comportamiento podría deberse principalmente a que la energía libre de interacción para la unión de antagonistas es dirigida para algunos ligandos por la entropía y para otros es dirigido por la entalpía [41].

El residuo de His 6.23 posee una carga positiva, por lo cual se produciría una interacción más fuerte con antagonistas que presenten un fragmento aromático con una mayor densidad de carga negativa  $\delta^-$ . El raclopride, antagonista selectivo  $D_2$ , presenta un gran número de sustituyentes que ejercen efectos inductivos y resonantes que aumentan la densidad de carga del anillo aromático y por ende la interacción con el residuo de His. Los estudios de relaciones estructura-actividad para compuestos que comparten el esqueleto de raclopride (ver Figura 4.14) muestran que la afinidad decrece cuando los sustituyentes en el anillo aromático son grupos atradores de electrones y aumenta cuando son grupos dadores de electrones.

Para la actividad antagonista de los ligandos dopaminérgicos no sería necesaria la formación de enlaces por hidrógeno con el receptor, pero en el modelo del raclopride existe una interacción entre el grupo hidroxilo y la Ser 5.07, actuando el ligando como un aceptor de enlace por hidrógeno y el receptor como un dador. Los estudios de relaciones estructura-actividad muestran que la presencia de este grupo hidroxilo es crítica en la afinidad de las 6-metoxisalicilamidas, grupo al que pertenece el raclopride [42].



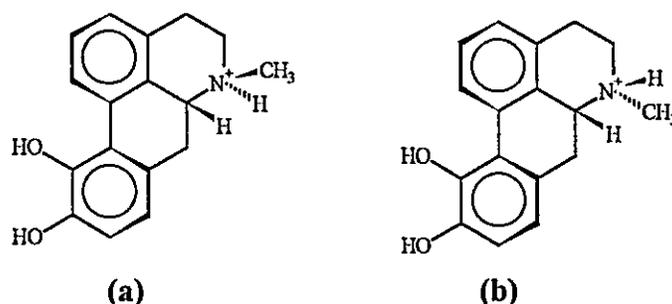
**Figura 4.20** Sitio de unión de antagonista. Complejo droga-receptor para el antagonista selectivo raclopride con el receptor  $D_2$ . Se aprecia el residuo de Ser 5.10, conjuntamente con los aminoácidos del sitio de unión de antagonista Asp 3.07 e His 6.23.



**Figura 4.21** Complejo droga-receptor para butaclamol. (a) Vista desde el lado extracelular de la membrana: se muestra los residuos de Asp 3.07 e His 6.23. Se aprecia que el residuo de Phe 6.20 está una vuelta de hélice más hacia el interior del receptor en la misma TM. Se muestran las superficies de van der Waals del ligando y los residuos. (b) Vista desde el interior de la membrana: se aprecia la interacción aromática entre el residuo de histidina y un fragmento aromático en el antagonista, además de una interacción electrostática y enlace por hidrógeno entre los grupos amino e hidroxilo del ligando y el residuo de Asp 3.07

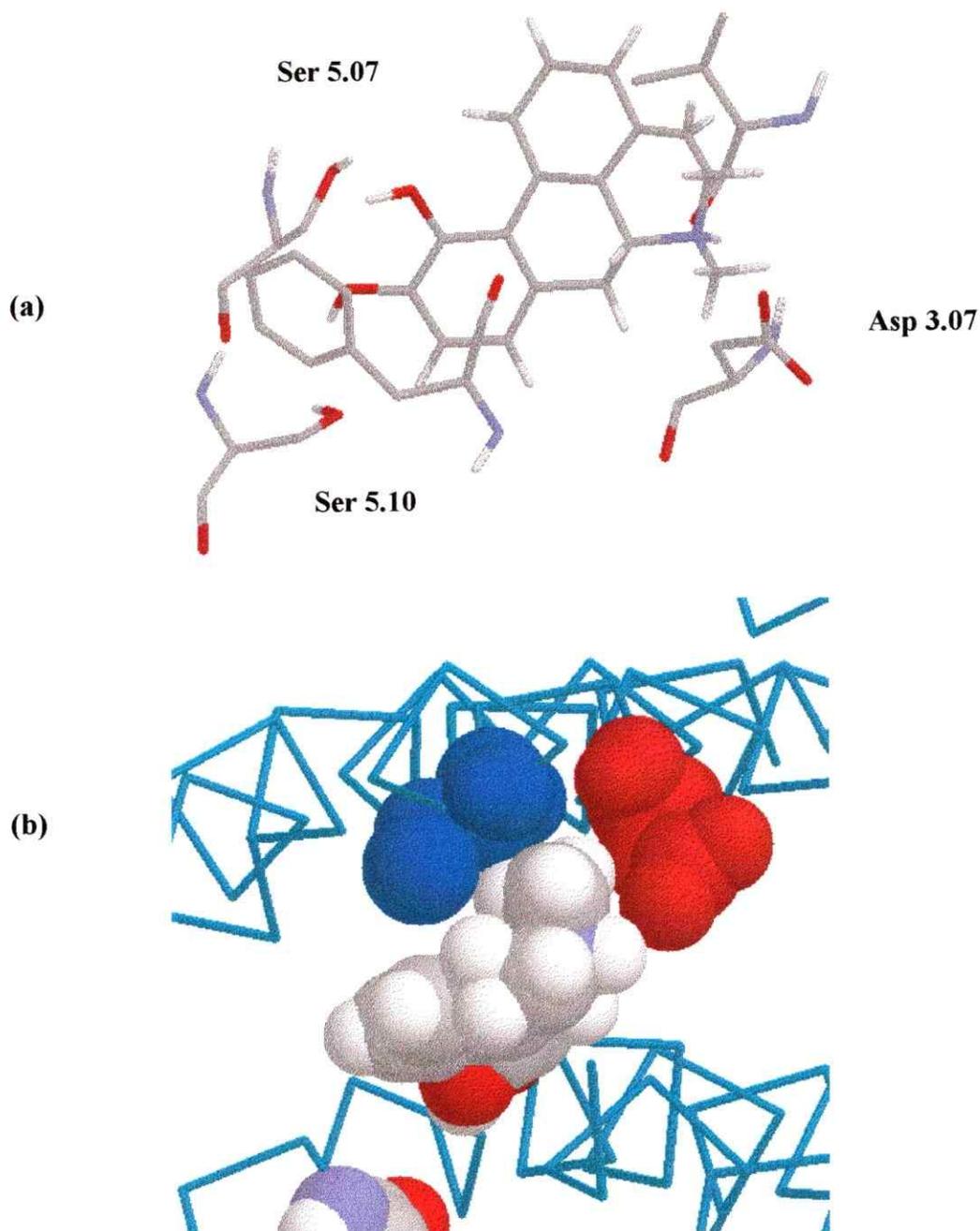
### 4.3.5 Modelo de unión para apomorfina y boldina.

La apomorfina *N*-protonada puede existir en dos formas diastereoisómeras, cuyas estructuras fueron ampliamente discutidas en el Capítulo 2. Se realizó el “docking” para ambos diastereoisómeros de la (*R*)-apomorfina protonada, ambos en sus conformaciones semisilla torcida en el anillo B, siguiendo la nomenclatura planteada en el Capítulo 2: Ia y IIa (ver Figura 4.22). También se realizó el proceso de “docking” para la (*S*)-apomorfina, la cual es un antagonista dopaminérgico, estudiando sólo su interacción en el sitio de unión de antagonistas (ver Figura 4.23).

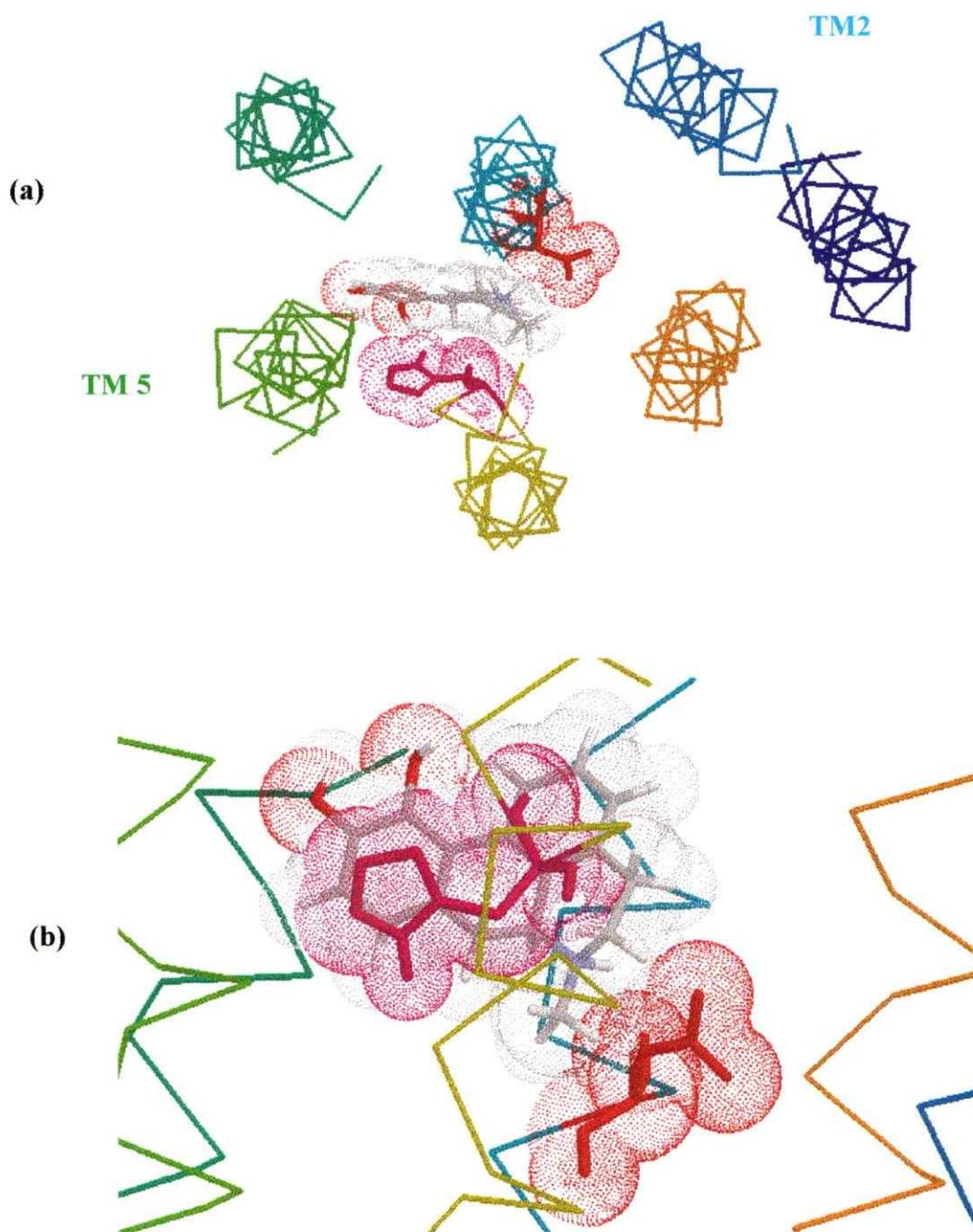


**Figura 4.22** Diastereoisómeros de la (*R*)-apomorfina. Diastereoisómeros (a) Ia y (b) IIa.

Las energías para los tres complejos droga-receptor de Ia- y IIa- (*R*)-APO, y la (*S*)-APO son  $-672,9$ ;  $-645,5$  y  $-663,3$  kcal/mol, respectivamente. El complejo droga-receptor para el diastereoisómero Ia es el más estable. En la Figura 4.23 se presentan los complejos droga-receptor para el enantiómero (*R*)-APO, en sus dos formas diastereoisómeras protonadas.



**Figura 4.23** Complejo (R)-APO-D<sub>2</sub>. (a) el diastereoisómero Ia de la APO, que muestra las características de un sitio de unión de agonista con los residuos Asp 3.07, Ser 5.07, Ser 5.10 y Phe 6.20. También se muestra el residuo de Val 3.04. (b) el diastereoisómero IIa de la APO, visto desde el lado extracelular. Se muestra la superficie de van der Waals para la apomorfina, el residuo Asp 3.07 (rojo) y el residuo de Val 3.04 (celeste). Se aprecia el contacto entre el grupo metilo en posición pseudoaxial y el residuo de Val 3.04.



**Figura 4.24** Complejo (S)-APO-D<sub>2</sub>, que muestra las características de un sitio de unión antagonista, residuos de Asp 3.07 (en rojo) e His 6.23 (en fucsia). (a) Vista superior desde el exterior extracelular del receptor y (b) desde el interior de la membrana. Para el ligando y los residuos se muestran sus superficies de van der Waals.

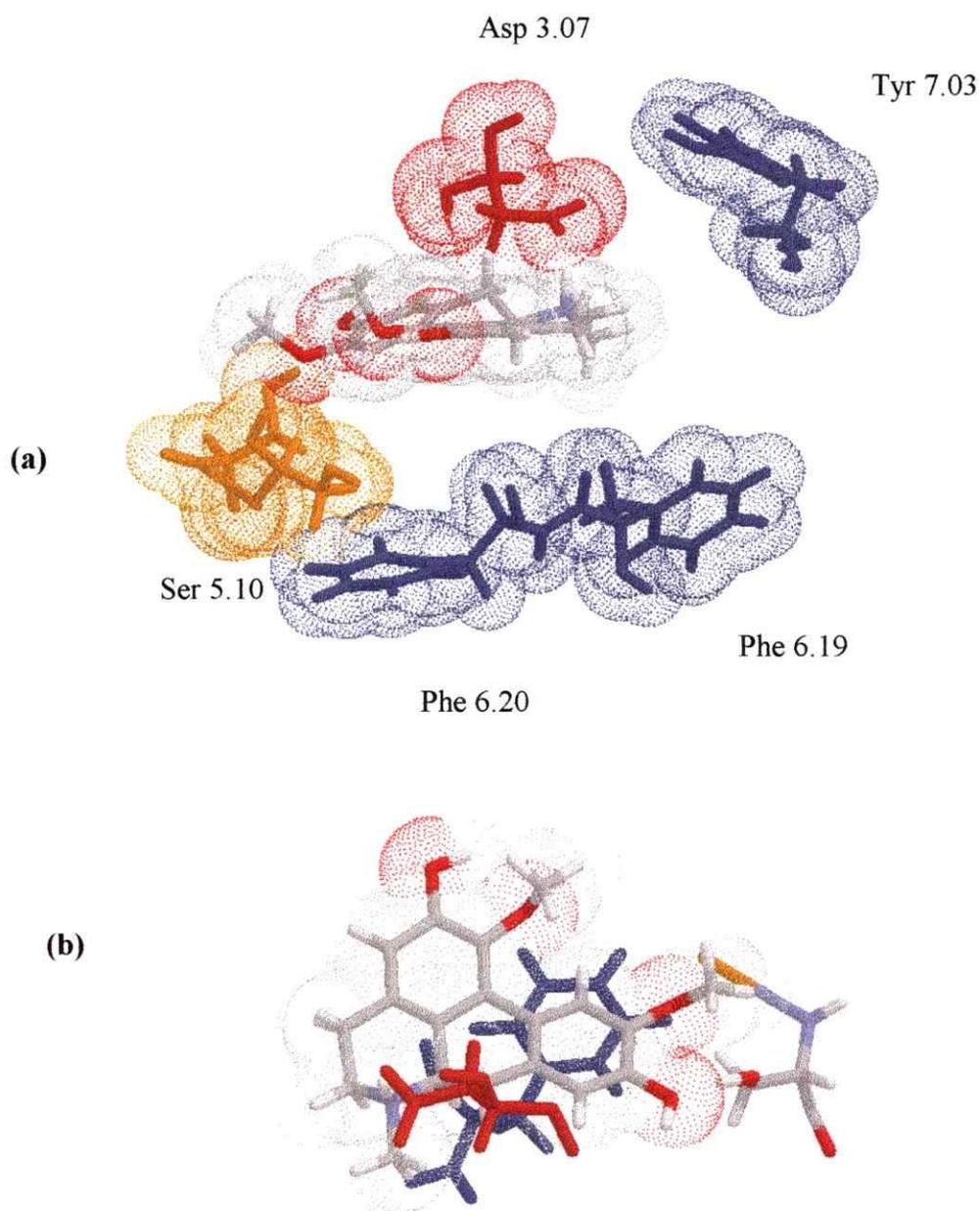
Las principales diferencias ocurren en la orientación del sustituyente metilo del nitrógeno. En el complejo droga-receptor para el diastereoisómero Ia, este grupo está orientado hacia el inicio de la hendidura que acomoda el grupo n-propilo, mientras que en el otro complejo formado con el diastereoisómero IIa, dicho grupo se encuentra en una posición pseudoaxial, en la cual choca con el esqueleto principal de la TM3, quedando en contacto con el residuo de Val 3.04 de dicha hélice. Además, los enlaces por hidrógeno se forman de una manera inversa, es decir, para el diastereoisómero Ia se forma entre el hidroxilo en la posición 11 y el residuo de Ser 5.10 mientras que el hidroxilo en la posición 10 interactúa con el residuo de Ser 5.07. Para el complejo formado con el diastereoisómero IIa de la (R)-APO protonada, los enlaces se forman entre el grupo OH en posición 10 y la Ser 5.10 y el hidroxilo en 11 con la Ser 5.07. Los resultados de mutaciones sitio dirigidas para la (R)-APO muestran que la afinidad se ve afectada por la mutación de la Ser 5.10 en una disminución de 30 veces su potencia mientras que para la Ser 5.07 es sólo de 2 veces. Asimismo, los estudios de relaciones estructura-actividad muestran que el hidroxilo en posición 11 (posición *meta* en el esqueleto de la DA) es importante en la unión a los receptores dopaminérgicos. Ambos resultados avalan una hipótesis de unión entre la Ser 5.10 y el residuo en posición *meta* (posición 11 en el esqueleto de aporfina).

Para el enantiómero (S) se muestra su inserción en el sitio de unión de antagonistas, por lo cual, sólo existen dos interacciones importantes: la interacción electrostática y la interacción aromática. En la Figura 4.24 se muestra el complejo droga-receptor y se aprecia claramente la disposición de la (S)-apomorfinina en el sitio de unión. Se puede notar la ubicación del grupo metilo hacia el interior del receptor, mientras que el protón del nitrógeno se encuentra en una posición pseudoaxial.

Por otra parte, las moléculas pertenecientes a la familia de las aporfina presentan actividad en ambos tipos de receptores dopaminérgicos. Por esta razón, para entender las diferencias en las afinidades por cada uno de los receptores en estudio, es necesario realizar el "docking" en un modelo del receptor D<sub>1</sub> para esta familia y analizar las diferencias generadas en los sitios de unión. Además de explicar las observaciones

experimentales, los modelos deben ser capaces de predecir la afinidad de nuevos compuestos. La aporfina (*S*)-boldina muestra actividad como antagonista en sistemas dopaminérgicos [44]. Para el enantiómero (*R*)-boldina no se conoce una eventual actividad, porque ésta aún no ha sido evaluada. En la familia de las aporfinas los enantiómeros (*R*) suelen presentar actividad como agonistas y los (*S*) son antagonistas dopaminérgicos. Además los enantiómeros (*R*) son más potentes que sus antípodas [43]. Si aplicamos esto a la boldina, se podría esperar que el enantiómero (*R*) se comportara como un agonista frente a este tipo de receptores.

