



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO COMPUTACIONAL DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Guillermo David Goode Romero

Dra. Laura Domínguez Dueñas
Facultad de Química

Dra. Ana María Martínez Vázquez
Instituto de Investigaciones en Materiales
Dr. Martín González Andrade
Facultad de Medicina

Ciudad de México. Febrero, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción 1, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado Estudio computacional de proteínas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer que presenté para obtener el grado de Doctorado es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente



Guillermo David Goode Romero
303275596

(Nombre, firma y Número de cuenta de la persona alumna)

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PRESIDENTE

Dr. Ramón Garduño Juárez
INSTITUTO DE CIENCIAS FÍSICAS

VOCAL

Dr. José Luis Medina Franco
FACULTAD DE QUÍMICA

SECRETARIO

Dra. Lilian González Segura
FACULTAD DE QUÍMICA

VOCAL

Dr. Enrique García Hernández
INSTITUTO DE QUÍMICA

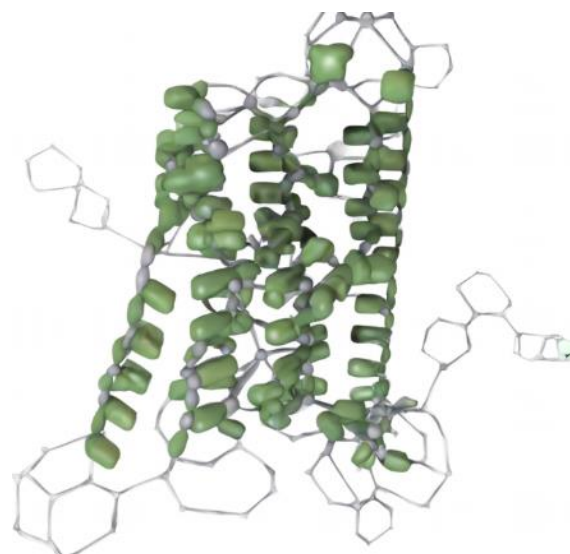
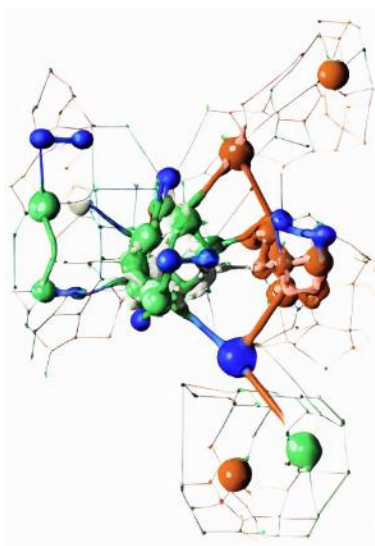
VOCAL

Dra. Laura Domínguez Dueñas
FACULTAD DE QUÍMICA

ASESORA

cDr. Guillermo David Goode Romero

SUSTENTANTE



Imágenes creadas con dreamstudio

INSTITUCIONALES

Agradezco a la Facultad de Química, a la Universidad Nacional Autónoma de México, y a la Dirección General de Tecnologías de la Información (LANCAD-UNAM-DGTIC-306), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (857743).

PERSONALES

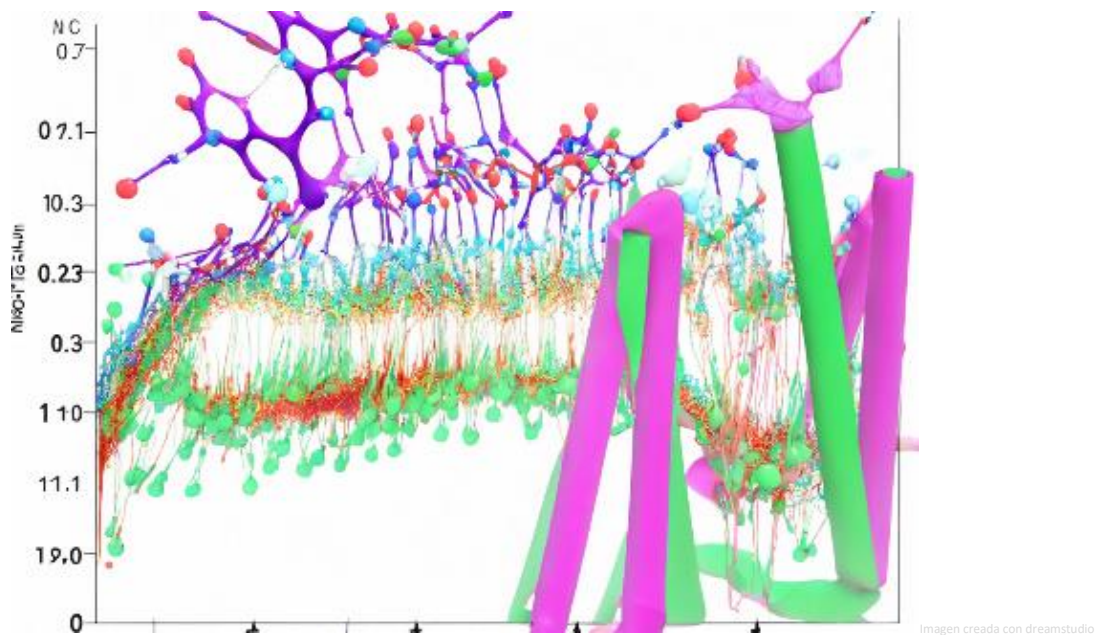
Agradezco a mi padre, Guillermo Goode Medina, y a mi madre, Graciela Romero Álvarez, que me han apoyado en todo.

A la Dra. Laura Domínguez Dueñas, a los miembros del comité tutor, Dra. Ana María Martínez Vázquez y Dr. Martín González Andrade, y a los compañeros, excompañeros y colegas del grupo Sim-Q:

Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz,
M. en C. Arsenio Natahel Cruz Cardoso,
M. en C. Humberto Flores Trujillo,
Q. Víctor Hugo Calvo Jiménez,
M. en C. José María Montes Montiel,
M. en C. Guillermo Leuman Rodríguez Segura,
M. en C. José Elías Legorreta Castillo,
Dr. Hugo Salazar Lozas.

Dr. José Luis Velasco Bolom,
Dra. Itzel Pérez Trejo,
Q.F.B. Alejandro Álvarez Hernández
Dr. Andrés Felipe Marmolejo Valencia,
M. en C. Sebastián Mauricio Fuentes Ordoñez,
Dr. César Iván León Pimentel,
Dr. Jorge Antonio Amador Balderas

De manera especial al Q.F.B. Esdras Enrique Juárez Palacios, y a mis amigos Minerva, Diana, Fernando y Adrián.



RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	8
2.2. FISIOPATOLOGÍA EN EL SISTEMA NERVIOSO	9
Otros factores implicados en la EA	9
2.2.1. Neuroglías	9
Astrocitos	10
Oligodendrocitos y glías NG-2	10
Microglías	10
2.2.2. Neuroinflamación	11
2.3. PROTEÍNAS RESPONSIVAS E IMPLICADAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA EA	12
Receptores acoplados a proteínas G	12
2.3.1. Enfoques antineuroinflamatorios y neuromoduladores	15
Sobre el receptor 5 de β -quimiocinas o CC (CCR5)	15
Sobre el receptor delta opioide (DOR)	18
Sobre el receptor 1 muscarínico de acetilcolina	22
3. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS GPCRs	27
3.1. JUSTIFICACIÓN	28
3.2. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
4.1. OBJETIVO GENERAL	29
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	29
5. RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN Y CONFIGURACIONES INICIALES	30
5.1. RECEPTOR CCR5	30
5.2. RECEPTOR δ	30
5.3. RECEPTOR M_1	31
5.4. METODOLOGÍA	32
6. INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS RECEPTORES CCR5, δ Y M_1	34
6.1. CAPÍTULO 1. ESTUDIO COMPUTACIONAL DEL COLECTIVO ESTRUCTURAL DEL RECEPTOR CCR5 Y SUS INTERACCIONES CON DIFERENTES LIGANDOS	35
6.1.1. ANEXO DEL CAPÍTULO 1.	43
6.2. CAPÍTULO 2. FARMACOLOGÍA DEL RECEPTOR δ (DOR): UN ESTUDIO COMPUTACIONAL	57
6.2.1. ANEXO DEL CAPÍTULO 2.	71
6.3. CAPÍTULO 3. DIFERENCIAS ENTRE LOS COLECTIVOS CONFORMACIONALES DEL RECEPTOR MUSCARÍNICO 1 (M_1) EN COMPLEJO CON DIFERENTES LIGANDOS	92
6.3.1. ANEXO DEL CAPÍTULO 3.	104
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	107
8. APÉNDICE 1: HIPÓTESIS ETIOLÓGICAS	110
8.1. PROTEINOPATÍAS Y ESTADO AMILOIDE: HIPÓTESIS AMILOIDOGENICA	110
8.2. DISFUNCIÓN NICOTÍNICA CENTRAL: HIPÓTESIS COLINÉRGICA	110
8.3. EVIDENCIAS DE LA HIPÓTESIS "NEUROINMUNOMICROENDÓCRINA"	111
8.4. TIPOS DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	111
9. APÉNDICE 2: GENERALIDADES DE DINÁMICA MOLECULAR CLÁSICA (MD)	113
9.1. MUESTREO ACELERADO GAUSSIANO (GAMD)	114
10. APÉNDICE 3: PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PROYECTO DE DOCTORADO	115
Goode-Romero, G. and Dominguez L. Computational study of the structural ensemble of CC chemokine receptor type 5 (CCR5) and its interactions with different ligands. <i>PLoS ONE</i> 17,10 (2022):e0275269.	115
Goode-Romero, G. and Dominguez L. Computational study of the conformational ensemble of CX3CR1 chemokine receptor 1 (CX3CR1) and its interactions with antagonist and agonist ligands. <i>J. Mol. Graph. Mod.</i> 117 (2022):108278.	126
Goode-Romero, G. et al. New information of dopaminergic agents based on quantum chemistry calculations. <i>Sci. Rep.</i> 10,1 (2020):21581.	137
Goode-Romero, G. et al. Analyzing the interaction energy between dopaminergic agents and DRD2: Is there any difference between risperidone (antagonist), aripiprazole (partial agonist) and pramipexole (agonist)? <i>Comp. Theo. Chem.</i> 1197 (2021):113125.	149
Goode-Romero, G. et al. Electron Donor-Acceptor Properties of Different Muscarinic Ligands: On the Road to Control Schizophrenia. <i>J. Chem. Inf. Model.</i> 61,10 (2021): 5117-5124.	155
11. REFERENCIAS	163

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que constituye un problema de salud pública, y que aumentará de manera importante en las siguientes décadas. En este trabajo se exploran tres blancos farmacológicos de interés por su papel modulador en la EA: el receptor CCR5, el receptor δ (DOR) y el receptor M_1 (mAChR1). Estos receptores, miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) desempeñan funciones tanto en individuos sanos como en neuroinflamación y cognición, que se encuentran desreguladas en la EA. Estos receptores se estudiaron computacionalmente en modelos membranales con simulación de dinámica molecular (MD) clásica, en una variedad de complejos con ligandos que poseen distintas actividades funcionales experimentales descritas, tales que inducen a los receptores hacia estados funcionales específicos, los cuales a nivel experimental han demostrado respuestas diferenciales. Los estados funcionales, rastreados a partir de los colectivos conformacionales, se pueden inferir a partir de la integración de múltiples características e información obtenida del estudio de los sistemas. Estos estados funcionales incluyen el estado activo, donde son capaces de señalizar, los estados de (in)activación incompleta, en tránsito y sesgada, donde la señalización es variable, los estados estativos, que se caracterizan por la ausencia de respuesta, así como los estados inactivos, que se distinguen por la disminución de la actividad basal del propio receptor, cuando la presenta. De esta manera, en este trabajo relacionamos y caracterizamos los efectos conformacionales de grupos de ligandos de los tres receptores, con sus actividades farmacológicas conocidas.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a worldwide-distributed, neurodegenerative disease that becomes a public health problem, and it will increase in the next years. In this work, we explore three pharmacological targets that are potentially relevant for its role in AD; CCR5, δ (DOR), and M_1 (mAChR1) receptors, that are members of the Superfamily of G Protein-Coupled Receptors (GPCR). These receptors participate in physiological and physiopathological processes of neuroinflammation and cognition, dysregulated in AD. We studied the receptors computationally, with classical molecular dynamics (MD) simulations, in a variety of protein-ligand complexes, that are described experimentally, and induce specific functional states, that act distinctively. The functional states, that are deduced from the conformational ensembles, from multiple features and parameters. Those functional states include the active state, able to initiate signalization, the incomplete, partial or biased activation/inactivation, with a wide range of responses, the stative states, that are unable to signal, and the inactive states, that are characterized by the absence of basal activity, when it is present. Thus, in this work we established relations and characterize the conformational effects of groups of ligands of the three receptors, knowing their given pharmacological activities.

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y ESTUDIO COMPUTACIONAL DE PROTEÍNAS

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que constituye un problema de salud pública, y que aumentará en las siguientes décadas. Los tratamientos se limitan a paliar algunos síntomas, y no se ha logrado ralentizar o detener el avance de la enfermedad de manera significativa. Múltiples causas han sido implicadas en la génesis de la EA, y en conjunto se considera un reto muy grande tanto para los familiares, los profesionales sanitarios, las sociedad, así como para los mismos pacientes, que van experimentando los síntomas paulatinamente y ven minada su calidad de vida, ya que los tratamientos paliativos de la EA sólo aminoran los síntomas en las etapas tempranas de la enfermedad.

Ante estos hechos y el conocimiento fisiopatológico de la EA, los abordajes para su tratamiento en las etapas subclínicas o asintomáticas han tomado impulso, toda vez que los cambios distintivos de la enfermedad son irreversibles. Dentro de los múltiples enfoques no causales, la modulación de los sistemas más afectados en la EA al inicio de la enfermedad es de gran interés para alterar o ralentizar su desarrollo fisiopatológico. Los hechos más sobresalientes en la EA incluyen los eventos neuroinflamatorios y las perturbaciones en los sistemas de recompensa y de consolidación de la memoria.

Entre las proteínas involucradas en los eventos neuroinflamatorios, el receptor 5 de β -quimiocinas, CCR5, es una proteína de membrana expresada ampliamente en las microglías, células con funciones inmunológicas y homeostáticas en el sistema nervioso central (SNC); así como el reconocimiento y las acciones efectoras ante las lesiones características de esta patología. El receptor δ opioide y el receptor muscarínico 1 de acetilcolina (M_1) son proteínas de la misma superfamilia, conocida como receptores acoplados a proteínas G (GPCR por su acrónimo en inglés), son representantes de dos sistemas de neurotransmisión y neuromodulación que presentan severas disregulaciones en la EA, y que cuentan con evidencias *in vivo* de disminuir los síntomas de la EA.

Dado que los enfoques computacionales han demostrado ser bastante precisos para el estudio de proteínas y sus interacciones con otras proteínas, ligandos, membranas y un entorno modelado en acuerdo con las condiciones fisiológicas, estos constituyen una valiosa herramienta para caracterizar y tipificar los colectivos conformacionales y de interacciones de las proteínas de interés, que cuentan con reproducibilidad, y carecen de la enorme complejidad intrínseca del estudio de una sola proteína de manera experimental.

En este trabajo planteamos el estudio computacional de los receptores CCR5, δ y M_1 basado en simulaciones de dinámica molecular atomística, en variedad de condiciones, y basado en la información experimental sobre ellos. Los hallazgos más importantes de este estudio constituyen el cuerpo principal para la realización de las respectivas publicaciones en revistas indizadas de alcance internacional.

2. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, multifactorial, multisistémica y de larga evolución que cursa con deterioro progresivo de las funciones cognitivas superiores como la memoria, atención, juicio y conciencia. Clínicamente, la EA se manifiesta por amnesia, afasia y apraxia, y sus características fisiopatológicas distintivas son la deposición de placas seniles, formación de ovillos neurofibrilares, inestabilidad microtubular y neuroinflamación crónica [1–6]. Las estimaciones globales sitúan a la EA como la causa principal de demencia en personas mayores a nivel mundial con una afectación estimada de más de 152 millones de personas para el año 2050 [7]. Los tratamientos hasta el año 2020 son limitados y se reducen a efectos paliativos antidemenciales, antipsicóticos, timomoduladores y somnorreguladores. La búsqueda de tratamientos más efectivos contra la EA se centra en el estudio multidisciplinario de los mecanismos patológicos subyacentes de esta enfermedad con el objetivo de mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados.

La EA se presenta en al menos una de dos modalidades marcadamente distintas, pero con sintomatología común. La EA de inicio temprano es la forma que puede presentarse antes de los 40 años de edad y está determinada por mutaciones bien identificadas en las proteínas que participan en la formación de las placas seniles. Esta modalidad de la enfermedad representa alrededor del 1% de los casos y suele tener una progresión rápida. Por otro lado, la EA de inicio tardío corresponde con la mayor parte de los casos, es de origen esporádico y su fisiopatología afecta a múltiples sistemas [8,9]. Se han descrito factores neurológicos, inmunológicos [10–14], microbiológicos [15], toxicológicos [16,17] y conductuales [18].

La EA se manifiesta predominantemente en el encéfalo, parte constituyente del sistema nervioso central (SNC) y que incluye los hemisferios cerebrales, el cerebelo y el tallo cerebral. La degeneración neuronal en la EA de inicio tardío comienza en una zona específica del encéfalo, la corteza entorrinal, de localización superior al bulbo olfatorio y adyacente al hipocampo, y donde residen las neuronas de rejilla, implicadas en la orientación espacial [19,20]. Su afectación por las características distintivas de la EA es el primer signo asintomático, o casi imperceptible por los pacientes y se manifiesta con deterioro del sentido del olfato y alteraciones en la orientación y los mecanismos de la memoria espacial y el reforzamiento de la memoria durante el sueño [21].

Esta zona anatómica del encéfalo donde inicia la degeneración es conocida como telencéfalo, y expresa de manera abundante receptores de acetilcolina (ACh), opioides, dopamina (DA), GABA y de otros neurotransmisores [22–24]. En la necropsia macroscópica quedan de manifiesto los hallazgos de atrofia cortical extensa y crecimiento de los ventrículos, y microscópicamente se observan las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (**Figura 1**).

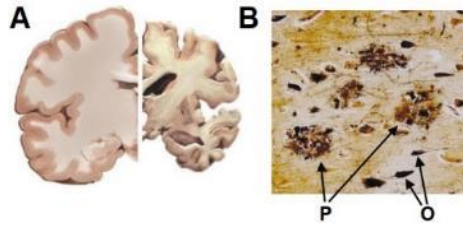


Figura 1. Marcadores de la EA. (A) Representación esquemática de un corte coronal de encéfalo de un individuo sano (izquierda) y un paciente con EA (derecha). (B) Hallazgos en espécimen de necropsia. P: placas seniles. O: Ovillos neurofibrilares. (Modificado de *National Institute on Aging, National Institutes of Health*).

2.2. FISIOPATOLOGÍA EN EL SISTEMA NERVIOSO

Las lesiones de la EA se originan de manera primaria por la actividad y los efectos de dos proteínas, la proteína precursora amiloide (APP por su acrónimo en inglés) y la proteína tau asociada a microtúbulos (MAPT) [25,26]. Las funciones homeostáticas de APP incluyen actividad de receptor, múltiples interacciones tipo integrina, coordinación de iones de cobre y modulación de la señalización intra y extracelular [27,28]. Asimismo, los productos catabólicos de APP participan en la regulación de numerosos receptores e integrinas, como son los receptores canal nicotínicos de acetilcolina, receptores de glutamato AMPAR, KAR, NMDAR; y de GABA GABA_A [29]. Las isoformas de estos productos catabólicos se conocen como péptidos beta amiloides (A β), y su longitud varía de 36 a 42 residuos de aminoácidos. Los péptidos A β 42 poseen la particularidad de formar agregados extracelulares, teniendo los oligómeros actividad neurotóxica [30] y los multímeros la formación irreversible de depósitos amiloides abundantes en láminas beta que actúan como estructuras de nucleación para otras proteínas [31,32]. En estos depósitos de oligómeros y fibras amiloides se concentran también otras proteínas, iones metálicos, productos finales de glicación avanzada (AGEs), ferritina, entre otros [33–38].

Otros factores implicados en la EA

Otras entidades que están involucrados en la EA son el receptor 1 de quimiocina CX3C (CX3CR1) expresado en microglías [8,39–41], la interacción de los nAChRs con A β 42 y las cinasas intracelulares Fyn y Lyn [42], el receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) en microglías [12], las α -secretasas ADAM10, ADAM17 y la enzima amiloidolítica neprilisina, las enzimas transmembranales BACE1 y γ -secretasa [43], la apoproteína E (APOE) constituyente de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) [44], así como la composición de las membranas plasmáticas [45,46], la hipercolesterolemia, la hiperglucemia y la depresión.

2.2.1. Neuroglías

Las células gliales, que inicialmente eran concebidas únicamente como células de soporte o “pegamento”, constituyen un grupo de células indispensables en la homeostasis del sistema nervioso [47]. Los astrocitos, los oligodendrocitos, las glías NG-2 y las microglías son las neuroglías en el SNC [48] (**Figura 2**).

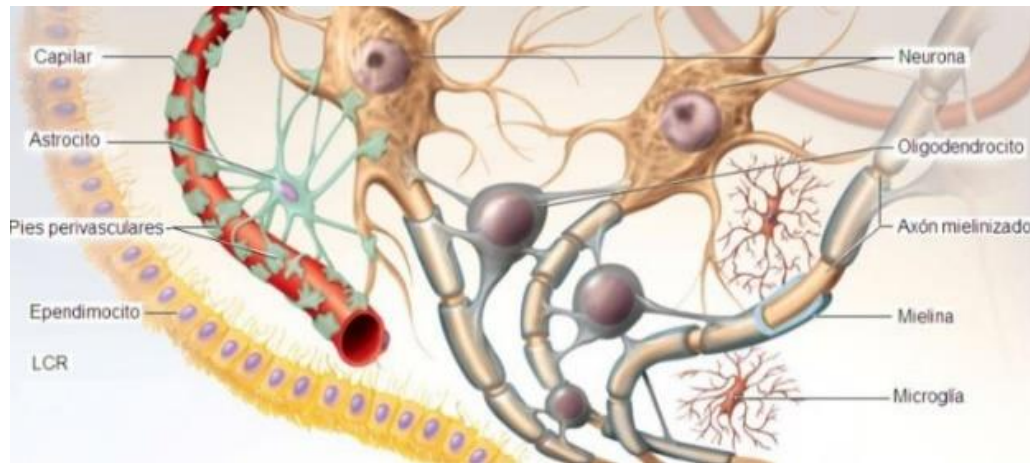


Figura 2. Interacciones de las neuronas con astrocitos, oligodendrocitos y microglías. Los endimocitos son las células epiteliales de los sistemas ventriculares (Modificado de McGraw-Hil Companies, Inc.).

Astrocitos

Los astrocitos son células de origen neural, que desempeñan funciones importantes como la provisión, remoción y recaptura de nutrientes, excretas y metabolitos neuronales respectivamente. Funcionan como comunicación entre la barrera hematoencefálica interactuando con los pericitos y la membrana basal de la vasculatura, así como con las neuronas. Disfunciones en los astrocitos participan en diversas patologías neuropsiquiátricas.

Oligodendrocitos y glías NG-2

Los oligodendrocitos y las células NG-2, que son sus precursoras, se consideran una población glial independiente debido a sus características morfofuncionales. Las células NG-2 son parte importante en el mantenimiento de los oligodendrocitos que forman las vainas de mielina en los axones neuronales [49,50]. Las glías NG-2 también son capaces de participar en sinapsis neuronales.

Microglías

Las microglías o células microgliales son las neuroglías de origen hematopoyético, derivadas de progenitoras. Durante el desarrollo embrionario las microglías se infiltran en el tejido neural donde residirán de manera permanente, y durante el período posnatal son esenciales en el proceso de maduración neuronal [51,52]. Posterior a la migración al SNC, se distinguen morfológicamente pasando de una forma ameboidea funcionalmente activa a una ramificada interactiva, y que se transforma cuando son expuestas a determinados estímulos. Las microglías de morfología ramificada presentan períodos intermitentes de motilidad y quiescencia. Los estímulos que desencadenan la funcionalidad inmunológica son los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y a patógenos (PAMPs), los cuales funcionan como ligandos agonistas de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), expresados distintivamente en todo el sistema inmunológico.

Las microglías estimuladas de esta manera experimentan una rápida activación dirigiendo su motilidad al sitio del insulto, desplazándose en dirección del gradiente de concentración del patrón cuando éste es soluble, al desarrollar una multipolaridad en la membrana plasmática centrada donde se localizan los PRRs activados; fenómeno conocido como quimiotaxia. De esta manera direccional las microglías también detectan otros componentes del microentorno como son determinadas proteínas de comunicación celular o citocinas, como las interleucinas proinflamatorias y las citocinas quimiotácticas o quimiocinas, que tienen como función destacada la inducción de la quimiotaxia. Las microglías activadas liberan al entorno numerosos factores neurotróficos y citocinas capaces de modificar la homeostasis celular. Asimismo, expresan una amplia variedad de receptores y moléculas de señalización como respuestas a la actividad fisiológica o fisiopatológica neuronal, como el receptor canal de glutamato AMPAR, receptores purinérgicos P2R, receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) TNFR1/CD120a, receptor del mediador inflamatorio interleucina 1 (IL-1R), complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II) implicado en el reconocimiento ante la presentación de antígenos, y receptores de quimiocinas. Adicionalmente son capaces de producir factor de crecimiento nervioso NGF, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y neurotrofina, proteínas con actividades neuroprotectoras y de supervivencia neuronal [48,53–57].

2.2.2. Neuroinflamación

En términos generales, la inflamación consiste en la respuesta integral y defensiva de un grupo celular ante un daño, y dependiendo del transcurso temporal puede ser aguda o crónica. En la inflamación aguda se presenta una reacción inmediata ante un agente agresor, sea éste de naturaleza exógena o endógena, y consiste básicamente en una respuesta ofensiva seguida por el restablecimiento de la homeostasis local en un proceso de recuperación y regeneración. En cambio, la inflamación crónica se presenta cuando el estímulo nocivo es persistente, ya sea por su permanencia o su reincidencia. Fuera del SNC, la inflamación periférica se manifiesta principalmente por infiltrados leucocitarios y la producción de agentes de señalización y regulación. Las células de núcleos segmentados y polimórficos o polimorfonucleares, de las cuales los neutrófilos son las más abundantes, son reclutadas mediante diversos mecanismos al sitio de daño en eventos agudos y las células mononucleares como macrófagos, linfocitos y células plasmáticas componen la respuesta inflamatoria celular y humoral crónica [58].

La inflamación en el SNC, conocida como neuroinflamación, difiere notablemente de la inflamación periférica dominada por los linajes linfoides y mieloides. Los eventos relacionados con la neuroinflamación están reconocidos como factores determinantes en el desarrollo y evolución de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA. De manera análoga a la periferia, en el SNC la inflamación puede ser aguda o crónica. La inflamación aguda, asociada previamente a la llamada gliosis reactiva, se presenta en eventos traumáticos, isquémicos o infecciosos como son lesiones, eventos cerebrovasculares y meningitis o encefalitis. La inflamación crónica en el SNC, en cambio, tiene características diferenciales con su contraparte periférica. Las microglías desempeñan

un papel primario en este tipo de reacción, realizando las funciones de reconocimiento y presentación antigénica, modulación de la inflamación, reclutamiento de células periféricas, inducción de apoptosis, aumento de la supervivencia neuronal, etc.; y se caracteriza por el daño y una posible muerte neuronal progresiva.

Las diversas hipótesis etiológicas de la EA se detallan en la Sección 8.

2.3. PROTEÍNAS RESPONSIVAS E IMPLICADAS EN LOS PROCESOS FISIOLÓGICOS Y FISIOPATOLÓGICOS DE LA EA

Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son proteínas politépicas de siete hélices transmembranales (TM1 a TM7) y una octava hélice yuxtamembranal (YXT) conectadas por tres asas intracelulares y extracelulares alternadas (**Figura 3**). Los GPCRs constituyen una de las superfamilias de proteínas más numerosa en el genoma humano, y alrededor del 30 a 40% de los blancos farmacológicos terapéuticos [59]. Estos receptores membranales poseen estados funcionales inherentes a su geometría, ya que responden al microentorno en el que se expresan a través de cambios conformacionales e interactúan dependientemente de estos con las proteínas G en la cara intracelular de la membrana. Las proteínas G son heterotrímeros $G\alpha\beta\gamma$, donde la subunidad $G\alpha$ posee actividad de GTPasa y que comparte con el heterodímero $G\beta\gamma$ la capacidad de iniciar la señalización intracelular [60–62].

La superfamilia incluye receptores para péptidos, proteínas, aminas, ácidos carboxílicos, nucleótidos, entre otros. La clase A de GPCRs, denominada grupo de la rodopsina por su homología, incluye receptores para quimiocinas (CCR5 y CX3CR1), para los neurotransmisores encefalinas (DOR), acetilcolina (M_1) y otros (**Tabla 1**) [63,64].

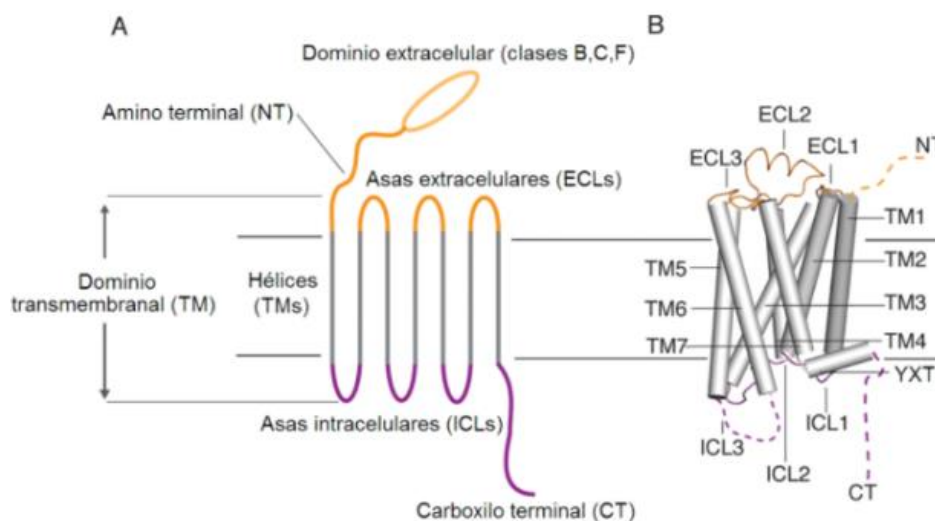


Figura 3. Arquitectura de un GPCR. (A) Estructura general de los GPCRs. (B) Configuración general de estas regiones.

Tabla 1. Receptores de interés en la superfamilia de GPCRs, por su importancia en la EA.

Clase	Prototipo	Tipo	Subtipo	Receptor	Ligandos ¹
A	Rodopsina	Péptidos	β -Quimiocinas	CCR5	CCL5, RANTES, otras quimiocinas, MRV, C21, C34, ANC, INCB9471, E913, APV, TAK220, AZD5672, TAK779, CNV, ESN196, CMPA, CMPB
			Opioide	DOR	ENKL/M, DLTR, MRP, NLR, NLX, BPNF, NLT, DIPPNH ₂ , DPI287, KGCHM07, TIPP ψ , SYK657
		Aminérgicos	Muscarínicos	mAChR1	ACh, IPX, ARE, MTX7, HYA, TTP

1. Acrónimos de ligandos. CCL5: Ligando 5 del receptor de β -Quimiocina (CC); RANTES: *Regulated upon Activation of Normal T-cell, Expressed and Secreted*; MRV: maraviroc; C21: compuesto 21; C34: compuesto 34; ANC: ancriviroc; APV: aplaviroc; CNV: cenicriviroc; CMPA: compuesto A, CMPB: compuesto B. ENKL/M: encefalina Leu y encefalina Met; DLTR: deltorfinas A; I y II; MRP: morfina; NLR: nalorfina; NLX: naloxona; BPNF: buprenorfina; NLT: naltrindol. ACh: Acetilcolina; IPX: iperoxo; ARE: arecolina; MTX7, toxina muscarínica 7; HSC, (-)-hioscina (escopolamina); TTP, tiotropio.

Los estados funcionales de los GPCRs fueron clasificados inicialmente como estados activo o inactivo dependiendo solamente de la propagación de la señalización intracelular, donde los ligandos capaces de activar o desactivar a un receptor se conocen como agonistas o antagonistas del ligando endógeno respectivamente. Cuando un GPCR se encuentra unido a un ligando se denomina complejo y se denota como RL, mientras que cuando no lo forma se denomina aporreceptor y se denota como R. En ausencia de ligandos, algunos GPCRs son capaces de señalizar de manera espontánea e infrecuente, fenómeno conocido como actividad constitutiva. Los estudios funcionales y estructurales de los GPCRs (entre los que se encuentran los ensayos funcionales con el análogo GTP γ ³⁵S y los ensayos con fluorescencia FRET: *Förster Resonance Energy Transfer*), han permitido una descripción más detallada de su naturaleza [65,66], y en la actualidad se reconocen varios estados funcionales que están definidos principalmente por su configuración espacial interna y la cardinalidad del protómero, así como la elucidación de mecanismos más allá de la dualidad de activo-inactivo y agonista-antagonista (**Tabla 2** y **Figura 4**). Los estados funcionales descritos y los ligandos que los inducen son [67,68]:

Estado basal o pasivo. Es el colectivo de confórmers que posee un receptor en ausencia de ligandos y de señalización.

Estado transitivo 1 (de “tránsito”, para distinguirlo de un estado de transición). Es el colectivo de confórmers que caracterizan la transición de un aporreceptor o complejo agonista-receptor que comienza a activarse mediante cambios conformacionales.

Estado partitivo (de “parte”). Es el colectivo de conformaciones de un GPCR en un estado parcialmente activo.

Estado activo. Es el colectivo de conformaciones de un GPCR capaz de señalizar y que es inducido por ligandos agonistas o por actividad constitutiva. Este estado funcional puede ser total o parcial para cada GPCR, en cuyo caso sus ligandos inductores se denominan agonistas totales o agonistas parciales respectivamente.

Estado transitivo -1. Es el colectivo de conformeros que caracterizan la transición de un receptor activo que ha propagado la información de señalización, y que se conduce hacia una desactivación. Este cambio suele ocasionar que el receptor y el ligando pierdan afinidad entre sí, o que el complejo sea internalizado en la célula.

Estado estativo (de “estático”, para distinguirlo de un estado inactivo). Es el grupo conformacional de un aporreceptor o receptor en complejo con un antagonista, que no es capaz de señalizar ni de activarse, y que posee actividad constitutiva. Cuando está formando un complejo antagonista-receptor, también se dice que el receptor está bloqueado.

Estado inactivo. Es el conjunto conformacional de un aporreceptor o receptor en complejo con un antagonista si el GPCR carece de actividad constitutiva, o un ligando agonista inverso si la posee. Los receptores con actividad constitutiva en este estado funcional anulan la totalidad de su capacidad de señalización.

Estado altivo o *high*. Es el estado conformacional adoptado por los GPCRs cuando la actividad termodinámica del ligando agonista es muy alta en el microentorno, y es más propenso a activarse.

Estado desactivado. Es el conjunto conformacional de un aporreceptor o receptor en complejo con un ligando que frecuentemente experimenta modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones o isopeptidación con ubiquitina o SUMO. Los estados desactivados sólo señalizan a través de vías de inactivación, remodelación del citoesqueleto para internalización, o degradación.

Tabla 2. Estados funcionales de los GPCRs de clase A y sus ligandos inductores.

Estado funcional	Símbolo	Ligando inductor	Señalización
Basal o pasivo	R ⁰	-	Ausente
Transitivo 1	R [‡]	Agonista total o parcial	No específica
Partitivo	R ^½	Agonista parcial	Activación de proteína G, vías no canónicas (activación sesgada o diferencial)
Activo	R [*]	Agonista total o parcial	Activación de proteína G, vías no canónicas (activación sesgada o diferencial)
Transitivo -1	R [‡]	Agonista total, parcial o inverso	Vías no canónicas, internalización
Estativo	R ⁰	Antagonista	Internalización o no específica
Inactivo	R ⁻¹	Antagonista o agonista inverso	Internalización o no específica
Altivo (<i>high</i>)	R ^{high}	Alta actividad termodinámica de agonistas	Activación facilitada de proteína G, vías favorecidas no canónicas
Desactivado	R ^P	-	Internalización y degradación

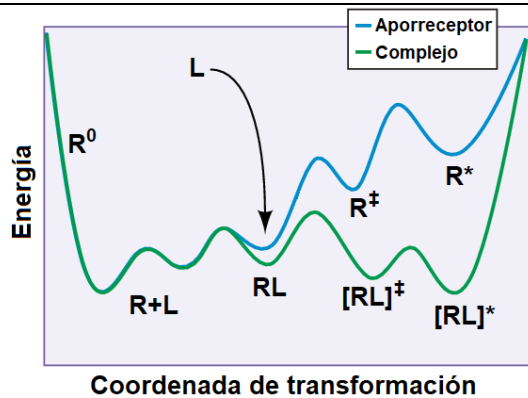


Figura 4. Perfil energético de la activación de un GPCR. La amplitud depende de la naturaleza del ligando, el entorno del receptor y sus interacciones. El acoplamiento con las proteínas G aumenta la profundidad del mínimo del complejo activo en el perfil, y la señalización por parte de ésta favorece la disociación del ligando y la desactivación del receptor (Modificado de Deupi X. y Kobilka B. K. en *Physiology (Bethesda)*. **2010**, 25, 5, 293-303) [69].

Varios tipos de GPCRs son funcionales como oligómeros, pudiendo ser homooligómeros o heterooligómeros. Algunos homodímeros y heterodímeros descritos de GPCRs poseen una funcionalidad unitaria, es decir, el dímero señala de una manera distinta a como lo hacen los monómeros [70]. Dímeros del receptor DOR como $\delta\delta$, $\delta\mu$ y $\delta\kappa$ han demostrado un impacto fisiológico distinto en efectos como eficacia y dependencia de opioides, modulación de la respuesta antidepresiva y convulsiva de los agonistas en DOR, analgesia con abstinencia y disforia disminuidas, entre otros [71–73]. Asimismo, el desarrollo de ligandos bivalentes consistentes en dos ligandos opioides bien descritos, unidos covalentemente por una estructura neutral enlazante, han demostrado la modulación de las especies no monoméricas de receptores opioides [74,75]. Adicionalmente, evidencias con experimentos como el ensayo de ligación por proximidad (PLA, consistente en la unión de dos oligonucleótidos conjugados a anticuerpos), transferencia de energía de resonancia de Förster [76] (FRET, donde un fluoróforo absorbe la fluorescencia emitida por otro cercano) y la inmunoprecipitación sustentan la existencia de GPCRs oligoméricos funcionales. Estas unidades oligoméricas también pueden constituir estados funcionales tradicionalmente atribuidos a un colectivo conformacional monomérico, así como la coactivación y coinactivación de estos oligómeros [77,78].

2.3.1. Enfoques antineuroinflamatorios y neuromoduladores

El receptor 5 de β -quimiocinas es un receptor de interés en la EA debido a sus efectos proinflamatorios y quimiotácticos en tejidos dañados, por lo que constituye un blanco potencial contra la neuroinflamación presente en la EA.

Sobre el receptor 5 de β -quimiocinas o CC (CCR5)

El receptor CCR5 o cúmulo de diferenciación 195 (CD195) está ampliamente expresado en microglías y en menor medida en astrocitos y neuronas [79]. El receptor CCR5 posee actividad constitutiva y se acopla mediante CCL5 y RANTES a proteínas de clase $G_{i/o}$, y ante otras quimiocinas, a proteínas de clase G_z y $G_{q/11}$ [80–82]. Al activarse inicia la señalización intracelular para la remodelación del citoesqueleto que dará lugar a la quimiotaxia. CCR5 tiene 352 residuos de

aminoácidos, dos a tres residuos de tirosina sulfato [83], y forma dos puentes disulfuro intracatenarios [84,85] (**Figura 5**). Este receptor tiene como ligandos a varias quimiocinas como CCL5₂₄₋₉₁ (68 residuos), RANTES₂₆₋₉₁ (66 residuos) y RANTES₂₇₋₉₁ (65 residuos); isoformas de la quimiocina 5 con motivo CC, además de fungir como correceptor para cada monómero viral gp120 de variante R5, subunidad de la espícula del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), por lo que ha sido profundamente estudiado [85–88]

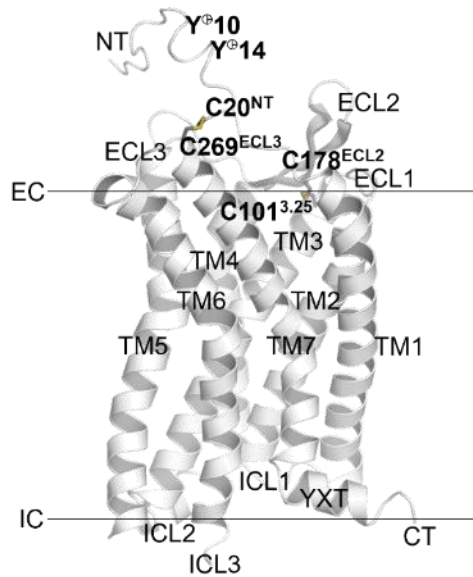


Figura 5. Representación de la estructura tridimensional del receptor CCR5. Las hélices transmembranales (TM) se numeran de 1 a 7, y la octava hélice yuxtamembranal (YXT). Los puentes disulfuro se forman entre C20^{NT} y C269^{ECL3}, y entre C101^{3.25} y C178^{ECL2}, y los residuos de tirosina sulfato modelados (Y^S) en este trabajo son los 10 y 14. NT: Segmento amino terminal, CT: Segmento carboxilo terminal (Representación generada a partir de la estructura con

PDB ID: 4MBS).

Las investigaciones con CCR5 y el receptor CX3CR1 expresado también en microglías, también han demostrado que la modulación farmacológica de estos influye de manera notable en las respuestas fisiológicas ante el daño en el SNC, como son resección espinal en ratones, eventos vasculares cerebrales y la deposición amiloide [52,89–93]. Adicionalmente, estudios recientes han remarcado las ventajas del uso de agonistas de CCR5 como inhibidores de entrada para HIV-1 [94], lo que establece la factibilidad de que las acciones moduladoras agonistas y antagonistas en CCR5 puedan tener un efecto de importancia clínica en el tratamiento de la EA.

