



Prof. Dr. Bruce K. Cassels

Bases Moleculares de la Selectividad de Ligandos de Enzimas y Receptores

2003 - Reservados todos los derechos

Permitido el uso sin fines comerciales

**Bases Moleculares de la Selectividad de Ligandos de Enzimas y
Receptores:
Aproximaciones desde el Punto de Vista Micromolecular**

Prof. Dr. Bruce K. Cassels

El reconocimiento selectivo de moléculas de fármacos por enzimas y receptores es uno de los fundamentos principales de la química terapéutica moderna. Las aproximaciones racionales al diseño de fármacos exigen cierta comprensión de los rasgos estructurales que permiten que una molécula pequeña interactúe de manera selectiva con una macromolécula-blanco de manera tal que otros sistemas sólo sean afectados en grado mínimo. Esto resulta particularmente claro en las quimioterapias antimicrobiana, antiparasitaria y antitumoral, donde el objetivo es eliminar algún tipo de célula dañando lo menos posible el huésped, pero es también un principio rector en el diseño de sustancias que modulan la actividad de sistemas fisiológicos al inhibir enzimas, activar o bloquear receptores, o afectar la síntesis, la liberación, la captación o la inactivación metabólica de neurotransmisores, autacoides u hormonas. En los párrafos que siguen se desarrollarán dos ejemplos de las líneas que se pretende cultivar en el Laboratorio de Química Biodinámica del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias.

Inhibidores selectivos y sustratos de enzimas de parásitos o huéspedes

Las enfermedades parasitarias son una importante fuente de sufrimiento en países de menor desarrollo relativo. Los tripanosomas y las leishmanias son protozoos parásitos estrechamente relacionados entre sí, pertenecientes al orden Kinetoplastida, suborden Trypano-somatina. Estos parásitos son los agentes causales de graves enfermedades del hombre y del ganado, entre las cuales la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, debida a *Trypanosoma cruzi*, y las leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral, debidas a diversas especies de *Leishmania*, tienen especial importancia en Latinoamérica. El gran número de personas con patologías activas o en situación de riesgo de contraer dolencias causadas por estos protozoos, el impacto considerable que tienen estas enfermedades en las economías de muchos países, la elevada toxicidad de los fármacos que se utilizan para su tratamiento y la eficacia limitada de aquellos que se emplean en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, justifican el actual consenso que debe continuar una búsqueda muy activa de nuevos y mejores fármacos antitripanosomales.

Nuestro conocimiento de la bioquímica de estos parásitos ha aumentado de manera marcada en el último decenio, con la identificación de importantes diferencias entre parásitos y huéspedes que pueden servir de bases para el desarrollo de fármacos más selectivos que los que se utilizan en la actualidad. Por otra parte, el cribado al azar de un gran número de sustancias naturales y sintéticas ha conducido al reconocimiento de algunos tipos de compuestos que poseen actividades antitripanosomales y que no se emplean actualmente en medicina. Un blanco bioquímico que parece especialmente atrayente es la

diferencia entre los sistemas de defensa redox de los mamíferos, basado en el glutatión y la enzima glutatión reductasa (GR), y de los protozoos tripanosomatinos, constituido por (mono)-glutathionilperimidina, tripanotión [*N1,N8-bis*-(glutathionil)espermidina] y tripanotión reductasa (TR). A pesar de la gran semejanza entre las formas oxidadas del glutatión y del tripanotión, cada una de estas enzimas es prácticamente inactiva frente al sustrato de la otra. Es por lo tanto posible diseñar racionalmente sustratos e inhibidores selectivos de la TR que no deberían interactuar de manera significativa con el sistema análogo del mamífero huésped. Además de algunos inhibidores clásicos con estructuras catiónicas anfífilas, han sido descritos sustratos subversivos que, al ser reducidos por la enzima del parásito para dar intermediarios radicales libres, revierten a sus formas oxidadas al reducir oxígeno molecular a ión superóxido, acentuando así el estrés oxidativo al interior de las células del protozoo. Sin embargo, el único fármaco utilizado actualmente para tratar la enfermedad de Chagas en las fases tempranas en las cuales responde a la terapia es el compuesto nitro-heterocíclico nifurtimox, que muestra una selectividad inversa: interactúa más eficazmente con la GR del huésped que con la TR del parásito, y por consiguiente no sólo tiene una eficacia muy limitada sino también es muy tóxica para los pacientes humanos.