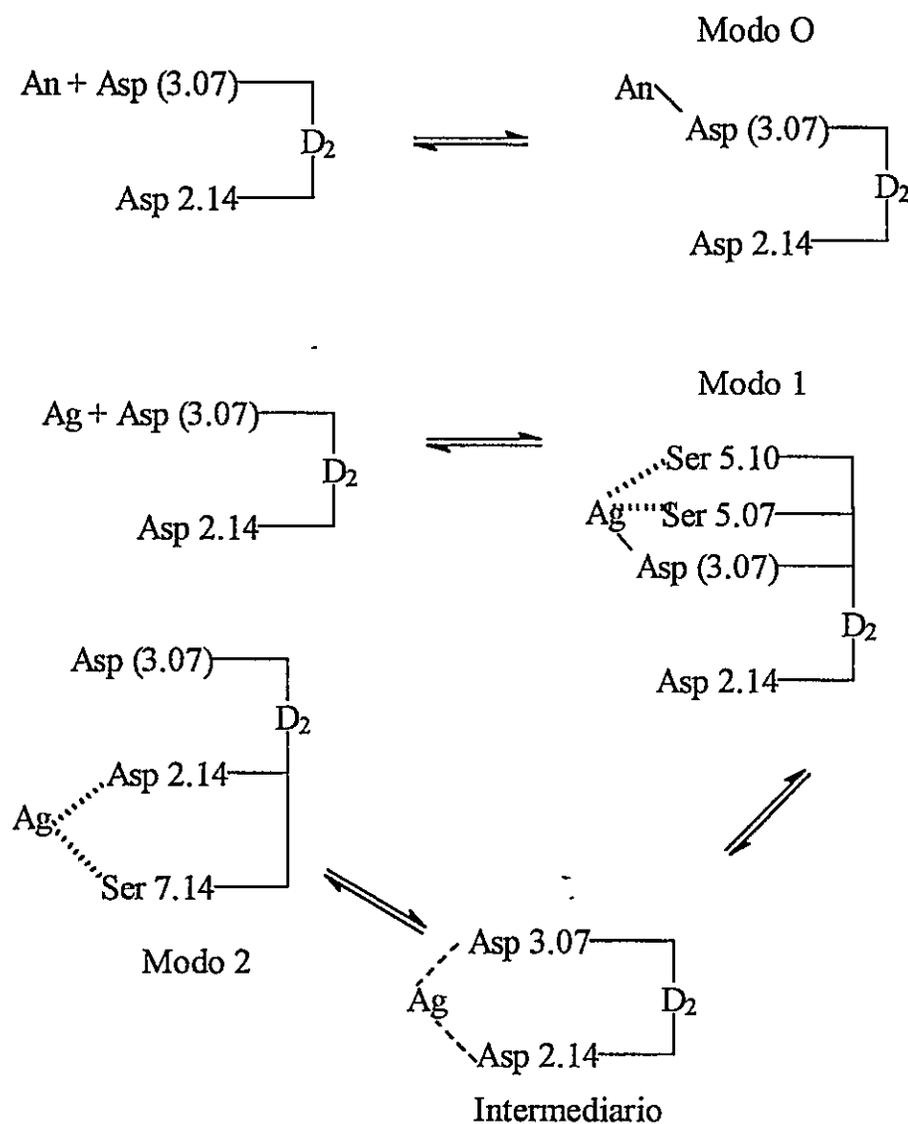
En la Figura 4.25 se muestran los complejos droga-receptor para el enantiómero (*R*) de la boldina. El complejo droga-receptor de (*S*)-boldina presenta el modo de unión definido para antagonistas, es decir, interacción electrostática, interacción aromática del anillo D con el residuo His 6.23, formación de enlaces por hidrógeno entre el grupo metoxilo en posición 10 con Ser 5.10 y el metoxilo del anillo A con la Ser 5.07, actuando el ligando como un aceptor de éstos. Para la (*R*)-boldina el modelo predice las interacciones definidas en el sitio de unión para agonistas, como son la interacción del anillo aromático D con la Phe 6.20 y la formación de enlace por hidrógeno con el receptor a través de la Ser 5.07 y el grupo metoxilo del anillo A del ligando, si bien éste actúa necesariamente como aceptor, y no como dador. Para la (*R*)-boldina, a través de la energía potencial del complejo droga-receptor, se podría esperar una afinidad mayor que la de la dopamina, pero ligeramente menor que la de la apomorfina.



**Figura 4.25** Complejo droga-receptor para la (R)-boldina. (a) vista desde el lado extracelular del receptor, donde se muestran los residuos de Asp 3.07, Phe 6.20, Phe 6.19 y Tyr 7.03, Ser 5.10. (b) vista desde el interior de la membrana: en frente de la molécula se aprecia el residuo de Asp 3.07 (en rojo), además se aprecia la proximidad del residuo de Ser 5.10, cuyo hidrógeno del grupo hidroxilo presenta un enlace por hidrógeno con el oxígeno del grupo hidroxilo en posición 9 y el oxígeno del grupo metoxilo en posición 10. En ambas vistas se aprecia la superficie de la molécula.

Los sitios de unión obtenidos están de acuerdo con los modos de unión propuestos por Saunders y col. [23] para los receptores muscarínicos. Proyectando esto hacia los receptores dopaminérgicos, se define el Modo 0 para antagonistas, donde para la inhibición del receptor sólo es necesaria la interacción con los residuos de Asp 3.07 y de His 6.23. En cambio, los agonistas presentarían dos modos de unión: el Modo 1 se define para el primer sitio de unión entre el Asp 3.07, Ser 5.07, Ser 5.10 y Phe 6.20. Un segundo modo de unión consistiría en la interacción con Asp 2.14 y Ser 7.14. El proceso de activación por parte de los agonistas estaría entre los Modos 1 y 2. El paso entre un modo y otro para los agonistas se debería a la fluctuación de la TM5 que rompería las interacciones de enlace por hidrógeno formadas a través de las Ser 5.07 y 5.10 del receptor y los grupos hidroxilos de los ligandos, dando paso a un cambio conformacional del receptor permitiendo el acceso al segundo modo de unión.

Este Modo 2 involucraría una interacción electrostática con el residuo de Asp 2.14. También existiría un enlace por hidrógeno entre el fragmento catecol de los ligandos y el residuo Ser 7.14, el cual sólo está conservado en los receptores dopaminérgicos (ver Fig. 4.26). Por esto, sería de gran interés realizar estudios de interacciones droga-receptor en este segundo sitio de unión, pero como se discutió en la sección 4.3.1 (ver Fig. 4.13) en los modelos obtenidos ambos sitios se encuentran muy cercanos entre sí. Esto permite postular que la unión del agonista debería producir un profundo cambio conformacional en la estructura del receptor para permitir la apertura de este segundo sitio.



**Figura 4.26** Modos de unión para el receptor dopaminérgico  $D_2$ , adaptado de Saunder y col. [23]. Modo 0 es la unión antagonista (An)-receptor. Modo 1 es la unión de agonista al receptor, donde se forman interacciones no-covalentes entre el ligando y el receptor. Modo 2, el agonista se mueve hacia el interior del receptor generando un cambio conformacional denominado "Intermediario", lo que permite abrir el segundo sitio de unión putativo.

#### 4.4 CONCLUSIONES

La interacción droga-receptor para los receptores dopaminérgicos puede ser descrita a través de un complejo droga-receptor. Para la modelación de este complejo [D-R] se construyó un modelo de la estructura tridimensional del receptor D<sub>2</sub> a través de una aproximación mixta utilizando la modelación por homología y las diferentes metodologías para la predicción de estructura secundaria y posteriormente se aplicó la técnica de "docking" para estudiar las interacciones con diversos ligandos.

- El modelo molecular tridimensional del receptor D<sub>2</sub> humano explica correctamente los órdenes experimentales de las afinidades de las moléculas estudiadas y también se pueden notar las diferencias en el sitio de unión entre ambos tipos de receptores D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>.

- Se definió un modo de unión para agonistas dopaminérgicos que está de acuerdo con las afinidades medidas con receptores que han sufrido mutaciones sitio-dirigidas experimentales. Este sitio está formado por los residuos de Asp 3.07, Phe 6.20, Ser 5.07 y Ser 5.10. Se encuentra además que la carga positiva del ligando enfrenta al Asp 3.07, rodeado por un medio apolar, lo que favorecería la transferencia de carga o la posible formación de un par iónico. Además, se puede explicar esta interacción como una reacción ácido-base utilizando el principio de HSAB.

- Se definió un modo de unión para antagonistas dopaminérgicos que involucra los residuos Asp 3.07 e His 6.23. La interacción aromática explica el hecho experimental que anillos aromáticos con una alta densidad de carga aumentan la afinidad de antagonistas por el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>.

- Los enlaces por hidrógeno formados en el complejo agonista –receptor muestran que el residuo de Ser 5.10 estaría interaccionando con el grupo hidroxilo en la posición *meta* del esqueleto de dopamina en los agonistas, lo que está de acuerdo con estudios de la mutación de este residuo que provocan una significativa disminución de la energía de unión del complejo.

## Referencias

- 1.- R. Henderson, J. Baldwin, T. H. Ceska, F. Zemlin y K. Downing, *J. Mol. Biol.*, **231**, 899 (1990).
- 2.- G. F. X. Schertler, C. Villa, y R. Henderson, *Nature* **362**, 770 (1993).
- 3.- J. M. Baldwin, *EMBO J.* **12**, 1693 (1994).
- 4.- M. F. Hibert, S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoflack y A. Bruinvels. *TIPS* **14**, 7 (1993).
- 5.- V. M. Unger, P. A. Hargrave, J. M. Baldwin y G. F. X. Schertler, *Nature* **389**, 203 (1997).
- 6.- A. Manson, F. Meng, J. H. Meador-Woodruff, L. P. Taylor, O. Civelli y H. Abil, *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 205 (1992).
- 7.- C. D. Strader, T. Gaffney, E. E. Sugg, M. R. Candlemore, R. Keys, A. A. Patchett y R. A. F. Dixon, *J. Biol. Chem.* **266**, 5 (1991).
- 8.- A. F. Fersht, *TIBS* **9**, 145 (1984).
- 9.- C. D. Livingstone, P. G. Strange y L. H. Naylor, *Biochem. J.* **287**, 277 (1992).
- 10.- S. V. Dahl, O. Edvarsen e I. Sylte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8111 (1991).
- 11.- M. M. Teeter, M. Froimowitz, B. Stecy y C. J. DuRand, *J. Med. Chem.* **37**, 2874 (1994).
- 12.- A. Malberg, G. Nordvall, A. M. Johansson, N. Mohell y V. Hacksell, *Mol. Pharmacol.* **46**, 299 (1994).
- 13.- T. L. Blundell, D. Barlow, N. Borlakoti y J. M. Thornton, *Nature* **306**, 281 (1983).
- 14.- G. van Heijne, *J. Mol. Biol.* **218**, 499 (1991).
- 15.- J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber y H. Michel, *Nature* **318**, 618 (1985).
- 16.- A. Polinsky, M. Goodman, K. A. Williams y C. Deber, *Biopolymers* **32**, 399 (1992).
- 17.- R. Sankaramakrishnam, N. Sreerama y S. Vishvesmera, *Biophys. Chem.* **40**, 97
- 18.- Tripos, St. Louis, Missouri.
- 19.- D. Donnelly, J. B. C. Findlay y T. L. Blundell, *Receptors & Channels* **2**, 61 (1994).
- 20.- P. A. Kollman, J. S. Weiner, D. T. Nguyen y D. A. Case, *J. Comp. Chem.* **7**, 230 (1986).

- 21.- R. A. Laskowski, M. Macarthur, D. S. Moss y J. M. Thornton, *J. Appl. Crystallography* **26**, 283 (1993).
- 22.- G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan y V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.* **7**, 95 (1963).
- 23.- J. Saunders y J. B. C. Findlay, *Biochem. Soc. Symp.* **57**, 81 (1994).
- 24.- J. A. Bikker, S. S. Trumpp-Kallmeyer y C. Humblet, *J. Med. Chem.* **41**, 2911 (1998)
- 25.- Y. Satow, G. Cohen, E. Padlan y D. Davies, *J. Mol. Biol.* **190**, 593 (1986).
- 26.- S. K. Burley y G. A. Petsko, *Trends Biotech.* **7**, 354 (1989).
- 27.- M. L. Verdonk, G. J. Boks, H. Kooijman, J. A. Kouters y J. Kroon, *J. Comp. Aided Mol. Design* **7**, 173 (1993).
- 28.- M. A. Lemmon y D. M. Engelman, *Current Opinion in Structural Biology* **2**, 511 (1991).
- 29.- K. A. Neve, B. A. Cox, R. A. Henningsen, A. Spanoyannis y R. L. Neve, *Mol. Pharmacol.* **39**, 733 (1991).
- 30.- C. D. Wood, Tesis Doctoral, Universidad de Glasgow.
- 31.- D. D. Miller, M. Harold, R. A. Wallace, L. J. Wallace y N. J. Uretsky, *TIPS* **9**, 282 (1988)
- 32.- C. D. Strader, I. S. Sigal, R. B. Register, M. R. Canderole, E. Rands y R. A. F. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4384 (1987).
- 33.- W. Cho, L. P. Taylor, A. Mansour y H. Akil, *J. Neurochem.* **65**, 2105 (1995).
- 34.- C. D. Strader, M. R. Canderole, W. S. Hill, I. S. Sigal y R. A. F. Dixon, *J. Biol. Chem.* **264**, 13572 (1989).
- 35.- Y. Gao, R. Zong, A. Campbell, N. S. Kula, R. J. Baldessarini y J. L. Neumeyer, *J. Med. Chem.* **31**, 1392 (1988).
- 36.- J. M. Schaus, R. D. Titus, M. M. Foreman, N. R. Manson y L. L. Truex, *J. Med. Chem.* **33**, 600 (1990).
- 37.- T. W. Schwartz, U. Gether, H. T. Schambye y S. A. Hjorth, *Curr. Pharm. Des.* **1**, 325 (1995).

- 38.- P. Gilli, V. Ferretti y G. Gilli en W. Gans, A. Amann, J. C. A. Boeyens, eds., "*Fundamental Principles of Molecular Modeling*". Plenum Press, New York 1996.
- 39.- Y. Gao, V. J. Ram, A. Campbell, N. S. Kula, R. J. Baldessarini y J. L. Neumeyer, *J. Med. Chem.* **33**, 39 (1990).
- 40.- R. Woodward, S. J. Daniell, P. G. Strange y L. H. Naylor, *J. Neurochem.* **62**, 1664 (1994).
- 41.- G. J. Kilpatrick, N. El Tayar, H. van der Waterbeemd, P. Jenner, B. Testa y C. D. Marsden, *Mol. Pharmacol.* **30**, 226 (1986).
- 42.- T. Paulis, N. El Tayar, P. A. Carrupt, B. Testa y H. van der Waterbeemd, *Helv. Chim. Acta* **74**, 241 (1991).
- 43.- J. L. Neumeyer en J. D. Phillipson, M. F. Roberts y M. K. Zenk eds., "*The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*". Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg; 1985.
- 44.- M. Asencio, B. Delaquerrière, B. K. Cassels, H. Speisky, E. Comoy y P. Protais, *Pharmacol. Biochem. & Behav.* **62**, 7 (1999).

## CAPITULO 5

### APLICACIÓN DEL PRINCIPIO HSAB A LA INTERACCIÓN DROGA-RECEPTOR

#### 5.1 INTRODUCCIÓN

En el complejo droga-receptor existen interacciones del tipo electrostático, hidrofóbico y/o aromático, enlaces por hidrógeno, como también interacciones menos energéticas tales como las de van der Waals. Si se relaciona la interacción droga-receptor con el principio de ácidos y bases duros y blandos (HSAB), donde ácidos duros reaccionan con bases duras, y ácidos blandos reaccionan con bases blandas [1], hay que plantear que para una máxima afinidad y activación del complejo droga-receptor se requiere que el ligando y el receptor presenten durezas (blanduras) semejantes. En otras palabras, una conformación dura (blanda) del agonista (un ácido de Pearson) debería interaccionar con un sitio de unión (base de Pearson) que posea una dureza (blandura) similar para formar un complejo más estable y generar una mayor activación del receptor. Recientemente, Li y Evans [2] mostraron la importancia de este principio en los procesos de catálisis enzimática. Para el fosfoenolpiruvato encontraron que durezas o blanduras locales podrían dar cuenta de las interacciones en el complejo sustrato-enzima. El fosfoenolpiruvato presenta pequeñas fluctuaciones en la energía, pero

propiedades locales, tales como carga o densidad del HOMO, cambian drásticamente cuando hay un cambio en la conformación. Ellos han postulado la importancia del principio de HSAB en la catálisis enzimática, planteando que si este principio no fuese aplicado a este tipo de reacciones, éstas perderían su especificidad o eficiencia.