El objetivo del desarrollo de moduladores de CCR5 en HIV-1/SIDA es interferir en la interacción CCR5-gp120 y limitar o inhibir la entrada del virión HIV-1 a las células hospederas CCR5+, incluyendo a las microglías. En el contexto de la lucha contra el HIV-SIDA, se han investigado y desarrollado ligandos ortostéricos de CCR5 con acción bloqueadora, como los miembros enlistados a continuación (**Figura 6**) [95,96]:

1. 8-Propil-3-(1,3,4-triazol-1H-il)tropanos, entre los que destacan el maraviroc (MRV),[84] el compuesto 21 (C21), y el compuesto 34 (C34) [97], los cuales cuentan con estructuras experimentales resueltas. El maraviroc (Celsentri[®] o Selzentry[®]) es un agonista inverso

parcial de CCR5 [98] que se emplea como inhibidor de fusión del HIV-1, y el único modulador de CCR5 aprobado hasta 2023.

2. *N*-[4-(Piperazino-1-il)piperidino-1-il]arilcarboxamidas, como vicriviroc (VIC) [99], ancriviroc (ANC) e INCB9471 [100,101].

3. 9-Benzilespiro[2.4]piperazino-piperidina-1,4-dionas como E913 [102] y aplaviroc (APV) [103,104], éste último siendo descartado de los ensayos clínicos debido a su hepatotoxicidad.

4. *N*-(1-Alquilpiperidino-4-il)arilalquilcarboxamidas como TAK220 [105,106] y AZD5672 [107,108]. AZD5672 ha demostrado eficacia en el tratamiento experimental de la artritis reumatoide y en la inflamación sistémica desencadenada por COVID-19 [109].

5. *N*-Fenil-(8-fenilbenzo[c]ciclohepteno)-2-carboxamida y *N*-fenil-(8-fenilbenzo[b]azocina)-5-carboxamida como TAK779 y cenicriviroc (CNV) respectivamente. El cenicriviroc ha mostrado además utilidad en el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica, la fibrosis hepática y la colangitis esclerosante primaria [110,111], una causa común de colangiocarcinoma.

Adicionalmente, otras entidades que interactúan con CCR5 son el alcaloide antagonista anibamina [112] obtenido de *Aniba sp.*, y el anticuerpo monoclonal IgG₄/k murino y humanizado, leronlimab [113]. Asimismo, el agonista ESN196 que induce endocitosis de CCR5 y ha demostrado actividad contra HIV [94].

Los efectos secundarios y adversos más frecuentes con el uso de maraviroc, detectados en fase 1 (en voluntarios sanos), los cuales son leves a moderados, incluyen diarrea, astenia, hipotensión ortostática y elevación de las enzimas hepáticas alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa, así como una elevación leve de la bilirrubina total, la enzima creatina cinasa (por miositis) y los lípidos totales, así como susceptibilidad a algunas infecciones [114,115]. El maraviroc es extensamente metabolizado por el CYP3A4, y es sustrato de la glicoproteína P. La hepatotoxicidad del maraviroc en algunos pacientes está documentada, pero se propone un mecanismo indirecto, mediado por activación de un toxicóforo o formación de un hapteno [116].

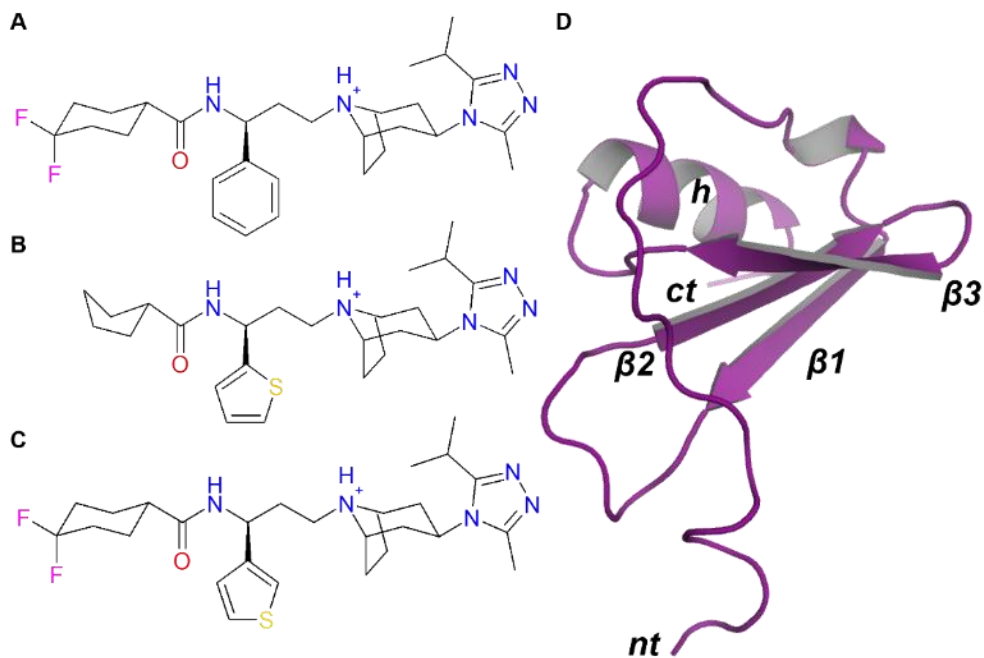


Figura 6. Estructura de los ligandos ortostéricos estudiados del receptor CCR5. (A) Maraviroc, (B) Compuesto 21, (C) Compuesto 34, y (D) CCL5₂₄₋₉₁ (modelada a partir del análogo [5P7]-CCL5, con PDB ID: 5UIW).

Considerando que el maraviroc mejora la recuperación en las funciones sinápticas y neuronales ante daños de diversa índole, disminuyendo los indicadores de neuroinflamación, como se mencionó anteriormente, es de interés su efecto inmunomodulador en la fisiopatología de la EA. Al tratarse de un agonista inverso parcial, el grado de inhibición en células CCR5+ (CD195+) se espera mayor que con antagonistas y agonistas parciales. Estos últimos poseerían el posible efecto clínico para una modulación microglial, que conserve sus propiedades inmunológicas pero sin incrementar los fenómenos que caracterizan la neuroinflamación.

Sobre el receptor delta opioide (DOR)

El receptor δ opioide (DOR) es coexpresado con el receptor μ opioide (MOR) [117] y κ opioide (KOR) [77] de manera abundante en el hipocampo, la corteza entorrinal y el giro dentado, regiones severamente afectadas por la EA, y comparte aproximadamente 60% de similitud en su estructura primaria con los receptores opioides μ y κ [118]. El receptor δ ha ganado relevancia al constituir una alternativa para el tratamiento del dolor crónico [119]. El receptor DOR contiene 378 residuos de aminoácidos, un puente disulfuro, dos sitios de *N*-glicosilación y un sitio de *S*-palmitoilación [82] (**Figura 7**), posee actividad constitutiva y se acopla a proteínas G inhibitorias del tipo $G_{i/o}$ [120]. El receptor δ , de manera muy similar a μ y κ , es la diana de los alcaloides morfínicos de *Papaver somniferum* (amapola y la pasta obtenida de ella, el opio), de manera histórica y

relevante, la morfina, la codeína y la tebaína. Estos alcaloides son narcóticos, es decir, inducen un estado de narcosis (un estado somnífero con conciencia alterada), y se conocen como opiáceos. Los ligandos endógenos que actúan en estos receptores se denominan opioides, y son todos péptidos. Los ligandos endógenos de DOR son los pentapéptidos encefalina-Met (ENKM) y encefalina-Leu (ENKL), así como los ligandos más afines al receptor κ : dinorfina A₁₋₁₃ y su precursor dinorfina A₁₋₁₇, dinorfina B₁₋₁₃ (rimorfina) y su precursor dinorfina B₁₋₂₉ (leumorfina); provenientes en primera instancia de la proencefalina (PENK) y la prodinorfina respectivamente [121]. Numerosos péptidos de origen exógeno son capaces de interactuar con el receptor δ con distintas afinidades, por ejemplo las casomorfina, subproductos de la hidrólisis parcial de las caseínas, las gliadorfinas provenientes de la gliadina del trigo, las rubiscolinas provenientes de la enzima ubicua RuBisCO, y las deltorfinas contenidas en la preparación consumida con fines recreativos conocida como *kambó*, producidas por las ranas del género *Phyllomedusa* [122–136].

Las encefalinas regulan las vías implicadas en las emociones a través del receptor DOR, y en la EA se ha descrito una depleción importante del receptor DOR en el giro dentado y la corteza entorrinal, así como un aumento de los niveles de encefalinas en el hipocampo en modelos de ratones que expresan APP humana con las mutaciones observadas en la EA familiar [137]. Estos hallazgos se han propuesto como mecanismos compensatorios en la EA, y que pueden incrementar en mayor medida el deterioro de la percepción y la orientación espacial. En modelos animales silvestres para EA, los agonistas de DOR deterioran la memoria de aprendizaje, y los deficientes de proencefalina manifiestan una resistencia al estrés, involucrado en el deterioro mnésico. La inactivación total de DOR por el agonista inverso SYK657 refuerza la memoria a corto plazo en ratones, mientras que este fenómeno se revierte con la administración del antagonista naltrindol (NLT) [138], selectivo hacia δ . Ante estos hallazgos, un enfoque modulador sobre el receptor DOR puede poseer un potencial modificador de la fisiopatología de la EA y sus manifestaciones neuropsiquiátricas [139,140]. Asimismo, se ha demostrado que DOR se expresa en colon [141] y tiene un efecto inmunomodulador al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias en modelos animales de colitis [142].

El receptor δ modula los efectos de los ligandos μ de varias maneras. Se ha demostrado que forma heterodímeros funcionales con μ , κ , quimiocinas y cannabinoides [71,143,144]. así como oligómeros [73,145] como unidades funcionales, caracterizadas como δ_1 y δ_2 , y que no están atribuidas a variaciones en corte y empalme durante la transcripción. El subtipo consiste en el heterodímero $\delta\mu$ o $\delta\kappa$ [71,146]. y posee actividades opuestas con el subtipo δ_2 , que es el homodímero $\delta\delta$ [147,148]. La unión de un agonista selectivo a μ y de un ligando selectivo a δ produce: i) Analgesia sinérgica si el segundo es agonista, disminuyendo los efectos adversos típicos del narcótico, o ii) Una analgesia opioide típica sin abstinencia al cesarla, si el segundo es antagonista. La actividad de los ligandos de δ varía dependiendo de la cardinalidad de los protómeros que forme (por ejemplo, la naloxona tiene mayor afinidad a los homodímeros $\mu\mu$ que a los monómeros μ , e induce la disociación

de estos complejos preformados [78,143]). Sin embargo, el receptor δ predomina como monómero cuando su densidad membranal es baja, como ocurre en numerosas condiciones patológicas como la misma EA, así como en ausencia de estímulos opioides externos [149].

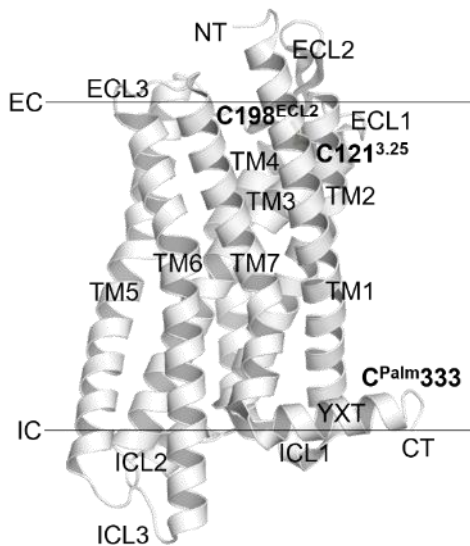


Figura 7. Representación de la estructura tridimensional del receptor DOR. Las hélices transmembranales (TM) se numeran de 1 a 7, y la octava hélice yuxtamembranal (YXT). El único puente disulfuro se forma entre C121^{3.25} y C198^{ECL2}, y el residuo de palmitoilsteína modelado (C^{Palm}) es el número 333. NT: Segmento amino terminal, CT: Segmento carboxilo terminal (Representación generada a partir de la estructura con PDB ID: 4N6H).

Múltiples ligandos morfínicos se unen a DOR [150], incluyendo varios ligandos no selectivos y uno selectivo (**Figura 8**):

1. Morfina (MRP), comercializada como sulfato de morfina (Analfin[®]), un agonista total en DOR y MOR [151], empleado en dolor severo postquirúrgico, quemaduras severas y tratamiento paliativo del dolor asociado a cáncer en etapa terminal.[152–155] Su uso está limitado por el desarrollo de tolerancia, habituación y dependencia, así como por los efectos adversos que incluyen constipación, vómito y depresión respiratoria, ambos fenómenos relacionados con el reclutamiento excesivo de β -arrestinas [156].
2. Nalorfina (NLR), previamente comercializada como Lethidrone[®], es un agonista parcial en DOR y KOR, y antagonista en MOR, que se encuentra en desuso clínicamente y fue reemplazado por agentes con menos efectos adversos.
3. Buprenorfina (BPNF), comercializada como clorhidrato de buprenorfina (Temgesic[®], Transtec[®]) y administrada de manera sublingual, intravenosa, subdérmica y transdérmica, es un antagonista en DOR y agonista parcial en MOR, por lo que se le conoce como agonista/antagonista o ligando opioide bifuncional. Tiene aplicación en dolor moderado a severo, indicado en dolor postquirúrgico, lesiones osteotendinosas y osteoarticulares, quemaduras severas y en tratamiento paliativo asociado a cáncer en etapa terminal.

4. Naloxona (NLX), un antagonista comercializado como clorhidrato (Narcan® o Narcanti®) y administrada por vía intravenosa y nasal, es usada para revertir la anestesia general narcótica (inducida por agentes como fentanilo), y como antídoto de primera elección en sobredosis de opiáceos y opioides. Posee menor afinidad hacia DOR que en MOR y KOR.

5. Naltrexona (NLTX), comercializado como Trexán® y Revia®, es un antagonista no selectivo con menor afinidad hacia DOR que en MOR y KOR, similar a la naloxona que se emplea en sobredosis de opiáceos y opioides. También se comercializa en combinación con morfina (Embeda®) para el tratamiento del dolor severo, con menos efectos adversos que MRP sola, y con el antidepresivo anorexigénico anfebutamona (Contrave®) en el manejo de la disminución ponderal en la obesidad [157].

6. Naltrindol (NLT), un antagonista experimental selectivo en DOR.

El complejo de δ con naltrindol, DOR-NLT, posee dos estructuras experimentales resueltas (PDB IDs: 4EJ4, 4N6H) [158,159], lo que permite conocer el sitio ortostérico y el modo de unión general de los morfinanos. En estos, la variación del sustituyente unido al átomo de N protonado, confiere un cambio de actividad sobre el receptor δ , transitando de una actividad agonista total con el metilo en la morfina, a agonista parcial con el grupo alilo de la nalorfina, hasta una actividad antagonista o inclusive agonista inverso con grupos voluminosos y electroattractores [138,159–161]. Asimismo, la presencia de un grupo voluminoso en la región extracelular del complejo aumenta la selectividad sobre DOR respecto a MOR y KOR [159]. El grupo farmacofórico de los ligandos ortostéricos incluye el grupo fenol, el amonio terciario y dos regiones hidrofóbicas, presente también en otros ligandos no morfinanos con actividad agonista, como los compuestos de tipo benzhidrilpiperazinas como BW373U86, SNC80 y DPI221, que pueden llegar a desencadenar convulsiones [162,163], y DPI287 (PDB ID: 6PT3) [119], que carece de actividad comicial [164], además de los agonistas sesgados PN6047 y TAN67 [155]. En las benzhidrilpiperazinas, el efecto estérico en la parte extracelular del complejo se evidencia con las diferencias de los ligandos DPI3290 y RWJ394674, donde el grupo *N*-(3-fluorofenil)-*N*-metilo en el primer caso, permite posicionar el sustituyente metilo hacia la región EC, y en el segundo caso, la biotransformación del grupo *N,N*-dietilo a *N*-etilo, aumenta considerablemente la unión a MOR sobre DOR.

El grupo farmacofórico fenol es compartido con los ligandos peptídicos, de tal manera que las modificaciones en la cadena principal y lateral de las encefalinas han permitido obtener ligandos peptídicos o peptidomiméticos que conservan la actividad agonista como KGCHM07 (PDB ID: 6PT2) [119], o que poseen actividad antagonista como DIPP-NH₂ (PDB ID: 4RWA, 4RWD) [165] o agonista inverso como TIPPP ψ , un pseudopeptido [166].

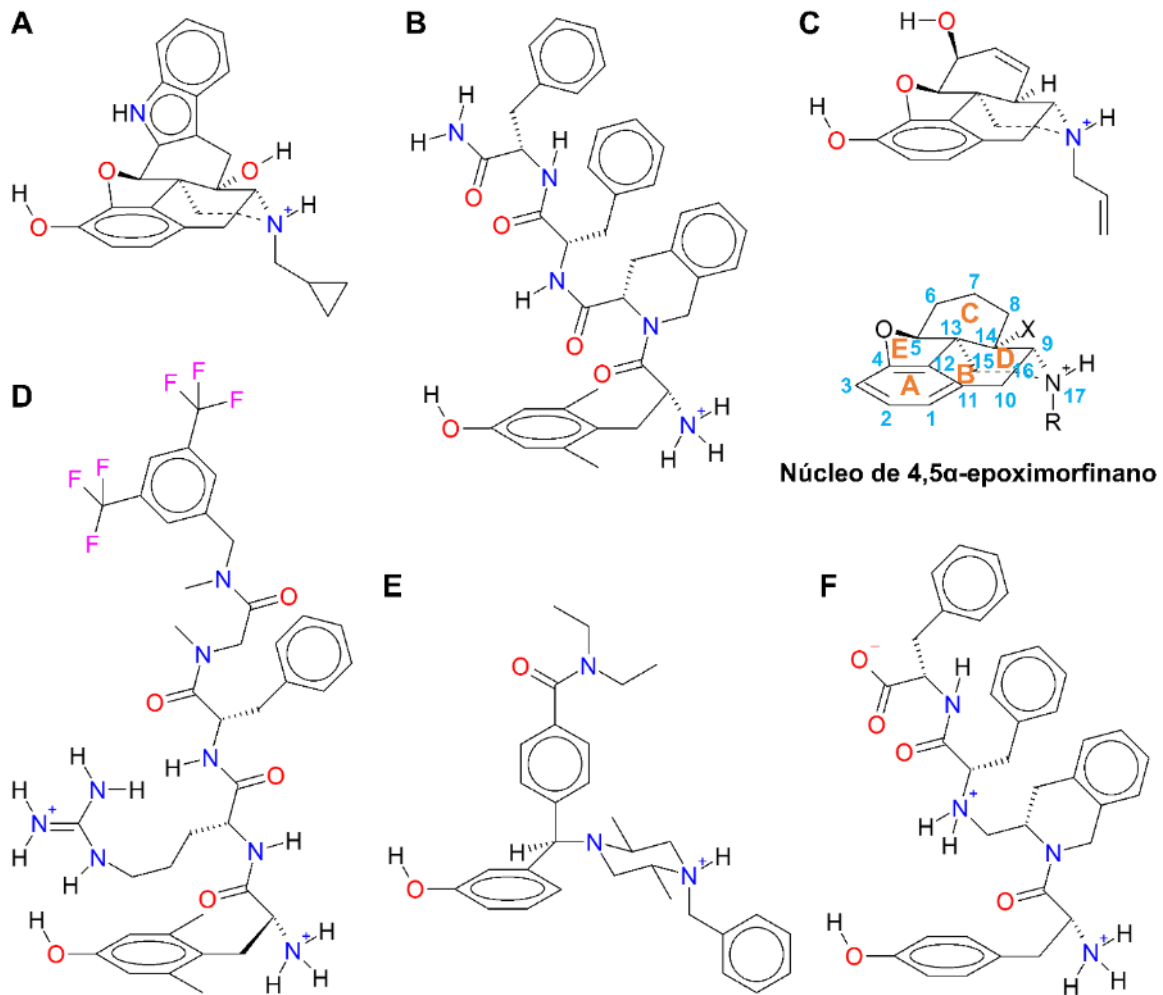


Figura 8. Representación bidimensional de los ligandos ortostéricos del receptor DOR. Morfinanos, benzhidrilpiperazinas y benzhidrilidenpiperidinas selectivas, péptidos y pseudopéptidos. (A) Naltrindol, (B) DIPP-NH₂, (C) nalorfina, (D) KGCHM07, (E) DPI287 y (F) TIPPψ.

La utilidad clínica de un fármaco selectivo hacia DOR en la EA, específicamente un agonista inverso parcial, radicaría en el incremento o reforzamiento de las funciones cognitivas, observado con experimentos animales, y que carecería de los efectos narcóticos de los ligandos de MOR.

Sobre el receptor 1 muscarínico de acetilcolina

Existen cinco subtipos de mAChRs, de M₁ a M₅ [63]. Los receptores muscarínicos se expresan ampliamente en el rombencéfalo (bulbo, protuberancia y cerebelo), mesencéfalo (parte superior del tallo cerebral o cerebro medio), diencefalo (núcleos talámicos), y múltiples vías colinérgicas en el telencéfalo (hemisferios cerebrales), y constituyen uno de los sistemas más importantes en las sinapsis preganglionares en el sistema nervioso autónomo, y en las sinapsis posganglionares de la rama parasimpática. También se expresan en músculo liso vascular y visceral

(digestivo, respiratorio, vesical y glandular). Los receptores muscarínicos poseen un asa extracelular 3 (ICL3) muy extensa y desordenada, de más de cien residuos; 157 para el subtipo M₁ [167,168] (**Figura 9**). El ICL3 es el sitio de unión para el regulador 2 de la señalización de proteínas G (RGS2), un activador de proteínas G (GAP). El receptor M₁ posee dos puentes disulfuro entre TM3 y ECL2, y en TM6, y se acopla típicamente con proteínas de tipo G_{q/11} [82], lo cual puede variar dependiendo del tejido [169].

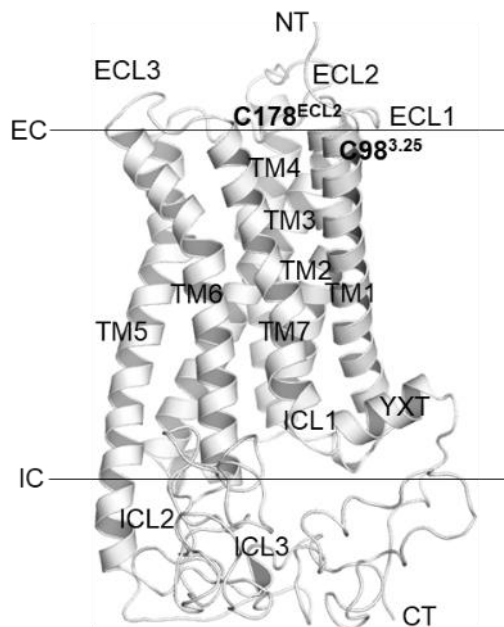


Figura 9. Representación de la estructura tridimensional del receptor M₁ (mAChR1).

Las hélices transmembranales (TM) se numeran de 1 a 7, y la octava hélice yuxtamembranal (YXT). El único puentes disulfuro se forma entre C98^{3.25} y C178^{ECL2}. NT: Segmento amino terminal, CT: Segmento carboxilo terminal. (Representación generada a partir de la estructura con PDB ID: 5CXV).

La acetilcolina es el ligando endógeno de los cinco subtipos, y se han caracterizado cientos de compuestos con actividad muscarínica [170–173]. Debido a que la acetilcolina activa los sistemas nicotínicos y muscarínicos, y es rápidamente hidrolizada por las enzimas colinesterasas, y la muscarina (que da el nombre a este sistema) activa los cinco subtipos y posee una elevada toxicidad [174], no tienen aplicaciones en la práctica clínica. En su lugar, los agonistas y antagonistas muscarínicos (**Figura 10**) constituyen la farmacoterapéutica muscarínica actual. Los antagonistas predominan en la clínica, ya que se indican en una amplia variedad de condiciones como enfermedad de Parkinson, parkinsonismos y distonías [175,176], como mióticos (para dilatar la pupila) [177], como antieméticos [178,179], y como inhibidores de las secreciones glandulares salivales [180], bronquiales [181,182], gástricas [183] e intestinales [184], con aplicaciones en tos productiva (de esputo), y en algunos tipos de gastritis y diarrea. Además, sus efectos antiespásticos sobre el músculo liso son de utilidad en el manejo de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), asma y broncoespasmo [182,184–186], en padecimientos que cursan con motilidad alterada como el síndrome de intestino irritable [187,188], dismenorrea, vejiga neurogénica, urgencia e incontinencia urinaria [189–192]. Por otro lado, los agonistas muscarínicos han ido ampliando sus usos potenciales como antipsicóticos [193–198] y antidemenciales [199–205], además de sus aplicaciones más conocidas en el tratamiento del síndrome de Sjögren y en algunos tipos de

glaucoma [206,207]. La selectividad en los sistemas muscarínicos es fundamental, ya que la modulación no selectiva puede conducir a dificultades cognitivas y perceptivas intensas, y severas reacciones gastrointestinales y cardiorrespiratorias. Adicionalmente, los receptores muscarínicos son modulados por una cantidad importante de fármacos antihistamínicos, antipsicóticos y antidepresivos, varios productos naturales coadyuvantes y tóxicos de serpientes, anfibios, invertebrados y de plantas, así como compuestos tóxicos de diseño, lo que ha estimulado una investigación muy extensa de la farmacología muscarínica.

La activación selectiva de los mAChRs puede reducir las dificultades y síntomas cognitivos en la EA y otras patologías como la esquizofrenia [24,193–196,199,201,202,205,208–213]. El subtipo M₁ se expresa abundantemente en regiones afectadas desde la etapa inicial de la EA, como el hipocampo y la neocorteza, donde se forman en gran medida las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. El agonista selectivo dual M₁/M₄ xanomelina disminuye de manera robusta las conductas patológicas en pacientes con la EA, pero posee los inconvenientes de activación periférica y la aparición de efectos adversos, por lo que el estudio de la selectividad de los agonistas M₁ es un enfoque con potencial en el tratamiento de los trastornos neuropsiquiátricos asociados a la EA [199,201,205,210,214].

El antagonismo central de los receptores M₁ produce un deterioro cognitivo y alteraciones en la senso-percepción espaciotemporal [203,209,213,215], y a la vez, el antagonismo periférico se asocia con la disminución del peristaltismo, disminución de las secreciones glandulares como las que revisten los epitelios oral, gastrointestinal y respiratorio, así como relajación del músculo liso vesical y contracción del esfínter urinario. Debido a los múltiples efectos antimuscarínicos, es preferible la acción de antagonistas muscarínicos selectivos a M₁, y de acción preferentemente central.

Una gran cantidad de ligandos muscarínicos poseen grupos funcionales de amonio cuaternario, por lo que su ingreso al SNC es bastante limitado. La muscarina, la sustancia agonista no selectiva aislada inicialmente de *Amanita muscaria*, y que definió a los receptores mAChRs, por sí sola es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica por lo que sus efectos tóxicos son periféricos; es decir, incremento del peristaltismo y diarrea, espasmos intestinales, sialorrea, hiperacidez gástrica y pirosis, tos productiva, rinorrea, lagrimeo excesivo, diaforesis y bradicardia que puede derivar en paro cardiorrespiratorio.

Además de la muscarina, los agonistas muscarínicos se clasifican en tres grupos [173,216,217]:

1. Análogos de la acetilcolina, como carbacol, metacolina y betanecol. Estos agentes son de uso delicado y están reservados para uso tópico o intrahospitalario debido a la activación generalizada, muscarínica y nicotínica, que producen.

2. Análogos de la arecaidina y 1-metil-1,2,5,6-tetrahidropiridinas. Basados en el agonista parcial arecolina, un alcaloide de *Areca catechu*, este grupo incluye algunos agentes selectivos y no selectivos como milamelina, alvamelina, xanomelina y tazomelina. Por su similitud estructural, también se incluyen aquí los análogos del bioisómero no clásico quinuclidina, como aceclidina, talsaclidina, sabcomelina, cevimelina y vedaclidina.

3. Butinilaminas como oxotremorina, oxotremorina-M e iperoxo, que han sido tipificados como superagonistas [218,219].

En contraparte, los antagonistas clásicos no selectivos de los receptores muscarínicos son los alcaloides (-)-hiosciamina y (-)-hioscina, los cuales se obtienen habitualmente durante las extracciones como parte de las mezclas racémicas (\pm)-atropina y (\pm)-escopolamina, respectivamente. Ambos alcaloides son biosintetizados por múltiples especies de plantas de la familia Solanaceae, entre las que sobresalen *Datura sp.*, *Brugmansia sp.*, *Duboisia sp.*, *Scopolia sp.*, *Anisodanus sp.*, *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger* y *Mandragora officinalis*. Atraviesan la barrera hematoencefálica, aunque su biodisponibilidad es baja debido a la hidrólisis del éster trópico. Además, la (-)-hioscina y la escopolamina posee una biodisponibilidad mucho más baja aún debido a la presencia del grupo epóxido, el cual al hidrolizarse genera la anisodamina, la cual posee una actividad antagonista menor. Debido a estos inconvenientes, los alcaloides tropánicos se emplean preferentemente por vía tópica o aprovechando su efecto farmacológico transitorio.

En contraste, la sustitución del éster tropato por un grupo voluminoso prolonga la vida media de los antagonistas muscarínicos al encontrarse mayor impedimento estérico para su hidrólisis enzimática, en el caso de los ésteres. Dentro de esta segunda generación de antagonistas se encuentran tres grupos [173,216,217]:

1. Diarilalquilaminas, dicicloalquilarilaminas, y análogos. Representados por el trihexifenidilo (Artane®) y el biperideno (Akinetón®), ambos agentes antiparkinsonianos con importantes efectos de deterioro cognoscitivo, así como el tiotropio (Spiriva®), un broncodilatador inhalable de efecto prolongado.

2. 4-(1-Piperidinil)piperidinas, un grupo relativamente novedoso de antagonistas y agonistas parciales entre los que se encuentran GSK1034702, HTL9936, AZD6088 y SPP1 [220].

3. Suberenos, dibenzoazepinas, dibenzooxepinas y análogos. Usados principalmente por sus perfiles antidopaminérgicos y antiserotoninérgicos como antipsicóticos, antidepresivos, antieméticos y timomoduladores. Sus efectos antimuscarínicos suelen considerarse efectos secundarios. Entre estos se encuentran los antidepresivos tricíclicos amitriptilina (Elavil®) y sus análogos nortriptilina, protriptilina, butriptilina y el miorrelajante ciclobenzaprina (Flexeril®); Imipramina (Tofranil®) y análogos desipramina, clomipramina y trimipramina; el antidepresivo

tetracíclico maprotilina (Ludiomil®), el antialérgico y estimulante del apetito ciproheptadina (Periactin®), los neurolépticos típicos clorpromazina (Largactil®), tioridazina (Melleril®) y clorprotixeno (Truxal®), los antipsicóticos atípicos clozapina (Leponex®), olanzapina (Zyprexa®), zotepina (Zoleptil®) y el antidepresivo-antipsicótico loxapina (Loxitane®); los antiulcerosos pirenzepina, telenzepina y el antiarrítmico otenzepad.

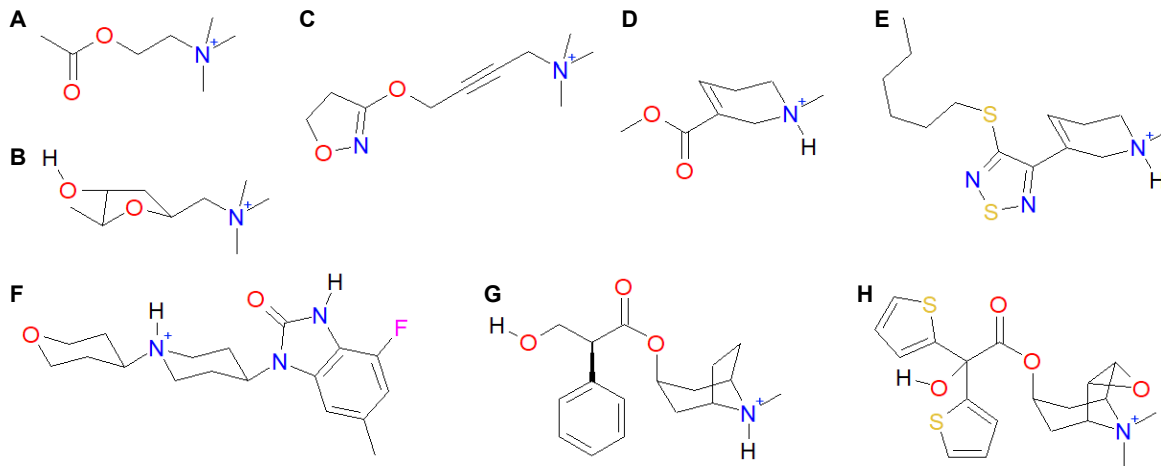


Figura 10. Algunos ligandos muscarínicos relevantes que cuentan con información cristalográfica (o análogos en complejos con algún receptor muscarínico). Los agonistas totales (A) acetilcolina, (B) muscarina, (C) iperoxo y (D) arecolina, los agonistas parciales (E) tazometina y (F) GSK1034702, (G) el antagonista (-)-hiosciamina (*l*-atropina) y (H) el agonista inverso tiotropio.

Los antagonistas muscarínicos han demostrado mejorar las funciones cognitivas en pacientes con varios padecimientos que cursan con deterioro en las funciones mnésicas. Los agonistas parciales cursarían con una menor incidencia de los efectos cognitivos adversos, en contraste con los antagonistas, y más aún, con los agonistas inversos. Aunque los fármacos muscarínicos sólo han sido empleados como paliativos, los cambios en la actividad intrínseca de los compuestos, así como sus diferentes selectividades, pueden allanar el camino hacia una mejora en los mecanismos muscarínicos en la EA.

El estudio de los GPCRs a nivel estructural es relativamente reciente, iniciando con la dilucidación en 1990 de la estructura de la bacteriorrodopsina, una proteína transmembranal de los dominios Archaea y Bacteria, pertenecientes a la macrofamilia de proteínas de siete dominios transmembranales, a las que también pertenecen los GPCRs en Eukarya. Las bacteriorrodopsinas, así como sus homólogos en Eukarya, las rodopsinas, poseen como grupo prostético el retinal como parte del residuo modificado *N*^ε-retinilidennisina, y éste funge como ligando en el sitio extracelular conservado entre las siete hélices, que en GPCRs se conoce como sitio ortostérico. A diferencia de las bacteriorrodopsinas, las rodopsinas y opsinas (que fungen como holorreceptor y aporreceptor al hidrolizarse el retinilideno, respectivamente), están acopladas a proteínas G.

Las dificultades subyacentes a la dilucidación de las estructuras experimentales de los GPCRs radican en: (1) la dificultad para obtener cristales, por lo que se recurre a la quimerización del gen respectivo con la secuencia de la lisozima acarreada por el virus bacteriófago T4, o de citocromo c, típicamente en los dominios extra e intracelulares, respectivamente, y (2) la temporalidad del estado funcional activo, el cual después de un determinado intervalo de tiempo de iniciada la activación, comienza la desactivación del receptor, lo que incluye endocitosis o modificaciones postraduccionales. De esta manera, sólo es asequible obtener información estructural de los estados no activos, como aquellos estados apo y complejos con antagonistas. Con el uso de los fragmentos Fab de anticuerpos que estabilizan los estados activos, la disponibilidad de receptores en estados activos, en complejos con agonistas, comenzó a incrementarse. Con el empleo de las técnicas de criomicroscopía electrónica, la obtención de estructuras experimentales experimentó un aumento considerable.

Considerando que la estructura experimental se deriva de los ajustes de la respuesta de la técnica usada, y que constituye un promedio colectivo del estado funcional en el instante de la resolución, así como dependiente de las condiciones del entorno; temperatura, morfología y topología de la fase lipídica, uso de cosolventes, presencia mutaciones y de fragmentos quiméricos, las técnicas computacionales dinámicas han permitido explorar valiosas

En los GPCRs están descritos mecanismos generales de activación, pero dada la extensa gama de receptores (estructuras primarias, secundarias y terciarias diferentes), interacciones con otras proteínas y composición variable de las membranas, cada receptor posee un mecanismo particular de adopción y cambio de cada estado funcional disponible, que de manera global, interseca en eventos muy sobresalientes con el mecanismo general.

3.1. JUSTIFICACIÓN

En este trabajo estudiamos tres receptores, CCR5, δ y M_1 , asociados con la enfermedad de Alzheimer.

1. Los antagonistas del receptor CCR5 han demostrado influir en la disminución del daño celular y oxidante asociado a la respuesta de las microglías activas [52,89–93]. Está bien descrito que la actividad microglial es necesaria para el reconocimiento de los DAMPs, y CCR5 desempeña un papel importante en la transición microglial y la quimiotaxia. Sin embargo, la señalización de otros receptores de quimiocinas e interleucinas en microglías es numerosa.

2. Los agonistas inversos del receptor DOR son de elección para la investigación en la mejora de los síntomas cognitivos asociados al daño hipocampal, como el que se desarrolla en la EA. Dados los efectos timomoduladores de la activación de delta, los antagonistas selectivos constituyen el punto de interés en demencia. Además, es de gran importancia su selectividad hacia DOR dados los efectos narcóticos y del sistema de recompensa asociados a la activación de μ [71,138–140,143,144].

3. Los agonistas muscarínicos selectivos a M_1 han demostrado mejorar la cognición en modelos animales y en pacientes con deterioro cognitivo, con y sin la EA, y en contraste con los antagonistas muscarínicos centrales [24,193–196,199,201–203,205,208–213,215].

3.2. HIPÓTESIS

La actividad farmacológica de los ligandos, que depende de su estructura y propiedades moleculares, induce cambios conformacionales agrupables y relacionables con los estados funcionales descritos para los GPCRs, en particular de los receptores CCR5, δ y M_1 , que son caracterizables con simulaciones de dinámica molecular, y reproducibles con ligandos de características similares, de tal manera, que se puede establecer una relación bidireccional entre ambos estructura y estado funcional.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar y caracterizar los receptores CCR5, DOR y mAChR1 utilizando herramientas de dinámica molecular y otras técnicas computacionales, para describir sus estados funcionales y los cambios conformacionales inducidos por grupos representativos de ligandos, con el fin de identificar los patrones de cambios de estado funcional.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Recopilar la información bibliográfica y experimental necesaria para el diseño de los sistemas membranales de los receptores.
2. Construir los sistemas membranales con las coordenadas iniciales para la simulación de dinámica molecular.
3. Analizar las trayectorias para generar los colectivos conformacionales de los receptores, así como identificar los patrones de interacción de los ligandos en complejo.
4. Establecer los fenómenos y eventos conformacionales y dinámicos en los receptores, relacionados con los estados funcionales definidos.
5. Proponer los métodos de activación de los receptores, así como patrones y elementos de no activación, relacionados con el tipo y naturaleza estructural de los ligandos.

5. RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN Y CONFIGURACIONES INICIALES

En las Tablas 3-5 se detallan los sistemas estudiados de cada receptor, respectivamente.

Tabla 3. Receptores y ligandos estudiados.

Clase	Prototipo	Tipo	Subtipo	Receptor	Ligandos ¹
A	Rodopsina	Péptidos	β -Quimiocinas	CCR5	CCL5, maraviroc (MRV), compuesto 21 (C21), compuesto 34 (C34)
			Opioide	DOR	Naltrindol (NLT), DIPPNH ₂ , Compuesto 4 (Cmp4), buprenorfina (BPNF), naloxona (NLX), PN6047, nalorfina (NLR), morfina (MRP), DPI287, BW373U86, KGCHM07, encefalina L (ENKL), deltorfina II (DLTR), TIPPP ψ , SYK657.
		Aminérgicos	Muscarínicos	mAChR1	Acetilcolina (ACh), muscarina (MUS), arecolina (ARE), hioscina (HSC), tiotropio (TTP), toxina muscarínica 7 (MT7)

5.1. RECEPTOR CCR5

La información estructural experimental de CCR5 se obtuvo de *RCSB Protein Data Bank* (RCSB PDB) [221], con PDB IDs: 4MBS [84], 5UIW [85], 6AKX, 6AKY [97] y 6FGP [222] (**Tabla 4**). Los segmentos faltantes de la estructura se completaron empleando modelado por homología, utilizando el servidor *SWISS-MODEL* [223], con la información obtenida de P51681 en *UniProt* [82], y utilizando como moldes las estructuras con PDB IDs: 4MBS y 6FGP. Los sistemas de estudio del receptor CCR5 se construyeron del residuo 1 al residuo 318, con dos puentes disulfuro (C20-C269 y C101-C178), excluyendo los residuos 319-352 del segmento C terminal (debido a que no se tiene información de la localización de los residuos palmitoilados [224] C321, C323 y C324 hasta el momento del inicio de este estudio). Los residuos de tirosina 10 y 14 (Y¹⁰ y Y¹⁴) de CCR5 se modelaron como tirosinasulfato (Y¹⁰ y Y¹⁴) de acuerdo con la información experimental disponible [83,222].

Tabla 4. Sistemas estudiados del receptor CCR5. Cada sistema se simuló 1 μ s.

Sistema	Ligando	Clase del ligando	Actividad del ligando	PDB ID
apoCCR5	(Apo)	-	-	4MBS [84]
CCR5-MRV	Maraviroc	8-Propil-3-(1,3,4-triazol-1H-il)tropano	Agonista inverso parcial [225]	4MBS [84]
CCR5-C21	Compuesto 21		Antagonista	6AKX [97]
CCR5-C34	Compuesto 34		Antagonista	6AKY [97]
CCR5-CCL5	CCL5 ₂₄₋₉₁	Quimiocina β	Agonista total	5UIW [85], 6FGP [222]

5.2. RECEPTOR δ

La información estructural del receptor DOR se obtuvo de las entradas con PDB ID: 4EJ4 [158], 4N6H [159], 4RWA, 4RWD [165], 6PT2 y 6PT3 [119] (**Tabla 5**). Los dominios amino (M1-A40) y carboxilo terminal (R334-A371) se modelaron con *SWISS-MODEL*, obteniendo modelos de DOR del residuo 1 al 371, con los residuos N18 y N33 *N*⁶-(*N*-acetilglucosaminados), la C333^{YXT} palmitoilada y un puente disulfuro (C121-C198), según la información disponible en P41143 de *UniProt*.

Tabla 5. Sistemas estudiados del receptor δ . Cada sistema se simuló 1 μ s en cMD.