Las estructuras cristalinas de la GR humana (Karplus y Schulz, 1987) y de la TR de parásitos (Kuriyan *et al.*, 1991; Hunter *et al.*, 1990, 1992; Krauth-Siegel *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993) son lo suficientemente bien conocidas como para que se puedan construir buenos modelos computacionales de estas enzimas, y también ha sido estudiado un complejo de la TR de *Crithidia fasciculata* con uno de sus sustratos (Bailey *et al.*, 1993). Empleando metodología de rayos X ha sido también posible determinar la estereoquímica de la catálisis (Pai y Schulz, 1983; Karplus y Schulz, 1989) y el modo de unión de varios inhibidores (Schirmer *et al.*, 1989). Ambas enzimas son activas como dímeros de polipéptidos con masas moleculares de 50-55 kDa. Contienen como cofactor una molécula de FAD por cada unidad monomérica, y utilizan NADPH como dador de electrones. El conocimiento disponible ahora acerca de las estructuras y el mecanismo de acción común de la GR y la TR permite racionalizar su selectividad hacia sus sustratos, como se ha hecho en un reciente estudio de modelado (Tapia *et al.*, 1994). Ya en 1988 se había mostrado que la TR reduce eficazmente ciertos nitrofuranos y naftoquinonas que poseen cadenas laterales nitrogenadas, iniciando así el ciclaje redox; estas sustancias inhiben la reducción del sustrato fisiológico T[S]2 (Henderson *et al.*, 1988). Algunos de estos compuestos resultaron ser mejores inhibidores de la TR y también mostraron actividad tripanosomicida a concentraciones menores que el nifurtimox, pero estas cabezas de serie sintéticas no parecen haber sido explotadas ulteriormente.

En esta propuesta tenemos la intención de explorar dos pistas de productos naturales que puedan conducir al diseño de inhibidores selectivos o sustratos subversivos de la TR: quinonas tales como las de *Calceolaria sessilis* (Morello *et al.*, 1995) y *b*-carbólicas tales como los alcaloides del harmano (Rivas *et al.*, resultados no publicados). Ambos grupos de sustancias muestran interesantes actividades frente a *T. cruzi in vitro*. Algunas de las primeras aumentan el consumo de oxígeno de una manera que apunta al ciclaje redox, mientras que las segundas, que son bien conocidas como inhibidores de la MAO-A, una flavoenzima como la TR, quizá formen complejos con la porción de FAD de enzimas pertenecientes a la cadena respiratoria más que al sistema de defensa redox. Se estudiarán

en forma comparada los efectos de compuestos activos conocidos pertenecientes a ambas clases sobre la TR y la GR. Al mismo tiempo se sintetizarán nuevos análogos para ampliar la gama de estructuras disponibles, buscando producir series racionales con potenciales redox variados (que serán determinados experimentalmente) y rasgos tales como grupos cargados, funcionalidades que formen enlaces por hidrógeno y sustituyentes capaces de participar en interacciones hidrofóbicas que favorezcan la unión al sitio activo. Se construirán modelos de TR y GR y se emplearán en estudios de dinámica molecular de su interacción con estas mismas moléculas con el objeto de inferir probables determinantes estructurales de su afinidad, selectividad y carácter de sustratos o inhibidores. Sobre la base de estos resultados se propondrán nuevos compuestos que serán sometidos a análisis teóricos semejantes, sintetizados y ensayados. Los compuestos promisorios serán ensayados frente a *Trypanosoma* y *Leishmania*, *in vitro* e *in vivo*, en laboratorios de colaboradores en Chile y el extranjero. Este ciclo heurístico se repetirá de manera indefinida, dependiendo de los resultados que se obtengan y del interés continuado por el problema.

En esta línea de investigación colaboran, entre otros, los Dres Ramiro Araya, Claudio Olea y Arturo Squella (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas), Antonio Morello (Facultad de Ciencias Médicas) y Silvia Sepúlveda (USACH).