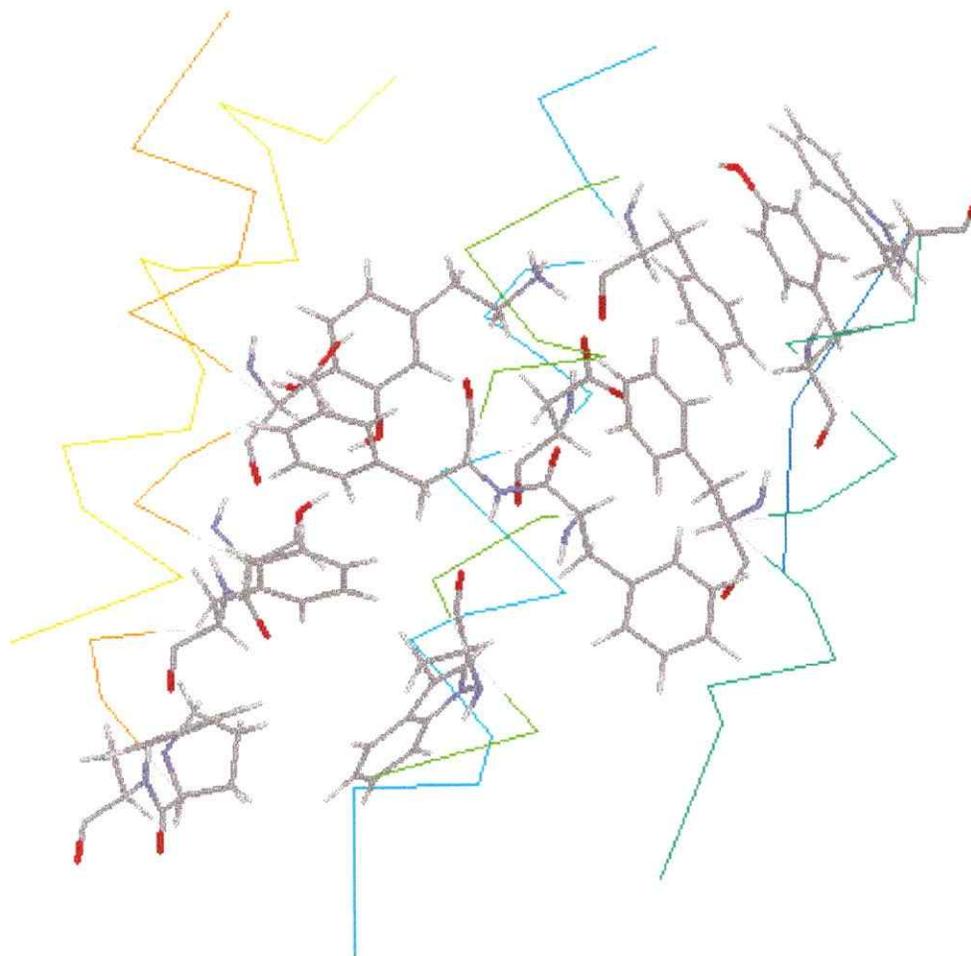
Los estudios realizados muestran que los ligandos dopaminérgicos deben poseer un átomo de hidrógeno unido al grupo amonio para tener una óptima interacción con el receptor [3]. A este tipo de interacción postulado se le denomina enlace iónico reforzado por hidrógeno (reinforced ionic bond). Por esto los ligandos dopaminérgicos son ácidos según la definición de Pearson, en su mayoría aminas protonadas que interactúan con una base en el sitio de unión, es decir, el sitio de unión podría considerarse una base de Pearson. Esta base es un grupo carboxilato aceptor de protones, perteneciente al residuo de aspartato-114 en la secuencia D<sub>2</sub>, como ha sido determinado a través del análisis farmacológico de receptores dopaminérgicos con mutaciones sitio-dirigidas [4]. Además, este residuo también está presente en otros receptores aminérgicos como son los adrenérgicos, serotoninérgicos e histaminérgicos [5].

Como se discutió en la introducción general de esta tesis, uno de los objetivos principales es modelar y estudiar la interacción droga-receptor a través de la utilización de modelos moleculares del complejo droga-receptor. Como se discutió ampliamente en el capítulo precedente, el sitio de unión agonista-receptor está formado por residuos primarios y secundarios, cada uno de los cuales cumple roles o funciones diferentes dentro del sitio de unión. Para una mayor comprensión de la función que cumple cada uno de estos residuos en la estabilización del complejo droga-receptor, se realizó un estudio químico-cuántico para diferentes modelos moleculares del sitio de unión de la dopamina. Estos modelos están formados por la dopamina más residuos primarios y secundarios, que forman parte del receptor dopaminérgico. Como se discutió en la sección 4.3.3, el sitio de unión de agonistas está formado principalmente por residuos apolares y aromáticos, con pocos residuos polares. La mayor parte de los residuos apolares son: leucinas, valinas e isoleucinas, los cuales poseen cadenas laterales cortas, que sólo pueden estar involucradas a través de interacciones de van der Waals. Este tipo de interacciones son generalmente débiles y de corto alcance. Los dos residuos polares

cargados: Asp 3.07 e His 6.23 se ubican hacia el lado extracelular del receptor. El residuo de His 6.23 está ubicado en una vuelta de hélice sobre el residuo de Phe 6.20. Como se expuso en el capítulo anterior, el sitio de unión está ubicado en la zona más cercana al lado extracelular. Otro hecho importante de destacar es la gran cantidad de residuos aromáticos en el sitio de unión. La mayor parte de ellos está en la vecindad del residuo de Asp 3.07.

En este capítulo se estudia la interacción droga-receptor a través del principio el principio de ácidos y bases duras y blandas (HSAB) propuesto por Pearson [1]. Además se estudia la influencia de los residuos aromáticos Otra hipótesis planteada para este racimo de residuos aromáticos es que estabilizaría la interacción electrostática, es decir, permitiría la formación de un par iónico entre el ligando y el receptor [6,7]. En esta situación están involucrados los residuos de Trp 2.24, Phe 6.19, Phe 3.03 y Phe7.06, y Tyr 7.03. Otros dos residuos aromáticos presentes en el sitio de unión son el Trp 6.16 y el Phe 5.11. El Trp 6.16 está demarcando el fin del sitio de unión, es decir, es uno de los residuos que están ubicados más hacia el interior del receptor. El estudio de relaciones estructura-actividad postula la existencia de otra interacción aromática en el sitio de unión de agonistas [8], cuya distancia, entre el anillo catecol y este nuevo centro aromático, en el farmacóforo es 5 Å. Esta interacción podría ocurrir con el residuo de Trp 6.16 al final del sitio de unión. El residuo de fenilalanina 5.11 está en las inmediaciones del residuo aromático 6.20, que está formando la interacción aromática con el ligando. Como se discutió en el capítulo anterior, estos dos residuos están formando una interacción aromática (ver Figura 4.11). Unido a esta interacción, el residuo de prolina en la TM5 puede variar la conformación de esta hélice. La formación de enlaces por hidrógeno como la interacción aromática, en conjunto con el cambio conformacional de la TM5 podrían producir los cambios necesarios para la activación de la respuesta neurotransmisora.

En la Figura 5.1 se muestra el sitio de unión de la dopamina y los residuos de aminoácidos aquí señalados.

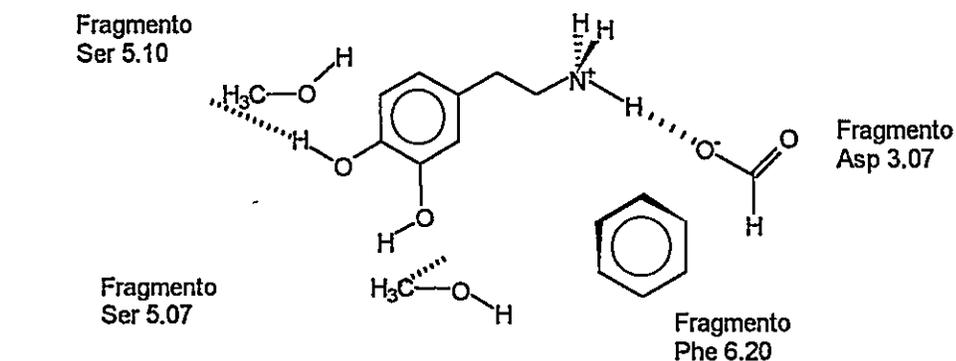


**Figura 5.1** Complejo droga-receptor para la dopamina- $D_2$ . Se muestran los residuos primarios: Asp 3.07, Ser 5.07, Ser 5.10 y Phe 6.20. Los residuos secundarios Phe 3.03, 5.11, 6.19 y 7.06, Tyr 7.03, Trp 6.16 y Trp 2.24.

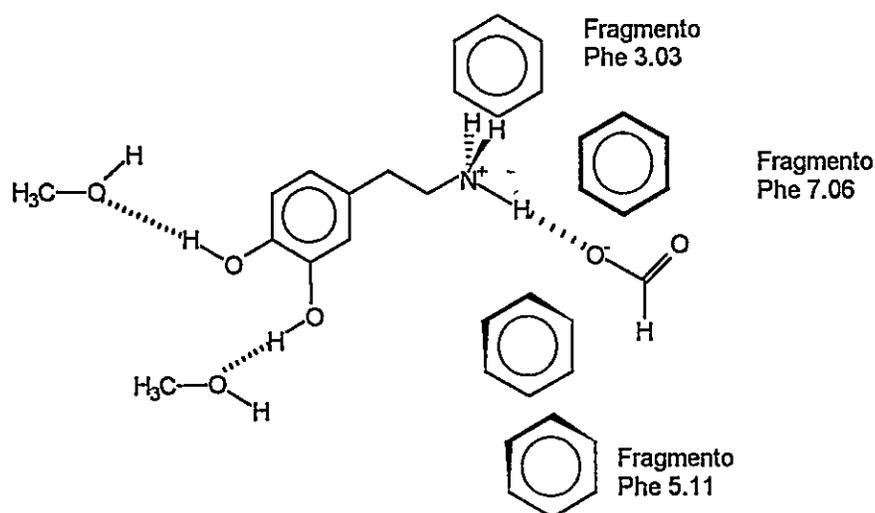
## 5.2 Metodología

Debido a la capacidad computacional y al tiempo de cálculo involucrado, no es factible incluir todos los residuos anteriormente discutidos: sólo se incluyeron aquellos con una distancia promedio de 5 Å del ligando. Los modelos moleculares a estudiar son mostrados en la figura 5.2. Los modelos del sitio de interacción droga-receptor son el Modelo A que sólo involucra al ligando (dopamina) más los fragmentos de los residuos primarios de Asp 3.07, Phe 6.20, Ser 5.07 y 5.10. El Modelo B está compuesto por el Modelo A más los fragmentos de los residuos secundarios Phe 3.03, Phe 7.06 y Phe

5.11. Los residuos son modelados a través de fragmentos que representan parte de las cadenas laterales.



**Modelo Sitio de Interacción A**

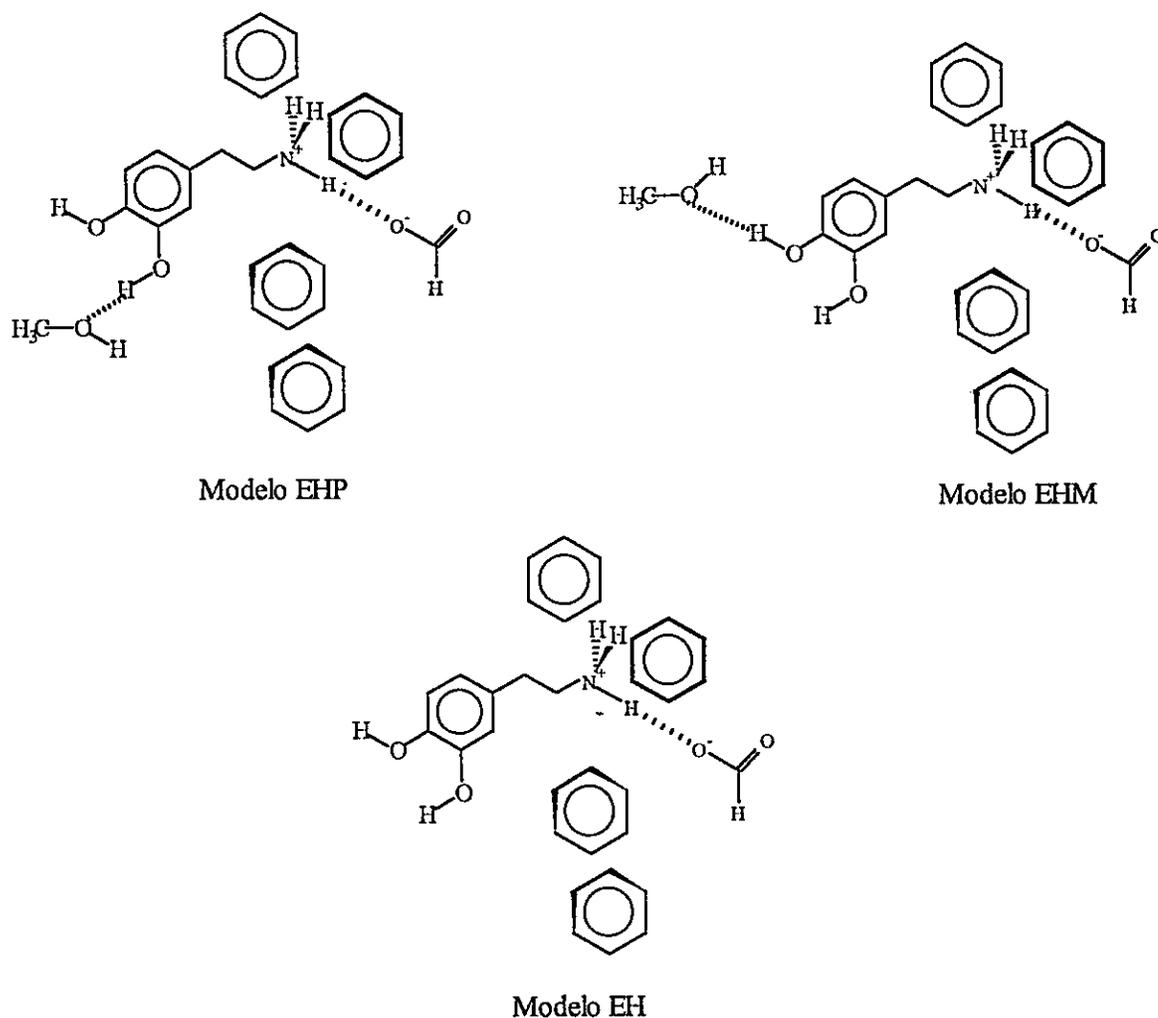


**Modelo Sitio de Interacción B**

**Figura 5.2 Modelos moleculares del complejo dopamina-sitio de unión.**

La evaluación del rol que cumplen los enlaces por hidrógeno en la estabilización se realizó a través del estudio de los modelos presentados en la Figura 5.3. En el Modelo EHP está ausente la interacción entre el receptor y el ligando a través del fragmento que representa al residuo de Ser 5.07, en el Modelo EHM está ausente la interacción para el

hidroxilo en posición *meta*. Para el último modelo EH se han eliminado la formación de los enlaces por hidrogeno con el receptor.

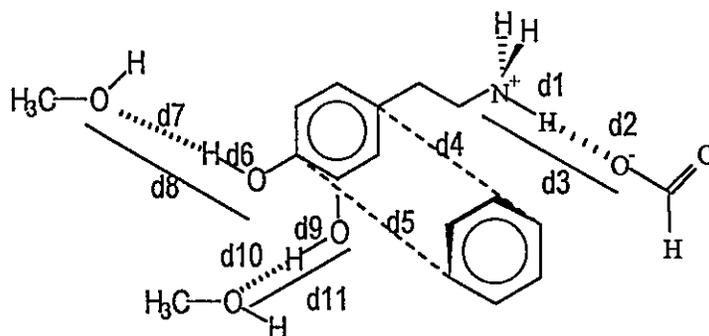


**Figura 5.3** Modelos utilizados para calcular la influencia de los enlaces por hidrógeno. Modelo EHP excluido el fragmento de Ser 5.07, Modelo EHM excluido fragmento de Ser 5.10 y Modelo EH excluido ambos fragmentos.

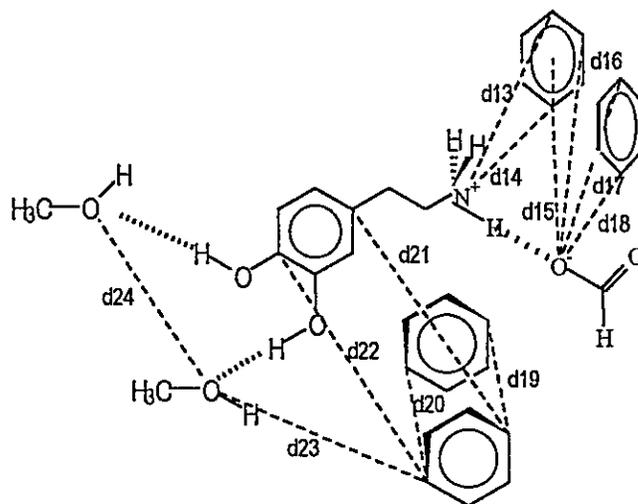
En la Tabla 5.1 se representan algunas de las distancias entre los distintos grupos en ambos modelos. La geometría de los modelos fue extraída de la estructura obtenida para el modelo tridimensional minimizado del receptor D<sub>2</sub> con la dopamina atracada en el sitio de unión. Una vez obtenida la estructura completa incluyendo los átomos que participan del esqueleto de carbono se modificaron los residuos para obtener cada uno de

los fragmentos. Los residuos de fenilalanina fueron modificados hasta obtener moléculas de benceno, el residuo de aspartato fue representado por un formiato, mientras que los residuos de serina son representados por moléculas de metanol.

**Tabla 5.1** Distancias (Å) entre los distintos fragmentos de los modelos. Se indican sólo las distancias entre el ligando y los residuos primarios.

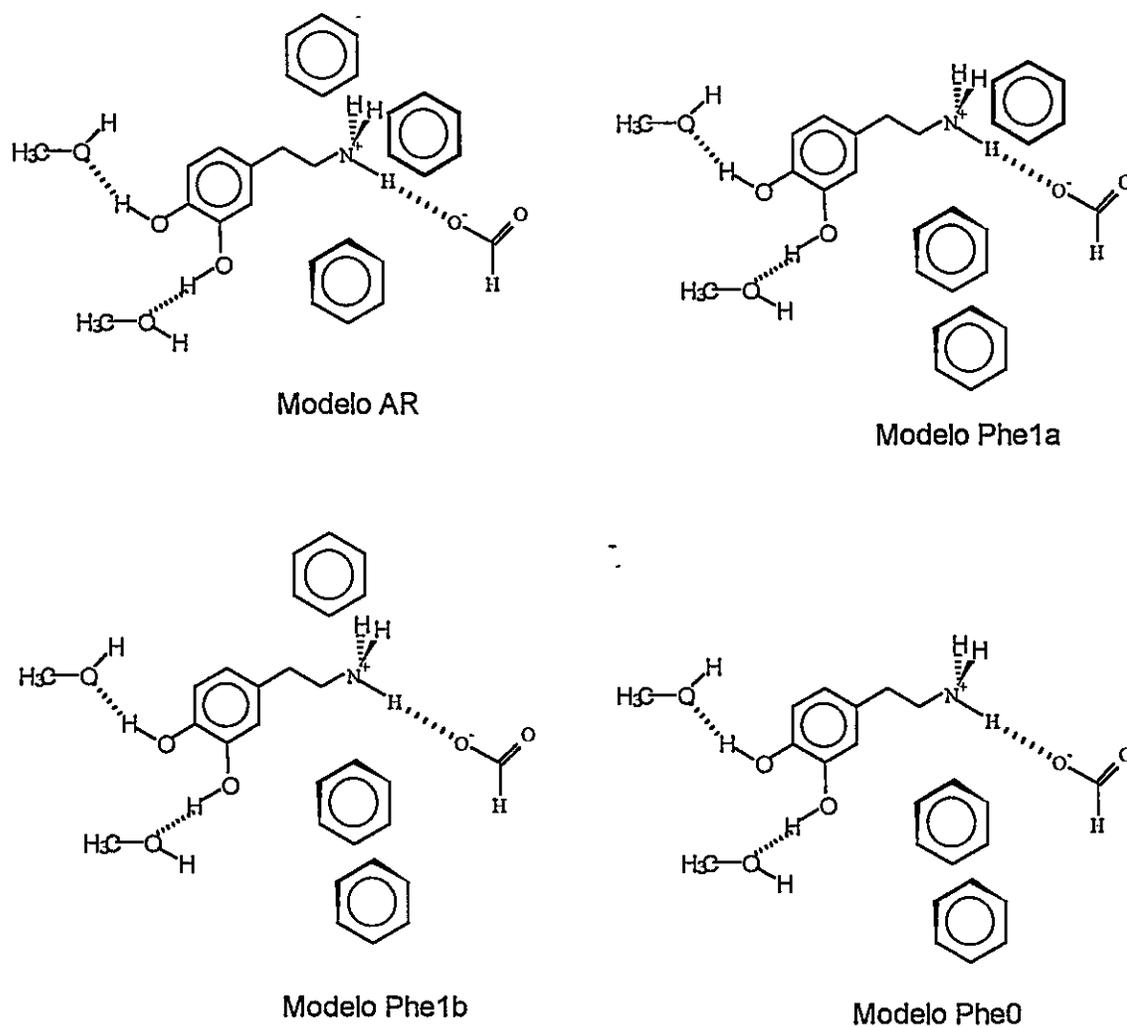


|           |           |            |
|-----------|-----------|------------|
| d1 = 1,10 | d5 = 6,3  | d9 = 0,96  |
| d2 = 2,32 | d6 = 0,95 | d10 = 1,86 |
| d3 = 3,4  | d7 = 2,50 | d11 = 2,64 |
| d4 = 7,8  | d8 = 3,43 |            |



|           |           |            |
|-----------|-----------|------------|
| d13 = 4,4 | d17 = 4,3 | d21 = 10,4 |
| d14 = 6,7 | d18 = 6,4 | d22 = 9,1  |
| d15 = 3,3 | d19 = 4,4 | d23 = 7,6  |
| d16 = 4,9 | d20 = 3,9 | d24 = 6,1  |

Aquellos modelos que se utilizaron para evaluar la influencia de los residuos secundarios se muestran en la Figura 5.4. El modelo Ar permite evaluar la influencia del residuo 5.11 en la estabilización del complejo droga-receptor. Los modelos Phe1a, Phe1b y Phe0 permiten evaluar la influencia de los residuos aromáticos alrededor del residuo de Asp 3.07.