Sistema	Ligando	Clase del ligando	Actividad del ligando	PDB ID
Apo- δ	(Apo)	-	-	
δ -NLT	Naltrindol	Morfinano	Antagonista selectivo en δ_2 [225]	
δ -NLX ^a	Naloxona	Morfinano	Antagonista no selectivo, putativo δ_2	
δ -BPNF	Buprenorfina	Orvinol (derivado de oripavina, aducto de Bentley, 6,14-endoetanomorfinano)	Multifuncional: Antagonista δ y κ antagonist/agonista parcial μ	4EJ4, 4N6H
δ -DIPP	DIPP-NH ₂	Péptido	Antagonista δ / agonista μ	4RWA, 4RWD[165]
δ -Cmp4	Compuesto 4	Ciclopéptido homodético	Antagonista selectivo	6PT2, 8F7S[226]
δ -NLR	Nalorfina	Morfinano	Agonista parcial no selectivo	4EJ4, 4N6H
δ -PN6	PN6047	Benzhidrilidenpiperidina	Agonista selectivo sesgado	
δ -BW3	BW373U86	Benzhidrilpiperazina	Agonista selectivo total	6PT3
δ -DPI	DPI287	Benzhidrilpiperazina	Agonista selectivo	6PT3[119]
δ -MRP	Morfina	Morfinano	Agonista no selectivo cuasitotal	4EJ4, 4N6H
δ -KGCH	KGCHM07	Péptido	Bifuncional: Agonista δ /antagonista NK1	6PT2[119]
δ -ENKL	Encefalina L	Péptido	No selectivo; agonista total δ_1 /agonista inverso δ_2	6PT2
δ -DLTR	Deltorfina II	Péptido	Agonista selectivo δ_2	8F7S[226]
δ -TIPP	TIPP ψ	Pseudopéptido	Agonista inverso selectivo	4RWD, 6PT2
δ -SYK	SYK657	Morfinano	Agonista inverso total selectivo δ_2	4EJ4, 4N6H

a. Se realizaron tres réplicas de este sistema.

5.3. RECEPTOR M₁

El modelado del receptor mAChR1 se basó en las estructuras de RCSB PDB con IDs 5CXV [227], 6OIJ [167], 6WJC [167] y 6ZG9 [228] (**Tabla 6**). Se modeló el ICL3 con *SWISS-MODEL*, y se establecieron dos puentes disulfuro entre C98-C178 y C371-C374, con la información de P11229 en *UniProt* y de RCSB PDB. El modelo membranar para este receptor se basó en la composición reportada para membranas plasmáticas de mamíferos [229].

Tabla 6. Sistemas estudiados del receptor mAChR1/M₁. Cada sistema se simuló 600 ns.

Sistema	Ligando	Clase del ligando	Actividad del ligando	PDB ID
apoM ₁	(Apo)	-	-	5CXV [227][84]
M ₁ -ACh	Acetilcolina	Alquilamonio cuaternario	Agonista total	
M ₁ -ARE	Arecolina	Arecaidina	Agonista	6OIJ [167]
M ₁ -MUS	Muscarina	Alquilamonio cuaternario	Agonista	
M ₁ -GSK	GSK1034702	Tetrahidropirano-4-il-piperidina	Agonista parcial extendido	6ZG9 [228]
M ₁ -HSC	(-)-Hiosciamina	Tropano	Antagonista	6WJC [167]

M ₁ -TTP	Tiotropio	Tropano cuaternario	Antagonista / Agonista inverso	5CXV [227]
M ₁ -MT7	Toxina Muscarínica 7	Toxina tridactilar	Antagonista alostérico	6WJC [167]

5.4. METODOLOGÍA

Los sistemas de CCR5, DOR y M₁, se construyeron en sistemas membranales de POPC, POPC y colesterol, y un modelo membranal multicomponente (Tabla y Figura M1) respectivamente, en los servidores OPM [230] y CHARMM-GUI [231,232]. Los residuos convencionales (incluyendo los *N*-glicanos y la *S*-palmitoilcisteína), los lípidos, el agua en modelo TIP3P y los iones se parametrizaron con el campo de fuerza CHARMM36m, mientras que los residuos de Y[®] se parametrizaron con ACPYPE [233].

Con el programa GROMACS 5.0.7 [234,235] se realizaron las simulaciones de cMD, con dinámica molecular de Langevin. Los cálculos de términos coulómicos se resolvieron haciendo uso del algoritmo de la suma en la malla de Ewald (*Particle Mesh Ewald*, PME) [236,237], a través de la transformada rápida de Fourier, y con una partición en el espacio de Fourier de 0.16 nm⁻¹, con un orden de interpolación de 4. Los cálculos de las interacciones no enlazantes se basaron en la búsqueda de vecinos, actualizada cada diez pasos, mediante un rango de corte, con radios iónicos y de van der Waals de 1.0 nm. Los enlaces que involucran átomos de hidrógeno se simplificaron con el algoritmo LINCS [238] de constricción de vibración. Inicialmente se efectuó una minimización de energía potencial por optimización geométrica con restricciones holonómicas decrecientes a los átomos pesados de la proteína y el ligando, las cabezas de POPC y los ángulos diedros del residuo de oleilo, con el algoritmo *Steepest Descent*, con una cota superior de 1000 kJ/molnm y un paso de 0.01 nm. Posteriormente, dos equilibrios de simulación de un colectivo isomolar-isocórico-isotérmico (NVT) mediante la generación de velocidades iniciales a través de la distribución de Maxwell-Boltzmann a una temperatura de referencia de 310 K, con un paso de tiempo de 0.001 ps, utilizando el termostato de Berendsen, que disminuye las fluctuaciones térmicas de manera exponencial [239] con constante τ de 1.0 ps⁻¹. Después se simularon cuatro equilibrios de un colectivo isomolar-isobárico-isotérmico (NPT) con las velocidades generadas durante el colectivo NVT, con un paso de tiempo de 0.002 ps empleando el barostato de Parrinello-Rahman [240], con una constante τ_P de 5.0 ps⁻¹, una presión de referencia en un sistema semiisotrópico de 1 bar, y una compresibilidad isotérmica de 5×10⁻⁴ bar⁻¹, correspondiente a un medio acuoso. Finalmente se realizó la producción de dinámica molecular NPT sin restricciones con el termostato de reescalamiento de velocidades. Se simularon 1000 ns de cMD con dos réplicas para los cinco sistemas, mientras que los sistemas apo y en complejo con CCL5 se simularon adicionalmente colectivos NVT con dinámica molecular acelerada gaussiana (GaMD) [241,242] utilizando la paquetería de AMBER18 [243], a partir de las coordenadas finales de la cMD. Para estos casos se prosiguió con una minimización de energía potencial, dos equilibrios NVT y cuatro equilibrios NPT. Se utilizó el algoritmo SHAKE [244] de constricción de vibración para enlaces de hidrógeno, y el barostato de Monte Carlo [245].

Los análisis efectuados, como cálculos de la desviación de la posición y de la distancia respecto a la estructura inicial, ponderada con masas atómicas a través del tiempo (RMSD), desviación de la posición respecto a la estructura inicial, ponderada con masas atómicas, por residuo (RMSF), radios de giro (rg), agrupamiento de estructuras por el método de Gromos [246] (muestreo sin reemplazo) y Jarvis-Patrick, obtención de configuraciones particulares, análisis de covarianza y componentes principales (PCA), cálculo de distancias medias y mínimas, cálculo de ángulos diedros, matrices de contactos y estructura secundaria, se realizaron con las herramientas del programa GROMACS 5.0.7 [235].

Los análisis de frecuencia de contactos, cálculo de presencia y permanencia de moléculas de agua, y ángulos de inclinación de hélices, se efectuaron con la paquetería de *MDAnalysis* [247] y la curvatura de las hélices se evaluó con Bendix [248]. El análisis de correlación cruzada de Pearson, análisis de comunidades con el algoritmo de intermedianza de Girvan-Newman [249], y redes de propagación de información se generaron empleando la librería *Bio3D* [250], así como los cálculos estadísticos, ambos con R [251]. La información mutua a partir de los ángulos diedros se calculó con MutInf de SimTK [252]. Los análisis de parámetros membranales se realizaron con FATSLiM [253], y LiPyphilic [254].

La detección del poro interhelicoidal y los residuos que lo delimitan, se obtuvo con el uso del servidor *CHEXVIS* [255].

Las estructuras de los ligandos se tomaron de *PubChem* [217], la información de su actividad farmacológica se consultó principalmente en *IUPHAR* [216], *Inxight: Drugs* [172] y *DrugBank* [173], la información sobre sus estados de protonación y/o pKa se obtuvieron de PubChem, publicaciones específicas (citadas en cada caso), y el servidor *Chemicalize* [*The server Chemicalize was used for prediction of pKa, 2019 <https://chemicalize.com/> developed by ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)*].

Los archivos de las simulaciones de GaMD se convirtieron a los formatos respectivos de GROMACS 5.0.7, con el programa cpptraj [256] y ACPYPE para los análisis correspondientes.

Se emplearon los programas PyMOL v1.7 y v2.5 [257], VMD [258], ISIS Draw [259] para la generación de imágenes estructurales, y Gnuplot [260] para la construcción de gráficos.

6. GENERALIDADES DE LOS GPCR ESTUDIADOS

En los casos de estudio, fue posible identificar patrones conformacionales de los estados estativos y de los activos (en los tres receptores), así como los inactivos (en DOR y CCR5). En los estados estativos, así como el estado apo, es evidente la convergencia hacia colectivos dinámicamente estables, de valores con tendencias constantes, como fue observado en los gráficos de perfiles temporales de RMSD. Esta característica es congruente con la estabilización que confieren los antagonistas a los GPCRs. Por su parte, los estados apo tienden a presentar altas similitudes con los estados estativos, y en mucho menor grado con los partitivos. Sin embargo, estos patrones no ocurren así en los otros estados. Por definición, se espera que la activación de un GPCR no presente perfiles temporales de RMSD con tendencias constantes, ni durante el proceso de proactivación, ni al haber alcanzado la activación total, la cual difiere entre los diversos agonistas y los mismos receptores. Una alternativa para obtener perfiles con tendencias constantes la constituye el RMSD móvil que, de manera similar con la media móvil, la elección del intervalo para el cálculo reviste un sesgo importante. Tanto los estados proactivos-activos, así como los inactivos (de manera sobresaliente en el estudio de DOR), presentan cambios intrínsecos que, sin embargo, se pueden relacionar con los múltiples hallazgos de activación reportados en la creciente literatura de estos receptores.

Los patrones de activación observados en el estudio de los tres receptores incluyen:

1. Extensión o acortamiento de TM5 y TM6, emparejamiento y disminución de la curvatura de ambas, y distanciamiento del resto del TMD en el lado intracelular, de manera sobresaliente de TM7,
2. Apertura de la región interhelicoidal en el lado intracelular,
3. Penetración abundante de moléculas de aguas en el poro interhelicoidal, debida principalmente a rotación y traslaciones en las hélices.

Por su parte, entre los componentes de estados estativos observados, figuran:

1. Aumento de la curvatura en TM5 y torsión en TM6 que la aleja de la primera y la mantiene en contacto estrecho con TM7,
2. Oclusión del poro interhelicoidal en el lado intercelular,
3. Presencia de regiones hidrofóbicas en el poro interhelicoidal que representan interrupciones al paso de moléculas de agua a través de él.

6.1. ESTUDIO COMPUTACIONAL DEL COLECTIVO ESTRUCTURAL DEL RECEPTOR CCR5 Y SUS INTERACCIONES CON DIFERENTES LIGANDOS

Artículo publicado en *PLoS One*, **2022**, 17(10), e0275269 (Apéndice 3).

A partir de las simulaciones, agrupamos los sistemas de CCR5 en dos categorías, basadas en sus similitudes conformacionales.

- a) La clase no activa: El complejo inactivo con en agonista inverso parcial MRV, y el estado basal del apo-CCR5,
- b) La clase activa: El complejo activo con el agonista total CCL5.

Realizando un análisis de agrupamiento conformacional de las hélices transmembranales, las diferencias más notables entre los estados funcionales (**Figura 11**) incluyen:

- a) La clase no activa (estados inactivo y basal) presentó una curvatura en la TM5, más pronunciada en el estado inactivo, en concordancia con estudios computacionales previos de CCR5 [261]. Además, TM6 adoptó un ángulo de inclinación menor (**Figuras C1 y C2** del anexo C al final de este capítulo).
- b) En el estado activo, la helicidad de la región intracelular (IC) de TM3 aumentó durante la simulación hacia el asa intracelular 2 (ICL2). El ángulo de inclinación de TM1 se incrementó, mientras que la helicidad en el extremo IC de TM5 y TM6 disminuyó (**Figuras C1 y C2**).

El sitio ortostérico en CCR5 incluye un área extensa de la región amino terminal (NT), el asa intracelular 2 (ECL2) y una estrecha cavidad parcialmente hidrofóbica e intrahelicoidal, localizada en el lado extracelular. En esta última cavidad es donde el MRV se une, así como el extremo amino de las quimiocinas (nt) [98,262]. El sitio en común de interacción de ambos tipos de ligandos, que denominamos sitio ortostérico pequeño (OSS), consiste principalmente de la tétrada de residuos Y37^{1.39}, W86^{2.60}, Y251^{6.51} y E283^{7.39}, en notación de Ballesteros-Weinstein [263].

Las réplicas del sistema apo-CCR5, que denominamos CCR5-I y CCR5-II, mostraron las configuraciones esperadas de características proinactivas, de manera análoga con la réplica CCR5-MRV-I, en particular en la orientación y la posición de la tétrada de OSS (**Figura 12**). Sin embargo, la réplica CCR5-MRV-II mostró características distintas en la configuración de OSS respecto a la réplica I, aunque ambos sistemas no activos son congruentes en la zona adyacente a OSS, como se explica en la siguiente sección. Adicionalmente, las interacciones del ligando y el receptor fueron conservadas y congruentes con las estructuras cristalográficas, así como otros estudios computacionales de CCR5 [261,264–266]. De manera importante, la interacción iónica entre el tropano protonado de MRV y el residuo E283^{7.39}, y el puente de hidrógeno entre el triazol del ligando y Y37^{1.39}, están muy conservadas.

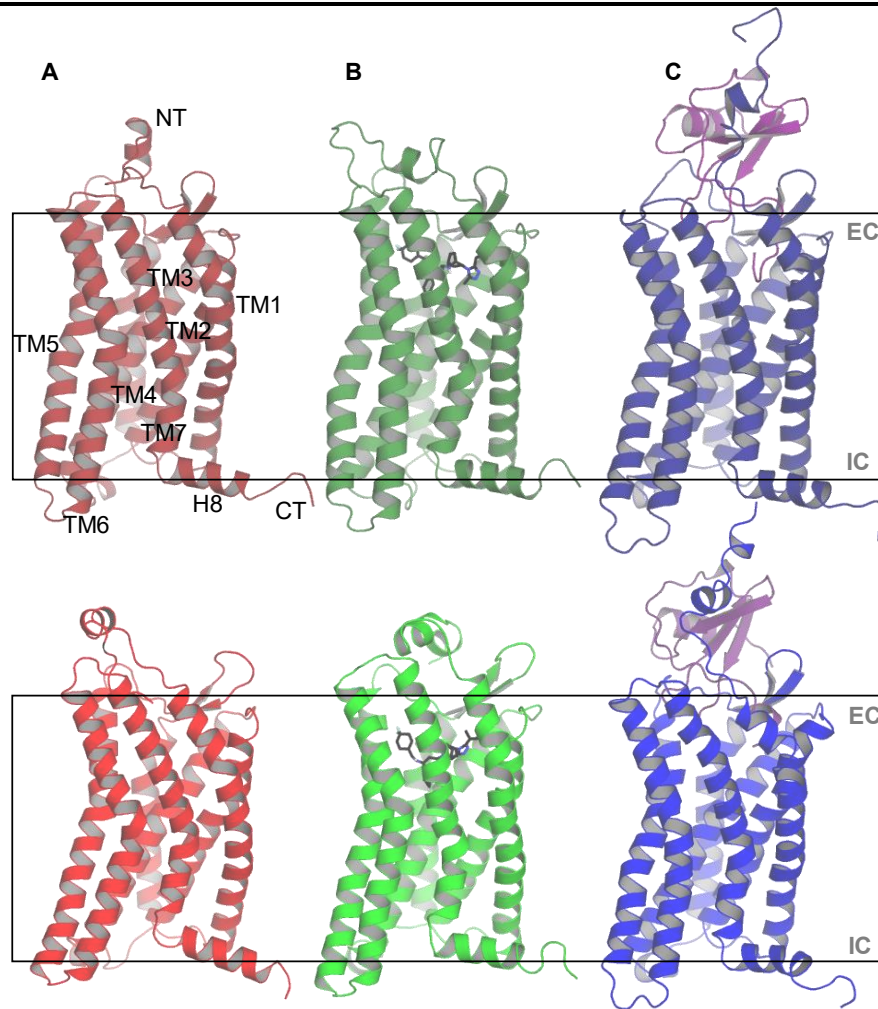


Figura 11. Confórmeros representativos de los sistemas estudiados, de ambas réplicas (arriba y abajo). (A) apo-CCR5, (B) CCR5-MRV y (C) CCR5-CCL5₂₄₋₉₁. TM: Hélice transmembranal, H8: hélice yuxtamembranal, EC: extracelular, IC: intracelular.

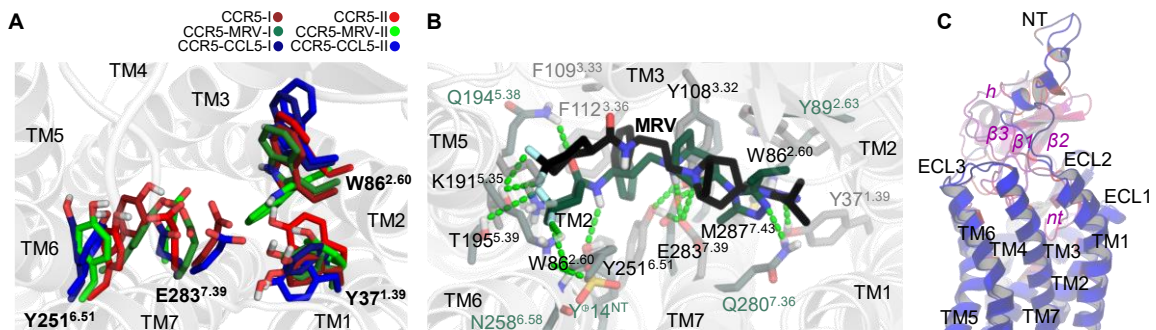


Figura 12. Sitio ortostérico (OSS) en CCR5. (A) Configuración de la tétada de residuos Y371^{3.39}, W86^{2.60}, Y251^{6.51} y E283^{7.39}. (B) Configuración de las réplicas del complejo con maraviroc (MRV), donde se aprecia que la misma orientación del ligando en el sitio ortostérico. (C) Estructura representativa del complejo CCR5-CCL5, indicando las regiones sobresalientes de ambas especies.

El MRV también interactúa con T195^{5.39} mediante los átomos de flúor, como se encontró en la estructura experimental [84], y el triazol experimenta un apilamiento π - π con W86^{2.60}, donde el indol lateral está situado hacia TM3. Un mayor detalle de las interacciones entre CCR5 y los ligandos pequeños se encuentra en las **Figuras C1 y C2** del Anexo C.

La quimiocina CCL5 establece contactos con múltiples residuos y de varias categorías con CCR5 (**Figura C3**). De manera predominante, E283^{7.39} forma interacciones con los átomos de hidrógeno de la cadena principal del *nt* de CCL5, mientras que Y37^{1.39} y W86^{2.60} de OSS, y Y89^{2.63} interactúan con los residuos de la quimiocina (denotados en minúsculas) p25, y26 y s27. La localización profunda de p25 y y26 en OSS permite la interacción de estos residuos con M287^{7.43}, lo que induce rearrreglos locales en TM7 y de esta manera, en la activación de CCR5, como está reportado experimentalmente [267]. Y251^{6.51} mostró una gran fluctuación en su cadena lateral, y un número menor de contactos con CCL5 que el resto de la tetrada, en contraste con el complejo CCR5-MRV. Este fenómeno es determinante en la interacción que este residuo establece con el disyuntor o interruptor de transmisión, W248^{6.48}.

El segmento NT forma predominantemente contactos iónicos con cadenas laterales ionizadas y con la cadena principal; los residuos D2, Y[®]10 y Y[®]14 interactúan con los residuos protonados r40, k68 y r70 de CCL5 (la notación de residuos en minúsculas refiere a la quimiocina). Entre los residuos de CCL5 que establecen contactos, varios son objeto de modificaciones postraduccionales, por ejemplo, s27 y s28 pueden ser glicosilados, m90 puede ser sulfoxidada [268] y el segmento s24-y26 puede ser removido para formar la isoforma RANTES₂₇₋₉₁, lo que involucra múltiples cambios en la naturaleza de las interacciones, y que implica actividades probablemente alternativas o sesgadas. Para detalles más amplios de los contactos entre CCR5 y CCL5, ver la **Figura C3**.

Un hallazgo notable es la interacción de iones Na⁺ con apo-CCR5, pero con ninguno de los complejos (**Figura C5**).

El residuo Y251^{6.51} funge como un tirador del disyuntor adyacente, W248^{6.48}. Este residuo es parte del motivo conservado WXPY [84,267,269], y está descrito ampliamente como un indicador del estado funcional de los GPCRs de clase A [270,271]. La cadena lateral de indol se acopla con OSS mediante Y251^{6.51} y el denominado conector aromático[267] (la región hidrofóbica constituida por Y108^{3.32}, F109^{3.33} y F112^{3.36}, ubicada en el seno de la capa hidrofóbica 1, HL1 [272]). La distancia entre Y251^{6.51} y W248^{6.48} es indicativa del estado del disyuntor de transmisión, debido a que distancias grandes entre ellos implican el posicionamiento del indol hacia TM5 o hacia el poro interhelicoidal. En los sistemas apo-CCR5 y CCR5-MRV, la configuración de Y251^{6.51} y E286^{7.39} son equivalentes, con un desplazamiento de TM7 en la réplica I del complejo respecto a la II del sistema apo (**Figura 13**). Sin embargo, en CCR5-CCL5 Y251^{6.51} accede a rotámeros que dirigen la cadena lateral de indol de W248^{6.48} hacia el entorno del grupo PIF (P206^{5.50}, I116^{3.40} y Y244^{6.44}), debilitando

su interacción con E283^{7.39} y el ligando. Los diedros χ_1 y χ_2 del disyuntor, formados por los planos intersecados que forman los átomos N-C α -C β -C γ y C α -C β -C γ -C δ 1 respectivamente, muestran valores distintivos que esclarecen la torsión de W248^{6.48} relacionada con la activación (**Figura 13**). La activación del disyuntor colapsa la HL1 y determina un remodelamiento del poro interhelicoidal. En nuestra simulación extendida de 1 μ s y en la GaMD de CCR5-CCL5, la torsión de W248^{6.48} es consistente con la alcanzada hacia los 600 ns de la simulación cMD. En la simulación extendida, la torsión se mantiene hasta el final, mientras que, en la acelerada gaussiana, esta configuración se alcanza desde el inicio del muestreo modificado (**Figura C5**), confirmando la preponderancia de esta torsión para la activación de CCR5. La simulación GaMD de apo-CCR5 presentó la misma torsión en el disyuntor que los primeros 230 ns de la simulación cMD, fenómeno que sugiere que, con el muestreo convencional, el sistema tiende a características no activas, que en el muestreo acelerado no son accesibles.

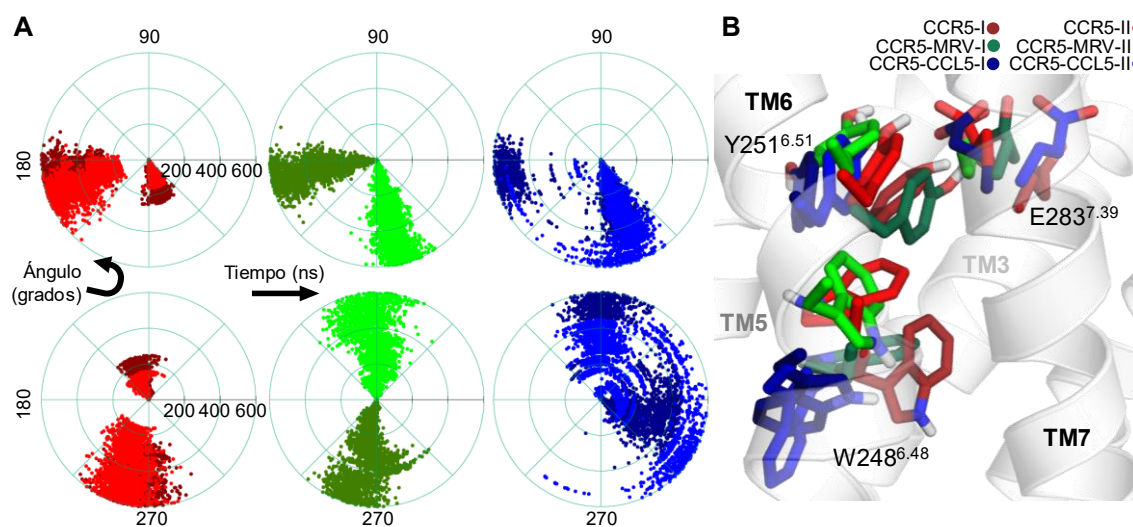


Figura 13. Torsiones del disyuntor de transmisión y su relación con el OSS. (A) Gráficos polares de los ángulos diedros χ_1 (N-C α -C β -C γ) y χ_2 (C α -C β -C γ -C δ 1) para el residuo W248^{6.48}. (B) Configuración de W248^{6.48}, Y251^{6.51} y E283^{7.39}, donde se observa que la ruptura de interacción entre los residuos del OSS desplaza la tirosina hacia el triptófano y le induce la rotación hacia TM5.

La penetración de moléculas de aguas en el poro interhelicoidal caracterizan la activación de CCR5

El colapso de la HL1 en CCR5-CCL5 conduce al ingreso de moléculas de agua desde el OSS y a través del poro interhelicoidal, hidratando el camino hacia el sitio central de coordinación (CSS) en el centro del receptor, donde se encuentra el residuo conservado D76^{2.50}. En contraste, en el sistema CCR5-MRV, el patrón de moléculas de agua genera una región deshidratada en HL1 (**Figura 14**). Para cuantificar estos hallazgos, calculamos el número de moléculas de agua en el poro a través de segmentos axiales en z, cada 0.5 nm y cada 100 ns para los dos sistemas. El sistema inactivo mostró una presencia global menor de moléculas de agua en el poro transmembranal, de

manera marcada en HL1. En el paso acuoso continuo en CCR5-CCL5, la capa hidrofóbica 2 (HL2 [272]) constituye un cuello de botella que se encuentra estrechado al inicio de la simulación, y posteriormente se relaja. La HL2 comprende varios residuos hidrofóbicos como L69^{2.43}, L72^{2.46}, I119^{3.43}, L122^{3.46}, M210^{5.54}, Y214^{5.58}, L236^{6.36}, I237^{6.37}, I240^{6.40} y Y297^{7.53}. Estos residuos son parte también de dos regiones funcionales. El par formado por L236^{6.36} e I237^{6.37} representan un disyuntor hidrofóbico cuya configuración determina las características del cuello de botella (**Figuras C5-C7**). Cuando las cadenas laterales de estos residuos se desplazan, debido a una rotación de TM7, como el análisis de componentes principales (PCA) mostró (**Figura C8**), HL2 colapsa y las moléculas penetran desde el CSS hacia la región asociada al disyuntor iónico, una región adyacente formada por Y214^{5.58} y Y297^{7.53}, parte de HL2; y R126^{3.50} y R235^{6.35}.

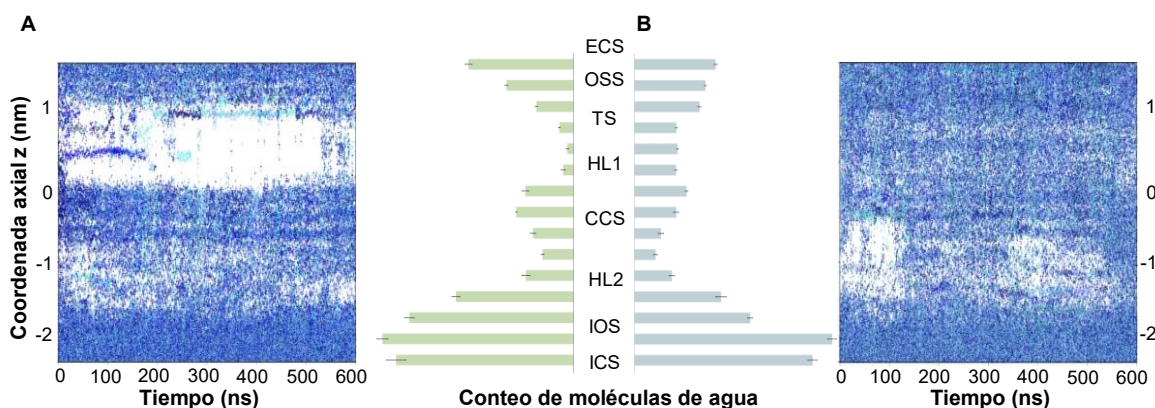


Figura 14. Perfiles dinámicos de agua en el poro interhelicoidal. Los puntos azules representan moléculas de agua en el poro. Gráficos de dispersión de moléculas de agua a través del tiempo, a lo largo de la coordenada axial z (nm), y barras de número de moléculas de agua para (A) CCR-MRV y (B) CCR5-CCL5₂₄₋₉₁. ECS: Sitio extracelular, OSS: sitio ortostérico, TS: disyuntor de transmisión, HL1: primera capa hidrofóbica, CCS: sitio central de coordinación, HL2: segunda capa hidrofóbica, IOS: cinturón iónico, ICS: sitio intracelular.

La péntada constituida por D125^{3.49}, R126^{3.50}, Y214^{5.58}, R235^{6.35} y Y297^{7.53} son capaces de formar varias interacciones pareadas, algunas de ellas relacionadas con la rotación de TM6 y la presencia de moléculas de agua en el poro (**Figura C9**).

La interacción iónica entre R232^{6.32} y E302^{YXT} predomina en CCR5-CCL5, mientras que es bastante infrecuente en apo-CCR5. Los rotámeros que dirigen la cadena lateral de L236^{6.36} hacia el poro son recurrentes en el sistema apo, mientras que en los complejos con MRV y CCL5, estos despejan el poro. Estas interacciones sugieren un reordenamiento de la región IC de TM3 y TM5-TM7. La presencia de moléculas de agua en la parte IC del poro parece estar relacionada con varias de estas interacciones y desplazamientos.

El mecanismo de activación de CCR5 involucra un empuje de Y251^{6.51} hacia W248^{6.48}, una inclinación de apertura IC de TM5 y TM6, y una modificación del disyuntor iónico como camino de propagación de información del sitio ortostérico a las regiones internas de CCR5.

El análisis de correlación cruzada de los átomos Cα en CCR5-CCL5, muestran que un grupo de residuos en TM1, TM2 y YXT forman una comunidad altamente correlacionada con CCS, que se puede interpretar como el movimiento concertado de TM1 y TM2 por el giro de YXT (**Figura C8**). Los valores negativos de correlación cruzada involucran tres grupos de residuos:

- a) El subdominio en TM1-TM3, de CCS a EC, incluyendo Y108^{3.32} y la flexión helicoidal en TM1,
- b) La parte EC de TM6 con YXT,
- c) Los dos subdominios de los segmentos IC de TM5 con TM6 (**Figura C10**).

Estos hallazgos muestran un movimiento concertado entre el entorno de Y108^{3.32} y D76^{2.50}, y con esto, el OSS y el CSS, la apertura del poro por el movimiento divergente de la parte EC de TM6 con el descenso IC de YXT, y los movimientos coordinados de vaivén de las partes IC de TM5 y TM6, que también es evidente en el PCA.

El análisis de la red de comunidades entre los diferentes sistemas sugiere diferencias múltiples en la dinámica del receptor. Las comunidades más grandes indican movimientos coordinados, como en CCR5-MRV, que son consistentes con las características de deshidratación del poro. En contraste, las comunidades fragmentadas pueden estar relacionadas con la dinámica de las moléculas de agua a través del poro (**Figura C11**). Debido a que en apo-CCR5 el poro permanece relativamente deshidratado, la ausencia de ligando y la coordinación con Na⁺ pueden ser causantes de la mayor cantidad de comunidades en este sistema. Encontramos que en el sistema CCR5-MRV se encuentran comunidades que involucran un gran número de residuos, distintas a los otros sistemas. Sin embargo, las redes de correlación responden a múltiples variables y no sólo la presencia o permanencia de moléculas de agua. Analizamos los caminos de propagación de información más cortos entre subdominios de CCR5 siguiendo dos directrices: el análisis de toda la cadena principal, y del dominio transmembranal (TMD) incluyendo ICLs y ECLs. Considerando los subdominios EC e IC como extremos, encontramos que el NT participa en dichas vías, incluyendo los dos residuos Y[®]10 y Y[®]14, la parte EC de TM1, ECL2 y el OSS, pasando a través de TM2, TM5, TM6 y YXT, cruzando varias regiones importantes, pero excluyendo algunos residuos clave como D76^{2.50}, E283^{7.39}, W248^{6.48} o Y297^{7.53}. Sin embargo, en el análisis del TMD con OSS y el disyuntor iónico como extremos, las vías de propagación incluyen todos los residuos notables mencionados anteriormente (incluyendo aquellos del OSS, el disyuntor de transmisión, la HL1, el CCS y el disyuntor iónico, **Figura 15**). En el análisis de la red de vías del TMD, TM1-3, TM6-7 y YXT son regiones importantes para la propagación de la correlación, y en menor medida, TM5. Efectuando la búsqueda de conexiones entre múltiples regiones, establecimos como extremos zonas en TMD que reveló información importante entre diferentes disyuntores. Estas vías comunican regiones como el OSS y el par iónico R232^{6.32}-E302^{YXT} (**Figura C12**).

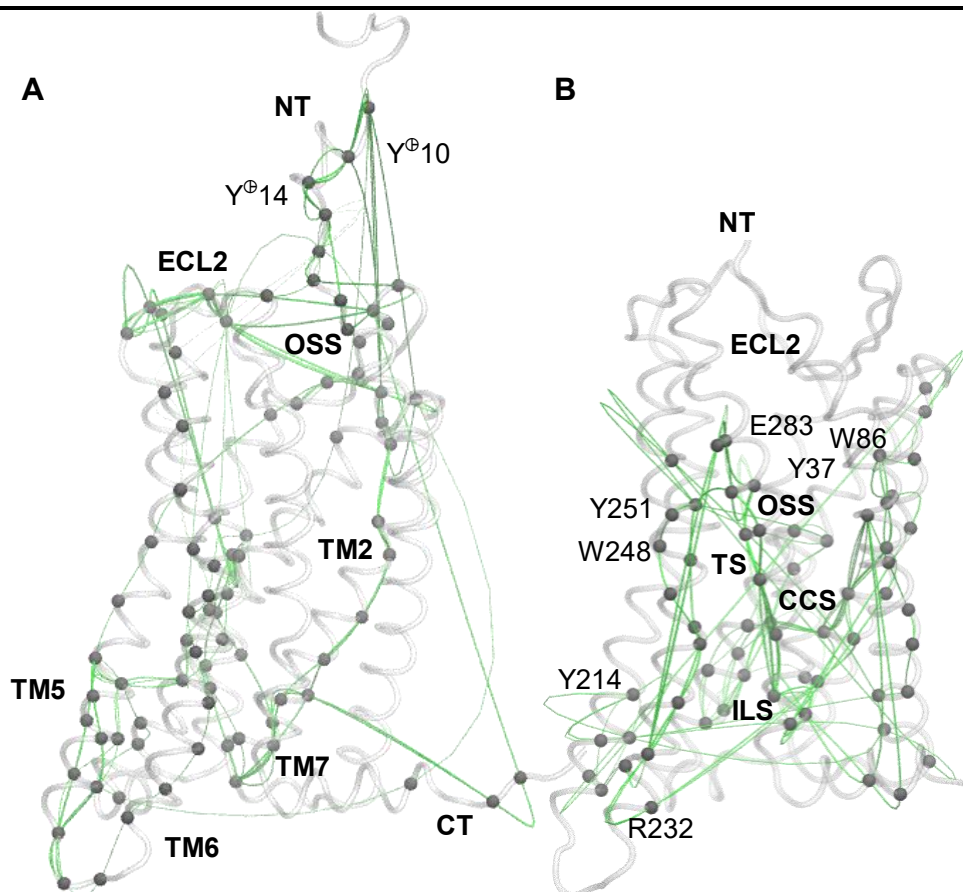


Figura 15. Vías de propagación de información en CCR5 para la activación en el complejo CCR5-CCL5₂₄₋₉₁. Las trayectorias en color verde representan la propagación de la correlación entre los átomos de carbono α . (A) Considerando toda la cadena principal, y (B) el TMD y las asas extra e intracelulares. TM: hélice transmembranal, NT: amino terminal, CT: carboxilo terminal, ECS: Sitio extracelular, OSS: sitio ortostérico, TS: disyuntor de transmisión, HL1: primer capa hidrofóbica, CCS: sitio central de coordinación, HL2: segunda capa hidrofóbica, IOS: cinturón iónico, ICS: sitio intracelular.

Integrando todos los resultados, encontramos que el mecanismo del agonista inverso parcial, MRV, involucra primariamente la interacción E283^{7.39}-Y251^{6.51}, la rotación de W248^{6.48} hacia el poro o hacia TM7, así como la HL1 y su entorno deshidratado. La geometría abarrilada adoptada por el TMD impone distancias mayores y ciertos rotámeros en algunos residuos de la péntada asociada al disyunto iónico. El sistema apo-CCR5 comparte varias características con el sistema inactivo, pero algunas de ellas son distinguibles, como la deshidratación de HL2 y la interacción con Na⁺, ausente en los otros sistemas. Para el sistema de la quimiocina CCL5, el mecanismo de activación implica una extensa red de residuos localizados en el OSS, mediante Y251^{6.51} y W248^{6.48} como un puente de comunicación, afectando y colapsando la HL1 y permitiendo el ingreso de moléculas de agua hacia el poro interhelicoidal. Esta característica distintiva en el sistema CCR5-CCL5 en activación, influye el rearrreglo de la parte IC del receptor, con movimientos clave, como la rotación de segmentos

helicoidales, movimientos coordinados de vaivén y curvatura de segmentos de hélices; y al nivel aminoacídico, encontramos que las torsiones y las interacciones en residuos clave, en conjunción con el resto de los eventos conformacionales, resultan en el colectivo conformacional del receptor CCR5 activo, y desacoplado de transductores como son las proteínas G. No obstante, los hallazgos de activación que reportamos concuerdan con los descritos para colectivos activos de GPCRs de clase A. En adición a esta concordancia, comparamos la estructura experimental de CCR5 con la variante modificada de CCL5, el superagonista [6P4]-CCL5 depositado en PDB posterior a la fecha de inicio del presente estudio (PDB ID: 7O7F [267]) para identificar similitudes. Encontramos que la desviación no estándar ponderada con masas atómicas (RMSD), de la posición respecto a la estructura 7O7F para la simulación extendida de 1 μ s, disminuye de 0.33 a 0.15 nm (**Figura C13**), demostrando una convergencia factible de nuestro colectivo conformacional de CCR5-CCL5 con el complejo experimental activo, aún en la ausencia de la proteína G.

Las características estructurales de CCR5 inducidas por el agonista inverso parcial MRV, son distintas a las producidas por los antagonistas C21 y C34.

Las simulaciones de los sistemas en complejo con los antagonistas C21 y C34 exhiben características muy similares al estado basal de apo-CCR5. A partir del análisis de agrupamiento, en los complejos con C21 y C34 mostraron conformaciones análogas en TM5 y TM6. La estructura general del complejo CCR5-C21 y CCR5-C34 no adoptó una geometría abarrilada (**Figura C14**). Sin embargo, la orientación del disyuntor de transmisión en el complejo con C21 es equiparable con la réplica CCR5-MRV-II, mientras que para el complejo CCR5-C34, el rotámero es similar a la réplica CCR5-MRV-I, ambos en estados no activos. Las interacciones de ambos antagonistas, encontramos patrones similares a aquellos del colectivo CCR5-MRV, como la torsión de W86^{2,60} y el puente de hidrógeno entre Y37^{1,39} y el triazol de los ligandos. El antagonista C34 experimentó un desplazamiento dentro del OSS que ocasionó la ruptura del puente iónico entre E283^{7,39} y el tropano protonado, en favor de la interacción con Y108^{3,32} (**Figuras C2 y C14**). Los complejos de C21 y C34 presentaron deshidratado el poro interhelicoidal, como la clase no activa (**Figura C5-C7**).

Conclusiones sobre el receptor CCR5

Utilizando simulaciones atomísticas extensivas, identificamos los cambios conformacionales inducidos por la actividad de un agonista inverso parcial, que son claramente distintivas de aquellas desencadenadas por antagonistas. Aunque comparten similitudes, consideramos que estos cambios constituyen un estado funcional de CCR5 dentro del espectro de estados funcionales de los GPCRs. De esta manera, en presencia del agonista inverso parcial MRV, el receptor alcanza un estado inactivo, mientras que los complejos con los antagonistas C21 y C34 culminaron en estados antagonizados o estativos.