Selectividad por receptores acoplados a proteínas G en derivados de aporfinas

Las catecolaminas (dopamina, noradrenalina) y la serotonina están involucradas en una enorme variedad de procesos fisiológicos que van desde el control de la presión arterial y la coagulación de la sangre, el ritmo cardíaco y la constricción bronquial, hasta la liberación de hormonas, el control motor fino, las emociones y la actividad intelectual. La gran mayoría de las acciones de estas aminas biógenas están mediadas por receptores acoplados a proteínas G (RAPG), miembros de una superfamilia de bastante más de 100 proteínas receptoras que muestran una considerable homología de secuencia en torno a sus sitios activos putativos. Aunque no se conocen las estructuras tridimensionales de los RAPG debido a que ninguna de estas proteínas de membrana ha sido cristalizada, generalmente se da por sentado que poseen siete dominios α -helicoidales en una disposición que se asemeja a la de la bacteriorrodopsina, que ha sido estudiada por difracción de electrones, un supuesto que ha recibido alguna confirmación de un estudio de baja resolución de la rodopsina bovina, que también es un RAPG. Cuando un ligando agonista ingresa a la región entre los dominios transmembranares e interactúa con residuos aminoacídicos adecuados, se cree que induce un cambio conformacional en algunos de estos dominios que conduce a la disociación de la proteína G (con un nucleótido de guanina) y la subsiguiente activación o inhibición de la producción de un "segundo mensajero" que amplifica la señal.

Modelo parcial de un receptor de histamina del tipo H₂, interactuando con uno de sus antagonistas de uso clínico, la ranitidina. Se observan partes de dos de los dominios que se supone que atraviesan la membrana plasmática (hélices 3 y 5), en las cuales se ha representado con mayor detalle los volúmenes de los residuos de aminoácidos (Asp-98, Asp-186 y Thr-190) que estarían involucrados en la interacción con el antagonista, también detallado al mismo nivel.

El aislamiento de genes se ha convertido en una fuerza importante detrás de la caracterización, expresión y cribado de RAPG y la mutagénesis sitio-dirigida ha permitido que se establezca la base estructural de la especificidad de receptores relacionados en un número creciente de casos. Por otra parte, aunque el diseño de ligandos puede en definitiva volverse completamente racional, los procesos iterativos de ensayo, selección, diseño y síntesis seguirán siendo muy importantes. Los ligandos conformacionalmente restringidos, como las aporfina, entregan mucha información relativa a los modos en que interactúan con sus blancos macromoleculares.

La aporfina más antigua conocida, la apomorfina [(*R*)-10,11-dihidroxiaporfina] ha sido reconocida por muchos años como un agonista dopaminérgico y ha servido de punto de partida de extensos estudios de relaciones estructura-actividad asociados con el desarrollo de agentes antiparkinsonianos eficaces (Neumeyer, 1985). En el transcurso de estos estudios se encontró que cierto número de sustancias relacionadas son antagonistas dopaminérgicos, y se ha dicho que algunos poseen propiedades similares a las de los neurolépticos (Zetler, 1988), lo que induce a pensar en cierta potencialidad para el tratamiento de la esquizofrenia. Más recientemente se vio que la introducción de un grupo metilo en el C-10 del esqueleto aporfínico hace desaparecer las propiedades dopaminérgicas, obteniéndose un agonista serotoninérgico (Cannon *et al.*, 1988).