**Figura 5.4** Modelos utilizados para calcular la influencia de los residuos aromáticos secundarios. Modelo AR, excluido el fragmento de Phe 5.11. Modelo Phe1a excluido fragmento de Phe 7.03 y Modelo Phe1b excluido fragmento de Phe 3.03. Modelo Phe0 no contiene anillos aromáticos alrededor del Asp 3.07, pero están presentes los bencenos que representan los residuos aromáticos de la interacción aromática.

Los cálculos fueron realizados en el programa Gaussian94 utilizando un nivel de teoría 6-31G. Para cada modelo se permitió sólo una optimización parcial de la geometría, dejando fijas algunas distancias interfragmento, ángulos y ángulos diedros impropios que definen las posiciones de los distintos fragmentos en los modelos. Se permitió la relajación interna de cada uno de los fragmentos, es decir, distancias de enlaces y ángulos de enlace, así como algunos ángulos diedros.

Para calcular la energía de interacción se utilizó la opción "massage" implementada en el programa Gaussian94. Esta opción permite añadir funciones de base extras para calcular la energía de la dopamina y del sitio de unión. Estas funciones representan aquellos fragmentos que no están presentes en cada uno de los modelos estudiados. Esto permite minimizar o anular una fuente de error importante al calcular la energía de interacción, que es el error de superposición de la base. Para todos los cálculos se empleó la base generada por los 87 átomos del modelo B.

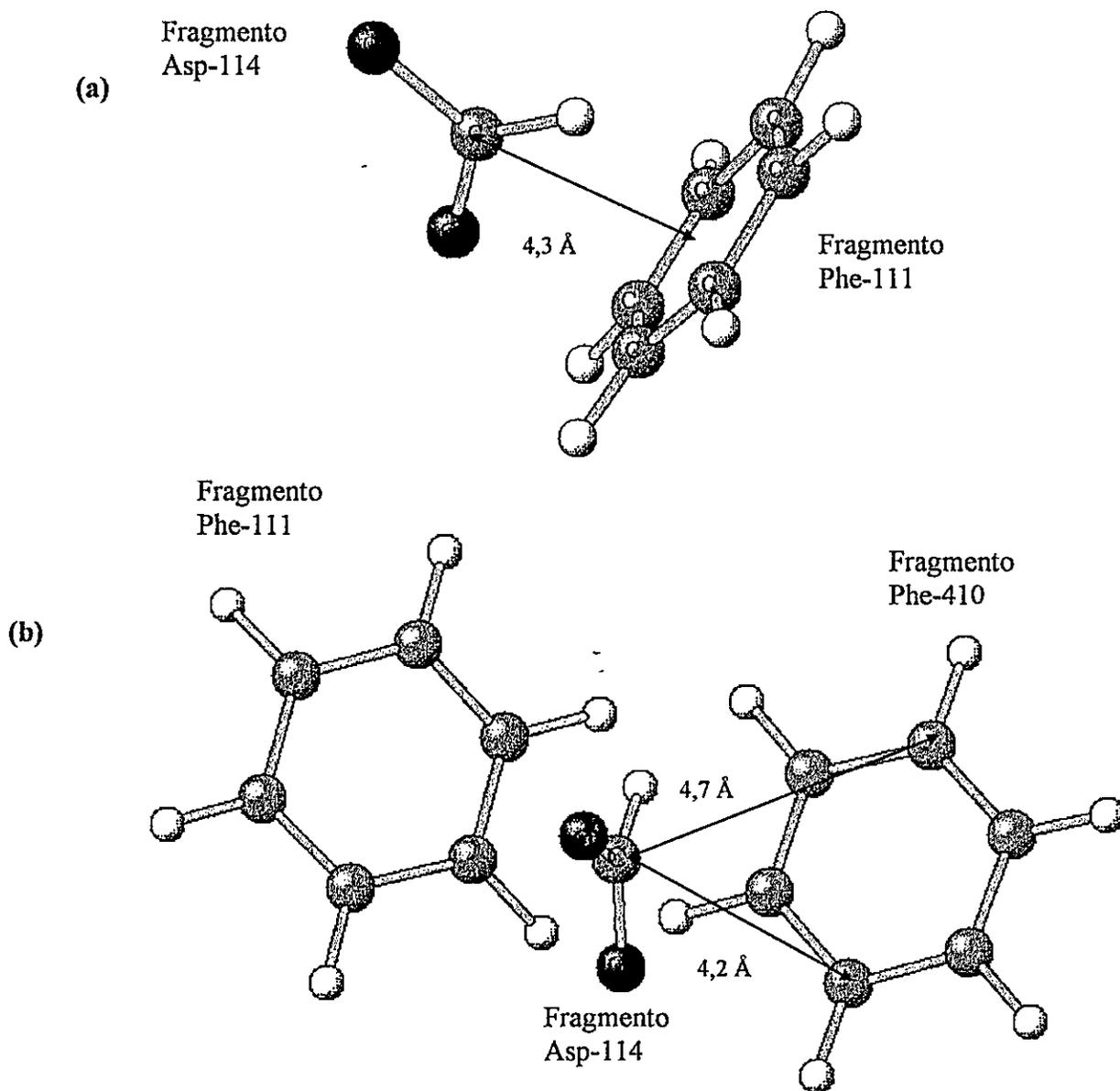
Si se considera la formación del complejo droga-receptor como un caso general de una reacción  $L + R \rightleftharpoons [L-R]$  se puede considerar que la energía potencial de interacción ligando-receptor ( $E_{L-R}^{INT}$ ) es la diferencia entre la energía del complejo ligando-receptor ( $E_{LR}$ ) y la energía del ligando ( $E_L$ ) y la energía del receptor ( $E_R$ ) representada en la ecuación 5.1:

$$(5.1) \quad E_{L-R}^{INT} = E_{LR} - (E_L + E_R)$$

### 5.3 RESULTADOS Y DISCUSION

El formiato es considerado una base dura, pero en el receptor forma parte de una cadena lateral que está rodeada de otras cadenas, que son en su gran mayoría residuos apolares o aromáticos. Esto hace que sus características ácido-base varíen, es decir, su dureza disminuiría por formar parte de un sitio altamente apolar. En la cercanía inmediata de este residuo de Asp existe un racimo de tres residuos aromáticos (dos residuos de Phe (111 y 410) y Tyr-407), que contribuirían a reforzar la energía de interacción entre el grupo amonio y el grupo carboxilato, es decir, estabilizar el par iónico formado.

Como se discutió en el capítulo 1 de esta tesis, la dureza del ácido (dopamina) varía entre 5,70 y 5,28 eV, siendo los rotámeros más blandos los *trans* coplanares. Se utilizaron tres modelos del sitio de unión aniónico: el primero fue el anión formiato que se utilizó como referencia en cuanto a la comparación de la dureza; los dos modelos siguientes fueron extraídos del modelo del receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>. La geometría del anión formiato fue optimizada completamente. Para los modelos I y II del sitio de unión sólo se permitió la optimización de las distancias y ángulos de enlace, manteniendo fijas las distancias y los ángulos diedros entre los distintos fragmentos (ver Fig. 5.5). El modelo I está constituido por el anión carboxilato (que representa el residuo de Asp-114) y un benceno (que representa el residuo de Phe-111, que es el más próximo al aspartato con una distancia promedio de 4,3 Å entre el átomo de carbono del grupo formiato y el centro del anillo aromático). El modelo II es similar al anterior con la inclusión de un benceno más (que representa al residuo Phe-410) con una distancia levemente mayor entre el centro del anillo al átomo de carbono del grupo carboxilato. Las durezas obtenidas fueron de 8,01 eV; 5,41 eV y 5,13 eV para el carboxilato desnudo, el modelo I y el modelo II respectivamente.



**Figura 5.5** Modelos del sitio de unión aniónico. Se muestran los fragmentos que representan a los residuos de aminoácidos involucrados en cada modelo. (a) modelo I y (b) modelo II. Se muestran algunas distancias entre el carbono del grupo carboxilato y el o los anillos aromáticos.

La incorporación de un anillo aromático disminuye drásticamente la dureza del sitio de unión, es decir, lo transforma de una base dura a una base relativamente blanda con una disminución de la dureza de 2,6 eV. La inclusión de otro anillo aromático sólo disminuye en 0,28 eV la dureza del sitio de unión. Los cálculos de dureza química para un modelo pequeño del sitio de unión y la dopamina muestran que la interacción droga-receptor es gobernada por el Principio de Acidos y Bases Duras y Blandas, es decir, se obtendría una mayor afinidad y actividad si el ácido (ligando) y la base (sitio de unión) tuviese durezas (blanduras) semejantes.

En la Tabla 5.2 se muestran las energías de interacción para cada uno de los modelos estudiados. Los resultados muestran que existe un aumento de la energía de interacción al incluir el medio en que ocurre la interacción droga-receptor.

**Tabla 5.2** Energía de interacción ( $\Delta E_{L-R}^{INT}$ ) y dureza química ( $\eta$ ) para cada modelo.

| Modelo   | $\Delta E_{L-R}^{INT}$ (kcal/mol) | $\eta$ (eV) |
|----------|-----------------------------------|-------------|
| Modelo A | -88,46                            | 5,32        |
| Modelo B | -109,8                            | 5,84        |

El análisis de la energía de estabilización muestra la influencia del medio, es decir, los residuos secundarios del sitio de unión. En el modelo A la energía proviene de las interacciones formadas entre el ligando y el receptor. Si se recuerda, estas son: una interacción electrostática, enlace por hidrógeno y aromática. En el modelo B, la energía de estabilización se puede descomponer en dos términos principales: el primero corresponde a la energía que proviene de la formación de cada una de estas interacciones y el segundo correspondería a un término que proviene de la incorporación del medio donde ocurren dichas interacciones. El medio está reforzando las energías de cada interacción, por lo cual es difícil evaluar directamente la estabilización producida por este medio no homogéneo. La diferencia entre la energía de estabilización de cada modelo da una idea general de la estabilización producida por el entorno del sitio de unión, realizando la aproximación que la energía asociada a cada interacción permanece

invariante. La diferencia es de 21,3 kcal/mol, es decir, el entorno del sitio de unión estabiliza al complejo droga-receptor.

Los resultados muestran que el principio de ácidos y bases duros y blandos gobernaría la interacción droga-receptor. El análisis de las durezas globales para la dopamina, el sitio de unión y el complejo muestra un aumento de la dureza del sistema. La dureza del complejo droga-receptor aumenta al incorporar los residuos secundarios.

La evaluación de la influencia de los enlaces por hidrógeno en la estabilización del complejo droga-receptor se realizó a través de la obtención de la energía de interacción para los modelos EHP, EHM y EH. Los resultados para la diferencia de la energía de interacción se muestran en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3** Energía de desestabilización para los modelos.

|            | Excluido | $\Delta\Delta E$ (kcal/mol) |
|------------|----------|-----------------------------|
| Modelo B   | -----    | 0,0                         |
| Modelo EHP | Ser 5.07 | 15,8                        |
| Modelo EHM | Ser 5.10 | 27,9                        |
| Modelo EH  | Ambos    | 40,5                        |

La diferencia entre las energías de estabilización de cada modelo con respecto al modelo B ( $\Delta\Delta E$ ) muestra un fuerte enlace por hidrógeno en el complejo droga-receptor. La ausencia de ambos fragmentos disminuye la energía de estabilización fuertemente. Además, se aprecia que la ausencia del fragmento de Ser 5.10 afecta en mayor grado la estabilización del complejo droga-receptor. Estos resultados están de acuerdo con las mutaciones experimentales [9,10]. La afinidad entre la dopamina y el receptor  $D_2$  se ve más afectada al mutar el residuo de Ser 5.10. Los estudios de mutaciones teóricas para evaluar la influencia de los enlaces por hidrógeno mostraron una disminución de aproximadamente 15 kcal/mol, en el complejo tridimensional droga-receptor de la dopamina (Capítulo 4, Tabla 4.7). El estudio de la interacción enzima-sustrato en el mecanismo de catálisis de la hidrólisis de ésteres en serina-hidrolasas, muestra la formación también de fuertes enlaces por hidrógeno entre la enzima y el sustrato,

utilizando moléculas de agua para representar a residuos de serina [11]. La energía de desestabilización por la ausencia de una molécula de agua es de 15,8 kcal/mol a un nivel HF/6-31+G\* [11]. Uno de los hechos que debemos destacar que a este nivel de teoría la energía de los enlaces por hidrógeno es sobreestimada.

Una pregunta interesante de responder es cuál es la influencia del residuo de Asp 3.07 en la energía de interacción droga-receptor. La mutación de este residuo produce la pérdida de la afinidad de agonistas y antagonistas por los receptores dopaminérgicos. Plantear una mutación teórica y calcular energías de unión es posible, pero desde un punto de vista conceptual, ¿qué complejo estaríamos modelando si la unión droga-receptor no ocurre?. Para el sistema de la hidrólisis de éster, con un residuo de Asp interaccionando con un residuo de His a través de un hidrógeno unido a uno de los nitrógenos, se obtiene una energía de unión es de 43,2 kcal/mol a un nivel MP2/6-31+G\* [11]. En esta tesis la interacción ocurre entre un residuo de Asp y un grupo amino y se esperaría una fuerte influencia de esta interacción en la energía de estabilización.

Una manera indirecta de analizar esta interacción es realizar mutaciones de los residuos que rodean al Asp 3.07, como fue ampliamente discutido en el capítulo 4. La influencia del entorno es importante en la reactividad del residuo de Asp: la inclusión de un anillo de benceno disminuye la dureza del residuo de Asp representado por el formato, pero la inclusión de un segundo residuo afecta débilmente la dureza del modelo. En la Tabla 5.4 se muestran las disminuciones de la energía de interacción al mutar (excluir) los residuos de fenilalanina 7.06 y 3.03.

**Tabla 5.4** Energía de desestabilización para los modelos de los residuos aromáticos.

|              | $\Delta\Delta E$ (kcal/mol) |
|--------------|-----------------------------|
| Modelo B     | 0,0                         |
| Modelo Phe1a | 3,3                         |
| Modelo Phe1b | 13,3                        |
| Modelo Phe0  | 17,8                        |

La disminución de la energía de unión es mayor cuando se excluye el residuo de Phe 3.30 que es el más cercano al fragmento del Asp 3.07, mientras que la exclusión de Phe 7.06 sólo disminuye muy poco la energía de interacción. La pérdida de ambos residuos afecta la estabilización casi tanto como la pérdida de un enlace por hidrógeno. Esto indica la importancia de estos residuos en la estabilización del complejo droga-receptor. El análisis de las cargas no mostró una mayor variación en el fragmento de Asp.

Por otra parte, el residuo Phe 5.11 aparece como importante no sólo para la unión del ligando sino que para la estabilización de la estructura terciaria del receptor. La ausencia de este residuo en el complejo droga-receptor, produce una disminución de 10,5 kcal/mol de la energía de estabilización. La ubicación de este residuo en la TM5 una posición más abajo en la secuencia que el residuo de Ser 5.10 y antes que el residuo de Pro 5.15, indicaría una función relevante en el sitio de unión de agonistas y estaría relacionada posiblemente con la activación del receptor. El lazo intracelular 3 al cual está unida la Proteína G está ubicado entre las TM 5 y 6, por lo cual un cambio en las cadenas laterales afectaría la conformación de la hélice transmembranal.

## 5.4 CONCLUSIONES

El estudio de la energía de interacción y de la dureza química de los modelos del complejo de unión droga-receptor, además de los modelos del sitio de unión aniónico permite postular que la interacción droga-receptor estaría gobernada por el Principio de ácidos y bases duros y blandos.

En este capítulo se exploró la influencia de los diferentes tipos de residuos de aminoácidos que forman el sitio de unión de los receptores dopaminérgicos. La importancia de algunos residuos fue analizada a través de la disminución de la estabilidad del complejo droga-receptor para la dopamina.

Los resultados mostraron la importancia de los enlaces por hidrógeno que contribuyen a la energía de estabilización con alrededor de un 25% de esta energía.

La influencia del entorno del sitio de unión demostró ser de vital importancia al aumentar la energía de estabilización (un aumento del 25%), y la presencia de residuos secundarios especialmente los aromáticos, resultó tener una función primordial en el sitio de unión aunque de una manera indirecta, influyendo especialmente en las interacciones electrostática y aromática.