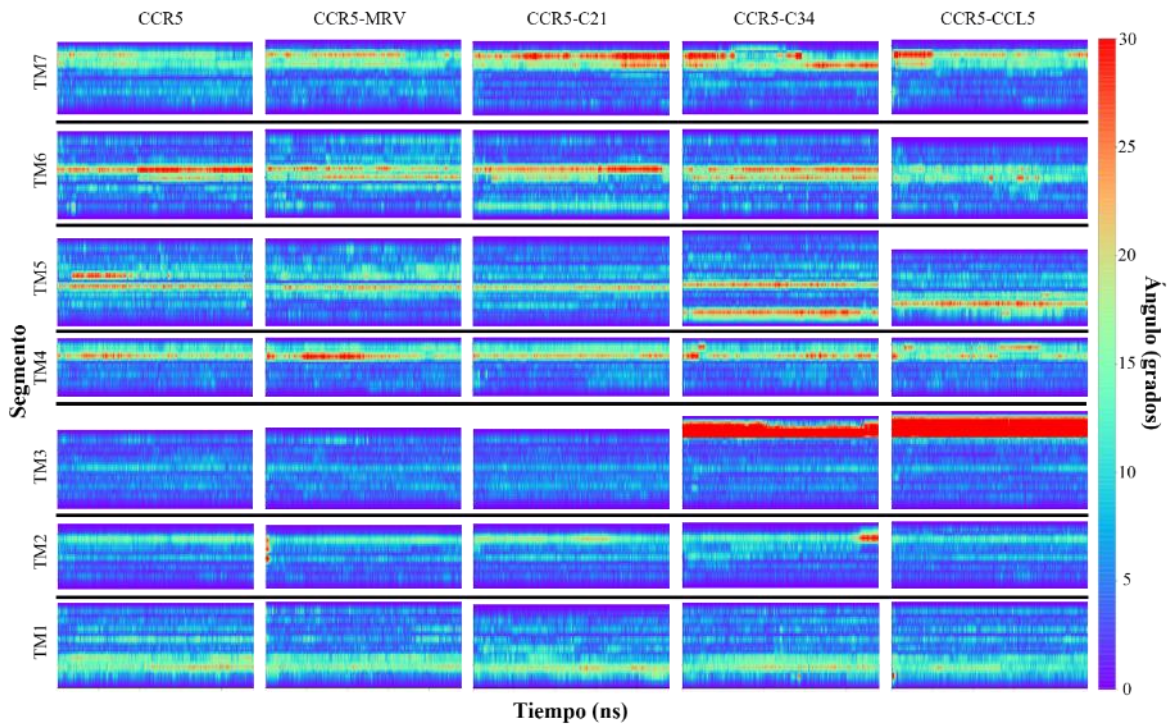


Figura C1. Curvatura de las hélices transmembranales en los cinco sistemas de CCR5, en grados respecto al eje helicoidal, a través del tiempo de simulación. En los sistemas de apo-CCR5 y CCR5-MRV con CCR5-C21, las curvaturas en las hélices son similares, a pesar de sus múltiples diferencias. En contraste, los sistemas CCR5-C34 y CCR5-CCL5 exhibieron una extensión en TM3 hacia el lado EC, que indujo una torsión importante al convertirse en ICL2.

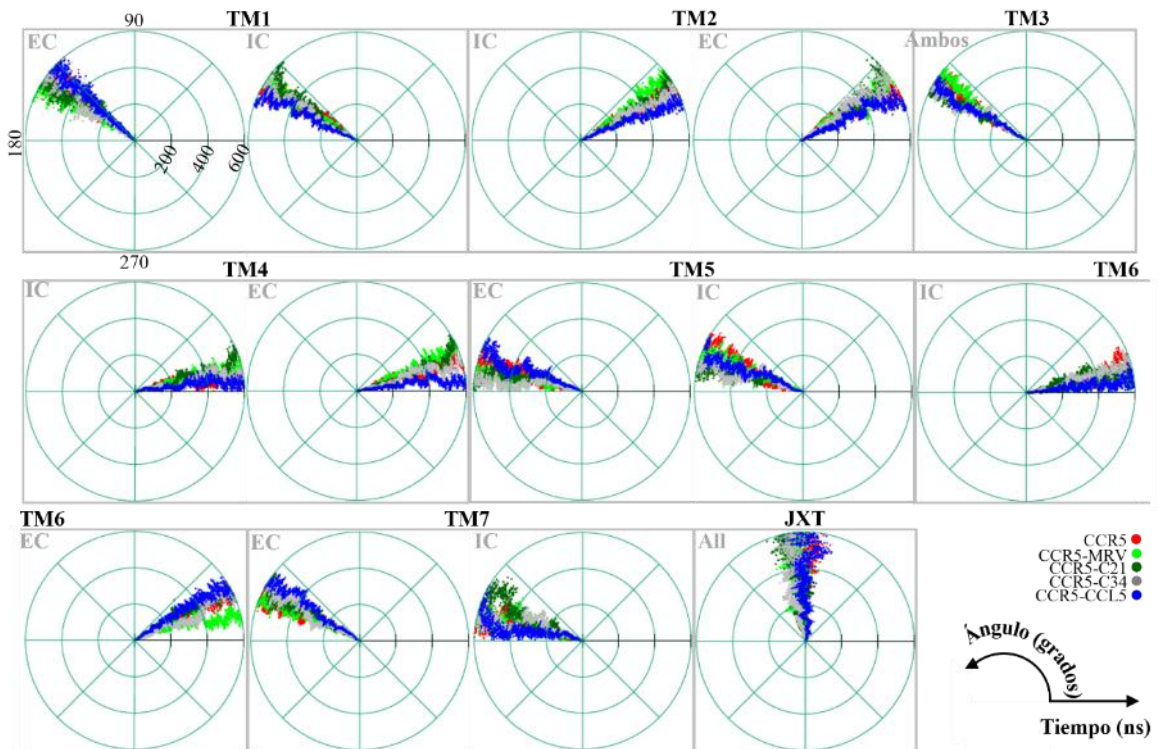


Figura C2. Ángulos de inclinación de las hélices. La selección de los segmentos para el cálculo de la inclinación se basó en la helicidad por residuo, particularmente ante los dobleces, en el tiempo de simulación. Los diagramas circulares muestran las porciones EC e IC, excepto para TM3 y H8. Las diferencias más notables son: TM1-EC entre MRV y CCL5, TM1-IC entre C21 y CCL5, TM2-IC entre MRV y CCL5, TM2-EC entre C34 y CCL5, TM3 entre MRV y C34, TM4-IC entre C21 y CCL5, TM4-EC entre MRV y CCL5, TM6-EC entre MRV y CCL5, TM7-EC entre apo y CCL5, TM7-IC entre C21 y CCL5, y H8 entre apo y MRV, C21 y C34. Los hallazgos relevantes incluyen la diferencia en la inclinación entre el sistema inactivo con el sistema activo, máxima en TM4, TM5, TM6 y TM7; la diferencia en apo en TM5, TM6-IC y TM7; y las múltiples diferencias entre los complejos con MRV, C21 y C34.

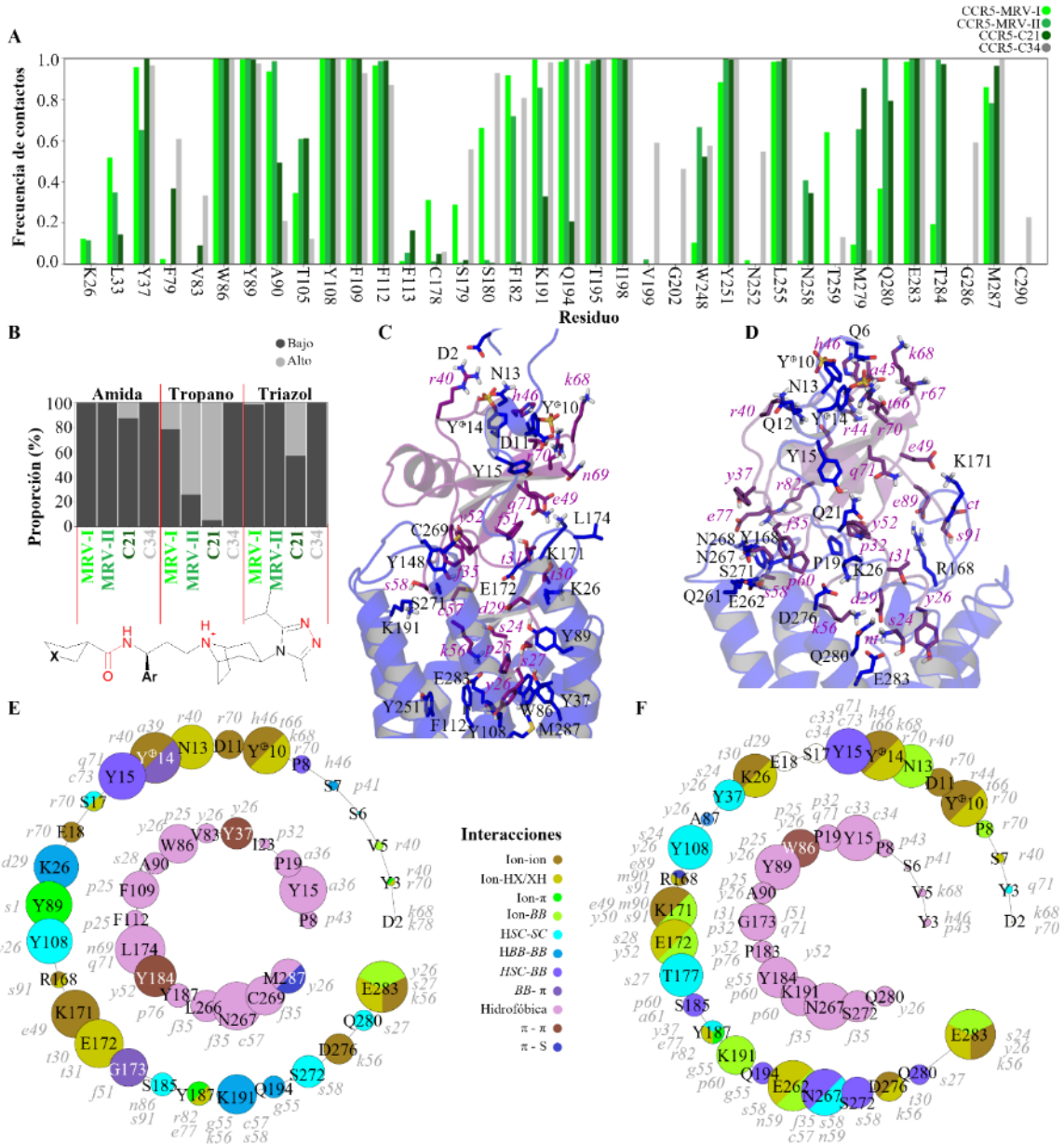


Figura C3. Contactos ligando-receptor en los complejos.

(A) Gráfico de barras de distancias escaladas (menores a 4.5 Å) entre los tres sistemas de moléculas pequeñas, MRV (réplicas I y II), C21 y C34 con cada residuo de CCR5. (B) Gráfico de la proporción

ANEXO C: ESTUDIO DEL RECEPTOR 5 DE β -QUIMIOCINAS CCR5

de la distancia de los grupos amida, tropano y triazol, respecto a las estructuras experimentales. (C) Interacciones de CCL5 en los conformeros representativos de las réplicas I y II. Los residuos de la quimiocina se indican en minúsculas e *itálicas*. (D) Gráfico de los tipos de interacciones en los complejos CCR5-CCL5. El anillo interno muestra los contactos hidrofóbicos, y el externo los contactos polares. Cada color representa el tipo de interacción, y el tamaño relativo de cada círculo indica la cercanía del residuo del receptor con la quimiocina.

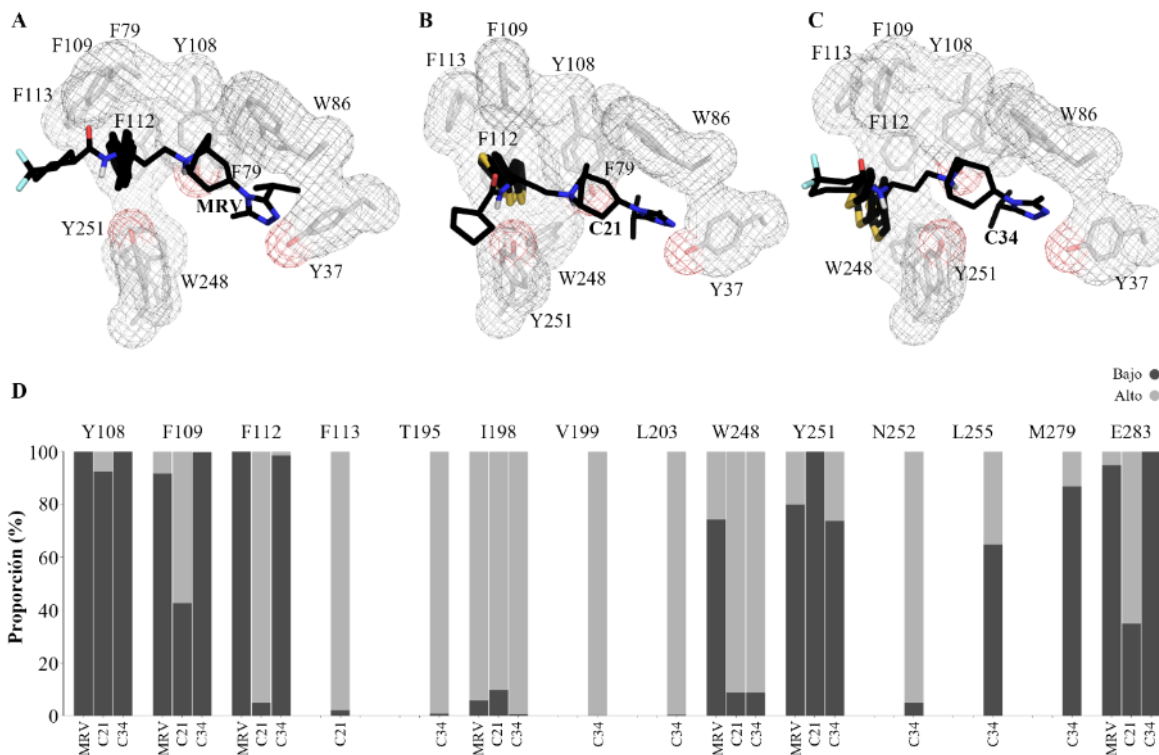


Figura C4. Interacciones entre los ligandos y los residuos aromáticos de la capa hidrofóbica 1 (HL1). (A) MRV, (B) C21, y (C) C34. Los tres ligandos se posicionan con el anillo de areno hacia HL1, y en los casos de MRV y C21, están rodeados por F109 y F113 del lado de TM3, W248 y Y251 del lado de TM6, y F112 en un entorno hidrofóbico entre TM3, TM5 y TM6. EN el caso de C34, el anillo tienilo se desplaza del ambiente hidrofóbico, y se expone hacia el lado interhelicoidal de TM5 y TM6. (D) Gráfico de barras, agrupadas por sistema, indicando la proporción de mayor o menor distancia de cada residuo respecto al areno de los ligandos, con la distancia de las estructuras experimentales como referencia. El fenilo de MRV sólo mostró un distanciamiento considerable de I198, mientras que permaneció próximo al resto de los residuos. C21 mostró un leve alejamiento de todos los residuos excepto Y251, en comparación con los otros dos ligandos. C34 estableció contactos con varios residuos que las otras moléculas no contactaron, como T195, V199, L203, N252, L255 y M279, estando los dos últimos más cercanos que en la estructura de referencia.

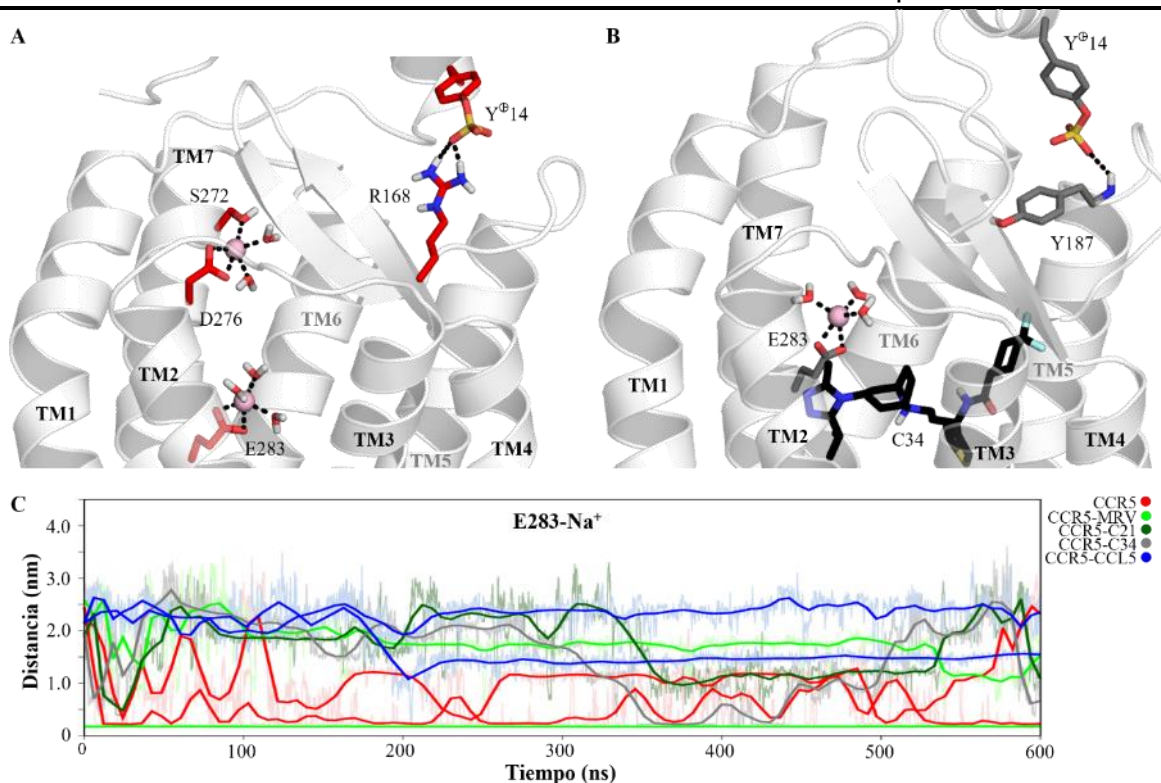


Figura C5. Coordinación de Na^+ con E283^{7,39} en el sitio ortostérico. (A) Apo-CCR5 (réplica I), y (B) CCR5-C34. D276 y S272 coordinaron un ion Na^+ en el sistema apo-CCR5. Los residuos de tirosina sulfato (Y14) no caracterizó la actividad necesaria para coordinar al catión, debido a sus interacciones con (A) R168, o (B) la cadena principal de Y187. (C) Distancia mínima entre E283 e iones Na^+ .

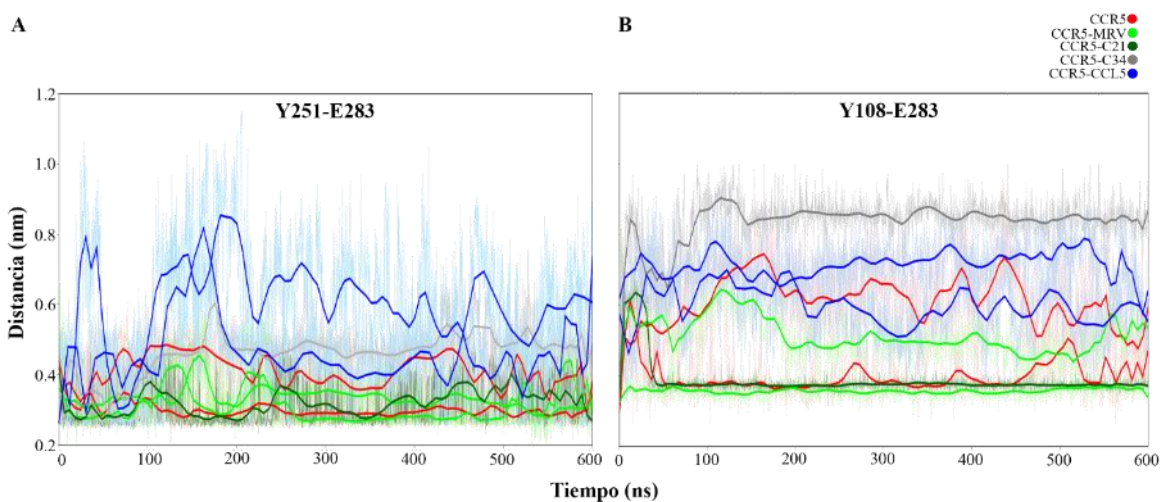


Figura C6. Distancias mínimas de E283 en el sitio ortostérico. Distancia con (A) Y251 y (B) Y108. En el complejo CCR5-CCL5, Y251 se alejó de E283 hacia W248 en mayor medida que en otros sistemas, y en menor grado en CCR5-MRV y CCR5-C21. Y108 permaneció cercano aa E283 en CCR5-C21 y apo-CCR5, mientras que se desplazó considerablemente en CCR5-CCL5 y CCR5-C34, sugiriendo que la quimiocina no es estéricamente la inductora de la separación del par.

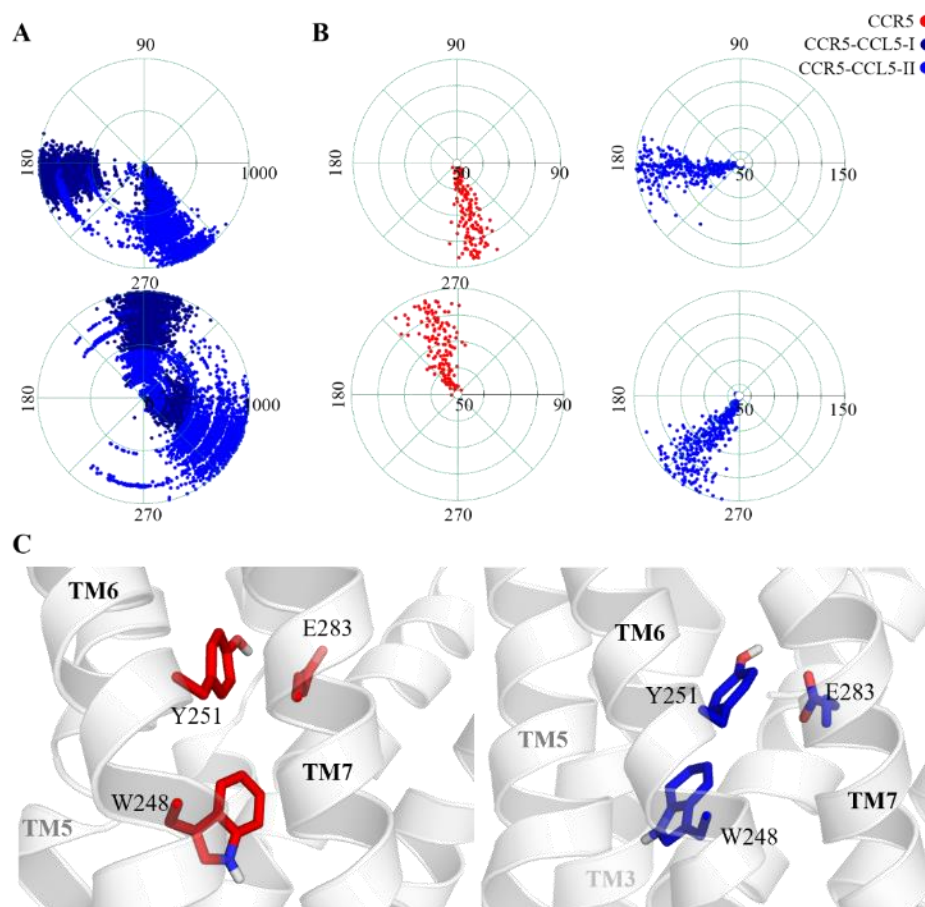


Figura C7. Ángulos diedros χ_1 y χ_2 de W248^{6,48} en los sistemas apo-CCR5 y CCR5-CCL5. (A) En la simulación extendida de 1 μ s de CCR5-CCL5-I, donde permaneció la torsión relacionada con la activación, que se alcanzó desde la versión de 600 ns. (B) En la simulación acelerada para ambos sistemas. Los dos ángulos diedros son consistentes con la simulación convencional hasta el cambio a los 230 ns, sugiriendo una ausencia de cambio de estado en el disyuntor de transmisión. Para el complejo de la quimiocina, el ángulo χ_1 alcanzó la misma configuración que en la simulación convencional a los 440 ns, y el ángulo χ_2 adquirió valores diferentes. (C) Configuración de la cadena lateral de indol orientada hacia TM5 y el poro acuoso en la simulación convencional de CCR5-CCL5-II. En el sistema apo, la configuración es muy similar a aquella de cMD.

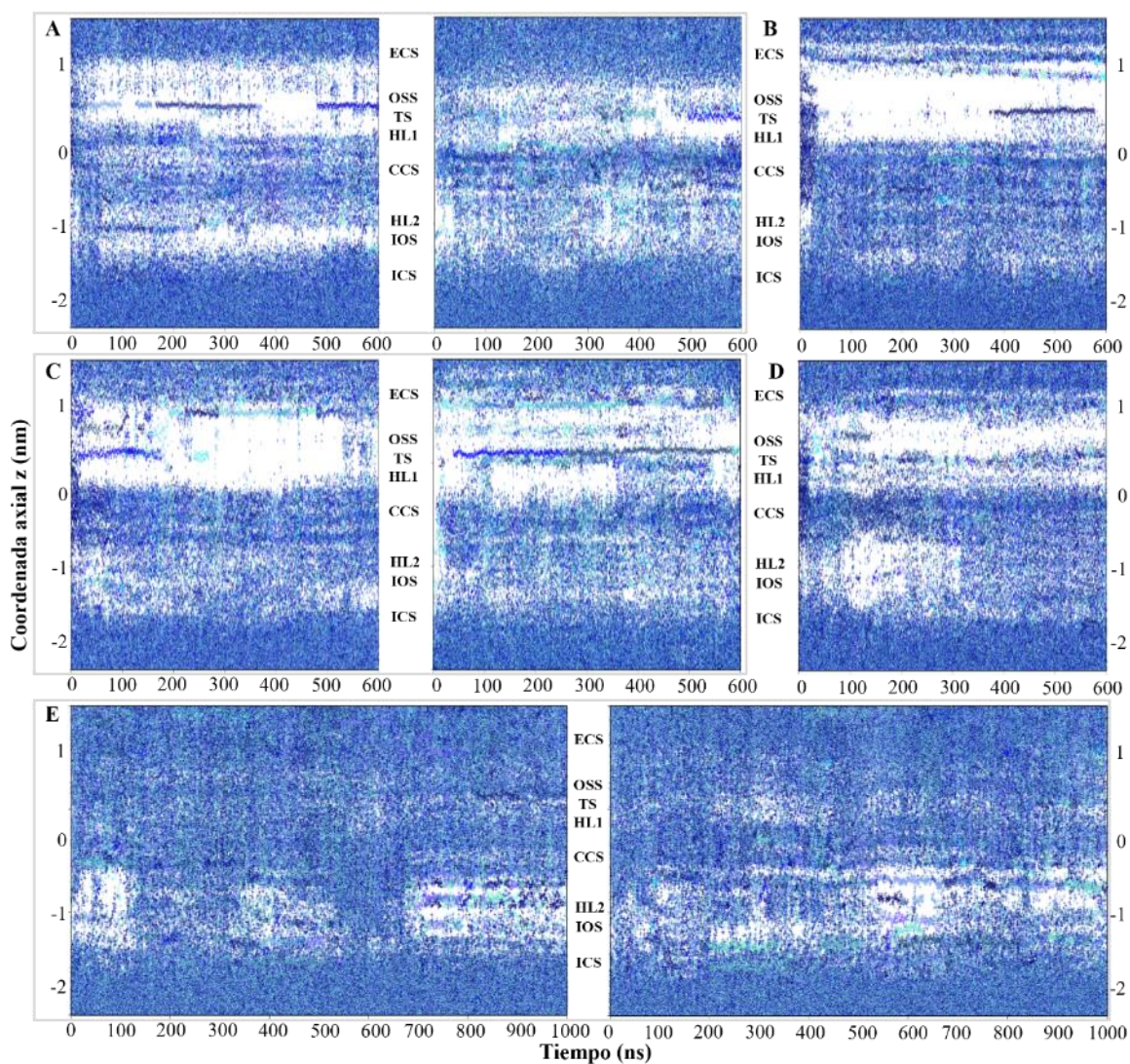


Figura C8. Presencia de moléculas de agua en el poro interhelicoidal. (A) Réplicas apo-I y apo-OO, y los sistemas de moléculas pequeñas. (B) C21, (C) MRV-I y -II, (D) C34, y (E) CCL5-I y -II. Las regiones HL1 y CCS permanecen similares en los cuatro sistemas en esta representación, con un patrón de mayor hidratación en CCR5-C34. El sistema apo presentó un estrechamiento y constante deshidratación de la región HL2, mientras que los complejos con MRV, C21 y C34 presentaron patrones variables en esta sección. El complejo con C21 experimentó mayor hidratación en HL2, y el complejo con C34 mostró una extensa región deshidratada entre CCS y HL2, por aproximadamente 300 ns de la simulación.

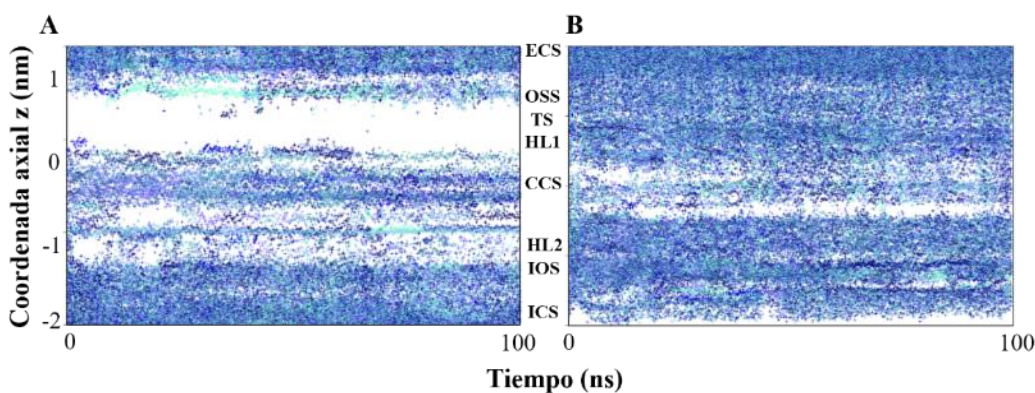


Figura C9. Presencia de moléculas de agua en las simulaciones aceleradas GaMD. (A) APo-CCR5 y (B) CCR5-CCL5. En el primer sistema, las zonas deshidratadas permanecieron, mientras que en el segundo, se alcanzó un patrón de hidratación muy similar a aquel en cMD.

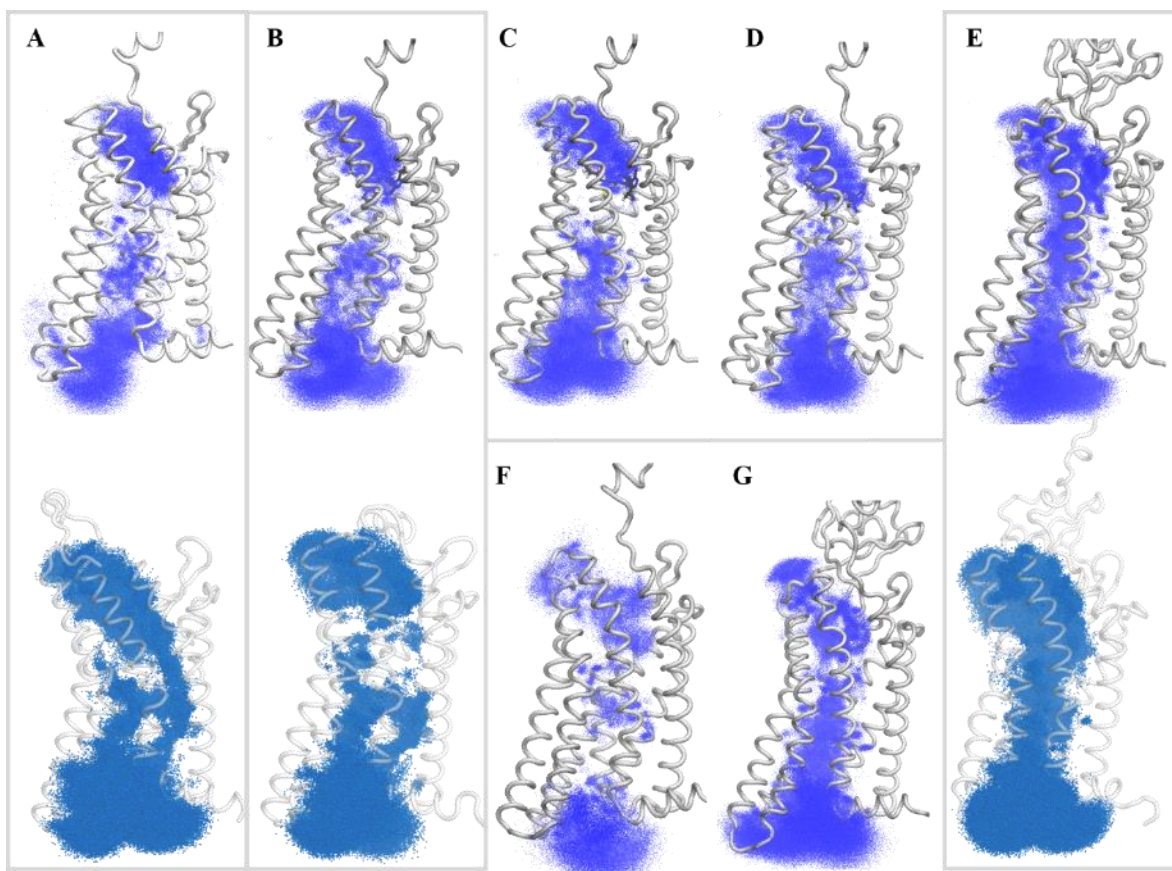


Figura C10. Presencia acumulada de moléculas de agua en cada sistema. Para las simulaciones cMD: (A) Apo-CCR5-I y -II, (B) CCR5-MRV-I y -II, (C) CCR5-C21, (D) CCR5-C34, y (E) CCR5-CCL5-I y -II. Para los muestreos GaMD: (F) apo-CCR5 y (G) CCR5-CCL5. En los sistemas no activos, fue evidente la interrupción del paso continuo de agua, principalmente en HL2, y en menor medida en HL1. En la simulación GamD, el complejo con la quimiocina alcanzó un paso continuo de agua por el poro interhelicoidal.

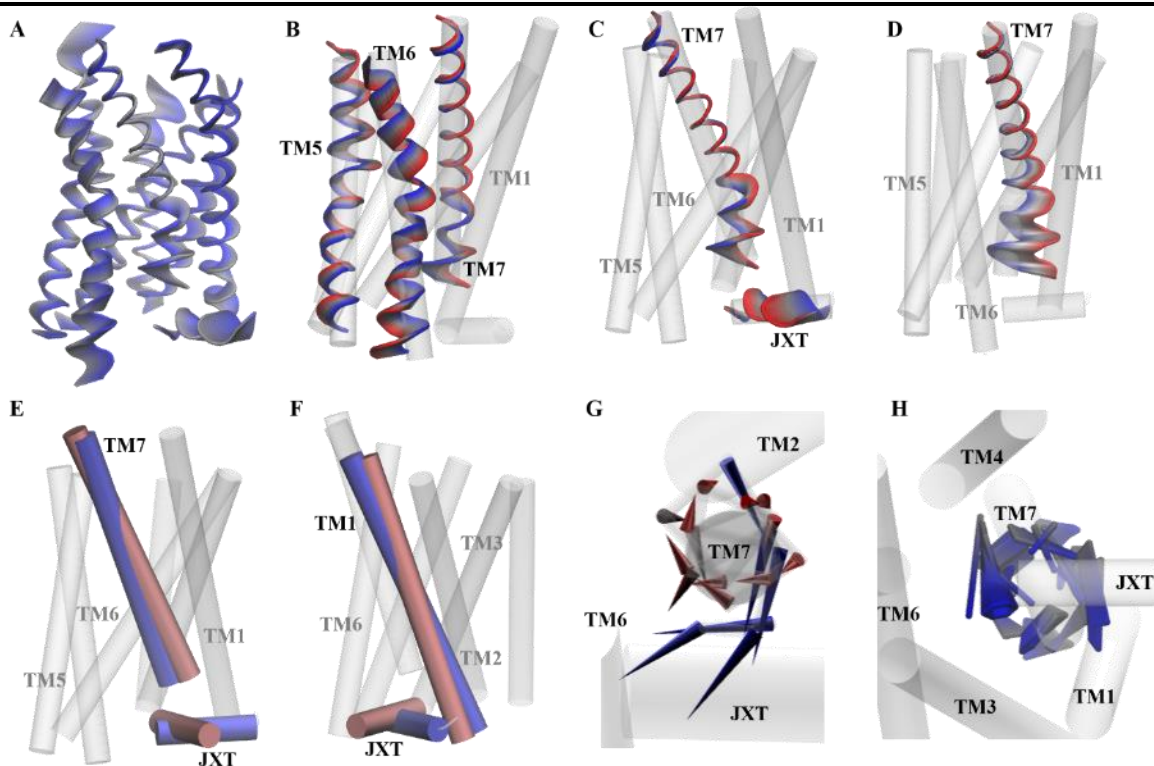


Figura C11. Modos principales de las TMs en el sistema CCR5-CCL5-I. En la escala de color, el movimiento inicia en los tonos rojizo y gris, y termina en el azul. (A) Modo principal 1 de TMD, representando el 35.83% de la varianza total. (B) Modo principal 1 en TM5, TM6 y TM7, que muestra el desplazamiento distintivo entre las partes EC e IC de cada hélice. La parte EC de TM5 realizó un giro hacia en sentido antihorario, mientras que la parte IC hizo un desplazamiento hacia TM6. La parte EC de TM6 se aleja de TMD, y la región EC y el segmento IC realizaron una torsión de tipo tijereteo hacia TM7, y hacia la región superior. La sección IC de TM7 se desplazó hacia TM6 con una torsión. (C) La hélice H8 y la porción adyacente de TM7 efectuaron un estrechamiento antisimétrico, donde H8 se movió hacia TM1, empujándola. (D) El modo principal 2 de TM7 mostró un desplazamiento largo de su parte IC hacia el poro interhelicoidal. (E) Los movimientos global de TM7 en el modo principal 1 reveló un desplazamiento antisimétrico con H8, TM7 hacia el poro y H8 hacia TM1, donde (F) es desplazada hacia TM2. (G) El giro de la parte IC de TM7 se tipificó en sentido horario, como se evidenció en la representación de espinas de la cadena principal. (H) Las cadenas laterales de la misma región giraron como la cadena principal, excepto Y297, cuya cadena de movió hacia la otra dirección. Así, este movimiento opuesto condujo al posicionamiento de Y297 en medio del poro.

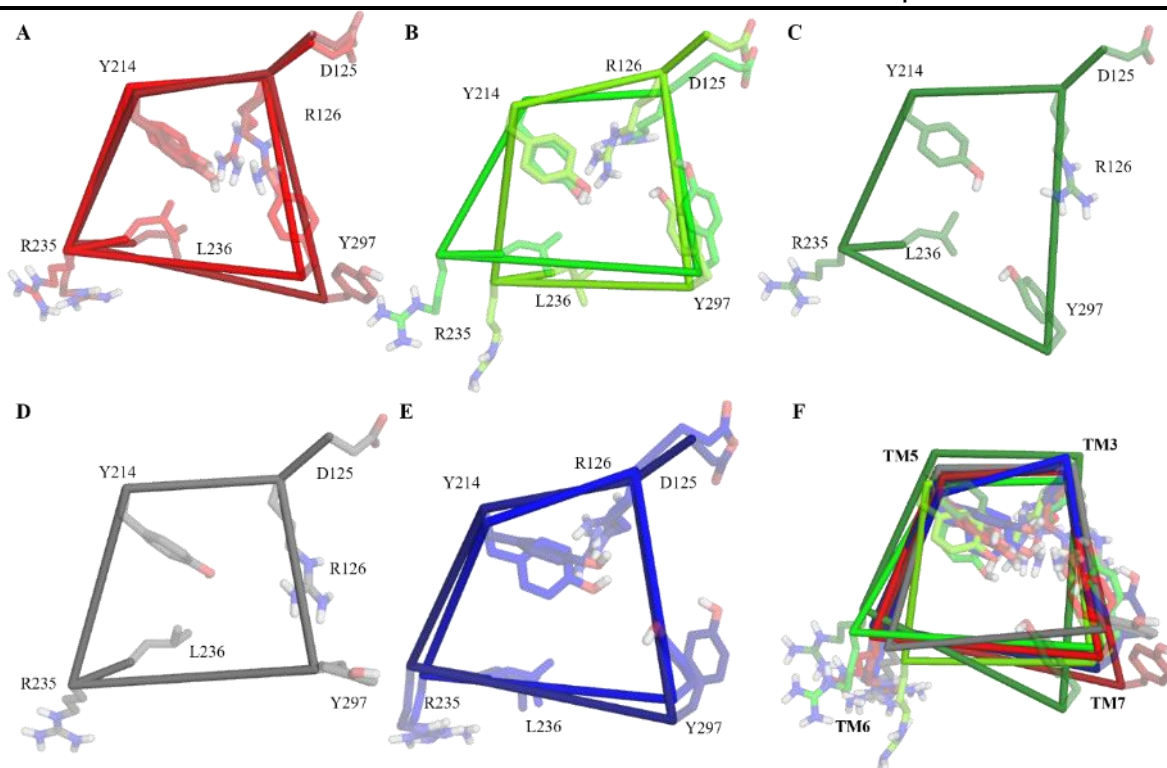


Figura C12. Residuos asociados a la compuerta iónica. Residuos D125^{3.49}, R126^{3.50}, Y214^{5.58}, R235^{6.35}, Y297^{7.53} y L236^{6.36}, para (A) apo-CCR5, (B) CCR5-MRV, (C) CCR5-C21, (D) CCR5-C34, (E) CCR5-CCL5, y (F) todos los sistemas. Los cuadriláteros representan la distancia media entre los C α en TM3, TM5, TM6 y TM7, respectivamente. Las características notables son las distancias mayores entre (1) R126 y Y214 en CCR5-MRV, (2) Y214 y R235 en CCR5-MRV, (3) R235-Y297 en apo-CCR5, CCR5-C21 y CCR5-CCL5, y (4) Y297 y R126 en CCR5-C21. Los rotámeros que desplazan al residuo L236 hacia el poro son frecuentes en el sistema apo, así como en los complejos con C21 y C34, mientras que en MRV y CCL5 se aleja este residuo del poro.