La (*S*)-boldina [(*S*)-2,9-dihidroxi-1,10-dimetoxiaporfina] y la (*R*)-pukateína [(*R*)-11-hidroxi-1,2-metilendioxiaporfina] son dos alcaloides aporfínicos que poseen interesantes propiedades adrenérgicas y dopaminérgicas (Neumeyer, 1985; Madrero *et al.*, 1996; Asencio *et al.*, resultados no publicados). La boldina, por lo menos, parecería ser en general bastante poco selectiva, pero muestra una selectividad interesante entre los subtipos α 1A- y α 1B de receptores adrenérgicos (Madrero *et al.*, 1996) que aumenta con la halogenación del anillo A (Ivorra *et al.*, resultados no publicados). Nos proponemos usar estos productos naturales abundantes como materiales de partida para la síntesis de análogos con configuraciones opuestas, que lleven diferentes patrones de sustitución en sus esqueletos tetracíclicos, explorar los efectos de estos cambios estructurales en su selectividad por diferentes subtipos de receptores, ante todo mediante estudios de unión que se efectuarán, en parte, en nuestro laboratorio y, en parte, por equipos que trabajen en colaboración. Se construirán modelos moleculares de diversos subtipos de receptores clonados adrenérgicos, dopaminérgicos y serotoninérgicos, y se efectuarán estudios de interacción con el objeto de inferir los posibles modos de unión de estas sustancias. También se utilizaría el análisis comparativo del campo molecular (Comparative Molecular Field Analysis), en combinación con estudios químico-cuánticos más detallados, para examinar semejanzas y diferencias. Los resultados de estos estudios serán retroalimentados en el ciclo de diseño-síntesis-evaluación para confirmar y afinar conclusiones, con el fin de descubrir

herramientas farmaco-lógicas útiles y posibles cabezas de serie para el desarrollo de fármacos.

Esta línea de investigación cuenta con el importante apoyo farmacológico de los grupos encabezados por los Dres Philippe Protais (Universidad de Rouen, Francia) y Pilar D'Ocon (Universidad de Valencia, España).

Referencias

S. Bailey, K. Smith, A.H. Fairlamb y W.N. Hunter
Eur. J. Biochem, 213, 67-75, (1993)

J.G. Cannon, P. Mohan, J. Bojarski, J.P. Long, R.K. Bhatnagar, P.A. Leonard, J.R. Flynn y T.K. Chatterjje
J. Med. Chem, 31, 313-318 (1988)

G.B. Henderson, P. Ulrich, A.H. Fairlamb, I. Rosenberg, M. Pereira, M. Sela y A. Cerami *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5374-5378, (1988)

W.N. Hunter, K. Smith, Z. Derewenda, S.J. Harrop, J. Habash, M.S. Islam, J.R. Helliwell y A.H. Fairlamb
J. Mol. Biol., 216, 235-237, (1990)

P.A. Karplus y G.E. Schulz
Mol. Biol., 210, 163-180, (1989)

R.L. Krauth-Siegel, C. Sticherling, I. Jöst, C.T. Walsh, E.F. Pai, W. Kabsch y C.B. Lantwin *FEBS Lett.*, 317, 105-108, (1993)

Kuriyan, X.P. Long, T.S.R. Krishna, R.M. Sweet, N.J. Murgolo, H. Field, A. Cerami y G.B. Henderson

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 8764-8768, (1991)

Madrero, M. Elorriaga, S. Martínez, B.K. Cassels, P. D'Ocon y M.D. Ivorra

Brit. J. Pharmacol., 119, 1563-1568, (1996)

Morello, M. Pavani, J.A. Garbarino, M.C. Chamy, C. Frey, J. Mancilla, A. Guerrero, Y. Repetto y J. Ferreira

Comp. Biochem. Physiol., (1995)

J.D. Neumeyer

En: The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids

J.D. Phillipson, M.F. Roberts y M.H. Zenk (Eds.)

Springer-Verlag, Berlín, (1985)

Tapia, M. Paulino y F. Stamato

Mol. Engn. 3, 377-414, (1994)

Zetler

Arch. Int., Pharmacodyn. Thér., 296, 255-281, (1988)

Zhang, S. Bailey, J.H. Naismith, C.S. Bond, J. Habash, P. McLaughlin, M.Z. Papiz, A. Borges, M. Cunningham, A.H. Fairlamb y W.N. Hunter

J. Mol. Biol. 233, 1217-1220, (1993)

Facilitado por la Universidad de Chile

Súmesese como **voluntario** o **donante** , para promover el crecimiento y la difusión de la **Biblioteca Virtual Universal**.

Si se advierte algún tipo de error, o desea realizar alguna sugerencia le solicitamos visite el siguiente **enlace**.



editorial del cardo