### Referencias

- 1.- R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **85**,3533 (1963).
- 2.- Y. Li y J. N. S. Evans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4612 (1996).
- 3.- D. D. Miller, M. Harrold, R. A. Wallace, L. J. Wallace y N. J. Uretsky, *TIPS* **9**, 282 (1988).
- 4.- A. Manson, F. Meng, J. H. Meador-Woodruff, L. P. Taylor, O. Civelli y H. Abil, *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 205 (1992).
- 5.- C. D. Strader, I. S. Sigal, R. B. Register, M. R. Canderole, E. Rands y R. A. F. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4384 (1987).
- 6.- D. Donnelly, J. B. C. Findlay y T. L. Blundell, *Receptors & Channels* **2**, 61 (1994).
- 7.- J. A. Bikker, S. S. Trumpp-Kallmeyer y C. Humblet, *J. Med. Chem.* **41**, 2911 (1998).
- 8.- D. M. Mottola, S. Laiter, V. J. Watts, A. Tropsha, S. D. Wyrick, D. E. Nichols, y R. B. Mailman, *J. Med. Chem.* **39**, 285 (1996).
- 9.- A. Manson, F. Meng, J. H. Meador-Woodruff, L. P. Taylor, O. Civelli y H. Abil, *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 205 (1992).
- 10.- C. D. Strader, T. Gaffney, E. E. Sugg, M. R. Candlemore, R. Keys, A. A. Patchett y R. A. F. Dixon, *J. Biol. Chem.* **266**, 5 (1991).
- 11.- C-H. Hu, T. Brinck y K. Hult, *Int. J. Quant. Chem.* **69**, 89 (1998).

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES GENERALES

- ◆ El estudio de las estructuras conformacionales y electrónicas de la dopamina y algunos compuestos aporfínicos y energía relativa para los diferentes conformeros apunta a que las conformaciones biológicamente activas serían aquellas *trans* coplanares, es decir, el anillo catecol y el nitrógeno cuaternario se encuentran en un mismo plano. La diferencia fundamental entre los farmacóforos para los receptores dopaminérgicos está relacionada con la distancia entre el nitrógeno cuaternario y el grupo hidroxilo en posición *meta* del anillo catecol, y en la desviación de la planaridad entre el nitrógeno cuaternario y el anillo aromático.
- ◆ El estudio de las estructuras conformacionales para la aporfina y la boldina muestra que coexisten dos procesos asociados a cambios conformacionales del anillo ciclohexeno, que no pueden ser analizados por separado. Estos procesos son la inversión del nitrógeno y la inversión/cambio conformacional del anillo. El primero de éstos genera los diferentes diastereoisómeros de los compuestos aporfínicos, y el segundo cambia solamente las orientaciones de los sustituyentes del anillo B. El estudio de la barrera de inversión del átomo de nitrógeno muestra valores similares a los experimentales. Los estudios de las energías relativas muestran que en ambos diastereoisómeros de apomorfina y boldina siempre es preferida una conformación semisilla para el anillo B.
- ◆ La utilización del principio de HSAB permite postular que la interacción droga-receptor está gobernada por este principio, como la mayoría de las reacciones

químicas. El sitio de unión del receptor dopaminérgico y los ligandos agonistas, presentarían características electrónicas similares, ya sea en dureza química o blandura molecular.

- ◆ La interacción droga-receptor para los receptores dopaminérgicos es descrita a través de un complejo droga-receptor, en el cual se describen las interacciones involucradas y los residuos de aminoácidos que forman parte del sitio de unión.
  
- ◆ El complejo agonista-receptor está estabilizado por tres interacciones importantes: interacción electrostática entre el nitrógeno cuaternario de los ligandos y el residuo de Asp presente en la TM3 en la posición número 7; la formación de enlaces por hidrógeno entre los hidroxilos del fragmento catecol de los ligandos con los residuos de Ser 5.07 y Ser 5.10, y por último una interacción aromática que se forma entre el fragmento aromático del agonista y el residuo de Phe 6.20. Además de estas tres importantes interacciones existen interacciones de van der Waals entre el ligando y el receptor.
  
- ◆ El sitio de unión para antagonistas dopaminérgicos involucra los residuos Asp 3.07 e His 6.23. La interacción aromática (mejor descrita como una interacción catión-sistema  $\pi$ ) explica el hecho experimental que anillos aromáticos con una alta densidad de carga aumentan la afinidad de antagonistas por el receptor dopaminérgico D<sub>2</sub>. La presencia en el sitio de unión de residuos aromáticos modifica no tan sólo el medio donde ocurre la interacción droga-receptor, sino las reactividades de las cadenas laterales cercanas a ellos. Los residuos de Phe 7.06, Phe 3.03, Tyr 7.03 y Trp 2.24 están rodeando la interacción electrostática en el sitio de unión. Una de las hipótesis propuestas es que estabilizan la formación de un par iónico. Sin embargo, los resultados de esta tesis muestran que modifican la reactividad del residuo de Asp 3.07, a través del cambio de la dureza química de la cadena lateral del residuo aminoacídico y su mutación teórica afecta fuertemente la estabilización del complejo droga-receptor.

- ◆ Otros dos residuos aromáticos importantes para el sitio de unión de agonistas son Phe 5.11 y Trp 6.16. Ambos residuos se encuentran en hélices vecinas: el residuo de Phe 5.11 está cercano al residuo de Phe 6.20 (que está participando en la interacción aromática con el ligando) y ambos están interactuando entre sí. La ausencia de estos residuos produce una pérdida de la energía de estabilización del modelo molecular del complejo dopamina-receptor, pero no existen datos experimentales de mutaciones sitio-dirigidas para este residuo. El segundo residuo aromático Trp 6.16 marca el fin del sitio de unión al interior del receptor. Se ha postulado para algunos agonistas dopaminérgicos del tipo D<sub>2</sub> una segunda interacción aromática, que en los modelos aquí presentados podría ser a través de este residuo.
- ◆ La influencia del entorno del sitio de unión demostró ser de vital importancia al aumentar la energía de estabilización del complejo droga-receptor (un aumento del 25%), y la presencia de residuos secundarios, especialmente los aromáticos, resultó tener una función primordial en el sitio de unión aunque de una manera indirecta, especialmente en las interacciones electrostática y aromática.

El trabajo a futuro para desarrollar en este campo de investigación es bastante amplio, desde la realización de mutaciones experimentales de los receptores en algunos de los residuos de aminoácidos aquí planteados, como en el desarrollo de nuevos ligandos dopaminérgicos.

Específicamente, en el ámbito de la modelación de la estructura de los receptores acoplados a proteína G, en este caso los receptores dopaminérgicos, se puede mejorar los modelos propuestos considerando los nuevos mapas cristalográficos obtenidos de la rodopsina, que muestran que hacia el lado intracelular del receptor éste se vuelve más compacto. Incluso, las hélices de la TM3 y TM5 están muy próximas entre sí, por lo cual

podría modificar algunas interacciones que ocurren para estabilizar la estructura terciaria del receptor, y por consiguiente algunos de los residuos secundarios del sitio de unión.

Desde un punto de vista sintético, los resultados mostrados en el complejo droga-receptor en conjunto con los farmacóforos permitirían la modificación de la estructura de aporfinas, especialmente la boldina, para encontrar agonistas más potentes y/o selectivos. Estudios ulteriores con el mismo modelo permitirían proponer el diseño de otros ligandos no aporfínicos.

La modelación del complejo droga-receptor permitió la identificación de algunos residuos que son candidatos para la realización de mutaciones sitio dirigidas en ambos tipos de receptores dopaminérgicos, ya sea para avalar los resultados propuestos en esta tesis o/y modificar el sitio de unión propuesto.

## APENDICE 1

### TEORÍA DE ORBITALES MOLECULARES

De acuerdo a la mecánica cuántica, la energía y muchas propiedades de un estado estacionario de un sistema se pueden obtener a través de la solución de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$(A1.1) \quad \hat{H}\Psi(r, R) = E\Psi(r, R)$$

donde  $H$  es el operador hamiltoniano, y  $\psi$  es la función de onda del sistema. Tanto  $H$  como  $\Psi$  dependen de las coordenadas de los núcleos ( $R$ ) y electrones ( $r$ ) [1-3]. El Hamiltoniano se puede expresar como:

$$(A1.2) \quad \hat{H}(r, R) = T_{nuc}(R) + T_{el}(r) + V_{nn}(R) + V_{ne}(R, r) + V_{ee}(r)$$

Debido a que las interacciones repulsivas electrón-electrón ( $V_{ee}$ ) están incluidas en el hamiltoniano, esta ecuación no puede ser solucionada analíticamente.

La Teoría de Orbitales Moleculares es una aproximación a la mecánica cuántica molecular la cual usa funciones monoeléctricas u orbitales para aproximar la función de onda completa ( $\Psi$ ), esta función para un electrón es el producto de un orbital espacial y una función de spin,  $\psi(r, R) \alpha(\xi)$  o  $\psi(r, R) \beta(\xi)$ . Esto se denomina un spin-orbital.

El objetivo de la química cuántica es proponer métodos aproximados de solución de la ecuación de Schrödinger. El método de Campo Autoconsistente (SCF, Self-Consistent Field) es el método más comúnmente empleado para el cálculo de la función

de onda electrónica. El método SCF es básicamente un método iterativo para solucionar la ecuación de onda. Los resultados obtenidos son dependientes de las aproximaciones realizadas sobre el hamiltoniano y el procedimiento iterativo involucrado en cada método. Las ventajas que ofrece este modelo radican en que éste produce las mejores energías propias de una función de onda electrónica representada por el determinante de Slater.

El modelo SCF tiene sus raíces en el método de Hartree. La suposición propuesta por Hartree es que un electrón se mueve en un potencial que es el promedio esférico del potencial debido a todos los otros electrones. Sin embargo, el movimiento electrónico está restringido por el principio de exclusión de Pauli, por lo cual la función de onda electrónica  $\psi$  debe ser antisimétrica con respecto al intercambio de electrones. Por esta razón la técnica de Hartree fue modificada por Fock y Slater para incluir el efecto del intercambio electrónico. La función de onda que satisface este requisito es un determinante de Slater, construido desde un conjunto de spin-orbitales mono-electrónicos. La integración sobre las coordenadas de spin produce una función puramente espacial escrita en términos de orbitales.

$$(A1.3) \quad \Psi = \frac{1}{(n!)^2} \begin{bmatrix} \psi_1(1)\alpha(1) & \psi_1(1)\beta(1)\dots\dots\dots & \psi_{\frac{n}{2}}(1)\alpha(1) & \psi_{\frac{n}{2}}(1)\beta(1) \\ \psi_1(n)\alpha(n) & \psi_1(n)\beta(n)\dots\dots\dots & \psi_{\frac{n}{2}}(n)\alpha(n) & \psi_{\frac{n}{2}}(n)\beta(n) \end{bmatrix}$$

La mejor elección del determinante de Slater se obtiene mediante un procedimiento variacional. Este procedimiento genera las denominadas ecuaciones de Hartree-Fock:

$$(A1.4) \quad F\Psi = E\Psi$$

donde  $F$  es el operador de Fock y  $\Psi$  son los llamados orbitales moleculares. El operador de Fock está compuesto de un conjunto de hamiltonianos que describe la interacción entre un centro y un electrón más los términos que describen la interacción entre dos

electrones. Estos operadores presentan la forma de un operador mono-electrónico y describen el potencial medio creado por los electrones del sistema. El operador de Fock consiste de dos contribuciones, una coulombica ( $j$ ) y otra de intercambio ( $k$ ).

$$(A1.5) \quad \hat{F} = H + \sum [j(r) - k(r)]$$

Soluciones rigurosas de las ecuaciones de Hartree-Fock son posibles para átomos, pero no para moléculas. La aproximación de Roothaan permite el tratamiento no sólo de los sistemas atómicos, sino también de los moleculares. Roothaan propuso una combinación lineal de funciones de base para calcular los orbitales moleculares. Estas funciones de base son los orbitales atómicos, por lo cual esta aproximación se denomina LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals).

$$(A1.6) \quad \Psi = \sum_{\mu=1}^N c_{\mu} \phi_{\mu}$$

La elección de una forma funcional para las funciones  $\phi_{\mu}$  y la elección de tales funciones es una importante consideración al realizar cálculos *ab initio*. Los coeficientes ( $c_{\mu}$ ) son derivados de la solución de la ecuación matricial de Roothan-Hall:

$$(A1.7) \quad FC = SCE$$

esta ecuación contiene la matriz de Fock ( $F$ ), la matriz de los coeficientes del orbital molecular ( $C$ ) de la aproximación LCAO, la matriz de solapamiento ( $S$ ) y la matriz diagonalizada de la energía de los orbitales moleculares ( $E$ ). Siendo que las ecuaciones de Fock son funciones de los orbitales moleculares, ellas no son linealmente independientes, por lo cual estas ecuaciones se resuelven mediante la aproximación SCF.

#### *Métodos ab initio y semiempíricos*

Los métodos *ab initio* usan la forma completa del operador de Fock para construir la ecuación de onda. Los métodos semiempíricos usan operadores de Fock simplificados, en los cuales los elementos de matriz de un electrón y algunas de las integrales de los términos bi-electrónicos son remplazados por parámetros determinados empíricamente.

### Referencias

- 1.- A. Szabo y N. S. Ostlund, "*Modern Quantum Chemistry*", MacMillan Publishing, New York, 1982.
- 2.- A. R. Leach, "*Molecular Modelling*", Longman, London, 1996.
- 3.- W. J. Hehre, L. Radom, P. v. R. Schleyer y J. A. Pople, "*Ab initio Molecular Orbital Theory*", J. Wiley & Sons, New York, 1986.

## APENDICE 2

### TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD

La Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT, Density Functional Theory) de Hohenberg, Kohn y Shan [1,2], propone la expresión diferencial fundamental para el cambio de un estado fundamental a otro para algún sistema electrónico como:

$$(A2.1) \quad E[\rho] = \int d\mathbf{r} v(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}) + F[\rho]$$

donde  $v(\mathbf{r})$  es el potencial externo generado por el(los) núcleo(s) y  $F[\rho]$  es la funcional universal de Hohenberg y Kohn. Esta funcional está compuesta por la energía cinética y la energía de repulsión electrón-electrón,

$$(A2.2) \quad F[\rho] = T[\rho] + V_{ee}[\rho]$$

La minimización de la energía con respecto a la densidad electrónica se hace bajo la condición de normalización, que al integrar la densidad en todo el espacio debe ser igual al número de electrones del sistema,  $N$ .

$$(A2.3) \quad N = N[\rho(r)] = \int \rho(r) dr$$

La energía es mínima para la densidad electrónica del estado fundamental. Aplicando el principio variacional a la funcional  $E[\rho]$  se obtiene la ecuación de Euler-Lagrange,

$$(A2.4) \quad \mu = \frac{\partial E[\rho]}{\partial \rho} = \nu(r) + \frac{\partial F[\rho]}{\partial \rho(r)}$$

donde  $\mu$  es un multiplicador de Lagrange, denominado potencial químico electrónico del sistema. Esta propiedad varía a menos que  $\rho$  sea la densidad verdadera del sistema, a lo cual  $\mu$  sería constante.

Por analogía con la termodinámica, podemos escribir para una variación de la energía total

$$(A2.5) \quad dE = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{\nu(r)} dN + \int \partial r \left( \frac{\partial E}{\partial \nu(r)} \right) \partial \nu(r),$$

que debe satisfacer la ecuación de Euler-Lagrange, por lo cual

$$(A2.6) \quad \mu \equiv \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)_{\nu(r)}$$

### *Potencial Químico Electrónico*

El potencial químico queda definido como la primera derivada parcial de la energía ( $E$ ) del sistema con respecto al número de electrones ( $N$ ), a un potencial externo constante ( $\nu(r)$ ). El término potencial químico en termodinámica clásica ha sido definido como la tendencia de escape de un componente desde una fase. En analogía, el potencial químico electrónico mide la tendencia a la fugacidad (al escape de las partículas) de la nube electrónica. Usando el formalismo de la función de onda, la derivada de la ecuación (A2.6) no puede obtenerse rigurosamente, por lo cual se usa la aproximación de las diferencias finitas para obtener una expresión aproximada para el potencial químico electrónico dada por:

$$(A2.7) \quad \mu \cong \frac{\Delta E}{\Delta N} \approx -\frac{1}{2}(I + A) = -\chi,$$

donde los parámetros  $I$  y  $A$  se refieren al primer potencial de ionización y electroafinidad, respectivamente. Estos parámetros pueden ser obtenidos experimentalmente. Esta expresión aproximada es considerada como la definición operacional del potencial químico [1]. Si se compara con la definición de Mulliken para la electronegatividad, se obtiene que el potencial químico es el opuesto a la electronegatividad y debido a esta ecuación es que  $\chi$  puede ser denominada la electronegatividad absoluta. De lo expuesto, ni el potencial químico ni la electronegatividad son útiles como índices de reactividad, pues en una reacción el reactivo ve una propiedad uniforme al interactuar con ella. Por lo tanto es necesario ver como varía frente a una interacción molecular.

### *Dureza y Blandura Molecular*

Se puede escribir el potencial químico como una funcional de  $N$  y  $\nu(\mathbf{r})$  y así estudiar la variación del potencial químico frente a una interacción molecular, es decir, la derivada parcial del potencial químico con respecto al número de electrones del sistema.

$$(A2.8) \quad \eta = \frac{1}{2} \left[ \frac{\partial \mu}{\partial N} \right]_{\sigma(\mathbf{r})} = \frac{1}{2} \left( \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right)_{\sigma(\mathbf{r})},$$

donde  $\eta$  es la dureza molecular definida por Parr y Pearson como la segunda derivada de la energía con respecto al número de electrones  $N$  [1,2]. Conceptualmente, la dureza molecular representa una medida de la resistencia del sistema a cambiar su distribución electrónica. Por lo tanto, mientras mayor sea la dureza de un sistema menor es su reactividad, mientras que una molécula reactiva debe presentar una baja resistencia, es decir, una dureza pequeña. Utilizando el método de variaciones finitas se obtiene una definición operacional para la dureza:

$$(A2.9) \quad \eta \approx \frac{1}{2} (I - A).$$

Además del concepto de dureza molecular, Yang y Parr definieron la blandura molecular ( $s$ ) como el inverso de la dureza ( $\eta$ ):

$$(A2.10) \quad s = \frac{1}{\eta}$$

La blandura es también una propiedad global y puede expresarse como:

$$(A2.11) \quad s = \left( \frac{1}{I - A} \right)$$

La blandura conceptualmente está relacionada a la polarizabilidad electrónica, es decir, la capacidad de un sistema para deformar su nube electrónica o su tendencia a sufrir transferencia de carga.