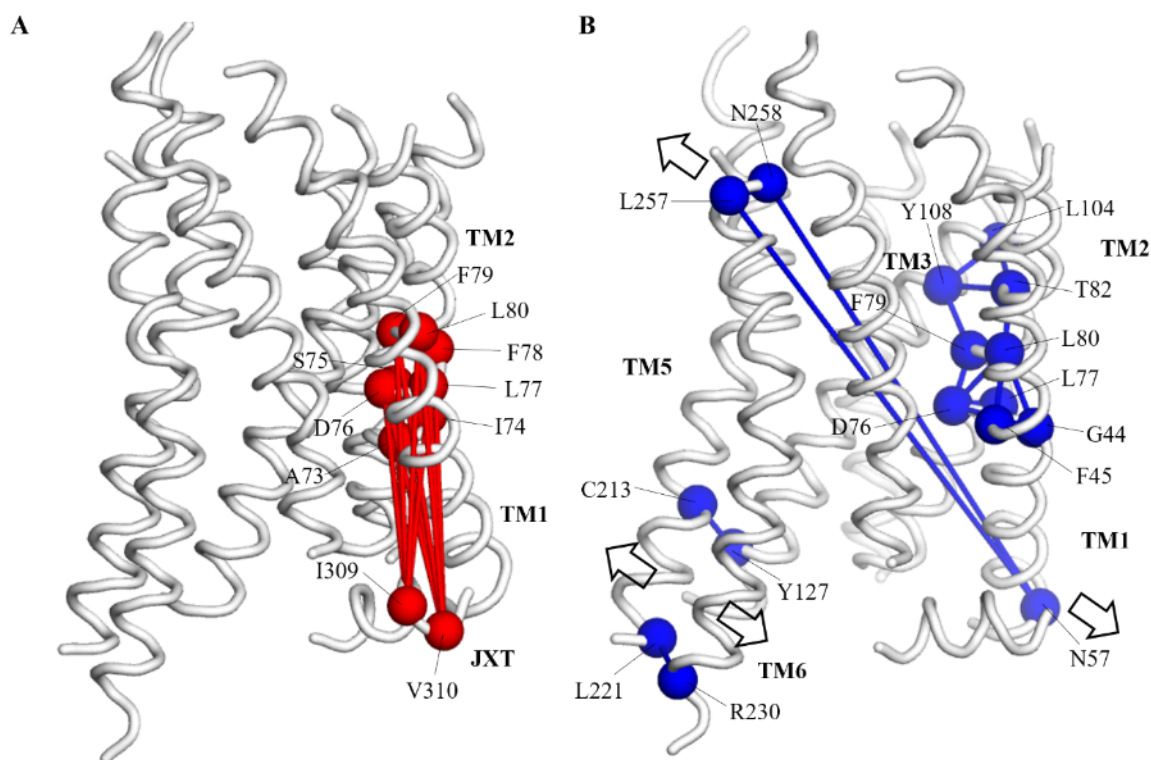


Figura C13. Correlación cruzada de Pearson a través del tiempo, para los C α de las TMs en CCR5-CCL5-I. Los valores significativos de (A) correlación cruzada positiva, entre 0.6 y 0.8, y (B) valores negativos, entre -0.6 y -0.8. Estas correlaciones positivas están localizadas en TM1, TM2 y H8, del CCS a la zona IC, y está relacionada con el modo principal 1 en esta región. Las correlaciones negativas involucraron residuos de TM1, TM2 y TM3, del CCS hacia el lado EC, así como dos residuos en TM6-EC y uno en TM1-IC, sugiriendo una apertura del poro y la adquisición de una geometría trapezoidal en el receptor. Entre TM5 y TM6, en el lado IC, dos zonas correlacionadas incluyen Y127 del motivo DRY, y la parte distal de ambas hélices en la cara IC, sugiriendo una flexión tipo tijereteo entre TM5 y TM6.

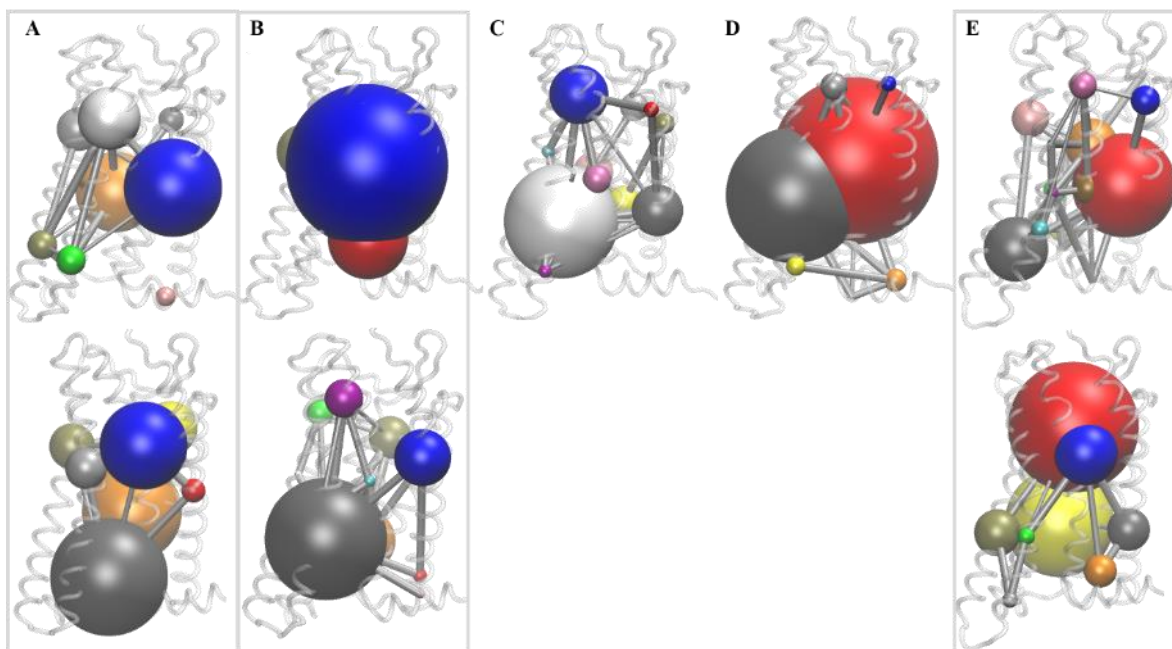


Figura C14. Análisis de comunidades en la región TMD de los sistemas de CCR5. Cada comunidad representa una correlación de Pearson mayor y densa entre los átomos C α de los residuos constituyentes, para (A) apo-CCR5, (B) CCR5-MRV, (C) CCR5-C21, (D) CCR5-C34, y (E) CCR5-CCL5. Cada color en las esferas indica la correlación decreciente (azul, rojo, gris, anaranjado, amarillo, gris claro, verde, blanco, rosa y cian). El tamaño relativo está relacionado con la extensión y la ponderación de las posiciones de cada miembro correlacionado en la comunidad. Es notable que los complejos con MRV y C34 presentaron comunidades muy extensas en toda la región TMD. En contraste, en los sistemas apo, y los complejos con C21 y CCL5, se presentaron patrones de comunidades particionadas, sugiriendo una perturbación en estos sistemas que se puede relacionar con la dinámica de las moléculas de agua en el poro.

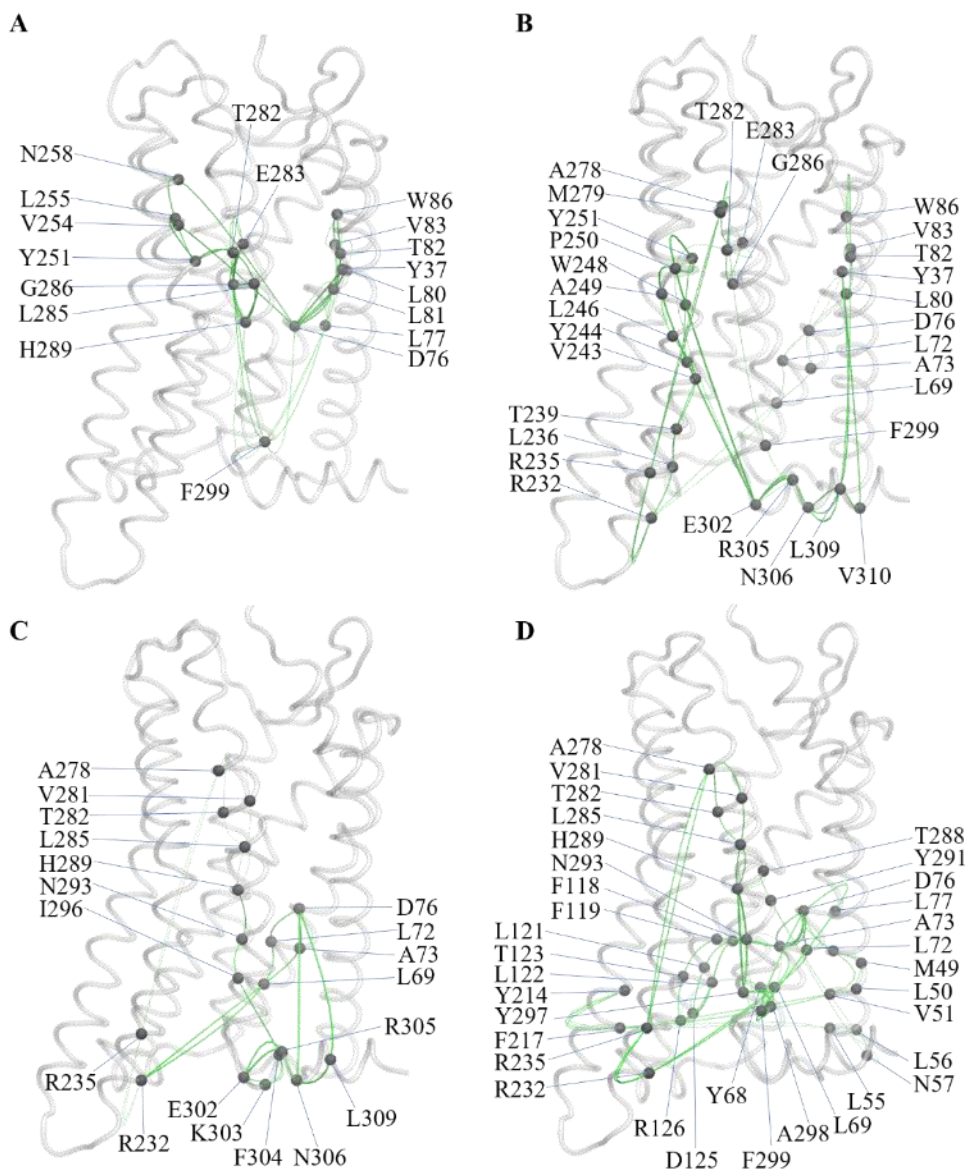


Figura C15. Cuatro vías de propagación de la correlación entre los C α de la cadena principal de CCR5. (A) Sitio ortostérico y disyuntor de transmisión, (B) sitio ortostérico y región de compuerta iónica, (C) Disyuntor de transmisión y sitio central de coordinación, y (D) disyuntor de transmisión y broche R232-E302.

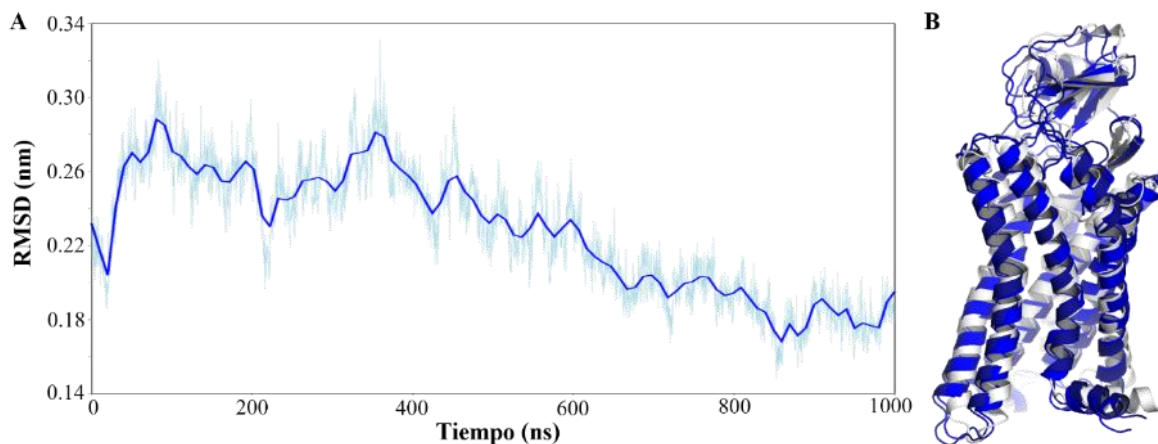


Figura C16. Comparación de las réplicas del sistema CCR5-CCL5 con la estructura experimental 7O7F, un complejo de CCR5 con la quimiocina modificada como superagonista [6P4]CCL5. (A) Perfil de RMSD de la cadena principal para los segmentos con estructuras secundarias definidas (hélices y láminas) en la trayectoria, respecto a 7O7F. La disminución predominante en el RMSD de la réplica I indica que el sistema se aproxima dinámicamente hacia un estado completamente activado, a pesar de la presencia de la perturbación introducida en el sistema experimental por la mutaciones presentes. (B) Superposición de ambos complejos; el sistema simulado (color azul), y la estructura experimental (color gris claro).

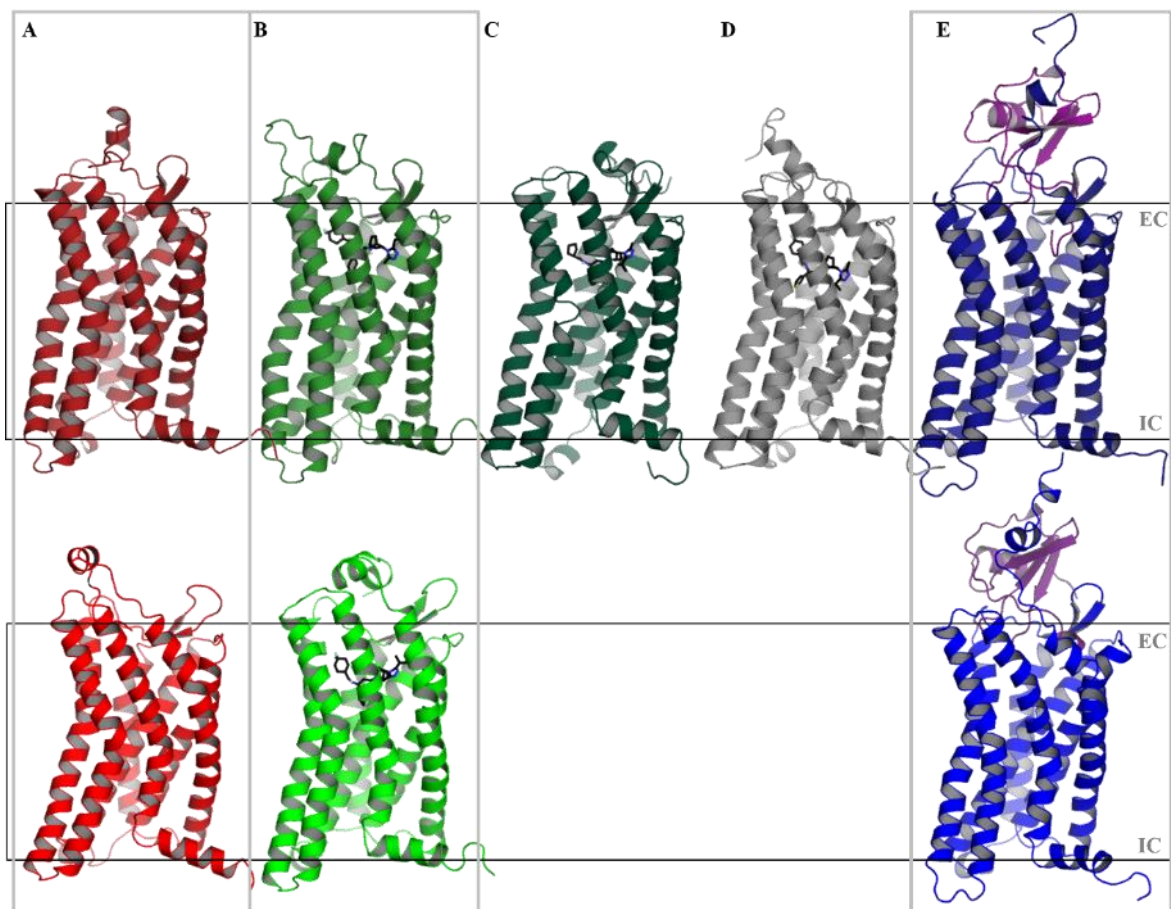


Figura C17. Confórmers representativos de los cinco sistemas. (A) Apo, (B) MRV, (C) C21, (D) C34, y (E) CCL5. Las diferencias principales residen en la geometría abarrillada en el sistema inactivo, y la separación de los extremos IC de TM6 y TM7.

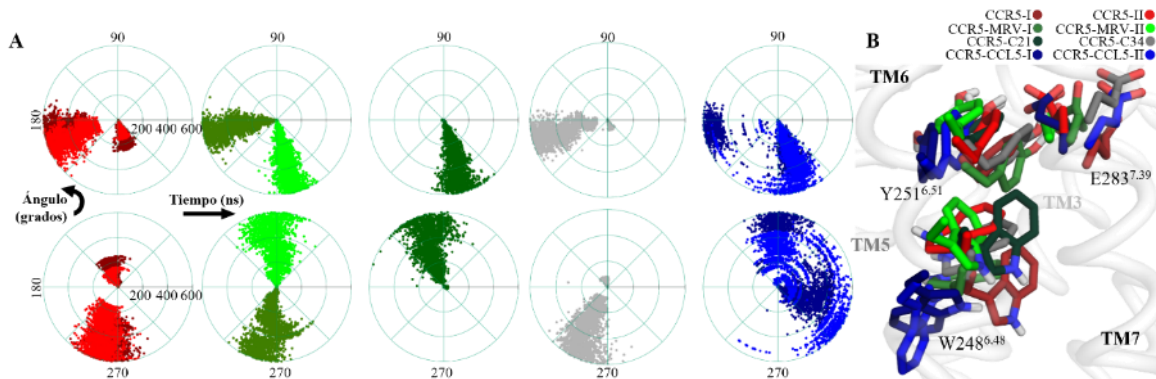


Figura C18. Torsiones del disyuntor W248^{6.48} en los cinco sistemas. (A) Gráficos circulares de los ángulos diedros χ_1 (parte superior) y χ_2 (parte inferior), y (B) configuración de la cadena lateral del residuo, superponiendo las estructuras agrupadas por su cadena principal.

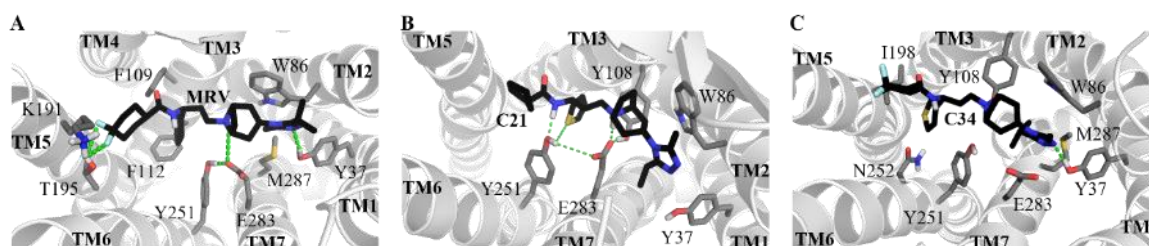


Figura C19. Configuraciones representativas de los ligandos pequeños unidos a CCR5. (A)MRV, (B) C21 y (C) C34 en la cavidad del sitio ortostérico.

6.2. FARMACOLOGÍA MOLECULAR DESCRIPTIVA DEL RECEPTOR δ OPIOIDE (DOR): UN ESTUDIO COMPUTACIONAL CON UN ENFOQUE ESTRUCTURAL

Artículo enviado a *PLoS One*, noviembre de 2023.

I. Cambios conformacionales a nivel receptor: TM1-TM2, TM5-TM6 y TM7 son indicadores clave del estado funcional.

El receptor δ experimenta cambios conformacionales relevantes inducidos por la actividad de los ligandos en los complejos, naltrindol, naloxona, buprenorfina, DIPP-NH₂ y compuesto 4 como antagonistas, TIPP ψ y SYK657 como agonistas inversos, nalorfina como agonista parcial, PN6047 como agonista sesgado, BW373U86 y DPI287; morfina, y encefalina L, deltorfina II y KGCHM07 como agonistas totales. Designamos como sistemas principales a los sistemas en complejo con naltrindol, DIPP-NH₂, nalorfina, DPI287, KGCHM07 y el pseudopéptido TIPP ψ (**Figura 16**). Los patrones conformacionales observados en las simulaciones convencionales (cMD) son consistentes con los encontrados en las simulaciones aceleradas gaussianas (GaMD). Los cambios conformacionales observados difieren notablemente entre agonistas totales o inversos, y antagonistas. Dado que los antagonistas como naltrindol (7.5% de eficacia intrínseca reportada [138,161]) o naloxona (8% a -10% de eficacia [273]) ejercen una actividad neutral en el receptor, es conveniente referirnos al colectivo conformacional inducido por ellos como “estativo”, y al colectivo conducido por los agonistas inversos, como “inactivo”, toda vez que los últimos disminuyen la señalización del receptor más allá de la actividad basal (eficacia negativa).

Las características generales de los colectivos conformacionales de los sistemas simulados, que corresponden a los respectivos estados funcionales, son las siguientes:

- a) **Colectivos estativos y parcialmente activos (partitivos).** Estos sistemas alcanzaron estados de equilibrio posicional dinámico alrededor de los 600 y 900 ns de la cMD, como se evidenció en los perfiles de RMSD para la cadena principal del dominio transmembranal (TMD). Los cambios conformacionales observados fueron de baja magnitud, como es esperado para sistemas antagonizados. Una excepción notable la constituyen los sistemas de los complejos con buprenorfina y naloxona, los cuales se discuten más adelante. Un fenómeno común en los sistemas del aporreceptor y los complejos antagonizados, es la separación de los extremos intracelulares (IC) de las hélices transmembranales 5 (TM5) y 6 (TM6), en conjunción con el asa intracelular 3 (ICL3) extendida y desplegada (excepto el aporreceptor). La inclinación del extremo extracelular (EC) de TM1 dirigida hacia el poro intermembranal, alcanzó una pronunciada torsión en algunos casos, cercana a ser perpendicular a la monocapa de la membrana. La hélice yuxtamembranal (YXT) mantuvo su plegamiento y una inclinación relativamente invariante. La cara extracelular del receptor permaneció abierta (excepto en apo- δ). Los residuos de *N*-acetilglucosamina unidos a N18

se embebieron en las zonas de las cabezas (fosfatos) y los cuellos (ésteres) de la monocapa membranal, lo que no ocurrió en los sistemas activos.

- b) **Colectivos activos e inactivos.** Los perfiles de RMSD de la cadena principal del TMD presentaron una gran variabilidad respecto a los estativos. Los complejos de KGCHM07, DPI287 y TIPP ψ exhibieron múltiples similitudes conformacionales, a pesar de poseer funcionalidades opuestas. Estos hallazgos se explican con el hecho de que los agonistas inversos promueven la disociación de los complejos preformados (es decir, receptor acoplado a proteínas G previo a la activación [274]), mientras que los agonistas estabilizan el acoplamiento del receptor con las proteínas G.

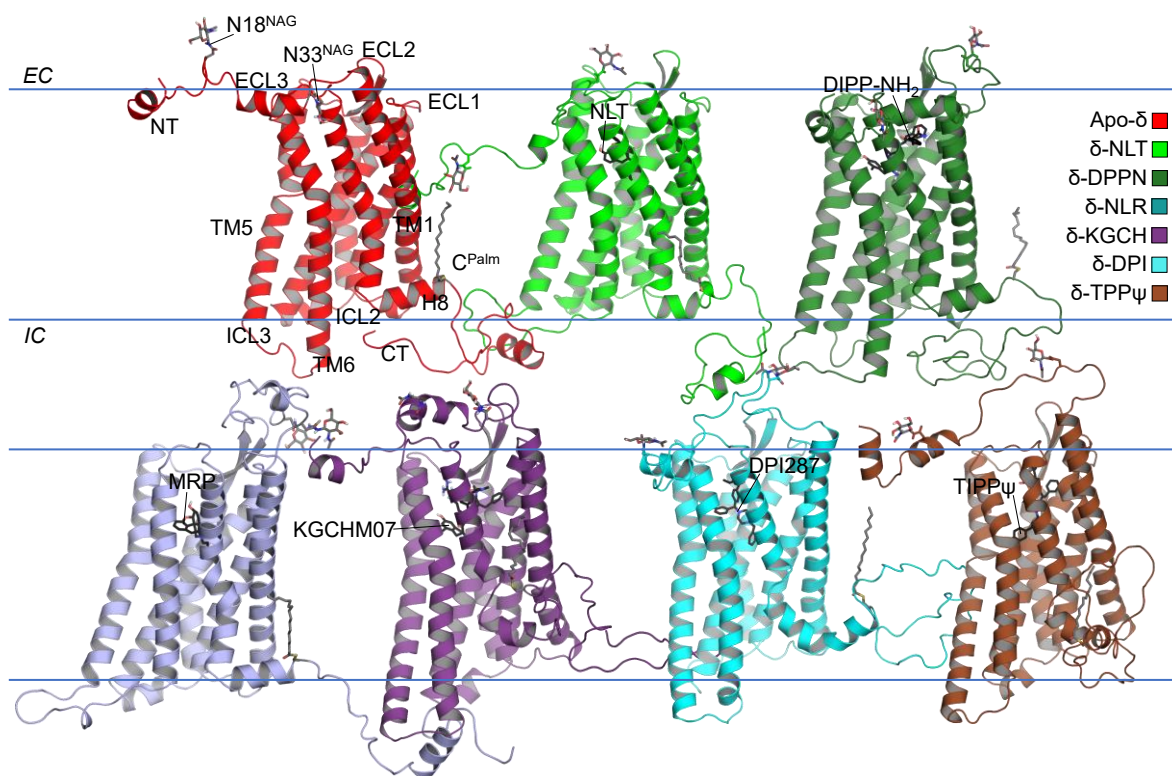


Figura 16. Confórmeros representativos de las simulaciones cMD de los sistemas principales del receptor δ : Apo- δ , δ -naltrindol (NLT), δ -DIPP-NH₂, δ -nalorfina (NLR), δ -KGCHM07, δ -DPI287, y δ -TIPP ψ . En los primeros cuatro, no agonizados, las hélices TM5 y TM6 se mantienen separadas, mientras que, en los sistemas agonizados, se alinean y se alejan del resto del TMD. Asimismo, YXT presentó desplegamiento o torsiones en estos últimos sistemas. Los confórmeros medianos de todos los sistemas presentan similitudes en acuerdo con el estado funcional inducido (**Figura D2**). TM: hélice transmembranal, H8: hélice yuxtamembranal, C^{Palm}: Residuo 333 de S-palmitoil-L-cisteína, N^{NAG}: residuo de N δ -(2-desoxi-2-acetamido-1 β -glucopiranosil-L-asparagina)

En estos sistemas, TM5 y TM6 permanecieron cercanas entre sí en su extremo IC, mientras que ICL3 se plegó en favor de ambas hélices en los sistemas activos, y sólo hacia TM5 en el inactivo con TIPP ψ . La separación concertada de los extremos IC de ambas hélices, respecto al TMD está relacionada con una incipiente activación del receptor; TM6 y TM7 disminuyen el número de interacciones, y el lado IC del receptor adopta una configuración accesible para una eventual inserción de la hélice de la proteína G. La hélice YXT presentó una tendencia a adentrarse hacia el centro de la bicapa lipídica, y en el caso del complejo con el pseudopéptido, también se alejó de TM1. Los complejos de KGCHM07 y TIPP ψ disminuyeron su área extracelular y desplazaron a TM1 hacia ese lado de la membrana, mientras que DPI287 mantuvo su geometría, a grandes rasgos. Estos hallazgos en los sistemas agonizados son consistentes con la información experimental [119], lo que permitió remarcar las diferencias en los mecanismos de los ligandos, o afinidades muy distintas por los protómeros de δ .

En las trayectorias cMD de 1 μ s de los sistemas activos y δ -TIPP ψ , TM7 perdió parte de su plegamiento helicoidal (**Figura 17 y D3**), lo que está relacionado con los cambios en YXT (**Figura D4**). El doblamiento en TM7 donde la helicidad se pierde se ubica en los residuos L313^{7.48} y N314^{7.49}; éste último participa la coordinación del catión sodio en el sitio central de coordinación (CCS). La importancia del residuo N314^{7.49} en DOR es patente, ya que las mutaciones que afectan este sitio, así como los adyacentes, conducen a la transformación de la actividad antagonista del naltrindol en el receptor silvestre, a una activación totalmente sesgada hacia la vía de la β -arrestina [159].

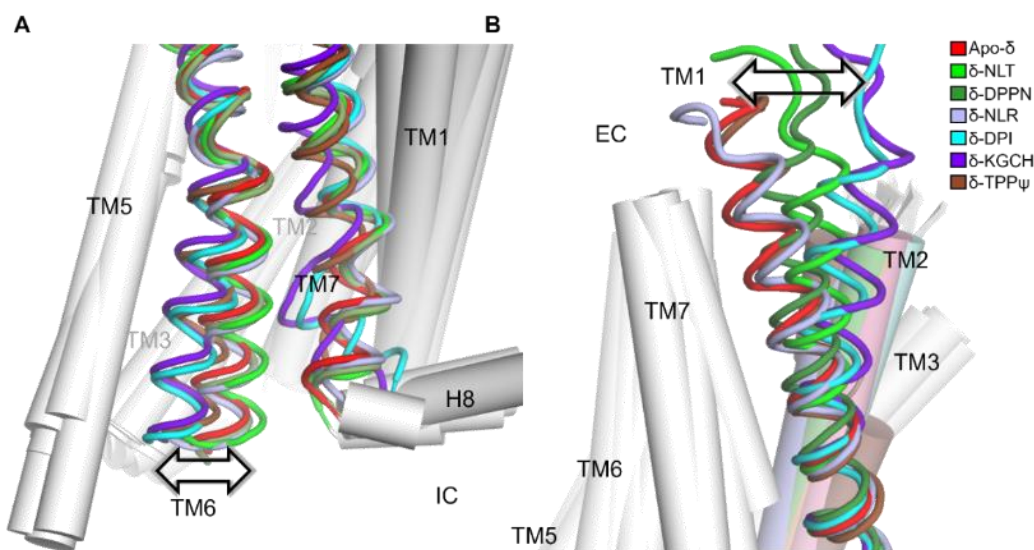


Figura 17. Contactos relevantes entre pares de hélices en los sistemas principales. (A) Extremos IC de TM6 y TM7, y (B) y los extremos EC de TM1 y TM2. De manera general, los sistemas activo e inactivo presentaron un número menor de contactos entre TM6 y TM7, pero mayor entre TM1 y TM2, respecto a los estativos y aporreceptor. TM: Hélice transmembranal, H8: hélice yuxtamembranal, EC: extracelular, IC: intracelular.

II: Interacciones de los ligandos: Los péptidos establecen interacciones distintivas donde un grupo voluminoso determina la selectividad

La clase estructural y la actividad de los ligandos están estrechamente relacionadas con los cambios que ejercen en δ (**Figura 18**). Los ligandos comparten algunos grupos funcionales, que, para fines comparativos, se relacionaron con el núcleo del morfinano (el núcleo heterocíclico de los opiáceos, **Figura 19**). Las interacciones individuales de cada ligando con DOR se sintetizan en una matriz colorida (**Figura D5**) para fines comparativos.

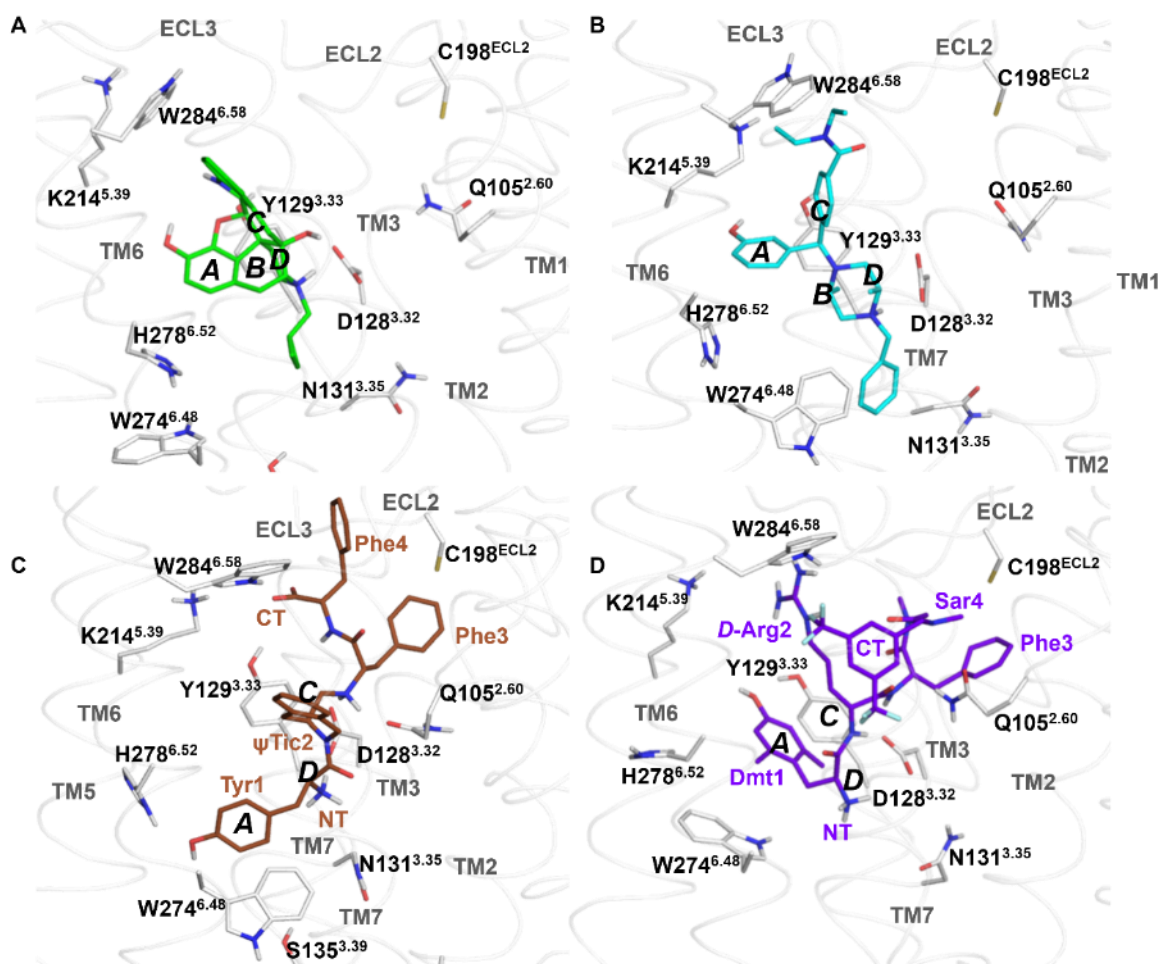


Figura 18. Contactos relevantes de los ligandos en los sistemas principales. (A) El antagonista morfinano naltrindol, (B) el agonista benzhidilpiperazínico DPI287, (C) el agonista inverso pseudopeptídico TIPPP ψ , y (D) el agonista total peptídico KGCHM07. Las literales itálicas A-E indican los anillos del núcleo de morfinano. El residuo D1283.32 es la contraparte aniónica en el sitio ortostérico, que forma un puente salino muy conservado, pero no esencial. El residuo Y129^{3.33} interactúa con el grupo fenólico que constituye el anillo A en los morfinanos, o el residuo N-terminal de tirosina o dimetiltirosina (Dmt) de los péptidos; así como con grupo donador de puente de hidrógeno (cuando está presente) en el anillo C, además de las interacciones con K214^{5.39}. El residuo H278^{6.52} establece puente de hidrógenos directos o mediados por una molécula de agua con el

mismo grupo fenólico de los ligandos. El disyuntor de transmisión, W274^{6,48} se encuentra en contacto con el grupo fenólico, o con el grupo hidrofóbico o aromático unido a la amina N¹⁷ del ligando. Además, Q105^{2,60} interactúa con los enlaces peptídicos de los agonistas, y también a través de los residuos de fenilalanina Phe3 o Phe4 (por claridad, los residuos de los ligandos se representan con el código de tres letras). El grupo *N*-bencilo de DPI287 presentó una tendencia a contactar al residuo N131^{3,35}, mientras que Tyr1 de TIPPy experimentó una torsión mayor hacia el disyuntor de transmisión que los otros ligandos. Los identificadores A-D en los ligandos corresponden con los anillos de morfinano. ECL: Asas extracelulares.

El núcleo de morfinano (Figura 19) posee tres subestructuras clave: (i) el grupo fenólico del anillo A, (ii) el amonio terciario (N¹⁷) unido a los anillos B y D, (iii) un grupo insaturado o voluminoso en o unido al anillo C, y (iv) un puente epóxido presente sólo en los alcaloides.

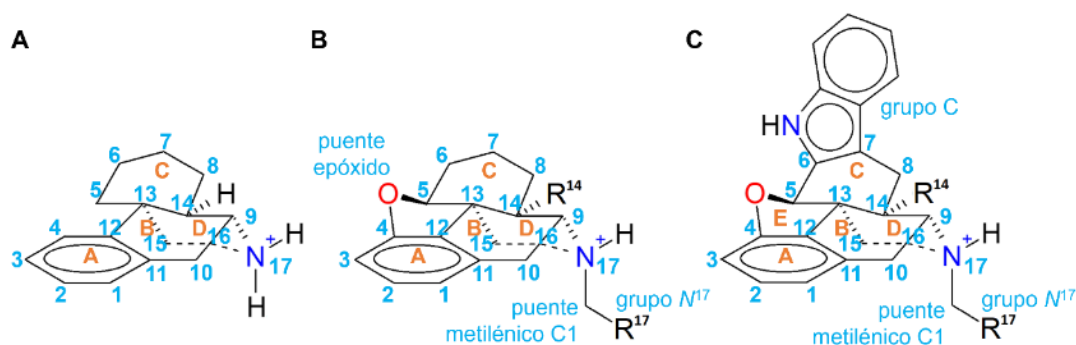


Figura 19. Núcleo del morfinano y su numeración. (A) Morfinano, (B) 4,5-epoximorfinano y (C) morfíndol.

Anillo A: El grupo fenólico que forma puentes de hidrógeno o de agua con Y129^{3,33} y H278^{6,52}

El grupo fenólico (el anillo A en morfinanos, el residuo 1 de los péptidos y el anillo *meta*-sustituido en el benzhidrilo) forma un puente de hidrógeno con al menos una molécula de agua, que a su vez establece otro puente de hidrógeno con Y129^{3,33} y H278^{6,52}, como también se observa en las estructuras experimentales [119,159,165]. Adicionalmente, Y129^{3,33} también interactúa con el oxígeno epoxídico que constituye el anillo E en los alcaloides.

El grupo fenólico separado por dos átomos de carbono de una amina básica está muy conservado en los ligandos opioides (toda vez que proviene biosintéticamente de la tirosina), y en los opiáceos emula de hecho éste mismo residuo, e incluso, la presencia de un residuo de tirosina en determinados péptidos les permite interactuar de manera variable con DOR, como ha sido reportado para varios análogos de la somatostatina [275]. Sin embargo, este grupo hidroxilo no es esencial para determinar la unión al receptor δ . Su ausencia en la codeína (*O*³-metilmorfina), que posee un metoxilo en esta posición, resulta en una afinidad muy baja hacia los receptores opioides, en comparación con la morfina, pero en otros ligandos, la ausencia de las interacciones que forma puede compensarse mediante la presencia de otros grupos en la molécula de ligando. Otros ligandos

sin el grupo fenólico, como SNC80 (O-metil-BW373U86) [276], SNC162 (desoxi-BW373U86) [277], PN6047 [155], así como el fentanilo y sus análogos (que poseen otro modo de unión) [278], se unen al receptor δ de manera muy selectiva o con gran afinidad. El samidorfano [279,280] empleado en combinación con el antipsicótico olanzapina para contrarrestar el aumento de apetito inducido por ésta última, es un antagonista en el receptor δ (21% de eficacia respecto a SNC80) [281], a pesar de que posee el grupo carboxamida en el anillo A en vez del hidroxilo fenólico. El sistema del complejo con PN6047, que posee un grupo carboxamida como el samidorfano, mostró que el grupo voluminoso (grupo C) compensa la ausencia de este grupo farmacofórico, como ha sido sugerido en estudios previos [119].

Anillos B y D: El grupo 14-hidroxilo y el amonio terciario interactúan de manera diferencial con D128^{3.32}

El grupo amino protonado de los ligandos establece un puente salino con D128^{3.32}, (de manera similar a E283^{7.39} en CCR5). El grupo funcional 14-hidroxilo de los morfínicos naltrindol, naloxona, buprenorfina y SYK657 establecen además la interacción con D128^{3.32} y Y129^{3.33} (**Figura D6**). Los ligandos agonistas benzhidrilpiperazínicos DPI287 y BW373U86, la benzhidrilidenpiperidina PN6047, y morfina interactúan sólo a través del átomo N¹⁷, mientras que los péptidos forman interacciones mediante su cadena principal, incluyendo el extremo -NH₃⁺.

El grupo enlazado al átomo N¹⁷ ha mostrado tener influencia en la sobre la funcionalidad en el receptor. El N¹⁷-ciclopropilmetilo del naltrindol posee una contribución torsional intrínseca que se encuentra confinada en el anillo de tres miembros, en comparación con el grupo alilo del agonista parcial nalorfina. Estas diferencias inciden distintivamente en el grupo metileno adyacente directamente unido a N¹⁷ (átomo C1). El grupo alilo es acíclico e insaturado, no experimenta resonancia electrónica, e imparte un carácter electrófilo alílico típico en C1. En consecuencia, el carácter electroattractor incrementado de N¹⁷ en la nalorfina (con 58% de eficacia en DOR [150]), se traduce en un aumento de la acidez del grupo, y por lo tanto, un menor carácter aniónico de D128^{3.32}. Adicionalmente, la ausencia del grupo 14-hidroxilo en la nalorfina implica una interacción biunívoca entre el par iónico. En contraste, el antagonista naloxona (con solo de 8 a 10% de eficacia [273]) sí posee éste hidroxilo además del alilo, lo cual incrementa la basicidad de N¹⁷ debido a la interacción de ambos grupos con D128^{3.32} (los valores experimentales de pKa de la naloxona y la nalorfina son 7.9 y 7.6, respectivamente [282]). De esta manera, la nalorfina posee un déficit electrónico relativo en el puente de metileno C1, en comparación con la naloxona. El agonista inverso SYK657, que posee un grupo N¹⁷-bencilo, así como el 14-hidroxilo, interactúa de manera similar a la naloxona. Este grupo bencílico contribuye a la reducción del carácter básico del residuo de aspartato mencionado.

Por otro lado, el naltrindol, buprenorfina y SYK657 comparten el mismo modo de unión. Debido a la restricción inherente a la torsión en el núcleo de morfínico, estos ligandos permanecieron prácticamente inmóviles, y con interacciones del anillo A y del grupo en N¹⁷ (excepto la naloxona)

como sobresalientes. Entre los ligandos que poseen un N^{17} -metilarilo, el bencilo de SYK657 no establece contactos notables con N131^{3,35}, posicionando en cambio éste sustituyente de manera análoga a los grupos de naltrindol y buprenorfina. El complejo con naloxona presentó múltiples diferencias en la configuración del ligando respecto a la nalorfina, el ligando más semejante, e incluso en los muestreos GaMD del sistema de este último. Los hallazgos del complejo δ -naloxona se detallan en la **Figura D7**.