### *Relación con la Teoría de Orbitales Moleculares*

Afortunadamente, la DFT y la teoría TOM han resultado ser complementarias, haciendo que ambas den muy buenos resultados [3]. Utilizando la TOM y el teorema de Koopman [1,2], el potencial de ionización de una molécula es simplemente la energía del orbital más alto ocupado (HOMO) con signo contrario y para sistemas con espines apareados, la electroafinidad es el negativo de la energía del orbital más bajo desocupado (LUMO).

$$(A2.12) \quad I = -\varepsilon_{HOMO}$$

$$(A2.13) \quad A = -\varepsilon_{LUMO}$$

Al reemplazar las ecuaciones A2.12 y A2.13 en las ecuaciones A2.7 y A2.9, se obtiene:

$$(A2.14) \quad \mu = \frac{\varepsilon_{HOMO} + \varepsilon_{LUMO}}{2}$$

$$(A2.15) \quad \eta = \frac{\varepsilon_{LUMO} - \varepsilon_{HOMO}}{2}$$

### *Principio de Ácidos y Bases Duros y Blandos*

Pearson, basado en observaciones experimentales, propuso el principio de ácidos y bases duros y blandos (HSAB, Hard Soft Acid Base) [4]. Pearson propuso que una base dura preferiría reaccionar con un ácido duro y una base blanda con un ácido blando

para formar un producto más estable. El concepto de dureza química y blandura química fue propuesto por Pearson en conexión al comportamiento ácido-base de Lewis. Los ácidos y bases fueron divididos en dos categorías, denominadas duros y blandos. Una base blanda, átomo dador de electrones, es de alta polarizabilidad, baja electronegatividad y es fácilmente oxidado. La polarizabilidad electrónica en DFT está asociada a la blandura molecular: a valores altos de blandura molecular corresponde alta polarizabilidad, esto es una pequeña separación de los orbitales HOMO-LUMO. Una base dura, átomo, molécula o grupo dador de electrones de baja polarizabilidad y alta electronegatividad, es difícil de oxidar, y está asociado a orbitales moleculares vacíos de alta energía, es decir que se asocia con una blandura pequeña una separación HOMO-LUMO grande. Un ácido blando, átomo o molécula aceptor de electrones de baja carga positiva y gran tamaño, polarizable, posee una pequeña separación HOMO-LUMO. Además posee una baja capacidad de interactuar electrostáticamente con un nucleófilo y, sus interacciones serán más bien de tipo covalente. Un ácido duro, átomo o molécula, aceptor de gran carga positiva y tamaño pequeño, no tiene electrones externos fácilmente excitables. Se caracteriza por tener una gran separación HOMO-LUMO, tendencia a formar enlaces iónicos y a reaccionar por interacciones de largo alcance, generalmente electrostáticas.

#### *Principio de Máxima Dureza*

El HSAB ha encontrado una amplia utilidad para establecer reglas empíricas de combinación y predecir la formación de productos en una reacción. En conjunto con este principio Pearson propuso el Principio de Máxima Dureza (PMD, Maximum Hardness Principle) [5], que establece que *“parece ser una regla en la naturaleza que las moléculas se reordenan ellas mismas para ser tan duras como sea posible”*. El PMD es por lo tanto una formulación alternativa al principio de mínima energía. El principio de máxima dureza ha sido formalmente demostrado por Parr y Chattaraj bajo algunas restricciones [6].

### Referencias

- 1.- P. Hohenberg y W. Kohn, *Phys. Rev.* **B64**, 136 (1964).
- 2.- R. G. Parr y W. Yang, *Density-Functional Theory of atoms and molecules*; Ed. Oxford Science Publications; Oxford University Press; 1989; London, New York; ISBN 0-19-504279-4.
- 3.- R. G. Pearson, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **83**, 8440 (1986)
- 3.- R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3533 (1963).
- 4.- R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.* **64**, 561 (1987).
- 5.- R. G. Parr y P. J. Chatarraj, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 1852.

## APENDICE 3

### MECÁNICA MOLECULAR

La mecánica molecular (MM) es esencialmente una aproximación para calcular la energía de una molécula usando una función de energía empírica, la cual intenta describir los enlaces covalentes en términos de átomos conectados por resortes, con interacciones de van der Waals, y electrostáticas, entre átomos noenlazados.

MM utiliza un conjunto de ecuaciones para describir la superficie de Born-Oppenheimer cuya forma matemática es similar a las ecuaciones de la mecánica clásica [1]. Este conjunto de funciones es llamado el Campo de Fuerzas, y contiene un juego de parámetros para calcular propiedades de las moléculas, tales como geometría, energías conformacionales, calores de formación, etc. Una de las suposiciones que se hacen está referida a la transferibilidad de los parámetros y constantes de fuerzas desde sistemas simples a más complejos.

La expresión más simple para calcular la energía potencial, que incluye términos asociados al estiramiento de enlaces, a las flexiones y torsiones y a las interacciones de van der Waals, se presenta en la ecuación (A3.1):

$$(A3.1) \quad E_{pot} = \sum V_{stretch} + \sum V_{bend} + \sum V_{tors} + \sum V_{VDW}$$

Los campos de fuerzas más elaborados pueden incluir términos de Urey-Brandley de interacciones no-enlazantes 1-3 o términos cruzados y de orden superior.

#### Campos de Fuerzas

En el desarrollo de esta tesis se emplearon dos campos de fuerzas, que se describen a continuación:

*Campo de Fuerzas AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement)*

Este campo de fuerzas fue desarrollado por Kollman y col. [2]. Inicialmente, este campo de fuerzas estaba parametrizado sólo para proteínas y ADN. Sin embargo, la parametrización ha sido ampliada para incluir una amplia variedad de sistemas. La forma de la funcional de la energía usada por AMBER está dada en la siguiente ecuación:

$$(A3.2) \quad E_{pot} = \sum_b K_2 (b - b_0)^2 + \sum_\theta H_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_\phi \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] \\ + \sum \varepsilon [(r^*/r)^{12} - 2(r^*/r)^6] + \sum q_i q_j / \varepsilon_{ij} r_{ij} + \sum \left[ \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right]$$

Los tres primeros términos son funciones de las coordenadas internas, de las distancias entre átomos enlazados, los ángulos de enlaces y los diedros torsionales, respectivamente. En el tercer término también se incluye la mantención de la naturaleza y quiralidad de los centros  $sp^3$  en la representación del átomo enlazado. En esta representación los átomos de hidrógeno no polares no son representados explícitamente, pues están colapsados en la descripción de los átomos pesados a los cuales están unidos. El cuarto y quinto término describen las interacciones de van der Waals y electrostáticas, respectivamente. En el último término de la funcional de energía se definen los enlaces por hidrógeno, interacción que es descrita aquí en función de su naturaleza electrostática. Existen dos aspectos que requieren un especial tratamiento: las interacciones no-enlazantes 1-4 son escaladas por un factor de 0.5 y en la mayoría de los casos se utiliza una constante dieléctrica ( $\varepsilon$ ).

*Campo de Fuerzas CVFF (Consistent Valence Force Field).*

El CVFF es una extensión del Campo de Fuerzas de Valencia desarrollado por Dauber-Osguthorpe y col. en 1988 [3]. Los parámetros son provistos para una gran variedad de sistemas, como aminoácidos, agua y una gran variedad de grupos funcionales. Este campo de fuerza es utilizado en el programa Discover3 [4]. La función analítica es mucho más compleja que para el campo de fuerzas AMBER y está representada en la siguiente ecuación:

(A3.3)

$$\begin{aligned}
E_{pot} = & \sum_b D_b [1 - e^{-\alpha(b-b_0)}] + \sum_\theta H_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_\phi H_\phi [1 + s \cos(n\phi)] + \sum_x H_x \chi^2 \\
& + \sum_b \sum_{b'} F_{bb'} (b - b_0)(b' - b'_0) + \sum_\theta \sum_{\theta'} F_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) + \sum_b \sum_{b'} F_{bb'} (b - b_0)(\theta - \theta_0) \\
& + \sum_\phi F_{\phi\theta\theta'} \cos\phi (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) + \sum_x \sum_{x'} F_{xx'} \chi\chi' \\
& + \sum \varepsilon [(r^*/r)^{12} - 2(r^*/r)^6] + \sum q_i q_j / \varepsilon_{ij} r_{ij}
\end{aligned}$$

Los cuatro primeros términos son aquellos que representan la diagonal en la matriz de campo de fuerzas de valencia y representan la energía de deformación de las distancias de enlace, los ángulos de enlace, los ángulos torsionales y los ángulos torsionales impropios, respectivamente. Los términos desde el quinto al noveno son términos cruzados (aquellos que están fuera de la diagonal) y representan el acoplamiento entre las coordenadas internas deformadas. Estos términos son mostrados en la Figura A3.1.

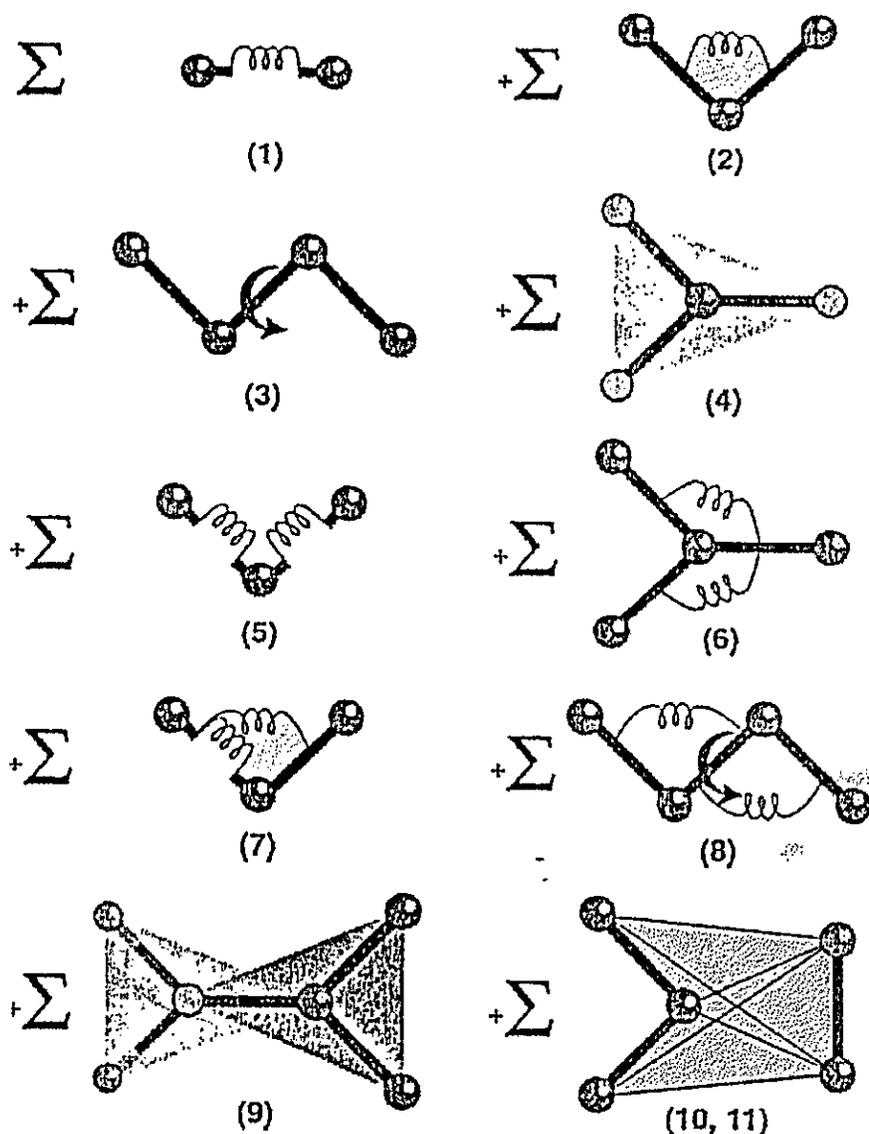


Figura A3.1 Ilustración gráfica de cada uno de los términos del CVFF [4].

Los dos últimos términos describen las interacciones no-enlazantes. El penúltimo representa las interacciones de van der Waals con una función de Lennard-Jones. El último término es la representación coulombica de las interacciones electrostáticas. La constante dieléctrica ( $\epsilon$ ) puede o no ser una función de la distancia. En este campo de fuerzas los enlaces por hidrógeno son una consecuencia natural de los parámetros de van der Waals y electrostáticos.

### Minimización

La minimización se efectúa básicamente en dos pasos: el primero es la obtención de la ecuación que describe la energía del sistema en función de las coordenadas (campo de fuerzas) que se evalúa para dar la energía correspondiente a la conformación dada. En el segundo paso las coordenadas del sistema son cambiadas para minimizar la energía total del sistema. Muchos programas de minimización están basados en el principio matemático de Newton-Raphson. Este principio requiere conocer la primera y segunda derivada de la superficie de energía potencial. Si la función que describe la energía del sistema fuese sólo una función de  $x$ , se debería conocer las siguientes derivadas:

$$(A3.4) \quad \frac{\partial V}{\partial x} = 0 = (F)$$

$$(A3.5) \quad \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} > 0 \quad (H)$$

donde la primera derivada corresponde a la fuerza del sistema y la segunda derivada de la energía con respecto a las coordenadas, denominada Hessiano. La matriz de la segunda derivada es construida usando todos los términos cruzados  $\frac{\partial^2 V}{\partial x_i \partial y_j}$  involucrados en cada coordenada. La utilización de la segunda derivada es un método costoso por la gran cantidad de memoria requerida, por lo cual no es de gran aplicabilidad para sistemas complejos y sólo se utiliza para sistemas de unos pocos átomos. Para proteínas se utilizan algoritmos menos efectivos pero más prácticos, definidos como algoritmos de primer orden. Entre éstos los más utilizados son los algoritmos de "steepest descent" y "conjugate gradient" [5].

#### *Steepest descent*

Este método de minimización es sólo dirigido por el gradiente ( $g$ ) a lo largo de la superficie de energía. En este algoritmo se utiliza una severa aproximación del Hessiano que consiste en considerarlo constante. Además, este método se ha mostrado ineficiente cuando la configuración del sistema está cerca del mínimo de energía, donde el gradiente es pequeño. Este método se utiliza como primera aproximación cuando las configuraciones están lejos de los mínimos.

### *Conjugate Gradient*

Este algoritmo produce un conjunto de direcciones mutuamente ortogonales, de modo que cada vez que se realiza un paso se refina la dirección hacia el mínimo evitando el retroceso. Las direcciones producidas por este método no muestran el comportamiento ondulatorio del método anterior en la zona de los mínimos. En el método anterior, el gradiente ( $g$ ) y la dirección de las etapas ( $v$ ) sucesivas son ortogonales. En este algoritmo el gradiente en cada punto es ortogonal, pero la dirección es conjugada. La nueva dirección de la etapa toma en cuenta el vector del gradiente previo ( $v_{k-1}$ ) y sigue la búsqueda a través de la siguiente relación

$$(A3.6) \quad v_k = -g_k + \gamma_k v_{k-1}$$

donde  $g_k$  es el gradiente y  $\gamma_k$  es un escalar definido en la ecuación (A3.7).

$$(A3.7) \quad \gamma_k = \frac{g_k \cdot g_k}{g_{k-1} \cdot g_{k-1}}$$

La ecuación (A3.6) puede ser usada solamente en la segunda etapa, mientras que la primera etapa es igual al método anterior.

## DINÁMICA MOLECULAR

La dinámica molecular (DM) calcula la dinámica "real" de un sistema, desde la cual pueden ser analizadas propiedades promedio en el tiempo. Un conjunto de posiciones atómicas son deducidas mediante la aplicación de las ecuaciones de movimiento de Newton. La dinámica molecular es un método determinista, pues el estado de un sistema en cualquier instante futuro puede predecirse desde el estado actual del sistema. Esta metodología, que simula los movimientos de un sistema de partículas, puede ser aplicada tanto a sistemas pequeños como átomos y moléculas diatómicas como también a sistemas macromoleculares como son las proteínas [5].

La trayectoria del sistema es obtenida resolviendo la ecuación diferencial de movimiento:

$$(A3.8) \quad \frac{d^2 x_i}{dt^2} = \frac{F x_i}{m_i}$$

según la cual una partícula de masa  $m_i$  con una posición  $x_i$  tiene una fuerza  $F x_i$ .

El movimiento de todas las partículas del sistema está acoplado, por lo cual no se puede resolver analíticamente la ecuación (A3.8). Bajo estas circunstancias las ecuaciones de movimiento son integradas usando el método de diferencias finitas. Esta técnica es usada para generar las trayectorias del sistema a través de una expansión en serie de Taylor:

$$(A3.9) \quad r(t + \delta t) = r(t) + \delta t v(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) + \dots$$

donde  $v$  es la velocidad y  $a$  es la aceleración del sistema.

El método más utilizado para integrar las ecuaciones de movimiento es el algoritmo de Verlet [5]. Este método utiliza la posición, la aceleración a tiempo  $t$  y la posición de la etapa previa  $r(t - \delta t)$  para calcular una nueva posición a tiempo  $(t + \delta t)$  descrita en la ecuación A3.9. La etapa previa viene dada por la ecuación A3.10.

$$(A3.10) \quad r(t + \delta t) = r(t) - \delta t v(t) + \frac{1}{2} \delta t^2 a(t) - \dots$$

Si se suman las ecuaciones A3.9 y A3.10 se obtiene la posición del sistema en función de la posición anterior y la aceleración.

$$(A3.11) \quad r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + \delta t^2 a(t)$$

Un factor importante en la integración de las ecuaciones de movimiento es la escala de tiempo utilizada. Esto se debe a la naturaleza continua de los potenciales que requiere que las ecuaciones de tiempo sean integradas a través de intervalos pequeños en la escala de tiempo, lo cual genera intervalos del orden de los femtosegundos (típicamente entre 1 femtosegundo y 10 femtosegundos;  $10^{-15}$  a  $10^{-14}$  s). En cada intervalo de tiempo, las fuerzas que actúan sobre los átomos son calculadas y se combinan con las posiciones y velocidades para generar las nuevas posiciones y velocidades al intervalo de tiempo siguiente. La fuerza que actúa sobre los átomos se supone constante durante el intervalo.

Las velocidades no son necesarias para registrar la trayectoria, pero sí lo son para calcular la energía cinética del sistema y a partir de ésta la energía total. Las velocidades pueden ser calculadas de varias maneras. La más simple aproximación se muestra en la ecuación (A3.12).

$$(A3.12) \quad v(t) = [r(t + \delta t) - r(t - \delta t)] / 2\delta t$$

Las velocidades iniciales pueden ser asignadas al azar a través de una distribución de Maxwell-Boltzmann a la temperatura de interés.

$$(A3.13) \quad p(v_{ix}) = \left( \frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{1/2} \exp \left[ -\frac{1}{2} \frac{m_i v_{ix}^2}{k_B T} \right]$$

Esta ecuación entrega la probabilidad de que un átomo  $i$  de masa  $m_i$  tenga una velocidad  $v_{ix}$  en la dirección  $x$  a una temperatura  $T$ . Las velocidades iniciales son ajustadas frecuentemente de manera que el momento total del sistema sea 0.

La temperatura está relacionada con la energía cinética a través de la siguiente ecuación:

$$(A3.14) \quad E_c = \sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{2m_i} = \frac{k_B T}{2} (3N - N_c)$$

$N_c$  es el número de restricciones del sistema y  $3N - N_c$  es el número total de grados de libertad.