Entre los no morfínicos, el grupo N^{17} -bencilo del agonista DPI287, que posee deslocalización electrónica, carece de algún grupo equivalente al 14-hidroxilo. El cambio de este grupo por el grupo alilo, como ocurre en el ligando BW373U86, resulta en una actividad también agonista. Ambas estructuras poseen dos grupos metilos en el anillo de piperazina, con propiedades distintas a los anillos B y D de los morfínicos, y subyace a la actividad funcional opuesta entre nalorfina, naloxona y BW373U86 (**Figura 20**). Además, los grupos N^{17} de DPI287 y BW373U86 ejercen un empuje estérico sobre Y308^{7,43} que induce parcialmente un doblamiento, lo que contribuye al desplegamiento de TM7 (**Figura D8**).

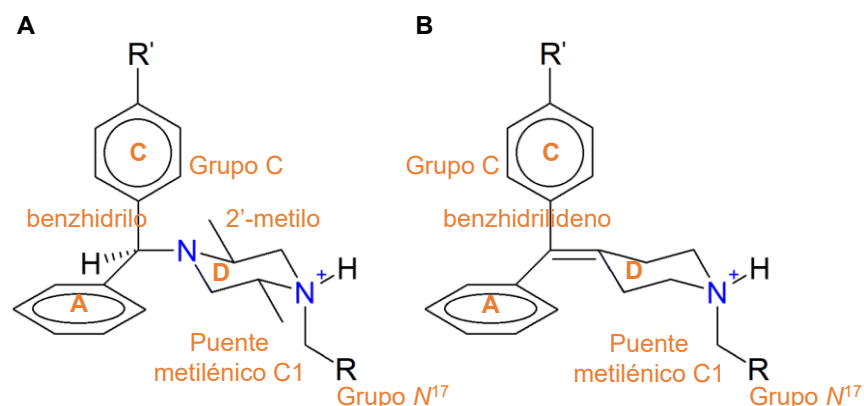


Figura 20. Núcleos de los agonistas no morfínicos. (A) Benzhidrilpiperazina, al que pertenecen los agonistas DPI287, BW373U86 y SNC80, y (B) benzhidriledenpiperidina, de donde deriva el agonista sesgado PN6047.

El agonista sesgado PN6047 de la clase de benzhidriledenpiperidina, posee el grupo N^{17} - (tiazol-5-il)metilo con propiedades electrónicas distintas en comparación de DPI287, las cuales son responsables de las diferencias entre ambos. Ambos, DPI287 y PN6047 comparten modos de unión muy similares en el sitio ortostérico y las interacciones con el disyuntor de transmisión: los grupos bencilo y tiazolilmetilo, en conjunción con el anillo A equivalente, interactúan con la cadena lateral indólica de W274^{6,48}, restringiendo el acceso a rotámeros de este residuo; mientras que el grupo alilo de BW373U86 no limita los cambios torsionales en el residuo de triptófano. De hecho, en este último sistema, el disyuntor de transmisión alcanza la configuración indicativa de activación total. Las interacciones restrictivas en el disyuntor están relacionadas con el mecanismo de activación parcial en el receptor cannabinoide 1 [283], otro GPCR de la clase A, a través de la estabilización del

rotámero mediante contactos aromáticos, y en el caso de DPI287 y PN6047 se observó este fenómeno, por lo que la actividad de DPI287 puede ser de agonista parcial del receptor δ , contrastando con el complejo con BW373U86, que se ajusta más a un estado activo.

Años atrás se identificó que los sustituyentes voluminosos en N¹⁷ en los morfinanos son determinantes para la actividad antagonista, implicando cambios bruscos en las relaciones estructura actividad. La presencia de grupos electroattractores ha sido profusamente explorada, incluyendo la reducción de la basicidad del átomo N¹⁷. Por ejemplo, sustituyendo el puente de metileno C1 por un grupo carbonilo o sulfonilo, ha derivado en un amplio intervalo de actividades en los respectivos ligandos ensayados [161]. Una descripción y discusión detallada de la influencia de estos grupos y los cambios funcionales que producen, así como el estudio de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) realizado en este trabajo para estas estructuras, se encuentra en las **Tablas D2-D6**.

Complementariamente, estudios de mutación han demostrado que los antagonistas selectivos en δ , como naltrindol, naltribén (el análogo morfobenzofurano del naltrindol y también agonista en oligómeros (δ) κ [284]), naltrexona (que posee la estructura de la naloxona con el cambio de N¹⁷-alilo por N¹⁷-ciclopropilmetilo), se unen eficientemente al receptor constitutivamente inactivo δ -D95N^{2.50}. También el agonista no selectivo bremazocina, mostró interacciones fuertes con el mismo δ -D95N^{2.50} [285]. Basándose en estas observaciones, se ha sugerido que los agonistas selectivos como DPI287, BW373U86 y PN6047 se unen de manera distintiva a los antagonistas selectivos como naltrindol, o los agonistas no selectivos como morfina y encefalina L. Esta propuesta refuerza la discusión de los perfiles divergentes de los ligandos nalorfina, naloxona y BW373U86, teniendo todos el grupo N¹⁷-alilo.

La basicidad del átomo N¹⁷, y la formación del respectivo catión en medio acuoso parecía un requerimiento para la unión, considerando que la mayoría de los ligandos opiáceos y opioides lo poseen. Sin embargo, algunas notables excepciones han sido reportadas. Por ejemplo, estructuras que carecen de un grupo básico, como los derivados carbonílicos y sulfonílicos del naltrindol, y el ciclopéptido homodético Compuesto 4, derivado de ligandos de los receptores de somatostatina. Está reportado que la acetilación del N-terminal en las encefalinas conduce a una pérdida de actividad agonista y en su afinidad por los receptores opioides, por lo que en el caso de los ligandos que se unen y carecen del grupo básico, debe darse una compensación en las interacciones con el receptor.

Las encefalinas L y M (YGGFL y YGGFM respectivamente) no tienen cadenas laterales voluminosas en las posiciones 2 y 3, de manera similar al antagonista DIPP-NH₂ y el agonista KGCHM07. Muchos ligandos opioides endógenos comparten la secuencia N-terminal con las encefalinas, como las endorfinas (YGGFM-), las dinorfinas y las neoendorfinas (YGGFL-). Aunque todos son no selectivos hacia los receptores opioides, poseen afinidades preferenciales hacia algún subtipo. Las interacciones llevadas a cabo por el segmento C-terminal dirigen estas diferencias. Así,

el compuesto 4 que carece de un átomo de nitrógeno protonado como posición 17, pero forma interacciones polares-aniónicas a través de Trp2, Tyr3 y Thr4 con D128^{3.32} (**Figura D9**). Mientras Tyr3 acarrea las funciones del anillo A, los residuos de 1-naftilalanina (Nal1) y Trp2 establecen contactos π - π con Y56^{1.39} (homólogo de Y37^{1.39} en CCR5) y con Y308^{7.43}. Además, los T101^{2.56}, Q105^{2.60} y K108^{2.63} forman ambientes hidrofóbicos a través de los grupos metilo _{γ} , etileno _{$\beta\gamma$} y butileno _{β} - ϵ , respectivamente.

Anillo C: El grupo hidrofóbico y voluminoso interactúa fundamentalmente con W284^{6.58} y determina la selectividad en δ

El anillo C del núcleo morfina presenta interacciones sobresalientes con un subgrupo hidrofóbico en la cara extracelular en TM5 y TM6, de manera particular con W284^{6.58} pero también con I277^{6.51}, F280^{6.54}, V281^{6.55}, R291^{ECL3} (propileno _{β - δ}) y L300^{7.35}. En contraste, los receptores μ y κ poseen los residuos R6.58 y E6.58 en la misma posición, por lo que W284^{6.58} desempeña un papel importante en la selectividad en DOR. Los grupos unidos al anillo C en las posiciones 6 y 7, entre mayor volumen e hidrofobicidad posean, mayor interacción con W284^{6.58}. El sistema de indol fusionado en el naltrindol y el de benzofurano en SYK657 (**Figura 21**), fungen como estos grupos, que se relacionan mediante interacciones π - π . Fijando el núcleo de morfina del naltrindol como referencia (7.5% de eficacia), y respecto al agonista total DPDPE, la sustitución del [6,7-*b*]-indol por [6,7-*b*]-quinolina, transita de un antagonista casi neutral a un agonista parcial (32.4% de eficacia), mientras que el cambio por [6,7-*b*]-benzofurano, lo transforma a un agonista inverso muy débil (-1.6% de eficacia). Los ligandos mencionados son selectivos hacia δ_2 , pero en el caso de transformar el grupo C en otro no cíclico, y con selectividad hacia los protómeros δ_1 , como el cambio de [6,7-*b*]-benzofurano por 7-benzilideno, obteniendo la bencilidennaltrexona, la actividad de agonista inverso se incrementa ligeramente (-10.2% de eficacia) [138,160]. Bajo estos hallazgos, se espera que el cambio de *N*¹⁷-ciclopropilmetilo por *N*¹⁷-bencilo en naltribén y bencilidennaltrexona produzca los correspondientes agonistas inversos SYK657 (selectivo a δ_2) y SYK656 (selectivo a δ_1), donde la tendencia se preserva (-99% y -103% de eficacia respectivamente) [138].

Los ligandos morfina de menor tamaño, como nalorfina, naloxona, morfina y codeína, que no poseen un grupo voluminoso unido al anillo C, tienen un grupo alcohol alílico o cetona: nalorfina y morfina presentan 6 α -hidroxilo e insaturación en 7,8, mientras naloxona sólo tiene un grupo 6-cetona. Estas subestructuras se encuentran en contacto estrecho con Y129^{3.33} en los complejos con DOR, formando además puentes de agua que se extienden hasta H278^{6.52}.

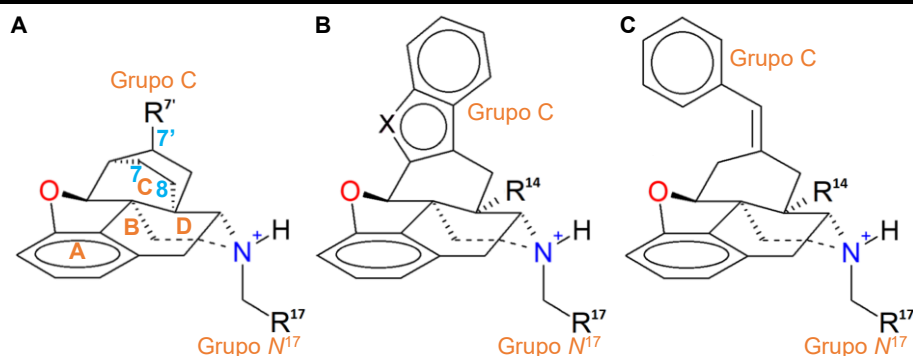


Figura 21. Grupos C en los 4,5-epoximorfinaños. (A) Orvinol en buprenorfina, (B) morfindol y morfobenzofurano en naltrindol, naltriben y SYK656, y (C) 7-bencilidenmorfinano, como en bencilidennaltrexona y el agonista inverso SYK656.

Por otro lado, los péptidos y peptidomiméticos también poseen grupos equivalentes que interactúan con W284^{6,58}. Estos grupos son *i)* Los anillos aromáticos de Tic2 y Phe3 en DIPP-NH₂ y TIPP ψ , *ii)* el grupo 3,5-*bis*-(trifluorometil)bencilo en KGCHM07, *iii)* Phe3 en el compuesto 4 y deltorfina II, y *iv)* el grupo N,N-dietilbenzamida en DPI287 y BW373U86. Los residuos del receptor que interactúan con estos grupos son también I277^{6,51}, F280^{6,54}, V281^{6,55}, W284^{6,58}, R291^{ECL3} y L300^{7,35} (**Figuras 22, D7 y D9-13**).

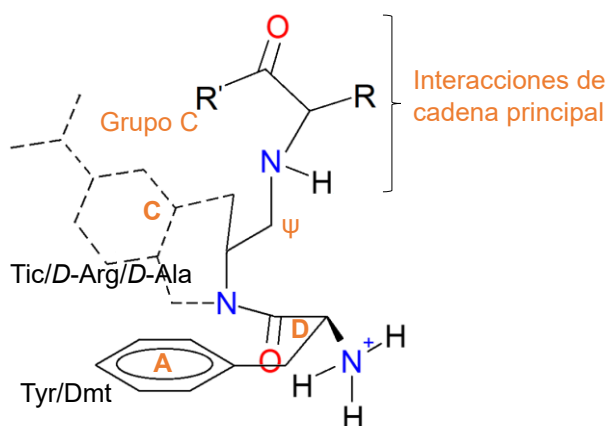


Figura 22. Grupos equivalentes en los ligandos peptídicos. Se incluye la posición ψ en 2 (pseudopeptídica) del ligando TIPP ψ . El residuo Tic es el residuo del ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-2-carboxílico, Dmt es la 2,6-dimetiltirosina. El residuo *D*-Arg se encuentra en KGCHM07, y *D*-Ala en la deltorfina II.

El grupo amino protonado de Phe3 en el agonista inverso TIPP ψ forma contactos catión-polar con Q1052.60, colapsando parte de otro subgrupo hidrofóbico, conformado además por W114^{ECL1}, V124^{3,28}, L125^{3,29} y C198^{ECL2}. El residuo Phe4 del antagonista DIPP-NH₂ se sitúa próximo a I304^{7,39}, muy similar a la interacción de la buprenorfina, y a Y109^{2,64}; mientras que Phe4 de TIPP ψ contacta a E291^{ECL3}. Los C-terminales de ambos ligandos (carboxilato y carboxamida, respectivamente) establecen puentes de hidrógeno con R291^{ECL3} y K214^{5,39} el primero, y con Q105^{2,60} el segundo. Los residuos Tic, impedidos estéricamente a rotaciones, interactúan a través

del anillo de tetrahydroisoquinolina con K214^{5.39} y W284^{6.58}, mientras que el grupo amino protonado de Phe3 y el grupo carbonilo de Tic2, respectivamente, forman un puente salino y un puente de agua con D128^{3.32} y Q105^{2.60} (**Figura D10**). El correspondiente grupo voluminoso en el Compuesto 4 es Phe5, y Thr4 es un grupo equivalente al 6 α -hidroxilo de morfina y nalorfina (ver Figura D9).

El antagonista DIPP-NH₂ no tiene grupos iónicos en la cadena principal más allá del N-terminal, mientras que TIPP ψ tiene dos grupos adicionales: el grupo amino pseudopeptídico y el C-terminal, que interactúan con D128^{3.32} y K214^{5.39}, de manera análoga a la encefalina L en el complejo, cuyos grupos voluminosos constituidos por Phe4 y Leu5, que teniendo menor impedimento estérico debido a Gly2 y Gly3, se aproximan en menor medida al subgrupo hidrofóbico. El agonista KGCHM07 establece interacciones con los grupos peptídicos predominantemente con Q105^{2.60}, y un contacto más estrecho con D128^{3.32} que DPI287, aunque esta tendencia se invirtió en los muestreos GaMD. Estos hallazgos subrayan la importancia de la identidad de los residuos 4 a 7 en los péptidos opioides, que determinan su capacidad de interactuar con δ . Las dinorfinas, ligandos preferentes de κ , contienen la secuencia N-terminal de YGGFLRR-, y poseen una afinidad hacia el receptor δ considerablemente endeble. Este fenómeno se debe a que los residuos Arg⁶-Arg⁷, contrastan con las interacciones hidrofóbicas descritas para los péptidos que interactúan de manera preferencial con el receptor δ .

Los dos péptidos agonistas deltorfina II y encefalina L presentaron fluctuaciones importantes en Tyr1 que otros péptidos, incluso que KGCHM07, desplazando el átomo de nitrógeno protonado lejos de la interacción distintiva con D1283.32. La deltorfina II y la encefalina L, como KGCHM07, establecen interacciones a través de los grupos peptídicos con Q105^{2.60}, y además, la deltorfina con el C-terminal amidado (**Figura D11**). La encefalina L y TIPP ψ , teniendo ambos el C-terminal como carboxilato, no establecen las mismas interacciones: la encefalina L sitúa el grupo con frecuencia hacia el centro del poro interhelicoidal, mientras que el pseudopéptido contacta primordialmente a K214^{5.39}, de manera similar a la cadena lateral de Asp4 en la deltorfina II. Con estos hallazgos, destacan por su relevancia las interacciones con Q105^{2.60} y K214^{5.39} con los ligandos peptídicos. Estas interacciones se representan en las **Figuras D12 y D13**.

III: Las moléculas de agua penetran continuamente el poro interhelicoidal en los sistemas agonizados

Como otros receptores de la clase A, el cambio de estado funcional del receptor δ está estrechamente relacionado con la presencia y el paso de moléculas de agua a través del poro interhelicoidal (**Figura 23**). En los sistemas no agonizados principales (el sistema de aporreceptor y los complejos con DIPP-NH₂, naltrindol y nalorfina), es característica la deshidratación prolongada de la región conocida como capa hidrofóbica 2 (HL2), en el entorno de Y318^{7.53}, e influido por la orientación hacia el lado EC de su cadena lateral. En contraste, los sistemas agonizados (los complejos con DPI287, KGCHM07 y TIPP ψ), la región HL2 se hidrata y la cadena lateral de Y318^{7.53} se orienta hacia el resto de las TMs (**Figura D14**).

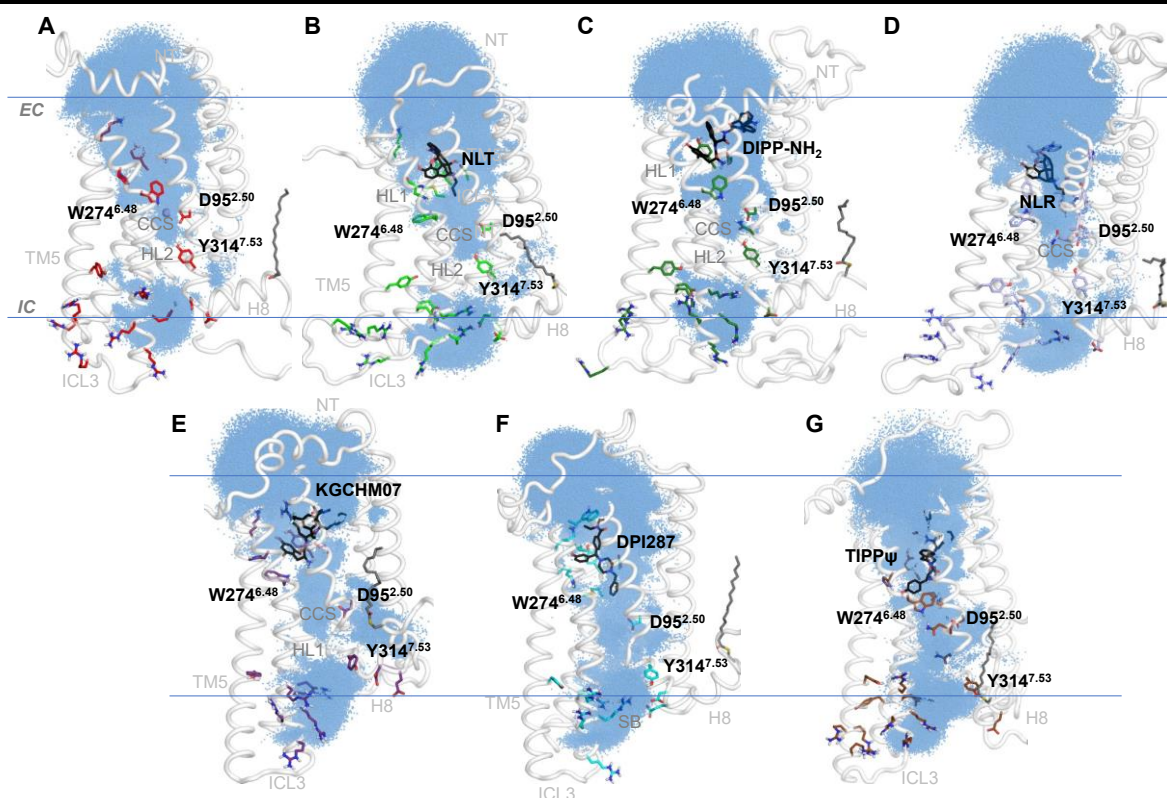


Figura 23. Dinámica de agua en los sistemas de DOR. Con puntillero azul se muestra la presencia acumulativa de las moléculas de agua, y las regiones relevantes se señalan con flechas. (A) Apo- δ , (B) δ -DIPP-NH₂, (C) δ -NLR, (D) δ -KGCHM07, (E) δ -DPI287 y (G) δ -TIPP ψ . En el aporreceptor y el complejo con TIPP ψ , la capa hidrofóbica 1 (HL1) se encuentra hidratada en el entorno de H278^{6.52} y W274^{6.48}, mientras que el resto de los sistemas presentan menor número de moléculas de agua, y ante las regiones hidrofóbicas de los ligandos. Sólomente el sistema del aporreceptor interactúa con un catión sodio en el poro, en el sitio central de coordinación (CCS). En la capa hidrofóbica 2 (HL2), los sistemas no agonizados se observa una deshidratación, mientras que los sistemas agonizados presentan el fenómeno contrario en esta parte. TM: Hélice transmembranal, ICL: asa intracelular, EC: extracelular, IC: intracelular.

De manera importante, el complejo del agonista KGCHM07 mantuvo durante un intervalo de tiempo, cierto grado de deshidratación en HL2 durante el muestreo cMD, aunque durante las simulaciones GaMD, esta región se hidrató en su totalidad, como los otros dos sistemas agonizados, que, de manera consistente, conservaron la hidratación de todo el poro (**Figura D15**).

Como parte de los cambios conformacionales que conducen a la hidratación del poro en DOR, en los sistemas no agonizados, la región rica en residuos de arginina, localizada en los extremos IC de TM5 y TM6, orienta las cadenas laterales hacia el poro, mientras que, en los sistemas agonizados, estas cadenas laterales se mantienen dispersas en la misma cara IC. La proteína Gai interactuante con el receptor δ , que no posee una densidad de carga negativa notable en su extremo C-terminal, puede ser menos estable en la interacción debido a esta densidad de cargas positivas,

y el rotámero de Y318^{7.53}. Estos patrones de hidratación también se observaron en los sistemas adicionales, incluyendo las réplicas del complejo con naloxona.

IV: El Sitio Central de Coordinación (CCS) que la un catión sodio con moléculas de agua y S135^{3.39} como primera capa

En los sistemas principales, el CCS presenta cambios notables en su constitución. En el aporreceptor, un ion Na⁺ ingresa desde el lado EC (**Figura 24**), permaneciendo coordinado durante todas las simulaciones, incluyendo las réplicas GaMD (**Figura D16**). En los dos sistemas activos, una interacción adicional se forma en una simulación pre-GaMD y en una réplica GaMD, respectivamente, con D322^{YXT} y E323^{YXT}, aunque no perduraron en los tiempos simulados. En los complejos antagonizados, la cadena lateral de S135^{3.39} rotó alejándose de CCS, y descartando la primera capa de coordinación observada en el aporreceptor (**Figura D17**). En los sistemas activos, la cadena lateral de N314^{7.49} se desacopló de la triada D95^{2.50}, N310^{7.45} y S311^{7.41}. De manera interesante, en el sistema inactivo, tanto N310^{7.45} como N314^{7.49} se desplazan de CCS debido al desplegamiento observado en TM7, además de la rotación de S310^{7.41}, desintegrando por completo el sitio de coordinación.

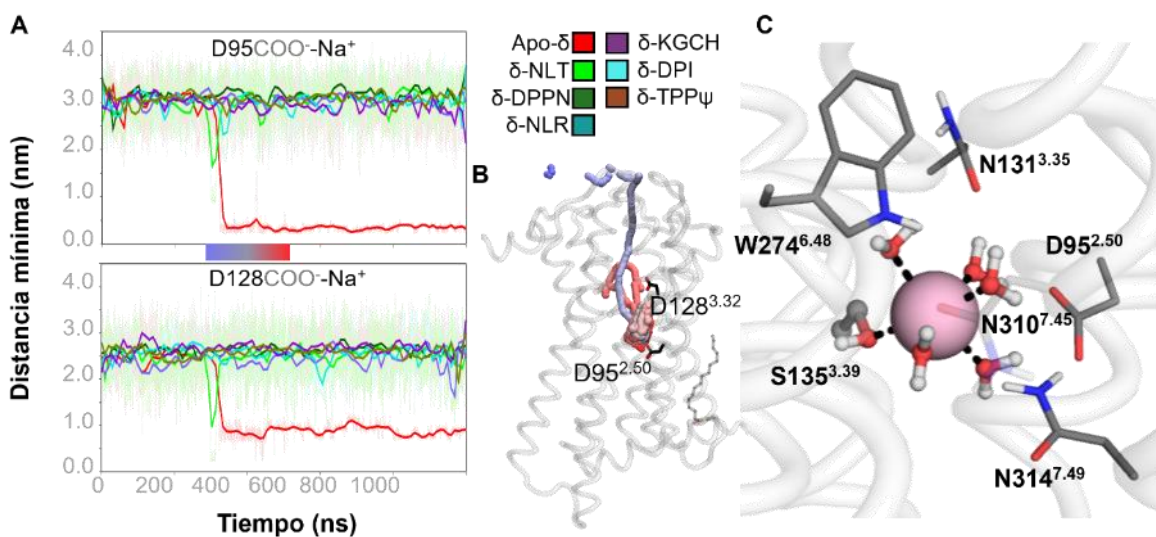


Figura 24. Coordinación de Na⁺ en CCS. (A) Distancia mínima de cualquier ion Na⁺ a D95^{2.50} y D128^{3.32}, donde sólo en el aporreceptor se da la quelación. (B) Trayectoria entre 300 y 500 ns de la simulación cMD, mostrando el camino del catión desde el lado EC hasta CCS. (C) Confórmero representativo del Na⁺ en el CCS, donde se establece una geometría hexacoordinada, una interacción a través de S135^{3.39} y cinco con moléculas de agua.

En resumen, los colectivos conformacionales del receptor δ en los sistemas simulados:

- 1) Los sistemas con agonistas y antagonistas unidos presentan diferencias dependiendo de su naturaleza peptídica y no peptídica. Sin embargo, se comparten varias características

conformacionales dentro de los sistemas activos y estativos alrededor de los 800 ns de simulación.

- 2) La hélice TM5 se extiende hacia la región IC, TM7 experimenta un desplegamiento parcial en el motivo conservado NPXXY, y YXT cambia drásticamente en su plegamiento y orientación, dependiente de una funcionalidad activa o inactiva, mientras que TM5 y TM6 se alejan mutuamente en el sistema del aporreceptor, en los estativos y en el partitivo con nalorfina. En la región EC, TM1 y TM2 aumentan los contactos de manera sustancial en presencia de agonistas totales, y disminuyen ante ligandos antagonistas, agonistas parciales o agonistas inversos.
- 3) La variedad de interacciones entre los ligandos y DOR es mayor cuando se trata de un agonista total o inverso, y menor cuando es un antagonista. Los ligandos DPI287 y sus análogos BW373U86 y PN6047, así como la naloxona en sus tres réplicas, establecen un contacto predominante con N131^{3,35}, un residuo implicado en la activación sesgada hacia la vía de la β -arrestina. El colectivo de δ -DPI287 comparte múltiples similitudes con el sesgado δ -PN6047. La presencia de un sustituyente voluminoso e hidrofóbico contactando el lado EC de TM6 y TM7, es un hallazgo común con los ligandos selectivos.
- 4) La presencia de moléculas de agua en el poro interhelicoidal es mayor en los sistemas agonizados, especialmente en el complejo de DPI287. En los sistemas antagonizados y el apo, la región HL2 permanece deshidratada. Estos patrones se conservaron durante los muestreos GaMD.
- 5) Únicamente el sistema del aporreceptor interactuó con Na⁺ en el sitio del poro interhelicoidal, conocido como Sitio Central de Coordinación (CCS), ingresando desde el lado EC. El catión se establece como hexacoordinado y adyacente a N131^{3,35}.

Conclusiones

La farmacología del receptor δ va tomando relevancia debido a la novedosa modulación en sus efectos narcóticos y antidepresivos. La información disponible para este sistema irá en aumento, toda vez que el abuso de los narcóticos ha derivado en una seria crisis de opioides. En este contexto, la farmacología de los receptores δ y κ experimenta un desarrollo como campos principales de estudio.

Este estudio de DOR y varios de sus ligandos permitió conocer los patrones de este sistema, así como sentar algunas bases para estudios y análisis posteriores, que pueden conducir a eventuales diseños de fármacos selectivos, asistidos por computadora.

Tabla D1. Descripción general de los sistemas adicionales del receptor δ .

Sistema	Ligando	Clase estructural del ligando	Actividad del ligando	PDB ID
δ -NLX ^a	Naloxona	Morfinano	Antagonista putativo no selectivo δ_2	
δ -BPNF	Buprenorfina	Orvinol (derivado de oripavina, aducto de Bentley, 6,14-endoetanomorfinano)	Multifuncional: antagonista κ , δ /agonista parcial μ	4EJ4 ¹² , 4N6H ³
δ -Cmp4	Compuesto 4	Ciclopéptido	Antagonista selectivo δ	6PT2 ¹³ , 8F7S[226]
δ -PN6	PN6047	Benzhidrilidenpiperidina	Agonista sesgado δ	6PT3 ¹³
δ -BW3	BW373U86	Benzhidrilpiperazina	Agonista total selectivo δ	
δ -MRP	Morfina	Morfinano	Agonista cuasitotal no selectivo δ	4EJ4 ¹² , 4N6H ³
δ -ENKL	Encefalina L	Péptido	Agonista total no selectivo δ_1 /agonista inverso δ_2	6PT2 ¹³
δ -DLTR	Deltorfina II	Péptido	Agonista total selectivo δ_2	8F7S[226]
δ -SYK	SYK657	Morfinano	Agonista inverso total selectivo δ_2	4EJ4 ¹² , 4N6H ³

a. Se realizaron tres réplicas del sistema complejo con naloxona, para muestrear de mejor manera el colectivo conformacional.

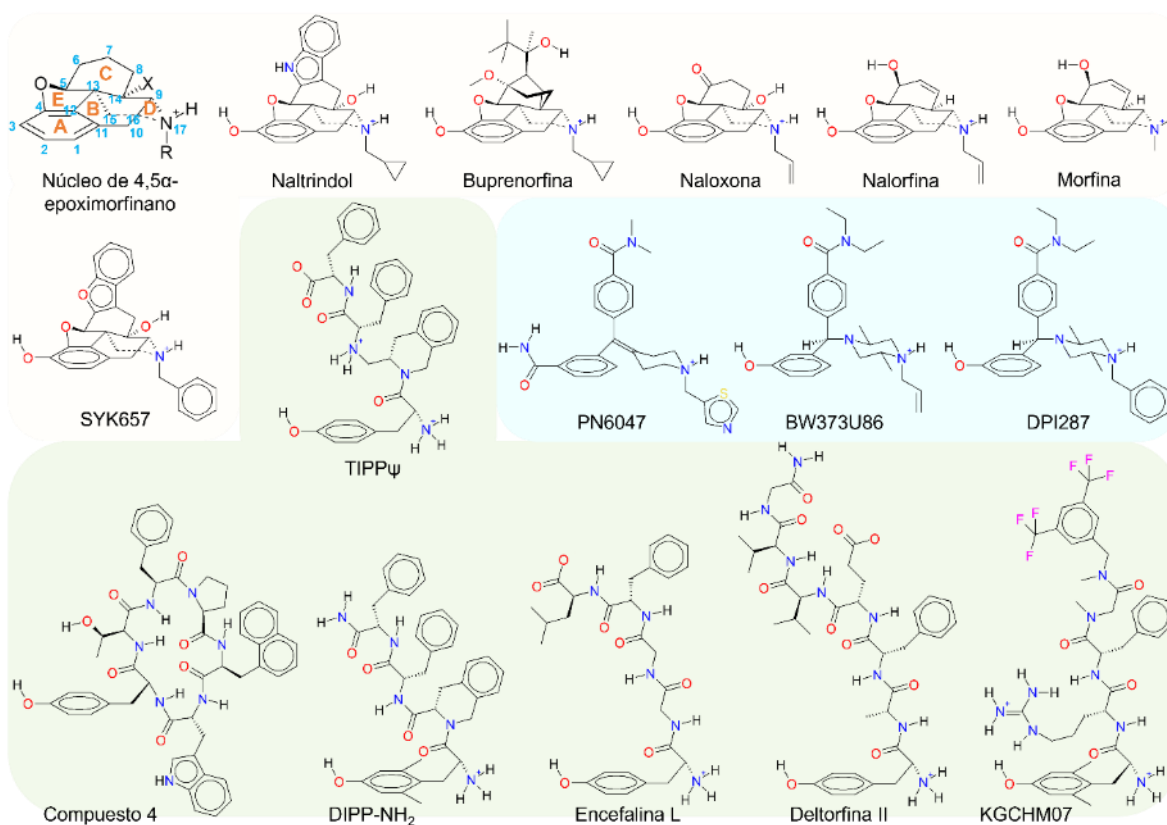


Figura D1. Estructuras bidimensionales de todos los ligandos estudiados en este trabajo. Entre ellos se encuentran los ligandos con núcleo de morfinano, 4-benzhidrilpiperazina/4-benzhidriliden-piperidina, y péptido/pseudopéptido. Los ligandos están agrupados por similitud estructural con el color del fondo. Color blanco: morfinanos, color cian: benzhidrilpiperazina o benzhidrilidenpiperidina, color gris: (pseudo)péptidos.

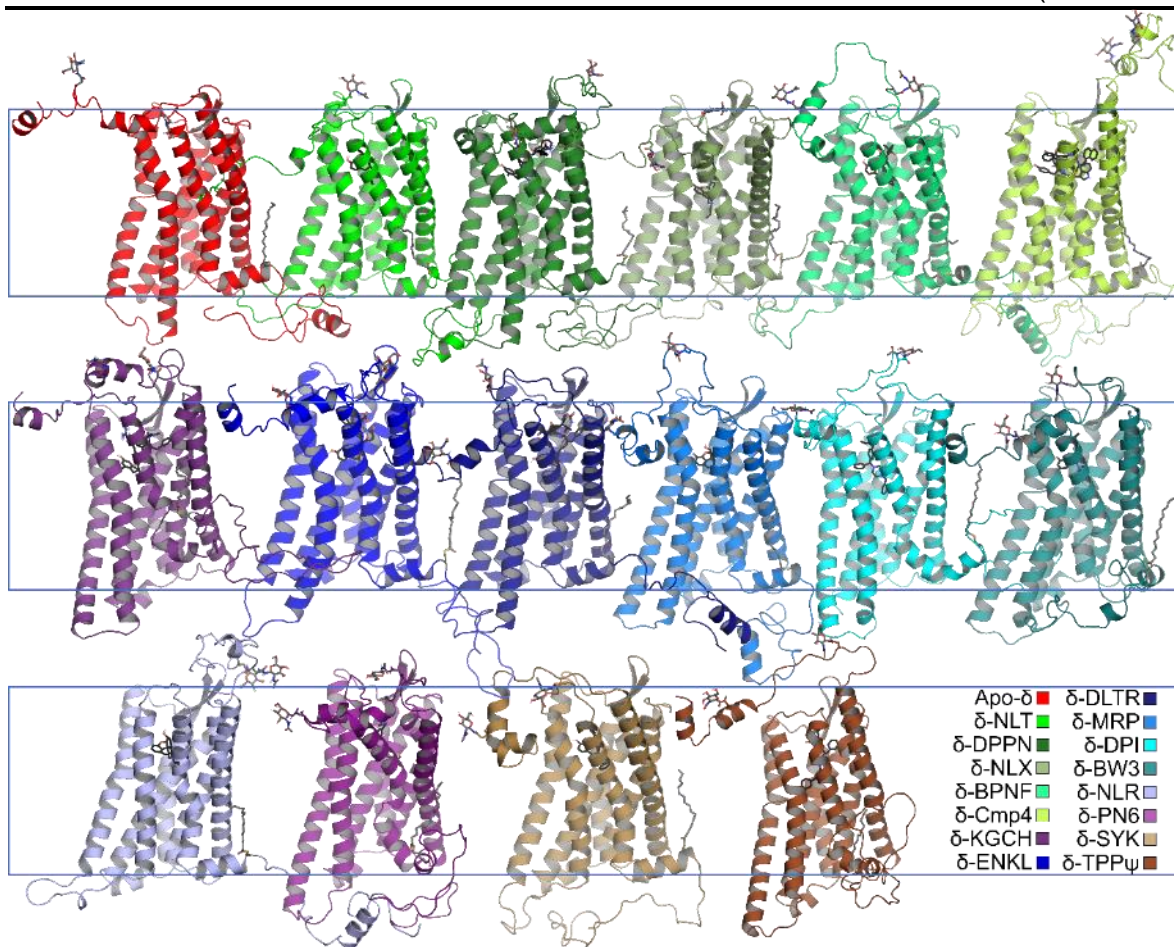


Figura D2. Conformers representativos de las simulaciones de todos los sistemas. Los conformers se alinearon con la configuración inicial respectiva, embebida en la membrana. Resultó evidente que en el sistema del aporreceptor y los antagonizados (primer renglón), el lado IC de TM5 y TM6 se alejan mutuamente, y en algunos casos, se despliegan parcialmente en favor de un incremento de ICL3. En contraste, todos los sistemas activos (segundo y tercer renglón), los lados IC de TM5 y TM6 se sitúan próximos entre ellos y extendieron su helicidad en detrimento de ICL3. En algunos casos, TM7 y H8 experimentaron una torsión y desplegamiento considerable. Los sistemas con agonistas parciales/sesgados y agonistas inversos presentaron características conformacionales mixtas entre ambos estados funcionales.

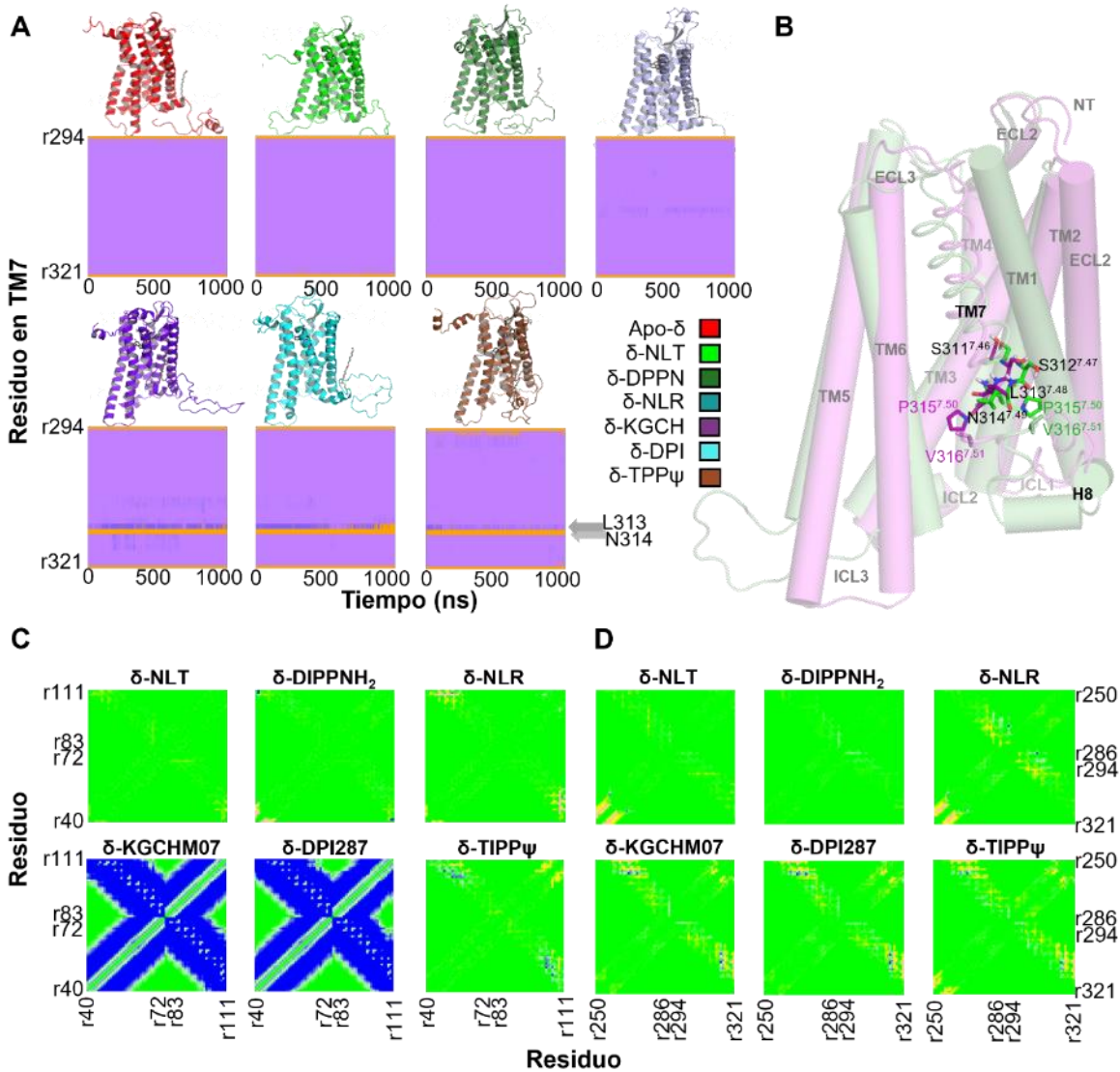


Figura D3. Cambios conformacionales en TM1-TM2 y TM6-TM7. (A) Estructura secundaria de TM7. Como se observa en los conformeros representativos del sistema apo, los complejos estativos y partitivos, la estructura secundaria se conserva en TM7 (en el último, una ruptura de helicidad incipiente se localiza en el sitio adyacente al grupo alilo de la nalorfina). En contraste, en los dos sistemas activos e inactivos, la TM7 se despliega parcialmente en el motivo NPXXY (B). Matrices de diferencias de distancia respecto al sistema apo, entre (C) TM1-TM2 y (D) TM6-TM7 (con un rango de 1.0 nm). Los contactos basados en distancia en los sistemas no activos son muy similares al sistema apo, con menores contactos cerca del lado EC en el sistema con nalorfina, y mayores en la misma región en el sistema con TIPP ψ . En contraste, en los dos sistemas activos, los contactos entre TM1 y TM2 son muy abundantes. En el sistema con naltrindol, hay una cantidad menor de contactos en el lado IC entre TM6 y TM7, mientras que en el complejo con DIPP-NH₂, los contactos son similares con apo- δ . En el complejo con nalorfina, de manera análoga al complejo con naltrindol, el número de contactos son similares, en adición con una región de menores contactos próxima al

lado EC. Para los sistemas complejo con KGCHM07, DPI287 y TIPP ψ , los contactos son mayores en el lado IC.

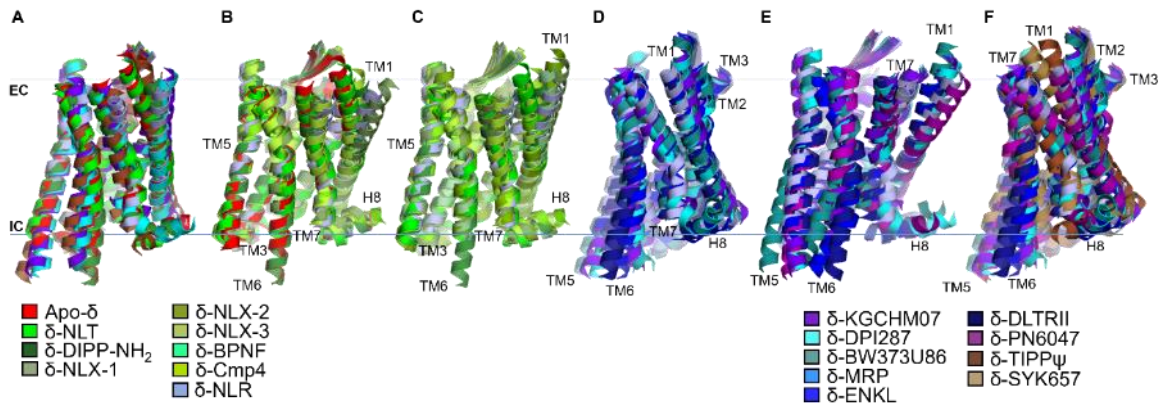


Figura D4. Hallazgos conformacionales entre los sistemas estudiados. Las conformaciones se tomaron del análisis de agrupamiento del TMD. Superposiciones de (A) los sistemas principales: apo- δ y los complejos con naltrindol, DIPP-NH₂, nalorfina, DPI287, KGCHM07 y TIPP ψ , donde los cambios conformacionales distintivos son evidentes. (B) Superposición del sistema apo y los complejos con los antagonistas y nalorfina (excepto naloxona). La alta similitud entre los conformeros es evidente, así como la extensión helicoidal del lado IC de TM5, similar al apo. (C) Complejos con antagonistas, incluyendo las réplicas con naloxona. El lado EC de TM1 varía entre las réplicas de NLX y el sistema con nalorfina. (D) Complejos con nalorfina y KGCHM07, DPI287, BW373U86, morfina, encefalina L y deltorfina II. Entre las múltiples diferencias conformacionales, la inclinación de los extremos IC de TM5 y TM6 son los más relevantes y están relacionados con el cambio de estado funcional. (E) Complejos con nalorfina y los agonistas, incluyendo a PN6047. (F) Todos los sistemas agonizados, incluyendo los dos agonistas inversos TIPP ψ y SYK657. Los conformeros representativos de los estados inactivos son similares a los activos, aunque los primeros sí alcanzaron estados de equilibrio dinámico, como fue detectado en los perfiles de RMSD.

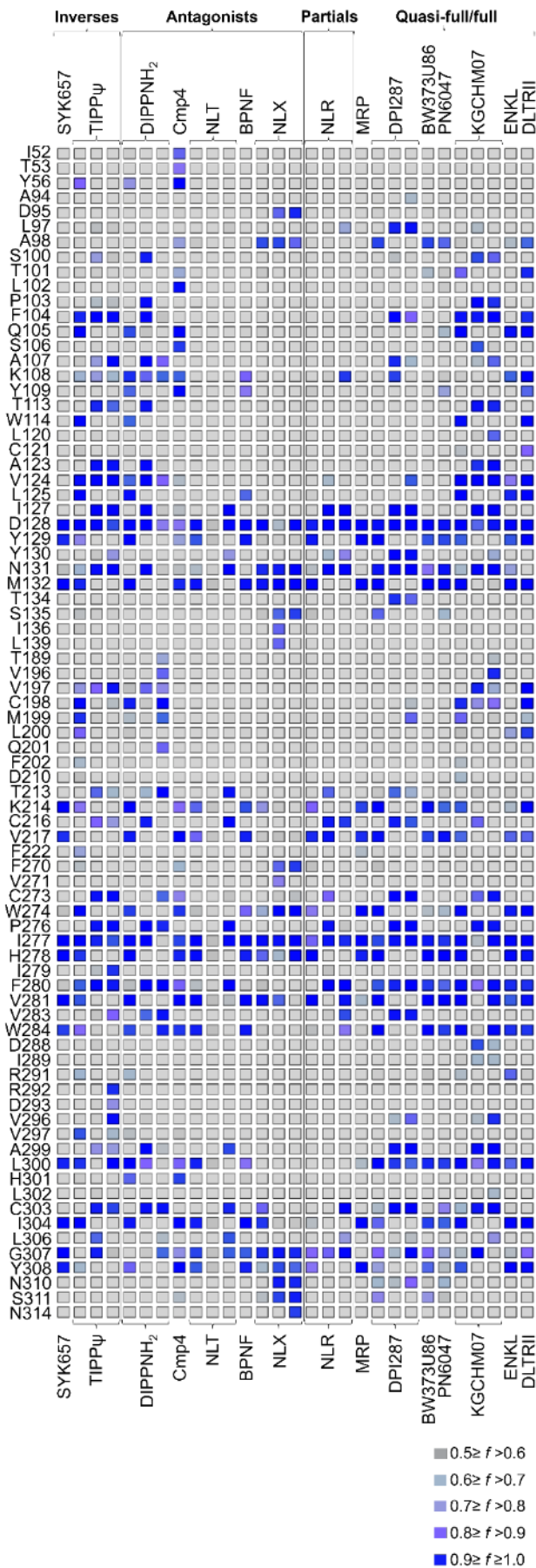


Figura D5. Interacciones de los ligandos en las simulaciones cMD. La imagen presenta la frecuencia escalada de contactos de los ligandos con el receptor δ , desde una interacción casi nula (color blanco) hasta un contacto predominante (color azul).

- i) El residuo Y56^{1,39}, cercano al sitio ortostérico, interactúa solamente con el Compuesto 4 (Cmp4), mediante el residuo de naftilalanina.
- ii) El residuo conservado D95^{2,50} and S135^{3,39} del sitio central de coordinación (CCS) sólo interactúa con naloxona (NLX), a través de su grupo protonado, actuando posiblemente como un equivalente del Na⁺, que previene la activación del receptor.
- iii) Los ligandos relacionados PN6047, DPI287 y BW373U86 comparten la interacción con A98^{2,53}, mediante el *N*-bencilo o *N*-alilo, y únicamente de manera ocasional la naloxona.
- iv) Los contactos con F104^{2,59}, W114^{ECL1} y V124^{3,28} están presentes en los complejos con agonistas totales o inversos (excepto encefalina L), en interacción con el residuo Phe³ de los ligandos. Este contacto podría desempeñar un papel importante en la selectividad de los péptidos interactuantes, toda vez que ENKL no interactúa con ellos.
- v) Q105^{2,60} contacta a través de la amida a ligandos peptídicos (TIPPψ, DIPP-NH₂, Cmp4, KGCHM07, deltorfina 2 (DLTRII) y ENKL).
- vi) D128^{3,32} y M132^{3,36} establecen contacto con todos los ligandos.
- vii) Y129^{3,33} interactúa con todos los ligandos, excepto TIPPψ, NLX, Cmp4 y BW373U86.
- viii) El residuo N131^{3,35}, implicado en la activación sesgada por la vía de la β -arrestina, interactúa con NLX y los ligandos relacionados PN6047, DPI287 y BW373U86.
- ix) K214^{5,39} estableció contactos con su grupo amonio y los metilenos de su cadena lateral. Como puente salino interactúa con DLTRII (con Glu³), a través de puentes de agua con morfina (MRP) y KGCHM07 (con *D*-Arg³), y mediante interacciones hidrofóbicas con SYK657, buprenorfina (BPNF), DIPP-NH₂ (con Tic²), PN6047, DPI287 y BW373U86.
- x) El disyuntor de transmisión W274^{6,48} estableció contactos directos con TIPPψ, NLX, DIPP-NH₂, DPI287, MRP, KGCHM07, DLTRII y ENKL. Principalmente a través del primer residuo peptídico (Tyr¹ o Dmt¹), los anillos A, B/D y el grupo *N*¹⁷-alquilo de los morfínicos (NLX y MRP), y grupo *N*¹⁷-bencilo equivalente de DPI287.
- xi) H278^{6,52} forma predominantemente puentes de agua con los grupos fenol de los ligandos, y puentes de hidrógeno directos en menor medida.
- xii) W284^{6,60} interactuó con el benzofurano e indol de SYK657 y NLT, respectivamente, el grupo C de BPNF, la amida secundaria de PN6047, DPI287 y BW373U86, Phe³ y/o Phe⁴, y Phe⁵ de Cmp4 de los péptidos, excepto con el agonista inverso TIPPψ.
- xiii) L300^{7,35} interactuó con todos los ligandos peptídicos aunque en menor grado con ENKL, y los morfínicos exceptuando BPNF, NLX, NLR y MRP. Todos los ligandos que no formaron esta interacción no son selectivos al receptor δ .
- xiv) I304 interactuó con todos los ligandos excepto NLX y NLR, y en menor medida con DPI287 y BW373U86.
- xv) Y308^{7,43} estableció interacciones con todos los morfínicos, aunque menores con NLR; con BW373U86 y los agonistas peptídicos.

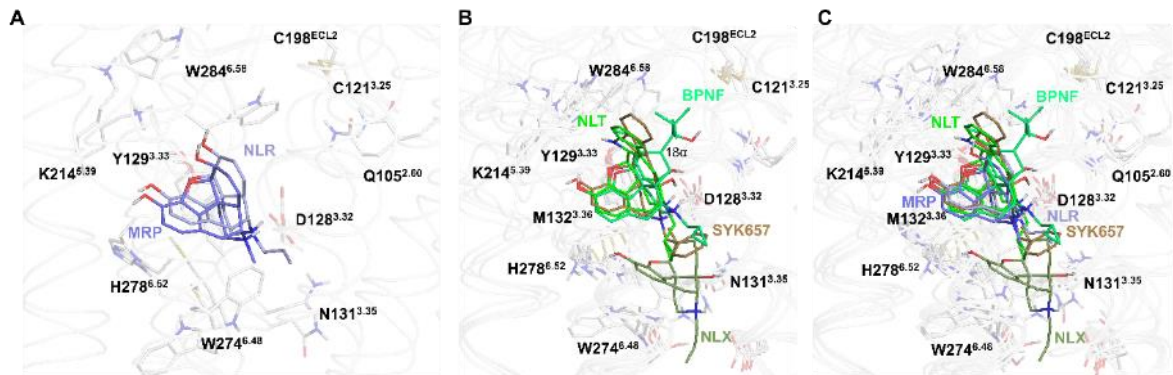


Figura D6. Interacciones de los morfinanos con el receptor δ . (A) El agonista morfina (MRP) y el agonista parcial nalorfina (NLR). Ambos ligandos son no selectivos, y carecen de un grupo C hidrofóbico y voluminoso. Las interacciones de ambos son similares, excepto para el grupo N¹⁷, donde el alilo de NLR interactúa con G307^{7.42} y W274^{6.48}. (B) Los antagonistas naltrindol (NLT, selectivo) y buprenorfina (BPNF, no selectivo), y el agonista inverso SYK657, que posee un sistema de benzofurano, análogo al indol de NLT. El grupo C de la buprenorfina, aunque es hidrofóbico y voluminoso, se ramifica desde el carbono 18 α ([286]) y se orienta hacia el vestíbulo del receptor, Q105^{2.60} y el puente disulfuro, y no hacia W284^{6.58}, donde el hidroxilo del grupo C interactúa con la glutamina y la cistina. (C) Superposición de los ligandos morfinanos, mostrando la configuración representativa en el OSS.

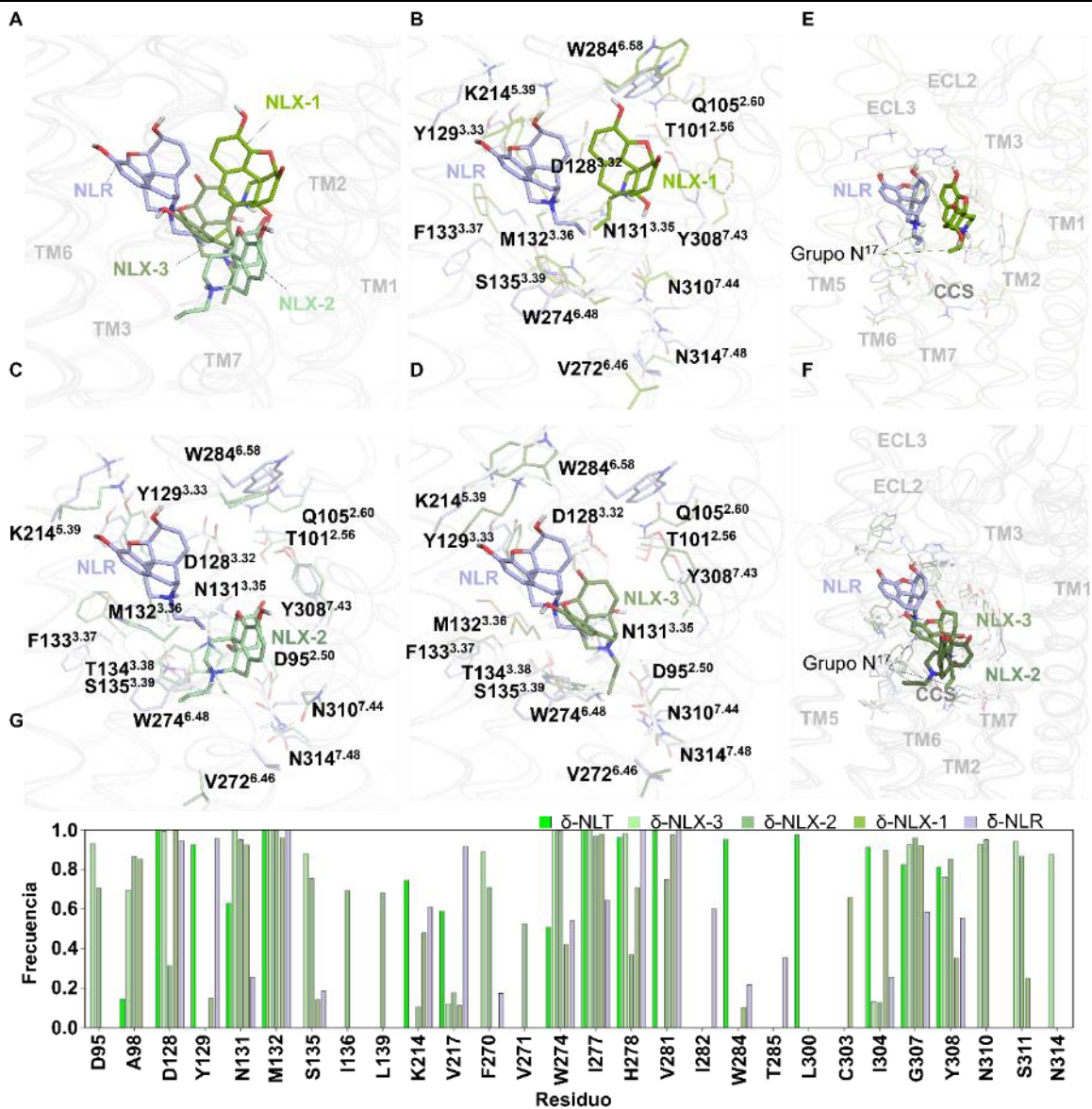


Figura D7. Comparación entre el agonista parcial nalorfina y el antagonista naloxona, en el sitio ortostérico. (A) Superposición de las configuraciones representativas de la nalorfina y las tres réplicas de naloxona. (B) La configuración de la réplica del complejo de naloxona con mayor similitud a la nalorfina (denominada NLX-1). El grupo alilo de la naloxona interactúa de manera próxima con N131^{3.35}, mientras que el de la nalorfina, con M132^{3.36}. (C) La réplica NLX-2, donde la naloxona experimentó una rototraslación hacia el sitio central de coordinación. (D) La réplica NLX-3, donde la molécula de naloxona solamente fue trasladada hacia el mismo sitio. Aún con estas diferencias, los cónfómeros de los complejos con nalorfina y (E) la réplica NLX-1, y (F) NLX-2 y NLX-3, mostraron configuraciones similares en el receptor. (H) Patrones comparativos de interacciones entre las réplicas de naloxona, el antagonista naltrindol (funcionalmente similar), y la nalorfina (estructuralmente similar). El gráfico de barras muestra los contactos que, en muchos casos, revela que los ligandos interactuaron de maneras análogas con el receptor.

En relación con la unión preferente de la naloxona a los dímeros μ - μ [78], y que posee un grupo cetona en lugar de un grupo hidroxilo, el sistema de este ligando presentó variaciones importantes, en relación con los complejos estructuralmente similares, en las tres réplicas. El enlace insaturado en el grupo N^{17} -alilo en la réplica I, estableció una interacción predominante con N131^{3.35}, con una distancia media de 0.288 nm, mientras que en la réplica II, el grupo N^{17} -alilo interactuó mayoritariamente con F270^{6.44} a una distancia promedio de 0.284 nm, mientras que en la réplica III, el grupo se extendió hacia el CCS (de manera análoga a como la cadena alquílica del ligando en el receptor cannabinoide 1; CB1 [283]), interactuando con N314^{7.48} (durante el 38.9% del tiempo de simulación en los últimos 900 ns, a una distancia media de 0.274, y en segundo lugar con W274^{6.48} (29.9% del tiempo a una media de 0.276 nm). En contraste, el anillo de ciclopropilo del naltrindol interactuó con G307^{7.42}, y el alqueno en nalorfina, tuvo escasos contactos con G307^{7.42} y W274^{6.48}. Por otro lado, de manera inesperada, el anillo N^{17} -bencilo de SYK657 estableció interacciones con I277^{6.51} e I304^{7.39}, mientras que el grupo equivalente en DPI287 se localizó próximo a M132^{3.36}. La configuración de la naloxona en la réplica I fue similar a la pose de la nalorfina de manera aproximada, y ambos complejos tuvieron múltiples diferencias en sus colectivos conformacionales. En las tres réplicas, la rotación de la cadena lateral de Y129^{3.33} en el diedro χ_2 se mantuvo libre, en contraste con la configuración restringida en los sistemas con naltrindol y nalorfina. Mientras que Y129^{3.33} formó un puente de hidrógeno con el átomo O⁶ del alcohol, y O⁵ del epóxido en la nalorfina, el grupo hidroxilo de la tirosina permaneció distante de estos átomos del ligando en los sistemas complejo con naloxona.

El grupo 14-hidroxilo en las réplicas I, II y III interactuó con N131^{3.35} durante unos 200 ns, con S135^{3.39} los últimos 700 ns de simulación, y con G307^{7.42}, respectivamente, en contraste con naltrindol y SYK657, que contactan de manera muy relevante a D128^{3.32}. Estos patrones exclusivos del complejo con naloxona, respecto a sus análogos estructurales y sus grupos equivalentes en otros sistemas, en conjunto con las particularidades experimentales que la caracterizan, permite develar un probable mecanismo novedoso de antagonismo en el receptor δ , al menos en la forma monomérica.

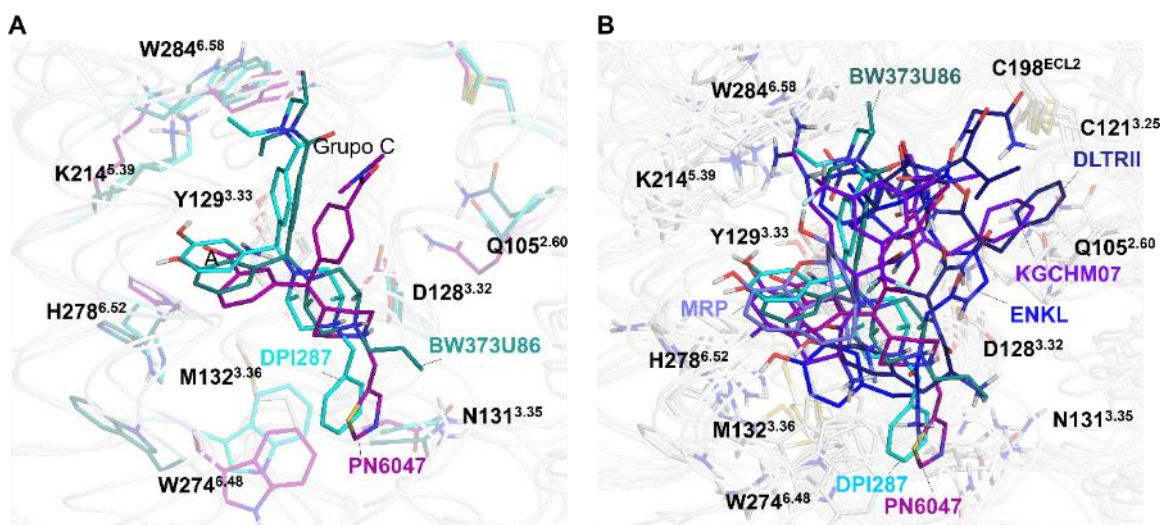


Figura D8. Interacciones de los agonistas en el sitio ortostérico. (A) Configuraciones emdianas de los agonistas selectivos DPI287 y BW373U86, de tipo benzhidrilpiperazina, y el agonista sesgado PN6047, de la clase estructural de las benzhidrilidenpiperidinas, con configuración muy similar. Los grupos N^{17} compartieron una interacción cercana con W274^{6.48} o N131^{3.35}, en comparación a los ligandos peptídicos. El contacto con el grupo indol del disyuntor es directo para el N^{17} -(5-tiazolilmetilo) de PN6047, y estrictamente hidrofóbico para el N^{17} -bencilo de DPI287. Debido a esta diferencia de interacciones con el disyuntor de transmisión, que no son compartidas con BW373U86, es factible que DPI287 también sea un agonista sesgado. Las subestructuras correspondientes al grupo C, las amidas secundarias que confieren selectividad a DOR, interactúan con W284^{6.48}, en concordancia con los hallazgos previos. Estos ligandos no interactúan de manera notable con Q105^{2.60} ni el puente disulfuro. (B) Superposición de todos los ligandos agonistas, donde es notable la congruencia en las configuraciones e interacciones entre sus subestructuras, donde los péptidos establecen interacciones con los residuos de glutamina y cistina, formando puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, particularmente con el extremo C-amidado de la deltorfina II.

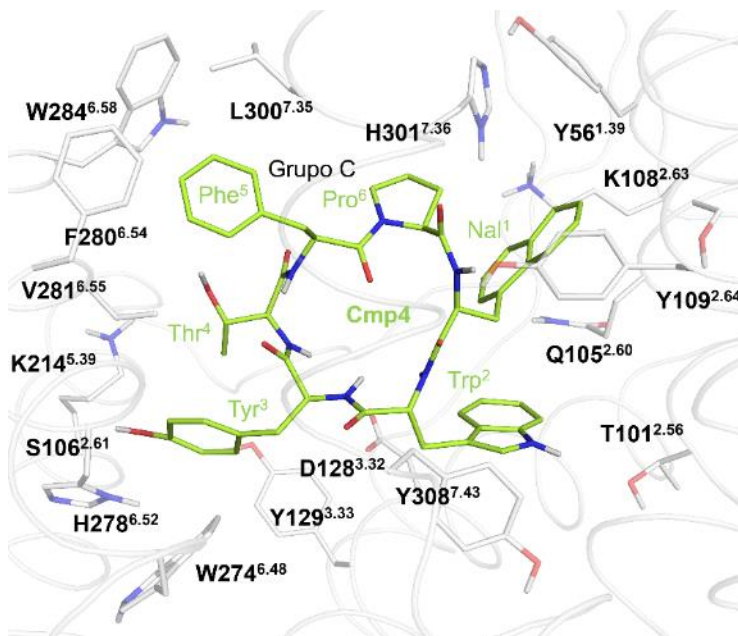


Figura D9. Detalle de las interacciones del ciclopéptido **Compuesto 4** con el receptor. El residuo Tyr³ del ligando, el equivalente del anillo A, interactúa de manera análoga a los otros ligandos, y en ausencia del grupo amonio terminal, los residuos Trp², Tyr³ y Thr⁴ interactuaron con D128^{3.32}. Cmp4 estableció interacciones aromáticas e hidrofóbicas a través de su grupo C, constituido por Phe⁵ y Thr⁴, y con Nal¹ y Trp² con Y56^{1.39}, Q106^{2.60} y K108^{2.63}, así como con Y308^{7.43}, respectivamente.

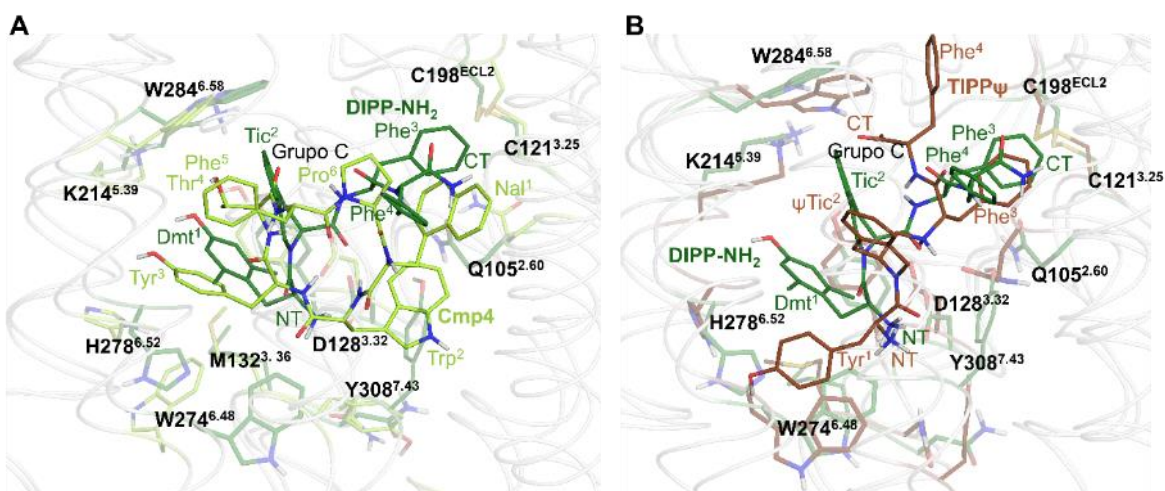


Figura D10. Interacciones de los péptidos no activadores. (A) Los antagonistas DIPP-NH₂ y Compuesto 4. (B) DIPP-NH₂ y el agonista inverso TIPPψ. DIPP-NH₂ interactuó con C198^{ECL2} y Q105^{2.60} mediante Phe³, mientras que Cmp4 a través de Nal¹, y TIPPψ también con Phe³. La configuración del anillo A fenólico fue similar en DIPP-NH₂ y Cmp4, pero diferente en TIPPψ. El ciclopéptido no interactuó de manera predominante ni directa con W274^{6.48}, mientras que TIPPψ sí lo hizo.

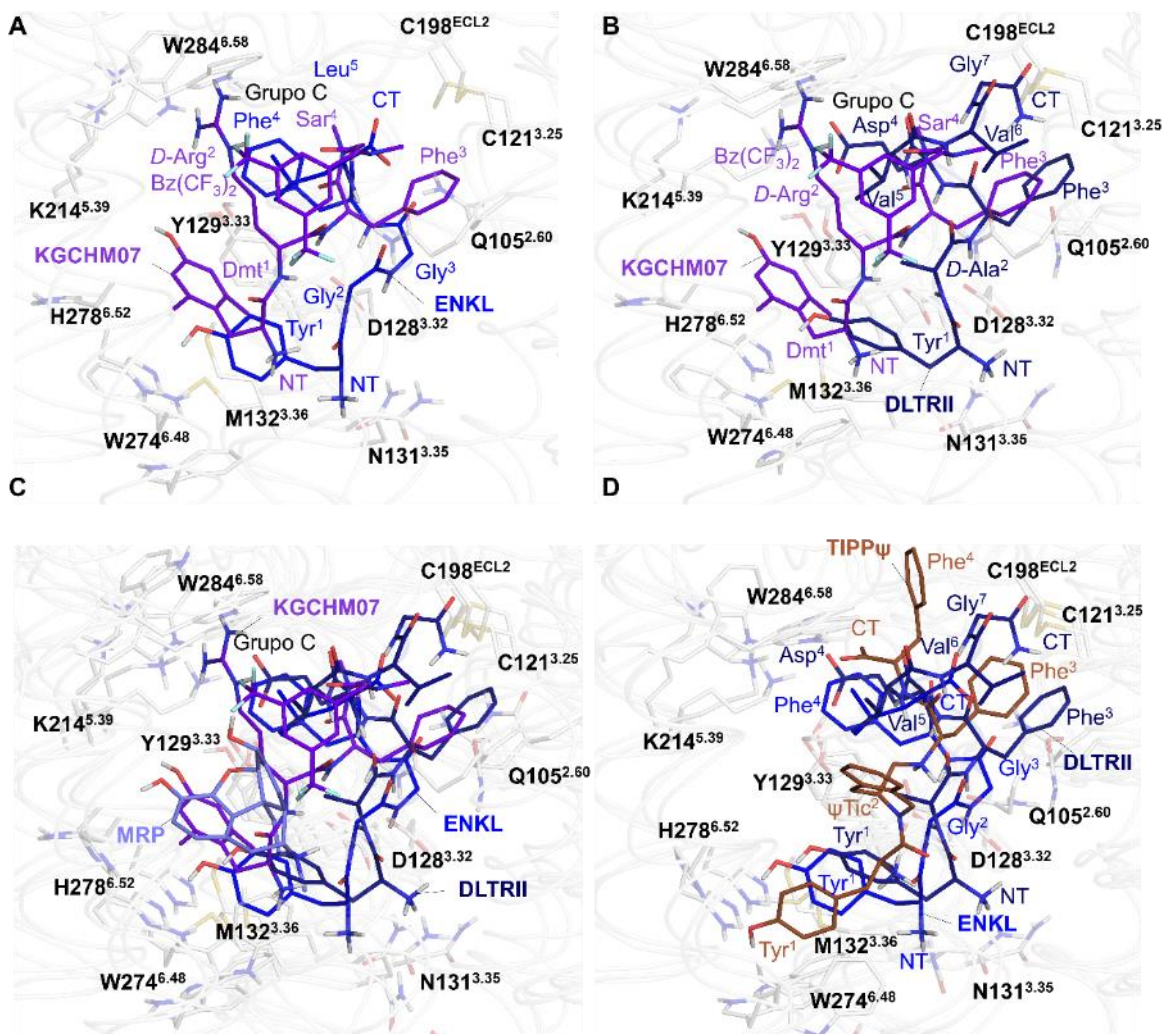


Figura D11. Interacciones péptidos agonistas totales. (A) KGCHM07 y encefalina L (ENKL) en el sitio ortostérico, a partir del análisis de agrupamiento. El residuo Dmt¹ de KGCHM07, equivalente al anillo A, se posicionó predominantemente en la misma configuración, mientras que Tyr¹ de ENKL se desplazó hacia W274^{6.48}. El N-terminal del primero interactuó con D128^{3.32}, y el de ENKL se desplazó hacia TM7. El residuo D-Arg² y el grupo *bis*-(trifluorometil)-bencilo (Bz(CF₃)₂) de KGCHM07, que en conjunto forman el grupo C, se encontraron rodeados por W284^{6.58} y su cavidad hidrofóbica de manera similar a los residuos Phe⁴ y Leu⁵ de ENKL. Por su parte, Phe³ y Gly³ formaron un entorno hidrofóbico adyacente a Q105^{2.60} and C121^{3.25}. (B) KGCHM07 y el agonista selectivo δ_2 deltorfina II (DLTRII) en el sitio ortostérico. El N-terminal de ambos péptidos interactuó de manera similar con D128^{3.32}. El grupo C voluminoso de DLTRII está formado principalmente por Val⁵, cercano al grupo Bz(CF₃)₂ de KGCHM07, y a Leu⁵ de ENKL. DLTRII, como KGCHM07, interactuó a través de Phe³ con la glutamina y cistina del receptor, mientras que ENKL lo efectuó mediante Gly³. De manera similar al C-terminal del agonista inverso TIPP ψ , el residuo Asp⁴ de DLTRII se posicionó hacia el grupo protonado de K214^{5.39}. El extremo C-amidado de DLTRII formó puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con Q105^{2.60} y el puente disulfuro, mientras que el C-terminal de ENKL se

orientó hacia el vestíbulo. (C) Superposición de los agonistas peptídicos KGCHM07, ENKL y DLTRII, junto a morfina, mostrando las similitudes entre ellos en el sitio de unión. (D) Deltorfina II, encefalina L y el agonista inverso TIPP ψ superpuestos con fines comparativos. La configuración del residuo Tyr¹ entre TIPP ψ y ENKL fue parecida en las estructuras representativas de la simulaciones. Aunque ambos ligandos tienen el C-terminal como carboxilato, cada uno se orientó de maneras distintas en el sitio, y la interacción con Q105^{2.60} es peptídica e hidrofóbica, respectivamente.

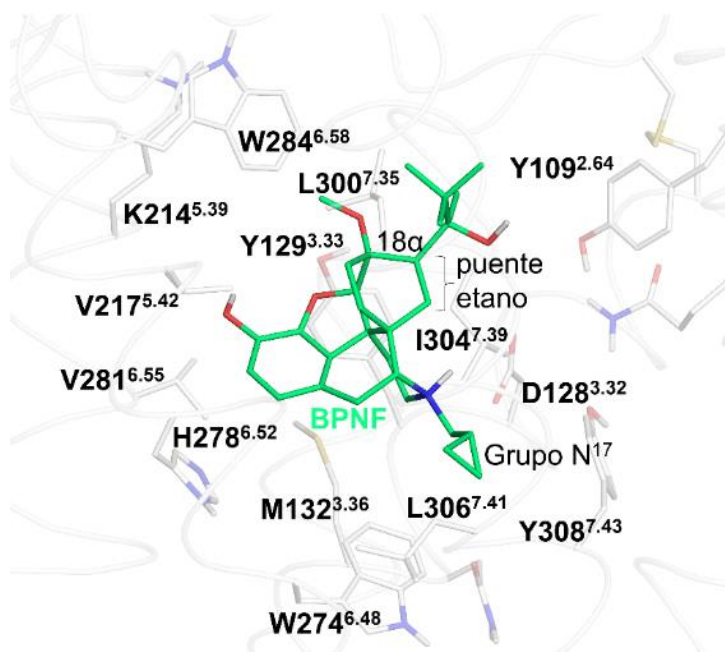


Figura D12. Detalle de las interacciones de la buprenorfina con DOR. El núcleo de morfina estableció interacciones como los otros miembros de su clase. El sustituyente voluminoso del ligando, ramificado del átomo 18 α del puente etano, no interactuó con W284^{6.58} como el grupo C de los ligandos selectivos. Esta característica puede explicar la ausencia de selectividad de la BPNF, que también se une a MOR. El grupo metoxilo se situó cercano a V281^{6.55} y W284^{6.58}.

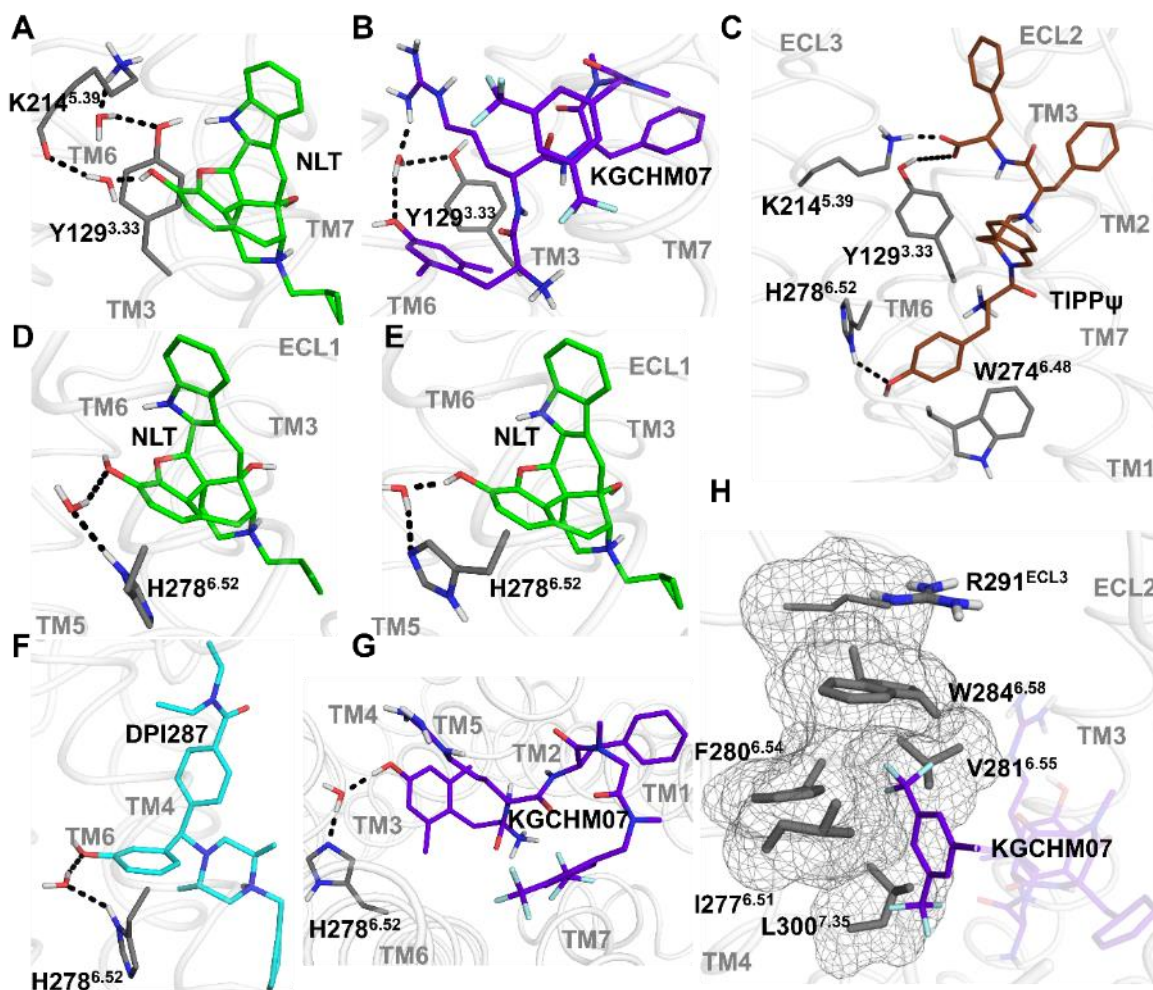


Figura D13. Algunas interacciones representativas de los ligandos con el receptor δ . Interacciones mediadas por moléculas de agua, de Y129^{3.33} con el grupo fenol de (A) naltrindol y (B) KGCHM07. Los residuos protonados K214^{5.39} y Arg² fueron parte de la red de moléculas de agua. (C) TIPPP estableció una interacción directa con H278^{6.52}, mientras que éste último formó puentes de agua con naltrindol como (D) donador y (E) aceptador de puente de hidrógeno, y con (F) DPI287 como donador y (G) KGCHM07 aceptador. (H) El grupo *bis*-trifluorometilbencilo de KGCHM07 quedó inmerso en la cavidad hidrofóbica formada por W284^{6.58}, V281^{6.55}, F280^{6.54}, I277^{6.51}, and L300^{7.35}, que también confiere especificidad al receptor para los sustituyentes voluminosos de los grupos C.

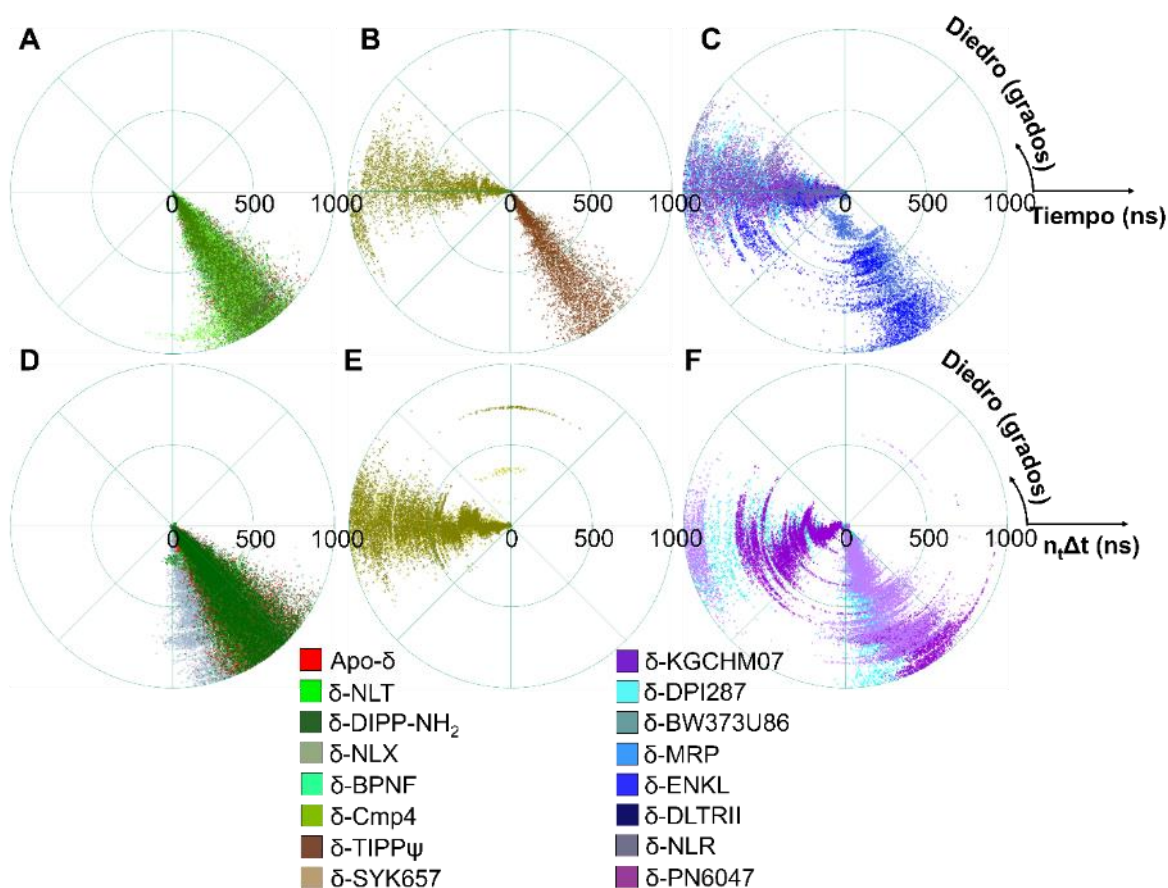


Figura D14. Ángulo dihedral χ_1 (N-C α -C β -C γ) de Y318^{7.53}. Gráficos polares de las simulaciones cMD y GaMD; para A y D: sistemas no agonizados, B y E: sistemas inactivados, y C y F: sistemas agonizados totales. El sistema del aporreceptor, junto a los complejos con naltrindol, DIPP-NH₂, nalorfina, naloxona, buprenorfina, y Compuesto 4, son invariantes en sus rotámeros, que posicionan la cadena lateral del residuo hacia el Sitio Central de Coordinación. Entre los agonistas inversos, solamente el complejo con SYK657 adoptó el rotámero de sistema no agonizado, mientras que el complejo con TIPP ψ se asemejó a los sistemas agonizados, que predominantemente situaron el rotámero con la cadena lateral dirigida hacia el lado IC. En los muestreos cMD, sólo la morfina y la encefalina L fluctuaron en los valores del ángulo diedro. En las simulaciones GaMD, en una réplica de DPI287, Y318^{7.53} adquirió una orientación hacia IC y la otra hacia el lado EC, mientras que las dos réplicas del complejo con KGCHM07 adoptaron ambos rotámeros.