### Referencias.

- 1.- A. K. Rappé y C. J. Casewit. "*Molecular Mechanics across Chemistry*". University Science Books, California, 1997.
- 2.- P. A. Kollman, J. S. Weiner, D. T. Nguyen y D. A. Case, *J. Comp. Chem.* 7, 230 (1986).
- 3.- P. Dauber-Osguthorpe, V. A. Roberts, D. J. Osguthorpe, J. Wollff, M. Genest y A. T. Hagler, *Proteins: Structure, Functions and Genetics* 4, 31 (1988)
- 4.- Discover3, Versión 1995, Force Field Program Manual, Biosym, 1995.
- 5.- A. R. Leach, "*Molecular Modelling*". Addison Wesley Longman, Londres, 1996.

## APENDICE 4

### PUBLICACIONES

- ◆ Theoretical Study of Dopamine.  
Application of the HSAB Principle to the Study of Drug-Receptor Interactions.  
Aceptado para su publicación en la revista TEOCHEM.  
Marcela P. Aliste  
Se adjunta manuscrito
  
- ◆ Conformational Studies on Ortho-methylated Dopamine Derivatives.  
Marcela P. Aliste and Bruce K. Cassels



# Theoretical study of dopamine. Application of the HSAB principle to the study of drug–receptor interactions

M.P. Aliste\*

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago 1, Chile

Received 14 June 1999; accepted 25 June 1999

## Abstract

We present a theoretical conformational study of neutral and *N*-protonated form of dopamine in which we relate its pharmacological activity to the chemical hardness. We have found that the neutral form presents small fluctuations in the energy and the chemical hardness with the conformational variables, whereas the *N*-protonated form shows significant changes in both properties. An important result is that the Principle of Maximum Hardness is satisfied. The *trans* coplanar rotamers are postulated as the pharmacophoric conformation(s) because these rotamers show minimal chemical hardness. In addition, we have calculated the hardness of a model of the anionic binding site of the dopamine receptor, which is formed by a formate ion and two benzenes. We have compared the hardness calculated for this model with the hardness of the isolated formate anion, and found that the hardness of the base in the binding site is lower than that of the isolated formate group. Also, it is found that the hardness of the anionic binding site model is similar to that of both *trans* coplanar rotamers of protonated dopamine, in agreement with the Hard and Soft Acid and Base Principle. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Dopamine; Rotamer; Drug–receptor complex

## 1. Introduction

Dopamine is an important neurotransmitter in the central nervous system, and malfunction of dopaminergic systems is implicated, for example, in Parkinson's disease, Huntington's chorea and schizophrenia [1,2]. This neurotransmitter is also involved in the reward system believed to underlie drug addiction [3]. Its action is mediated by several receptor types with different structural requirements for exogenous ligands [4].

Conformational studies of dopamine have been performed experimentally using NMR techniques

[5,6], and based on quantum chemical calculations [7,8]. In addition, the crystal structure of dopamine hydrochloride has been determined by X-ray diffraction [9]. The NMR studies show that in solution the *trans* population is larger than the *gauche* population [5]. Also, the *trans* population increases with pH, and a mixture of both the *gauche* conformations is observed in acid solution [6]. No information could be obtained from these studies, regarding the orientation of the catechol ring due to the rapid rotation of the aminoethyl chain.

Quantum chemical studies of dopamine indicated that in the gas phase, the *gauche*–*distal* conformer has the lowest energy and  $\alpha$  and  $\beta$  *trans* rotamers are the most energetic, although relatively stable, conformations [7,8]. On the contrary, using the AM1/SM1 solvation model, it has been shown that the *anti*

\* Fax: + 56-22713888.

E-mail address: maliste@pregrado.ciencias.uchile.cl  
(M.P. Aliste)

conformer is isoenergetic with *gauche* conformers [8].

The pharmacophoric conformation(s) remain(s) unclear for dopamine, but structure–activity relationships in semirigid analogues suggest that the coplanar rotamers might approximate the conformations interacting with dopamine receptors [10]. In addition, the *N*-protonated form is a preferred candidate for formation of the drug–receptor complex through a reinforced electrostatic interaction [11]. Recently, mutagenesis studies have given strong support to the idea that an aspartate residue is responsible for this interaction with the ammonium group of dopaminergic ligands [12], and that the interaction between the ligands and the binding site may be viewed as an acid–base interaction.

The Hard and Soft Acid Base Principle (HSAB) was proposed by Pearson [13] to predict the stability and the reactivity of a generalized acid–base reaction. The HSAB principle states that a hard acid prefers to react with a hard base and a soft acid prefers to react with a soft base. Recently, Li and Evans [14] showed the importance of the HSAB principle in enzymatic catalysis. These authors found small fluctuations in the energy of phosphoenolpyruvate, but the local properties of the molecule, such as charge and HOMO density, change dramatically when the conformation of the molecule varies. They proposed that the importance of the HSAB principle in enzymatic catalysis is that if it were not present the enzymatic reaction would not be specific and/or efficient.

On the contrary, the chemical hardness has been related to long-range electrostatic interactions [15] and associated with noncovalent (i.e. electrostatic) interactions, hence, it is interesting to discuss drug–receptor interactions, which are noncovalent in nature, in terms of the hardness. Here in, we present a study of the electronic and conformational structure of dopamine in terms of global properties such as chemical hardness and electronic chemical potential with special consideration of the postulated pharmacophoric conformations. We have also evaluated the variation of both properties as a function of the reaction coordinate that describes the internal rotation of dopamine. On the contrary, we have also calculated the global hardness for different models of the anionic binding site of the dopamine receptor and found that

can be treated using the HSAB Principle and The Principle of Maximum Hardness (PMH).

## 2. Methodology, models and calculations

In this paper we will use concepts that have been formalized through the Density Functional Theory (DFT) to characterize the conformational dependence upon internal rotation of the neutral and *N*-protonated dopamine. The DFT provides the theoretical basis for chemical concepts such as electronic chemical potential ( $\mu$ ) and chemical hardness ( $\eta$ ), both global properties of the system. Furthermore, the DFT has proven to be useful in the verification of the PMH, which asserts that molecular systems at equilibrium tends to high hardness conformations [16], transition states should therefore present minimal hardness [15]. Parr and Chattaraj [17] showed that the PMH holds under the constraints that the external potential and electronic chemical potential must remain constant all along the reaction coordinate. However, the PMH seems to be valid even under less restrictive conditions, relaxation of these constraints seems to be permissible [18–22]. It has been found that the chemical potential is not always constant along a reaction coordinate [18–22]. Cárdenas-Jirón et al. have shown that for rotational isomerization processes the PMH holds, although the chemical potential along the reaction coordinate does not remain constant [19,20]. These authors suggest that a less restrictive condition for the PMH to hold might be dictated by the electrostatic Hellman–Feynman theorem [19–22].

The electronic chemical potential is formally defined in DFT [23,24] as:

$$\mu = \left[ \frac{\partial E}{\partial N} \right]_{\nu(r)} \quad (1)$$

The external potential  $\nu(r)$ , is the potential accounting for the interactions of electrons and nuclei in the molecule. Using a finite difference approximation, this quantity may be expressed in terms of the ionization potential  $I$  and electron affinity  $A$ , respectively. A further approximation based on Koopman's theorem, leaves  $\mu$  expressed in terms of the one-electron energy levels of the HOMO (highest occupied molecular orbital) and LUMO (lowest unoccupied

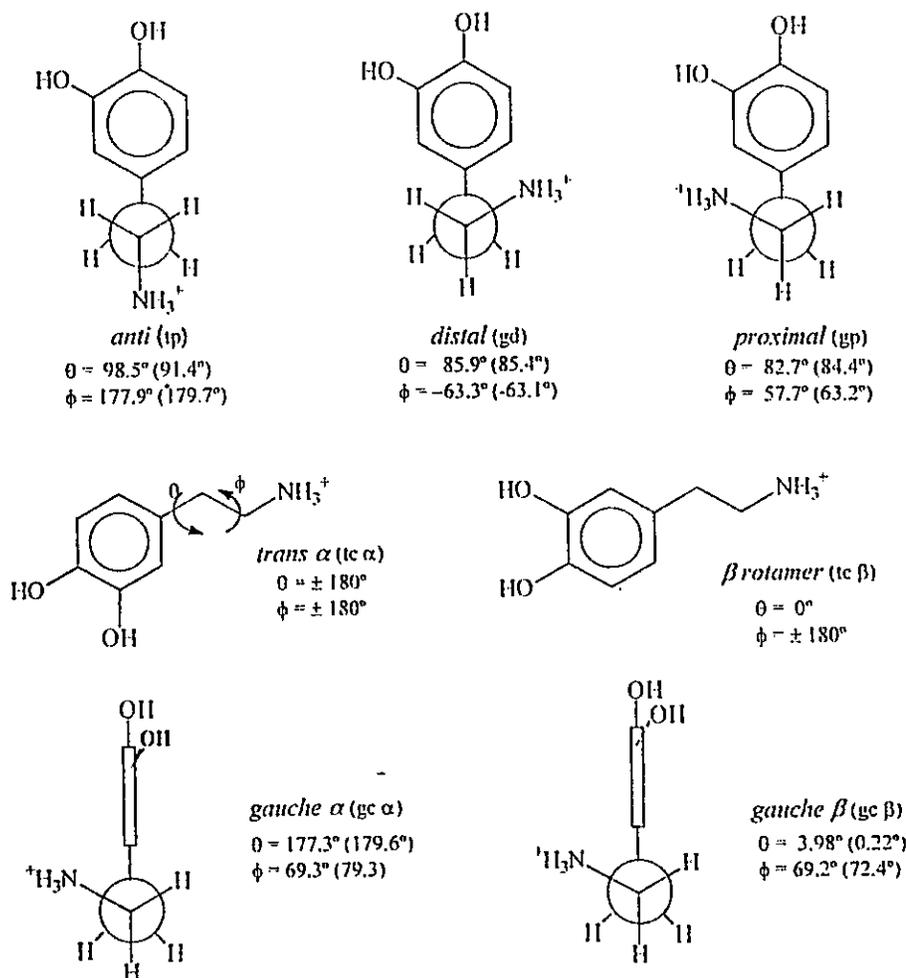


Fig. 1. The different rotamers for *N*-protonated dopamine. Definition of the dihedral angles  $\phi$  and  $\varphi$  is shown for the  $\alpha$  rotamer. The optimized dihedral angles are shown below each rotamer for the *N*-protonated (neutral) form. *Anti*, *gauche*-*distal* and *gauche*-*proximal* rotamers correspond to the staggered conformations resulting from rotation about  $\phi$  with  $\theta \approx 90^\circ$ . The coplanar conformations correspond to  $\alpha$  and  $\beta$  rotamers with  $\theta = 180$  and  $0^\circ$ , respectively.

molecular orbital) orbitals  $\epsilon_h$  and  $\epsilon_l$ , respectively:

$$\mu \cong -\frac{(I + A)}{2} \cong \frac{\epsilon_h + \epsilon_l}{2} \quad (2)$$

Chemical hardness ( $\eta$ ) is the resistance of a system to change its electronic distribution [23,24], it is defined as:

$$\eta = \left[ \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right]_{r(r)} \quad (3)$$

and the finite difference approximation and

Koopmans theorem leads to:

$$\eta \cong \frac{(I - A)}{2} \cong \frac{(\epsilon_l - \epsilon_h)}{2} \quad (4)$$

The calculations were performed at the HF/6-31G level of theory, implemented within the GAUSSIAN94 package [25]. The two dihedral angles defining the different conformations are  $\theta$  and  $\phi$  (defined in Fig. 1). Each rotamer for the neutral and *N*-protonated forms was fully optimized. The potential energy, hardness and electronic chemical potential profiles were obtained for the *N*-protonated form with  $\theta$

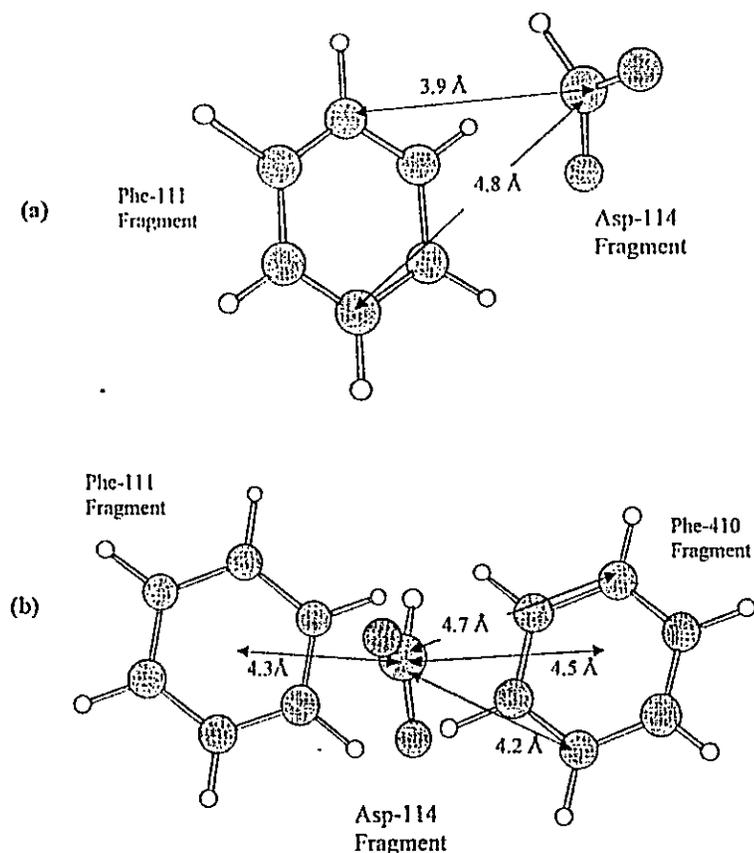


Fig. 2. Models for the anionic binding site of the  $D_2$  dopamine receptor: (a) model 2 the formate group (representing the Asp-114 residue) surrounded by one benzene ring (representing the Phe-111) and (b) two benzene rings in model 3 (representing Phe-111 and Phe-410).

fixed at 0, 90 and 180° and rotating  $\phi$  from  $-180$  to  $180^\circ$  in  $20^\circ$  increments. In theory, dopamine may exhibit the following relatively stable side chain conformations: two *gauche* and three *trans* forms (Fig. 1). For the *trans* conformers two extreme situations may be envisioned, i.e. with the plane of the catechol ring tending to be perpendicular to the amino ethyl chain (*anti*), or with the ring and side chain coplanar, in which case two rotamers, “*trans*  $\alpha$ ” and “*trans*  $\beta$ ”, depending on the orientation of the catechol ring, are possible. In the *gauche*–*distal* conformation the ammonium group is oriented away from the *m*-hydroxyl group, and in the *gauche*–*proximal* conformation the ammonium group lies close to the *m*-hydroxyl group. Also, the *trans* coplanar rotamers present *gauche* coplanar rotamers. Owing to the symmetry of rotation for the *trans* coplanar rotamers, the energy will be the same for the rotamers with  $\phi =$

$60^\circ$  or  $\phi = -60^\circ$ . The results for the optimized torsional angle for each rotamer in their neutral and *N*-protonated form are shown in Fig. 1. The conformation for the neutral form, is almost the same as the *N*-protonated form. However, the lone pair of the nitrogen is always in the opposite direction to the aromatic cloud.

We have used three models for describing the anionic binding site. Model 1 is a formate anion representing the aspartate-114 residues. Models 2 and 3 represent the same aspartate residues surrounded by the environment in the receptor, they were obtained from our  $D_2$  dopaminergic receptor-model [26,27], and are depicted in Fig. 2. Model 1 was fully optimized, meanwhile for models 2 and 3 we allowed only the optimization of each individual fragment and constrained the dihedral angles and distances between the different fragments as shown in Fig. 2.

Table 1  
Relative energies ( $\Delta E$ ), chemical hardness ( $\eta$ ) and electronic chemical potentials ( $\mu$ ) for the neutral form of dopamine at the 6-31G level

| Rotamers        | $\Delta E$ (kcal/mol) | $\eta$ (eV) | $\mu$ (eV) |
|-----------------|-----------------------|-------------|------------|
| Proximal        | 0.0                   | 6.07        | - 2.23     |
| Distal          | 0.0                   | 6.07        | - 2.28     |
| Anti            | 0.0                   | 6.07        | - 2.21     |
| Trans $\alpha$  | 2.2                   | 6.09        | - 2.25     |
| Gauche $\alpha$ | 2.7                   | 6.07        | - 2.19     |
| Trans $\beta$   | 2.1                   | 6.08        | - 2.25     |
| Gauche $\beta$  | 2.9                   | 6.07        | - 2.24     |

### 3. Results and discussion

The principal drug–receptor interaction in the dopamine–receptor complex is the reinforced ionic bond that involves the presence of a protonated amine function in the dopaminergic ligand [11] and an anionic binding site in the receptor. Thus, the drug–receptor interaction may be viewed as an acid–base interaction. Under this assumption, the HSAB [13] may be applied to rationalize the interaction between the dopamine and the binding site. This entails that the *N*-protonated dopamine and the binding site should have comparable hardness (softness) in order to have a high affinity. We have examined the hardness of the ligand and the binding site.

#### 3.1. Energy and hardness of the ligand

We present the hardness of the different conformations of dopamine in the neutral and *N*-protonated

form. The resulting differences in energy and hardness for the neutral form of dopamine are summarized in Table 1. The results show that the most stable rotamers are the perpendicular ones. Both coplanar conformations are less stable. The most energetic rotamers are the *gauche* coplanar ones. On the contrary, the electronic chemical potential remained nearly constant. The hardness of the different rotamers differs slightly, showing small fluctuations. These results are probably not significant for evaluating compliance with the PMH. The rotation of the amino group around the catechol (aromatic) ring brings the lone pair of nitrogen close to the catechol ring. The analysis of the density of HOMO and LUMO shows that both the orbitals are centered in the aromatic ring. However, the main contribution of the lone pair in a molecular orbital is localized in HOMO-2. The eigenvalues of the orbital HOMO-2 for the neutral form shows the same trend as that of the relative energy, but does not contribute to the chemical hardness. The isodensity surface for the HOMO and HOMO-2 orbitals are shown in Figs. 3 and 4, respectively.

The results for the *N*-protonated form are quite different from those seen for the neutral form (see Table 2). We observed significant differences in the energy and the hardness that follow the PMH, even though, the results show that the electronic chemical potential does not remain constant. The most stable rotamer is the *distal* one, which also presents the greatest hardness. The results are in agreement with the trends in relative energy shown by Urban et al. [8]. The *proximal* form is slightly less stable than the

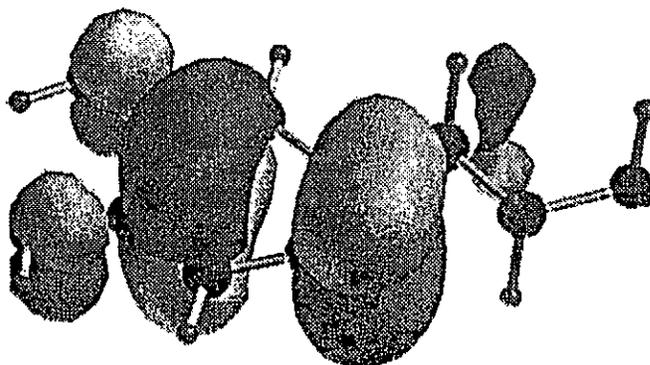


Fig. 3. HOMO density surface for the neutral form of dopamine. Isodensity value is 0.03 a.u.

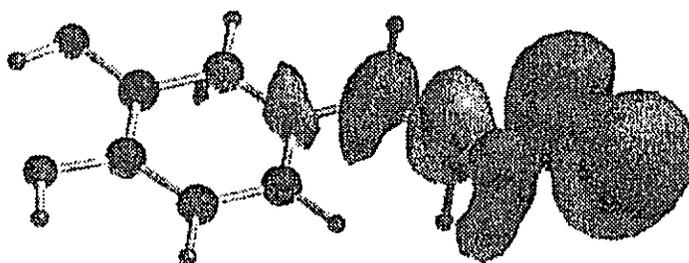


Fig. 4. HOMO-2 density surface for the neutral form of dopamine. Isodensity value is 0.03 a.u.

*distal* one, and the hardness decreases only by 0.03 eV. The *anti* rotamer is the most unstable of the perpendicular conformations. The stability of the *trans* coplanar form decreases and it becomes the most unstable rotamer presenting the lowest hardness. For the coplanar rotamers, an inversion in the relative energy may be noted, as the *gauche* coplanar form becomes more stable than the alternative conformation. The hardness for the *gauche* coplanar form reaches approximately the same value as that of the most stable rotamer. The analysis of the density of molecular orbitals for the *N*-protonated form shows that the HOMO is localized in the aromatic ring (see Fig. 5), similar to that in the neutral form, whereas the LUMO (see Fig. 6) shows a contribution only from the ammonium group (this orbital is centered in the nitrogen atom). In addition, the quantitative structure-activity relationship study of dopaminergic antagonist-receptor interaction shows that LUMOs eigenvalues have a good correlation to the affinity of a series of neuroleptic compounds, and it has been postulated that there is LUMO-antagonist and HOMO receptor interaction [28]. In this case there

will be a LUMO-antagonist and a HOMO-receptor interaction.

The *gauche* rotamers are more stable than their respective *trans* conformations. The main reason for this stability is the cation- $\pi$  interaction present in the *gauche* forms. The cation- $\pi$  interaction has been observed in the gas phase, in the solid state and in the proteins [29]. This interaction occurs between a cation (in our systems the ammonium group) and an aromatic ring.

### 3.2. Hardness profiles

The theoretical study of ligand-receptor interaction shows that a ligand conformation could not be the global minimum, but any conformation up to 10 kcal/mol above the global minimum. The hardness profiles has been defined as the change in the hardness of a species along the reaction coordinate [30]. The energy, hardness and chemical potential profiles were obtained for the reaction coordinate ( $\phi$ ), with  $\theta$  fixed at 0, 90 and 180° for the *N*-protonated form of dopamine. Our results are in agreement with the experimental free rotation of dopamine. The energy and hardness profiles show interesting features as shown in Fig. 7.

We first note in Fig. 7 that the PMH is clearly satisfied, as the potential energy and hardness curves show opposite behavior, i.e. a minimum (maximum) in hardness corresponds to an energy maximum (minimum). Gázquez et al. [31] have found an expression that relate the energy change of a chemical process with the change of electronic chemical potential and hardness,

(5)

Table 2

Relative energies ( $\Delta E$ ), chemical hardness ( $\eta$ ) and electronic chemical potential ( $\mu$ ) for rotamers of the *N*-protonated form of dopamine at the 6-31G level

| Rotamer $\alpha$ | $\Delta E$ (kcal/mol) | $\eta$ (eV) | $\mu$ (eV) |
|------------------|-----------------------|-------------|------------|
| Proximal         | 0.3                   | 5.73        | - 6.03     |
| Distal           | 0.0                   | 5.78        | - 6.10     |
| Anti             | 3.8                   | 5.37        | - 6.02     |
| Trans $\alpha$   | 6.8                   | 5.28        | - 5.90     |
| Gauche $\alpha$  | 3.9                   | 5.61        | - 5.95     |
| Trans $\beta$    | 7.6                   | 5.30        | - 5.96     |
| Gauche $\beta$   | 5.7                   | 5.60        | - 6.02     |

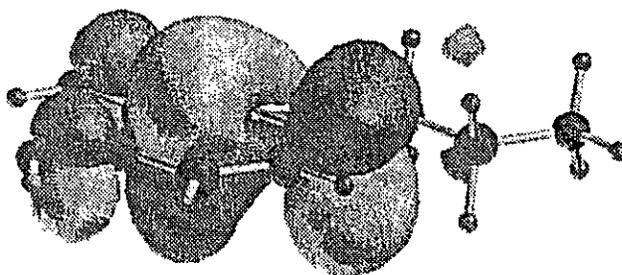


Fig. 5. HOMO density surface for the *N*-protonated form of dopamine. Isodensity value is 0.03 a.u.

where  $N$  is the total number of electrons. Through this expression it is established that, under the conditions of constant  $\mu$ , when a system evolves toward a state of high (lower) hardness, its stability increases (decreases), i.e. the PMH is satisfied.

The hardness profiles for the *trans* coplanar dopamine rotamers (see Fig. 7(a) and (c)) shows an area where the hardness is almost constant, around  $60^\circ$ , the region between  $\pm 180$  and  $\pm 120^\circ$ , the  $V_{NN}$  energy present a minimum in this region and shows a small variation, and the electronic energy shows a maximum. These results suggest that small fluctuations around a strictly *trans* coplanar relationship between the ammonium group and the catechol ring do not greatly affect the hardness, i.e. the reactivity in-front an interaction. This result suggests that the pharmacophoric *trans* conformation could be less restrictive. In addition, almost all the known dopaminergic ligands hold the dopamine moiety in a nearly *trans* coplanar conformation, but the orientation of the ammonium group with regard to the catechol ring could be fluctuating slightly; for example the torsional angle may be  $175^\circ$  or less. The hardness increases when the ammonium group is close to the catechol

ring, i.e. when the distance between the positive charge and the aromatic cloud decreases. For the perpendicular profiles (see Fig. 7(b)) the hardness profile shows a maximum in the region between  $-60$  and  $60^\circ$  that correspond to the *gauche* perpendicular conformations where the cation- $\pi$  interaction stabilize the conformation. On the contrary, the hardness shows similar trends for the coplanar profiles is an area where the hardness remain almost constant ( $\pm 180$  to  $\pm 120^\circ$ ).

### 3.3. Hardness of the receptor

The study of the ligand-receptor interaction is important to the rationalize drug-design. The structure of the receptor is still unclear, but protein homology modeling of the receptor provides an independent approach for determining the basis of the binding and stabilization of the drug-receptor complex and identifies residues of the receptor as candidates for interaction with specific atoms of ligands. The anionic binding site in dopaminergic receptors is commonly regarded as the aspartate-114 residue, but close to this residue there is also a cluster of four aromatic residues (Phe-111, Phe-398, Tyr-407 and Phe-410) [26,27]. Similar clusters are also present in other receptor and nonreceptor proteins [32], and mutation of these residues in  $D_2$  and other monoaminergic G-protein coupled receptors significantly reduces the ligand binding affinity [33]. The hardness of formate base of the aspartate residues should decrease in the binding site because the anionic residue within the receptor site is surrounded by apolar or aromatic environment (side chains).

The structure for each model is shown in Fig. 2.



Fig. 6. LUMO density surface for the *N*-protonated form of dopamine. Isodensity value is 0.03 a.u.

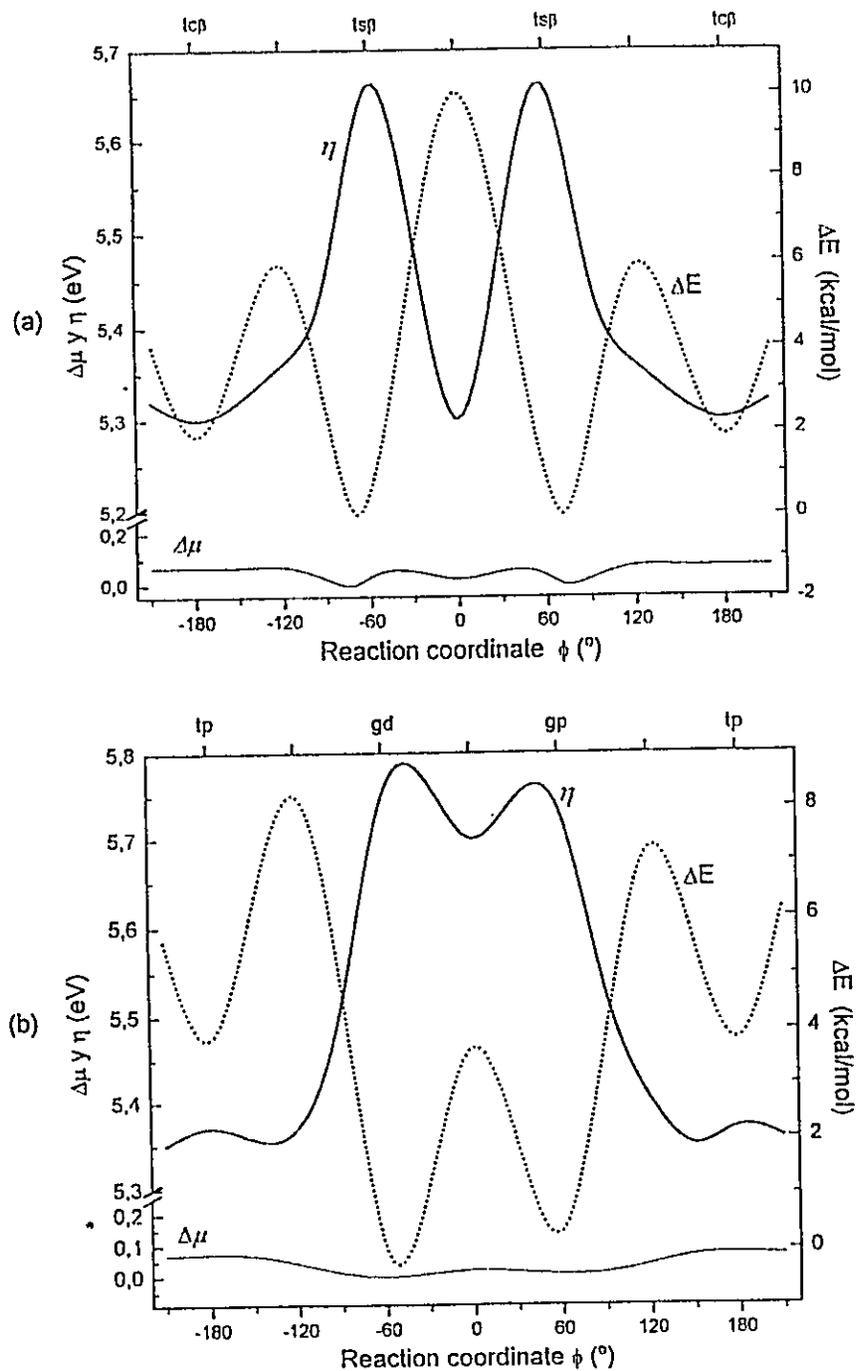


Fig. 7. Profiles of relative potential energy ( $\Delta E$ ) (dotted line), hardness ( $\eta$ ) (bold line) and electronic chemical potential differences ( $\Delta\mu$ ) (bold line) for rotation of *N*-protonated dopamine about the dihedral angle  $\phi$ . (a)  $\theta$  fixed at  $0^\circ$ , (b)  $90^\circ$  and (c)  $180^\circ$ .  $\Delta E$  is in kcal/mol, and  $\eta$  and  $\Delta\mu$  are in eV.

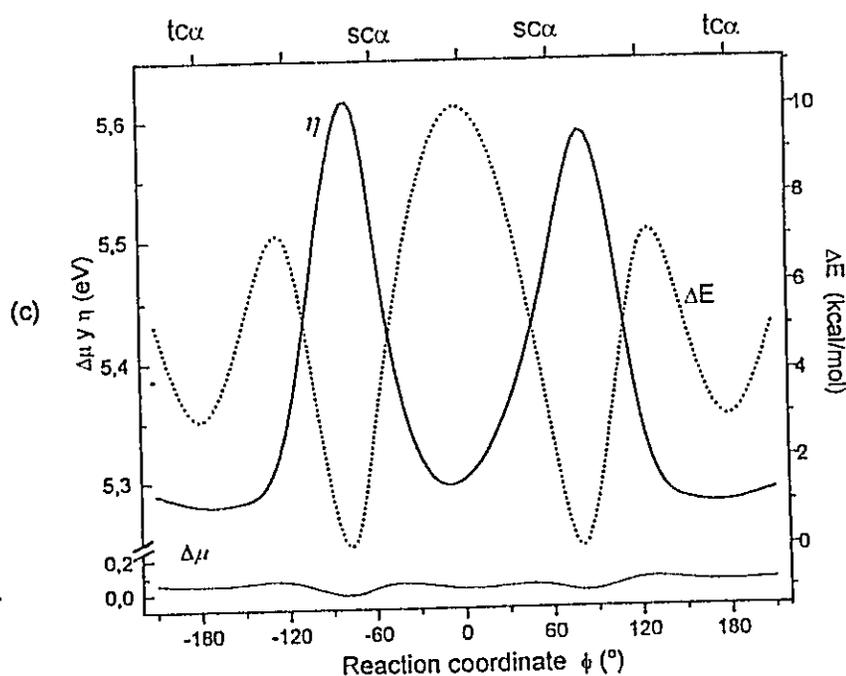


Fig. 7. (continued)

Model 1 (isolated formate anion) is a hard base that presents a hardness of 8.01 eV. The results for the models 2 and 3 of the electrostatic binding site show hardness of 5.41 and 5.13 eV, respectively. The inclusion of one benzene ring decreases the hardness by 2.6 eV, but the introduction of the second ring only decreases the hardness by another 0.28 eV. The hardness of the formate is drastically changed due to the environment of the receptor. If we compared the change obtained for the anionic binding site with the hardness profile for the ligand, we find regions in the profiles for the perpendicular and coplanar between  $\pm 100$  and  $\pm 180^\circ$  where the hardness of the ligand matches the hardness of the receptor. Our results suggest that the dopaminergic pharmacophoric conformation could be less restrictive in the orientation between the aromatic ring and the cationic nitrogen.

#### 4. Concluding remarks

The use of a global reactivity index such as chemical hardness allows drug–receptor interaction—in

this case the dopamine–receptor interaction—to be described as an acid–base reaction governed by the HSAB principle. In the present example, the hardness of only a small part of the binding site was examined. Nevertheless, it may be concluded that the hardness (softness) of dopamine is very similar to the hardness (softness) of the proposed binding site. On the contrary, the PMH holds good for the systems present in this paper.

#### Acknowledgements

M.P.A. acknowledges financial support from the Departamento de Postgrado y Postítulo, Universidad de Chile, PG/038/1997 and Postgraduate Fellowship from CONICYT.

#### References

- [1] Goodman, A. Gilman, J.G. Hardman, L.T. Limbird (Eds.), Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics 9, McGraw-Hill, New York, 1995 ISBN: 0-07-026266-7.

- [2] O. Henrykiewicz, *Pharmacol. Rev.* 18 (1996) 825.
- [3] A. Imperato, A. Mele, M.G. Scrocco, *Eur. J. Pharmacol.* 212 (1992) 299.
- [4] J.A. Gingrich, M.G. Caron, *Annu. Rev. Neurosci.* 16 (1993) 299.
- [5] T.M. Bustard, R.S. Egan, *Tetrahedron* 27 (1971) 4457.
- [6] P. Solmajer, D. Kocjan, T. Sohmajer, *Z. Naturforsch.* 38c (1983) 758.
- [7] J.J. Urban, C.J. Cramer, G.R. Famini, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 8226.
- [8] J.J. Urban, G.R. Famini, *J. Comp. Chem.* 14 (1993) 353.
- [9] J. Giesecke, *Acta Cryst. B* 36 (1980) 178.
- [10] J.G. Cannon, *Prog. Drug Res.* 29 (1985) 303.
- [11] D.D. Miller, M. Harold, R.A. Wallace, L.J. Wallace, N.J. Uretsky, *TIPS* 9 (1988) 282.
- [12] A. Manson, F. Meng, J.H. Meador-Woodruff, L.P. Taylor, O. Civelli, H. Abil, *Eur. J. Pharmacol.* 227 (1992) 205.
- [13] R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3533.
- [14] Y. Li, J.N.S. Evans, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93 (1992) 4612.
- [15] R.G. Pearson, W.E. Palke, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 3283.
- [16] R.G. Pearson, *J. Chem. Ed.* 64 (1987) 561.
- [17] R.G. Parr, P.J. Chatarraj, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 1852.
- [18] G.I. Cárdenas-Jirón, J. Lahsen, A. Toro-Labbé, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 5325.
- [19] G.I. Cárdenas-Jirón, A. Toro-Labbé, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 12 730.
- [20] G.I. Cárdenas-Jirón, S. Gutiérrez-Oliva, J. Melin, A. Toro-Labbé, *J. Phys. Chem. A* 101 (1997) 4621.
- [21] S. Gutiérrez-Oliva, R. Letellier, A. Toro-Labbé, *Mol. Phys.* 96 (1998) 61.
- [22] R.G. Parr, W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, Oxford, 1989.
- [23] R.G. Pearson, *Chemical Hardness*, Wiley, New York, 1997.
- [24] J.L. Gázquez, A. Martínez, F. Méndez, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 4059.
- [25] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, P.M.W. Gill, B.G. Johnson, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, T. Keith, G.A. Petersson, J.A. Montgomery, K. Raghavachari, M.A. Al-Laham, V.G. Zakrzewski, J.V. Ortiz, J.B. Foresman, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, A. Nanayakkara, M. Challacombe, C.Y. Peng, P.Y. Ayala, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andrés, E.S. Replogle, R. Comperts, R.L. Martin, D.J. Fox, J.S. Binkley, D.J. Defrees, J. Baker, J.P. Stewart, M. Head-Gordon, C. González, J.A. Pople, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1995.
- [26] M.P. Aliste-Gómez, B.K. Cassels, unpublished results.
- [27] M.P. Aliste-Gómez, PhD thesis, Universidad de Chile, 1998.
- [28] J. Szymoniak, A. Boudon, J.R. Chrétien, J.E. Dubois, *Eur. J. Med. Chem.* 22 (1987) 101.
- [29] J.C. Ma, D.A. Dougherty, *Chem. Rev.* 97 (1997) 1303.
- [30] D. Datta, *J. Phys. Chem.* 96 (1992) 2409.
- [31] J.L. Gázquez et al. Author please supply details.
- [32] Y. Satow, G. Cohen, E. Padlan, D. Davies, *J. Mol. Biol.* 190 (1986) 593.
- [33] J.A. Bikker, S. Trumpp-Kalmeyer, C. Humblet, *J. Med. Chem.* 44 (1998) 2911.