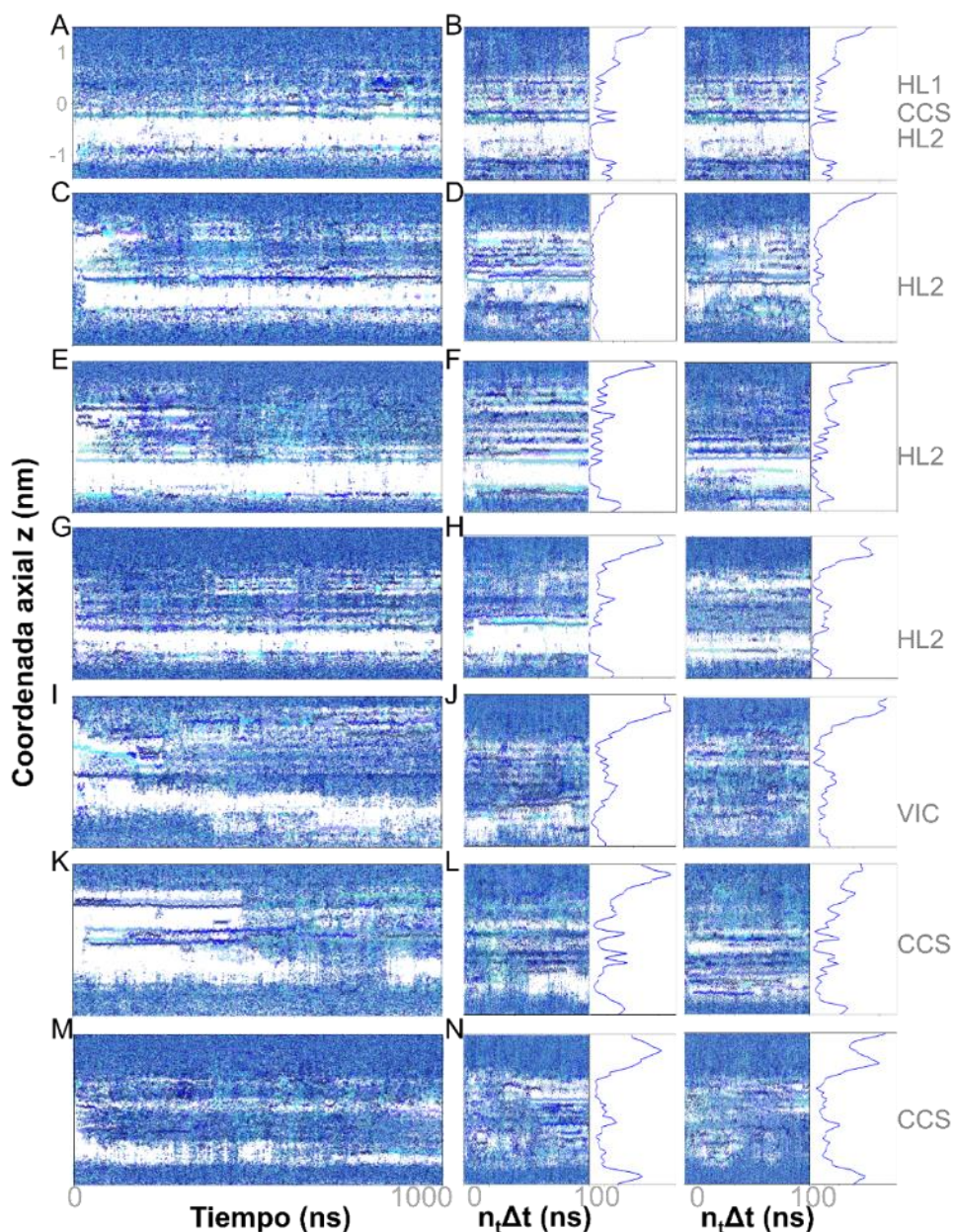


Figura D15. Presencia de agua en el poro interhelicoidal de los sistemas de DOR. Las tendencias de hidratación observada en los muestreos cMD continuaron presentes en las simulaciones aceleradas. Para (A) apo- δ , (C) δ -NLT, (E) δ -DIPP-NH₂, y (G) δ -NLR, las moléculas de agua no penetraron notablemente en la capa hidrofóbica 2 (HL2), donde se localiza Y318⁷⁻⁵³. Durante las réplicas GaMD (B, D, F y H respectivamente), HL2 permaneció con menores interacciones con moléculas de agua. Sin embargo, los sistemas agonizados principales (I) δ -KGCHM07, (K) δ -DPI287 y (M) δ -TIPP ψ , que iniciaron con la HL2 hidratada durante el muestreo cMD, se hidrató en grado sumo durante el muestreo GaMD (J, L, and N respectivamente).

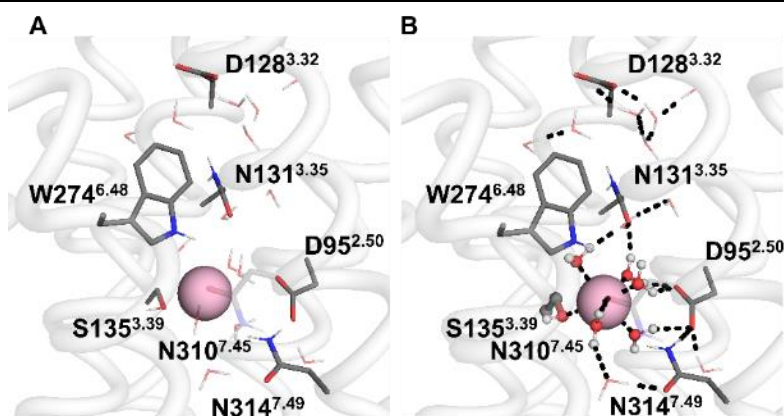


Figura D16. Interacciones del catión sodio en el Sitio Central de Coordinación en apo- δ . El catión se rodeó por una red de moléculas de agua que se extendió desde el disyuntor de transmisión W274^{6.48} y el residuo and N131^{3.35}.

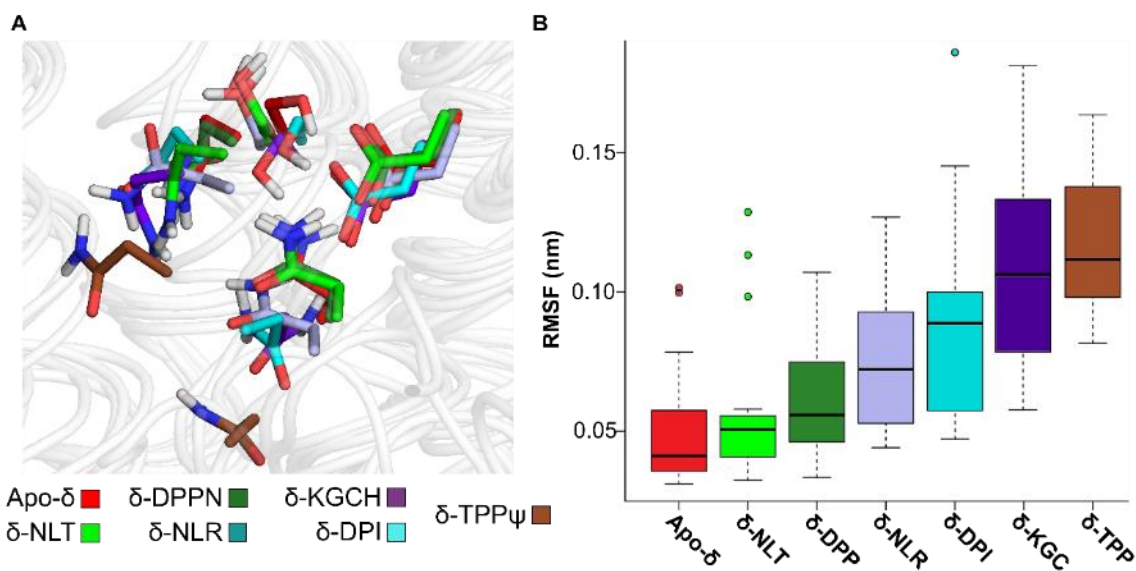
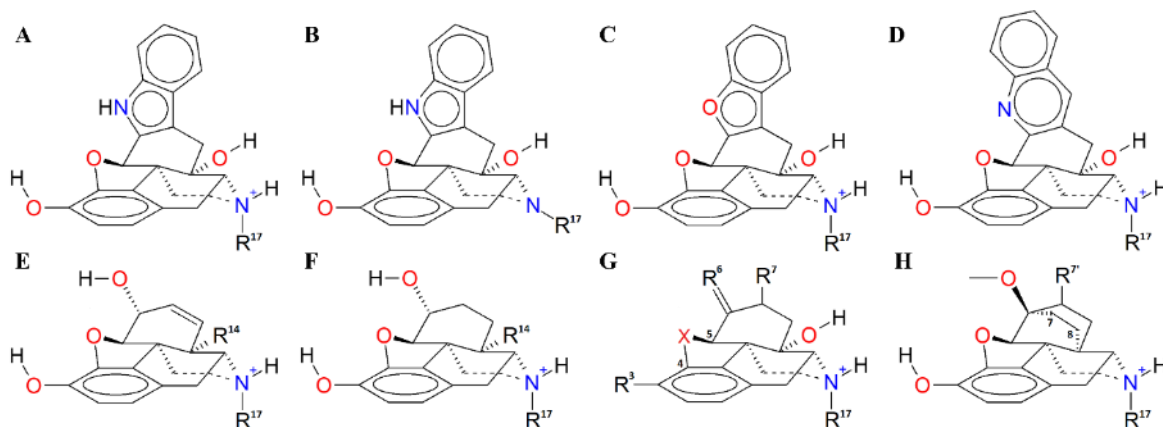


Figura D17. Sitio Central de Coordinación (CCS) en DOR. Los residuos D95^{2.50}, S135^{3.39}, N310^{7.45} and N314^{7.49} forman la cavidad central para Na⁺. (A) Configuración mediana del CCS. El sistema apo y los complejos con naltrindol, DIPP-NH₂ y nalorfina fueron similares en su configuración representativa, mientras que en el complejo con TIPP ψ , el CCS se colapsó debido al desplegamiento parcial y desplazamiento de TM7. (B) Valores de RMSF de la cadena lateral de estos residuos (junto con C273^{6.47}). Los valores de RMSF fueron menores en el sistema coordinado con Na⁺ y en los antagonizados, mayor en los agonizados, teniendo el complejo con el agonista inverso TIPP ψ los mayores.

Tabla D2. Estudio de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) realizado a un grupo de morfinaos. A continuación se muestra la estructura de estas moléculas.



Núcleo A		Núcleo B		Núcleo C		Núcleo D			
R ¹⁷	Nombre	R ¹⁷	Nombre	R ¹⁷	Nombre	R ¹⁷	Nombre		
-CH ₂ CH(CH ₂) ₃	Naltrindol	-COCH(CH ₂) ₃	SYK623	-CH ₂ CH(CH ₂) ₃	Benzofurano	-CH ₂ CH(CH ₂) ₃	1		
-CH=CH ₂	1M	-COCH ₂ C ₆ H ₅	SYK754	-CH ₂ C ₆ H ₅	SYK657	-CH ₂ CH ₃	6A		
-CH ₂ CH ₂ F	1C	-SO ₂ CH ₃	9A			-CH ₂ CH ₂ CH ₃	6B		
-CH ₂ CHF ₂	1B	-SO ₂ CF ₃	9B			-CH ₂ CH ₂ CH ₂ F	6C		
-CH ₂ CF ₃	1A	-SO ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	9C	Core H					
-CH ₂ CCl ₃	1F	-SO ₂ (CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	9D	R ¹⁷	R ⁷	7-8	Nombre		
-CH ₂ CH ₂ CF ₃	1D	-SO ₂ CH(CH ₂) ₃	9E	-CH ₃	-CH[OH][CH ₃]	C=C	Etorfina		
-CH ₂ CF ₂ CF ₃	1E	-SO ₂ CH=CH ₂	9G	-CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	C-C	Dihydroetorfina		
-C ₆ H ₅	1J					C-C	RX6007M		
-CH ₂ C ₆ H ₅	1K					C-C	Diprenorfina		
-CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₅	1L			-CH ₂ CH(CH ₂) ₃	-C[CH ₃] ₂ [OH]	C-C	Diprenorfina		
					-CH[OH][CH ₃]	C-C	Buprenorfina		
					C(CH ₃) ₃				
Núcleo E				Núcleo G					
R ¹⁷	R ¹⁴	R ³	Nombre	R ¹⁷	R ⁷	R ⁶	R ³	4-X-5	Nombre
-CH ₃	-H	-H	Morfina	-CH ₃	-H,-H	O	-OH	-O-	Hidromorfona
-CH ₃	-H	-CH ₃	Codeína	-CH ₃	-H,-H	O	-OCH ₃	-O-	Hidrocodona
-CH=CH ₂	-H	-H	Nalorfina	-CH=CH ₂	-H,-H	O	-OH	-O-	Naloxona
-CH ₂ CH(CH ₂) ₃	-OH	-H	Deshidronalbufina	-CH ₂ CH(CH ₂) ₂	-H,-H	O	-OH	-O-	Naltrexona
				-CH ₂ CH(CH ₂) ₂	=CHC ₆ H ₅	O	-OH	-O-	Benzilidennaltrexona
				-CH ₂ C ₆ H ₅	=CHC ₆ H ₅	O	-OH	-O-	SYK656
-CH ₃	-H	-H	Dihidromorfina	-CH ₂ CH(CH ₂) ₂	-H,-H	CH ₂	-OH	-O-	Nalmefeno
-CH ₃	-H	-CH ₃	Dihidrocodeína	-CH ₂ CH(CH ₂) ₂	-H,-H	O	-CONH ₂	-OH	Samidorfano
-CH=CH ₂	-H	-H	Dihidronalorfina						
-CH ₂ CH(CH ₂) ₃	-OH	-H	Nalbufina						

Estructuras de (A) morfinaos: naltrindol y la serie de moléculas de Shigeto Hirayama (color amarillo claro), (B) serie de sulfonilmorfinaos de Chiharu Iwamatsu (color verde claro), (C) morfobenzofuranos: naltribén y su análogo SYK656, (D) serie de morfoquinolinas de Toru Nemoto (color azul claro), (E) 4,5-epoximorfinaos: morfina, codeína, nalorfina and deshidronalbufina, (F) 7,8-dihidro-4,5-epoximorfinaos, (G) moléculas con el núcleo de morfinao-6-ona, y (H) dihidronorvinolinos.

El cambio de N^{17} -metilo por N^{17} -alilo en el agonista morfina, origina al agonista parcial nalorfina, y del agonista parcial oximorfona al antagonista naloxona; el cambio del grupo N^{17} -ciclopropilmetilo por N^{17} -ciclobutilmetilo, del agonista 6β -naltrexol al agonista parcial nalbufina [280]; implica un cambio por un sustituyente más voluminoso que en el caso de los antagonistas morfínicos típicos. En acuerdo con estos fenómenos, se ha reportado [287], que los grupos electroattractores como aquellos en los antagonistas, como sustituyentes en N^{17} , son muy importantes para su actividad. Por su parte, el cambio del ciclopropilmetilo en naltrindol por fenilacetilo produce el agonista total SYK754, y su reemplazo con sustituyentes bencilsulfonilo ($C_6H_5 CH_2 SO_2-$) y fenetilsulfonilo ($C_6H_5 (CH_2)_2 SO_2-$), genera los respectivos agonistas parciales (47.1% y 88.1% de eficacia, respecto al agonista DPDPE). En segundo lugar, el derivado N^{17} -bencensulfonilo ($C_6H_5 SO_2$) posee actividad antagonista, mientras que los grupos mesililo ($CH_3 SO_2-$), triflilo ($CF_3 SO_2-$), ciclopropilsulfonilo ($[CH_2]_2CH SO_2-$) y vinilsulfonilo ($CH_2 CH SO_2-$) genera los agonistas parciales (con eficacias -48.8%, -36.1%, -80.5% y -80.2%, respectivamente). Finalmente, el derivado con el grupo ciclopropilcabilo (SYK623) es un agonista inverso casi total (menos del -69% de eficacia respecto a SNC80 [288]). Respecto a las diferencias entre las carboxamidas y las sulfonamidas, está reportado [289] que las primeras poseen mayor dureza química y tienen un momento dipolar menor que las últimas. Además, el grupo bencensulfonilo incrementa la basicidad de los dos heteroátomos, mayor en el átomo de nitrógeno y menor en el átomo de oxígeno, mientras que el grupo trifluorometilsulfonilo disminuye la basicidad en los mismos átomos, ambos respecto al sustituyente metilsulfonilo. Esto vuelve más factible que el átomo de nitrógeno de una sulfonamida interactúe con un protón ácido que el N de una carboxamida, por lo que en la última, la interacción con el 14-hidroxilo sería más fuerte. Con estas evidencias, se deduce que: *i*) La disminución de la basicidad en N^{17} influye en el cambio de agonista inverso hacia agonista, y *ii*) la ausencia de una deslocalización continua de electrones favorece una actividad tipo activadora. En el caso de los derivados con los grupos bencilsulfonilo y fenilacetilo, parece que la interacción del 14-hidroxilo con el N^{17} en la sulfonamida, debilita su carácter de donador de puente de hidrógeno para D128^{3,32}, y de esta manera, reduciría su capacidad activadora, respecto a la carboxamida, que podría interactuar a través del O de la amida, que se encuentra más alejado. Este efecto en la capacidad donadora de puente de hidrógeno del 14-hidroxilo puede explicar las diferencias entre la hidrocodona y la oxycodona (ambos con el anillo A metoxilado), con 39% y 21% respecto a SNC80 [290]; también metilado, pero no entre la hidromorfona y la oximorfona (29% y 33% de eficacia). La ausencia de resonancia en los grupos en N^{17} , junto a la presencia del grupo 14-hidroxilo, permite preservar la interacción conservada con D128^{3,32}, que parece estar relacionada con la activación de DOR, en este nivel. Una mayor deslocalización determinaría un mayor efecto no activador, como es posible observar con el grupo bencensulfonilo en comparación con los agonistas mencionados. Por otro lado, el cambio del grupo ciclopropilo con etilo o propilo en los compuestos con núcleo de morfoquinolina (32.4%, 41.2% y 62.4% de eficacia respecto a DPDPE [160]), no influye marcadamente en la actividad agonista parcial. Aparentemente, los sustituyentes acíclicos o con menor energía torsional, favorecen una actividad de agonista, como podría ser en el caso de la

nalbufina, que posee el grupo N^{17} -ciclobutilmetilo. La presencia de uno a tres átomos de flúor en estos grupos acíclicos, en particular en la posición 2 del etilo del análogo del naltrindol, le confiere actividad agonista inversa parcial (-38.1%, -48.6% y -44.8% respecto a DPDPE), mientras que estas sustituciones en los morfoquinolinas respectivas, les atribuye una actividad agonista parcial (27.1% de eficacia para el monofluorado, respecto a DPDPE), o perfiles antagonistas [160]. Debido a que los átomos de flúor poseen propiedades electrónicas muy distintas a los grupos hidrocarbonados, como son mayor momento dipolar y dureza química, tienen mayor capacidad de atraer densidad electrónica, afectando así directamente al átomo C2 del etilo. Estos grupos pueden crear un entorno de mayor localización electrónica que sus contrapartes alquílicas, y una deficiencia electrónica relativa en N^{17} , impactando la actividad funcional de los ligandos. En algunos de los casos mencionados previamente, las contribuciones de los grupos en los ligandos parecieran ser aditivas de una manera aproximada. Así, se concluye que una deslocalización electrónica extendida, y/o la ausencia de átomos electrófilos (como en el grupo alilo) como sustituyentes en N^{17} , es una contribución para la actividad proagonista en estas subestructuras.

La saturación del anillo morfinano C incrementa ligeramente la afinidad y activación en los receptores opioides respecto a las contrapartes insaturadas, como es evidente en el cambio de morfina a dihidromorfina [216] (con 103% a 106% de eficacia [150]). El cambio del grupo 6-alcohol por 6-cetona incrementa la afinidad respecto al compuesto saturado, como es evidente entre dihidromorfina e hidromorfona [216], pero disminuye su eficacia (73% y 29% respecto a SNC80), preservando la actividad agonista. Durante las reacciones de biotransformación, las variaciones diastereoméricas de las reacciones de saturación de 6-cetonas a 6-alcoholes o viceversa, tienen un impacto en el perfil farmacológico de los sustratos. Se ha reportado [291] que la configuración 6α -hidroxilo confiere mayor eficacia que la 6β -hidroxilo, y de esta forma, el 6β -naltrexol posee una eficacia disminuida respecto a la nalbufina (considerando también el cambio en N^{17}). Variaciones en los grupos C, como se mencionó previamente, influyen de manera notable en la selectividad hacia DOR. Sin embargo, los grupos con configuración 7β tienden a restar selectividad al compuesto parental, como se vio en los opiáceos más conocidos: morfina, codeína, tebaína, etc. Dos características parecen influir en esta actividad: *i*) la capacidad donadora o aceptora de puente de hidrógeno del grupo C, y *ii*) el carácter electrodonador o electroceptor.

Los ligandos que interactúan con W284^{6,58} y la correspondiente cavidad hidrofóbica poseen, una subestructura electrónicamente conjugada o densa, y en algunos casos, un formador de puente de hidrógeno directamente unido al anillo C. Cuando el grupo C posee un donador, como en el caso de la buprenorfina (con 19% de eficacia respecto a SNC80 [281] y), y sus análogos -denomianados nororvinoles- diprenorfina (un agonista δ total con 98.5% de eficacia [150] y con un sustituyente 2-hidroxi-2-propilo), etorfina (su superagonista en δ con 107% [150] de eficacia y un grupo 2-hidroxi-2-pentilo), RX6007M (el derivado dihidroetorfina), tienorfina [292], y la misma buprenorfina (ambos antagonistas no selectivos con grupos C: 2-2(tienil)etilo y 2-hidroxi-3,3-dimetilpentilo, respectivamente), que poseen el grupo hidroxilo en un sustituyente enlazado en la posición y en la

misma orientación que un sustituyente en 18 β (el anillo C teniendo el puente eteno o etano, formando las posiciones 18 y 19). Como se ha propuesto [293], el impedimento estérico de un grupo C voluminoso, en contacto con Y109^{2.64}, que establece un puente de hidrógeno con la buprenorfina en la simulación, y donde el grupo 6 α -metoxilo contacta parcialmente a F280^{6.54}, V281^{6.55}, W284^{6.58} o I304^{7.38}. Con estos hechos, una fuente de interferencia para los cambios relacionados con la activación, pueden deberse en parte, al impedimento estérico para establecer un puente de hidrógeno con el grupo C, y aún menos favorecido en posición β (hacia el vestíbulo). El sitio hidrofóbico en el receptor, junto a Q105^{2.60}, tiene características de un disyuntor de activación. En acuerdo con esta premisa de no activación, los ligandos PN6047 (con el sustituyente *N,N*-dimetilcarboxamido como grupo C), nor-RWJ394674 (con *N*-etilcarboxamido) [294] y DPI3290 (con *N*-(3-metilfenil)-*N*-metilcarboxamido) [295] se unen a DOR y MOR [296], mientras que RWJ394674 (con *N,N*-dietilcarboxamido) se une preferentemente a DOR. Finalmente, la morfina establece una interacción importante con I277^{6.53} mediante el grupo alqueno en el anillo C, que corresponde aproximadamente con el puente eteno del superagonista etorfina, y también las posiciones 7 y 8 de los otros agonistas morfínicos (codeína, oripavina, tebaína).

Tabla D3. Datos del estudio QSAR de los ligandos δ . Incluyen la eficacia experimental, la energía de Gibbs absoluta calculada (G), y la energía del estado basal (E₀), relevantes en el estudio.

Molécula bioactiva	Eficacia (%)	Energía de Gibbs ($\times 10^9$ J/kg)	Energía basal ($\times 10^9$ J/kg)	Molécula bioactiva	Eficacia (%)	Energía de Gibbs ($\times 10^9$ J/kg)	Energía basal ($\times 10^9$ J/kg)
SYK656	-103	-8.533	-8.535	SMDF (samidorfano)	21	-8.676	-8.678
SYK657	-99	-8.569	-8.572	OXCD (oxicodona)	21	-8.757	-8.759
SYK623	-91.2	-8.678	-8.681	HY1e	21.1	-9.582	-9.584
IW9f	-80.5	-10.47	-10.47	NM6c	27.1	-8.779	-8.782
IW9g	-80.2	-10.56	-10.57	HMRO (hidromorfona)	29	-8.624	-8.627
HY1k	-56.5	-8.472	-8.475	NLBF (nalbufina)	30	-8.593	-8.596
IW9a	-48.8	-10.63	-10.63	COD (codeína)	31	-8.565	-8.568
HY1b	-48.6	-9.033	-9.036	NM1	32.4	-8.480	-8.483
HY7a	-48.5	-9.290	-9.293	OXMR (oximorfona)	33	-8.821	-8.824
HY1a	-44.8	-9.255	-9.257	HCDO (hidrocodona)	39	-8.565	-8.568
HY1c	-38.1	-8.792	-8.795	HY1l	40.3	-8.439	-8.442
IW9b	-36.1	-10.105	-11.05	NM6a	41.2	-8.524	-8.526
BNTX	-10.2	-8.549	-8.552	MRP (morfina)	43	-8.624	-8.627
NTB (naltribén)	-1.6	-8.589	-8.592	IW9d	47.1	-10.23	-10.24
HY1j	4.1	-8.525	-8.527	DPNF (diprenorfina)	55	-8.424	-8.427
NLT (naltrindol)	7.5	-8.484	-8.487	NLR (nalorfina)	58	-8.556	-8.559
NLX (naloxona)	8	-8.741	-8.744	NM6b	62.4	-8.484	-8.487
HY1f	12.2	-16.44	-16.44	NLMF (nalmefeno)	66.5	-8.458	-8.461
HY1m	16.2	-8.523	-8.526	HDC (hidrocodeína)	69	-8.519	-8.522
BPNF (buprenorfina)	19	-8.329	-8.332	SRI22141	73	-10.41	-10.41
HY1d	19.3	-9.197	-9.199	HMRP (hidromorfina)	76	-8.575	-8.578
NTX (naltrexona)	25	-8.383	-8.688	IW9e	88.1	-10.16	-10.16
				ETRF (etorfina)	107	-8.460	-8.463

Tabla D4. Resumen del análisis QSAR. Resumen de los coeficientes del polinomio bivariado, de la eficacia con las energías basal y de Gibbs.

Variable	Coficiente	Error estándar	Estadístico t-Student	Valor p
G	3.731×10^{-2}	1.013×10^{-2}	-3.683	0.001017**
G ²	-1.171×10^{-2}	2.885×10^{-3}	-4.060	0.000377***
G ³	-9.545×10^{-4}	2.622×10^{-4}	-3.640	0.001138**
GE ₀	2.508×10^{-3}	6.830×10^{-4}	3.671	0.000328**
GE ₀ ³	8.939×10^{-6}	3.126×10^{-6}	2.859	0.008089**
G ³ E ₀ ³	-3.180×10^{-8}	1.163×10^{-8}	-2.734	0.010905*
E ₀	3.836×10^{-2}	1.030×10^{-2}	3.725	0.000913***
E ₀ ²	9.681×10^{-3}	2.918×10^{-3}	3.318	0.002599**
E ₀ ³	1.055×10^{-3}	2.774×10^{-4}	3.804	0.000741***
β_0 (ordenada al origen)	2.391×10^6	7.561×10^5	3.163	0.003840**

Tabla D5. Resumen del análisis QSAR. Resumen de los estadísticos del ajuste al polinomio bivariado, de la eficacia con las energías basal y de Gibbs.

Error estándar residual	RSE = 40.36
Coefficiente de determinación	$r^2 = 0.6084$
Coefficiente de determinación ajustado	$r_{adj}^2 = 0.4779$
Estadístico de Fisher de la regresión	$F_c = 4.662$
Grados de la libertad de la regresión	$v_1 = 9, v_2 = 27$
Valor p de la regresión	0.0008682
Coefficiente de correlación de Pearson	$r_{obs;calc} = 0.771^{***}$

Tabla D6. Aplicación del polinomio bivariado. Estimación de la eficacia de algunos compuestos mediante el modelo QSAR obtenido.

Ligando	Eficacia estimada (%)	Ligando	Eficacia estimada (%)
2',3'-Dihidro-HY1m	12.56	6 β -Naloxol	60.64
2',3'-Dihidronaloxona	59.72	7,8-Dehidro-6 β -naloxol	19.34
2',3'-Dihidronalorfina	42.29	17-Cyclobutilmetil-7,8-deshidroepoximorfinan-3,6-diol	284.79
RX6007M	59.99	14-Desoxinalbufina	55.60
SYK754	-69.27	14-Desoxinalbufona	42.68
7,8-Dihidroetorfina	66.66	Nalbufona	48.15
Morfinona	-20.65	7,8-Deshidronalbufina	46.32
Hidromorfona	5.43	14-Dseoxinalbufinona	22.85
7,8-dihidro-14-hidroxymorfina	392.86	17-Ciclopropilmetil-7,8-deshidroepoximorfinan-3,6-diol	32.22
14-Hidroxymorfina	33.31	17-Ciclopropilmetilepoximorfinan-3,6-diol	50.02
Codeinona	-1.82	14-Deoxynaltrexone	31.42
14-Hidroxycodeína	46.85	6 β -Naltrexol	88.34
7,8-Dihidro-14-hidroxicodeína	82.57	7,8-Deshidro-6 β -naltrexol	35.43
Nalorfona	23.11	7,8-Deshidro-14-desoxynaltrexona	5.04
7,8-Dihidronalorfina	41.73	17-Metilmorfindol-3-ol	30.95
Nalorfina	-10.02	17-Metoximorfindol-3-ol	-21.61

6.3. DIFERENCIAS ENTRE LOS COLECTIVOS CONFORMACIONALES DEL RECEPTOR MUSCARÍNICO 1 (M₁) EN COMPLEJO CON DIFERENTES LIGANDOS

Manuscrito terminado, febrero de 2024.

Los colectivos conformacionales del receptor M₁ exhibieron diferencias entre los sistemas, que permitieron caracterizarlos de manera más detallada respecto a las categorías de los estados inducidos por los ligandos estudiados (**Figura 25**). Los principales parámetros de orden que permitieron describir y comparar los sistemas, son: (i) la información mutua torsional, (ii) la configuración de las hélices membranales, (iii) las distribuciones de contactos entre las hélices, (iv) las distribuciones de moléculas de agua en el poro interhelicoidal, y (v) patrones de interacciones con los lípidos de la membrana.

Sistemas activos:

Los sistemas con ligandos agonistas se agruparon en tres categorías, atendiendo las diferencias en sus colectivos.

1. **Complejos con agonistas totales acetilcolina**, muscarina y arecolina.
2. **Complejo con el agonista parcial** extendido GSK1034702.

Sistemas no activos:

3. **Sistema del aporreceptor**. El sistema apo-M₁ fue el único de este estudio en que las hélices presentaron una separación mayor que en los sistemas inactivos, fenómeno atribuible a la ausencia de ligando y la presencia de un catión en el espacio interhelicoidal.
4. **Complejos estativos**. Los colectivos de los complejos de los ligandos ortostéricos, (-)-hiosciamina y tiotropio presentan un alto grado de similitudes en los cinco parámetros de orden estudiados.
5. **El inactivador o modulador alostérico negativo**, toxina muscarínica 7, confirió características únicas al colectivo conformacional de receptor que sobresalen de los parámetros analizados de los antagonistas ortostéricos.

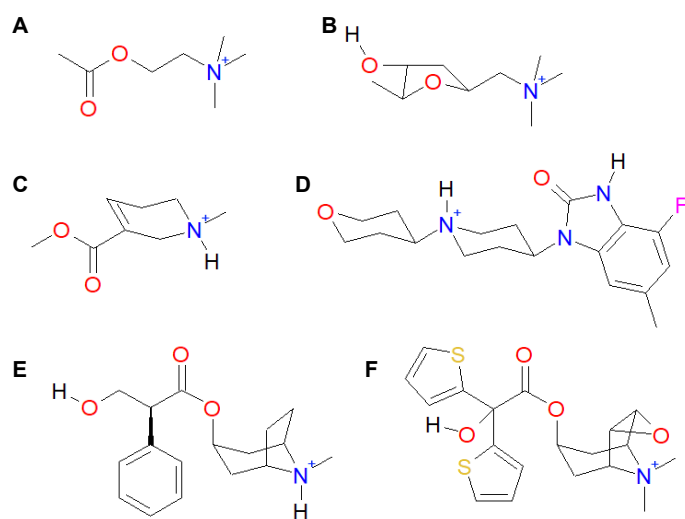


Figura 25. Ligandos estudiados con el receptor M₁. (A) El ligando endógeno acetilcolina (ACh), (B), el agonista fúngico muscarina, (C) el agonista arecolina, (D) GSK1034702, un agonista parcial extendido de unión hacia el vestíbulo del receptor, (E) el antagonista (-)-hiosciamina (el enantiómero natural cuya mezcla racémica constituye la atropina), y (F) el antagonista tiotropio.

I. Información mutua torsional

La información mutua entre las distribuciones de ángulos diedros entre los sistemas agrupados por actividad inducida esperada, mostró que en los sistemas con los agonistas acetilcolina, muscarina y arecolina, mostraron un patrón fragmentado de la información mutua entre los diferentes segmentos del receptor, mientras que los sistemas de complejos con los antagonistas hiosciamina, tiotropio y toxina muscarínica 7, presentaron un perfil más agrupado de residuos que poseen mayor información mutua (**Figura 26**). Esta característica se pierde al incluir en el análisis al sistema apo, de manera importante, disminuye en los extremos IC de TM5 y TM6, y aumenta en TM4. Al excluir el sistema apo y la MT7, analizando únicamente la información mutua de los tropanos (hiosciamina y tiotropio), el patrón de información mutua se vuelve similar al analizar los tres ligandos antagonistas.

De manera individual, la información mutua entre los intervalos de las simulaciones comprendidos entre 0 a 300 y 300 a 600 ns para cada sistema, permitió identificar que el sistema de muscarina y de arecolina son muy similares entre sí, y con diferencias importantes respecto al sistema con acetilcolina (**Figura M1**).

Un hallazgo interesante en los sistemas muscarínicos es el perfil de información mutua torsional del asa intracelular 3 (ICL3) entre los sistemas entre inactivos y activos: en los primeros, la densidad de residuos con información mutua es muy alta, mientras que los sistemas con agonistas, está notablemente fragmentada. Esta característica puede atribuirse a determinados fenómenos globales que ocurren en los sistemas, en relación con el estado funcional, o un cambio en éste. En los sistemas no activos, la proyección del primer modo principal del TMD reveló que en la región intracelular, TM5 experimentó desplazamientos globales mínimos en el sistema con acetilcolina, mientras que se acopló en movilidad a TM6 de manera convergente y divergente en los complejos con muscarina y acetilcolina, respectivamente, y que en ambos sistemas con ligandos tropánicos,

TM5 experimentó desplazamientos relevantes en dirección al TMD, mientras que en TM6 fueron mínimos (**Figura M2**).

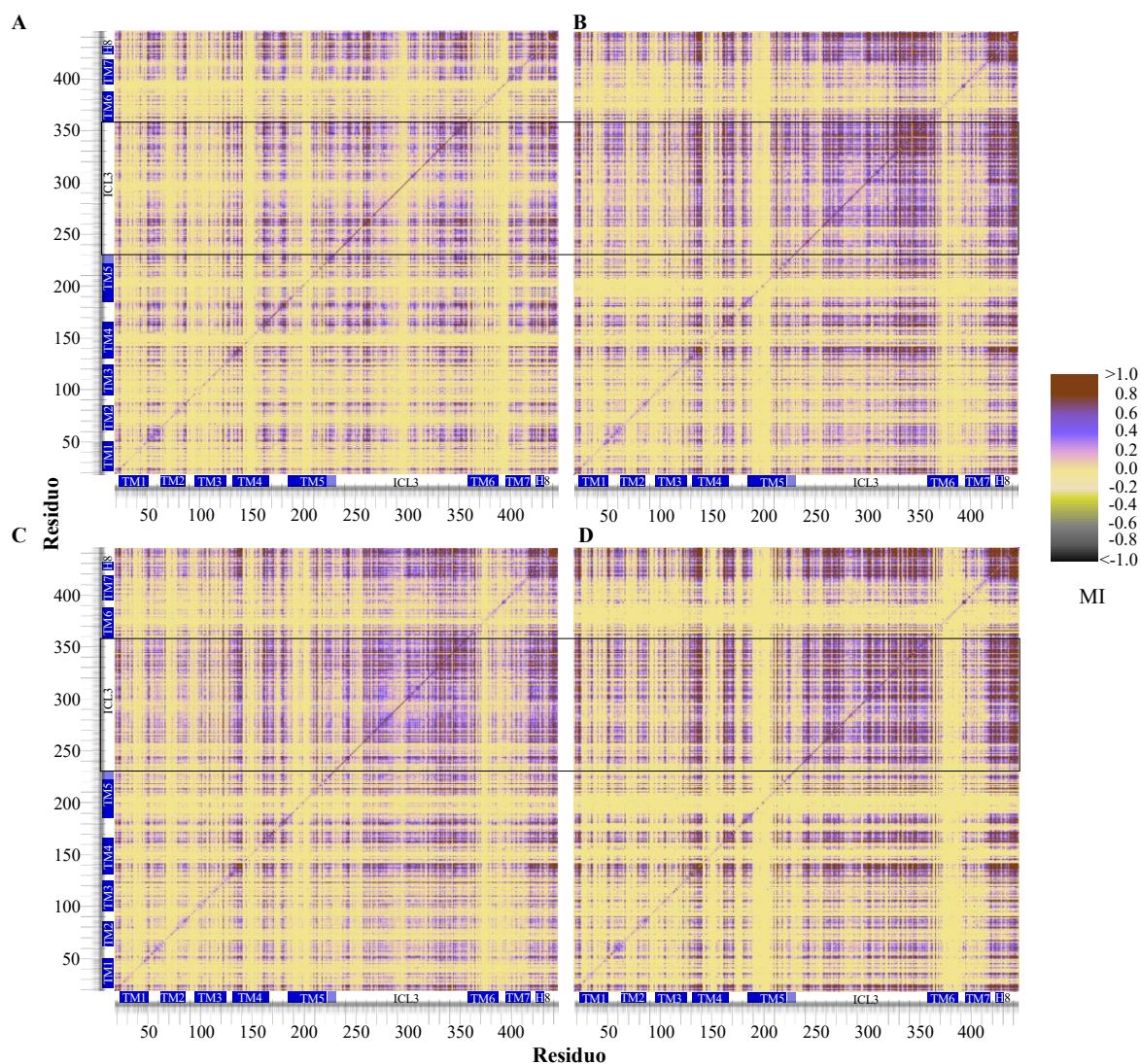


Figura 26. Matrices de información mutua (MI) torsional para los sistemas muscarínicos. Los ángulos diedros considerados para la estimación de MI fueron: φ ($C\alpha-C-N-C\alpha$), ψ ($N-C\alpha-C-N$) para la cadena principal, y χ_1 ($N-C\alpha-C\beta-X\gamma$) a χ_4 ($C\gamma-X\delta-X\epsilon-X\zeta$) para las cadenas laterales. (A) Sistemas complejos con agonistas (acetilcolina, muscarina y arecolina), (B) sistemas con antagonistas (hiosciamina, tiotropio y MT7), sistemas no activos (apo, hiosciamina, tiotropio y MT7), y tropanos (hiosciamina y tiotropio).

La torsión del residuo Y418^{7.53}, un integrante de la compuerta iónica y uno de los determinantes de activación del lado IC, presentó tendencias homogéneas en sus valores, (excepto por una rotación distintiva en uno de los sistemas). Los rotámeros disponibles para este residuo coincidieron en los sistemas del agonista total acetilcolina y el antagonista-agonista inverso tiotropio,

para los agonistas muscarina, arecolina y el antagonista hiosciamina, y para el agonista parcial GSK1034702, el sistema apo, y el complejo con la toxina muscarínica 7 (**Figura 27**). Como en los sistemas del receptor δ , el estado activo total y el inducido por un agonista inverso son similares, en este caso, en la torsión de este residuo. Los ligandos muscarina y arecolina, que han constituido dos colectivos similares, también coincidieron el rotámero adquirido desde la mitad de la simulación o en todo el intervalo, respectivamente. El hecho de que el antagonista hiosciamina presentara un rotámero equivalente, sugiere que estos tres sistemas en las simulaciones, tienen una proximidad conformacional en el sitio IC. Además, las coincidencias de muscarina y arecolina, un agonista parcial en algunos receptores M_1 de mamífero, permiten proponer una posible actividad parcial o sesgada en estos ligandos. Finalmente, el agonista parcial extendido GSK1034702, y los dos sistemas divergentes, el aporreceptor y el complejo con el péptido MT7, coinciden en el rotámero de Y418^{7.53}, indicando una característica de no activación total.

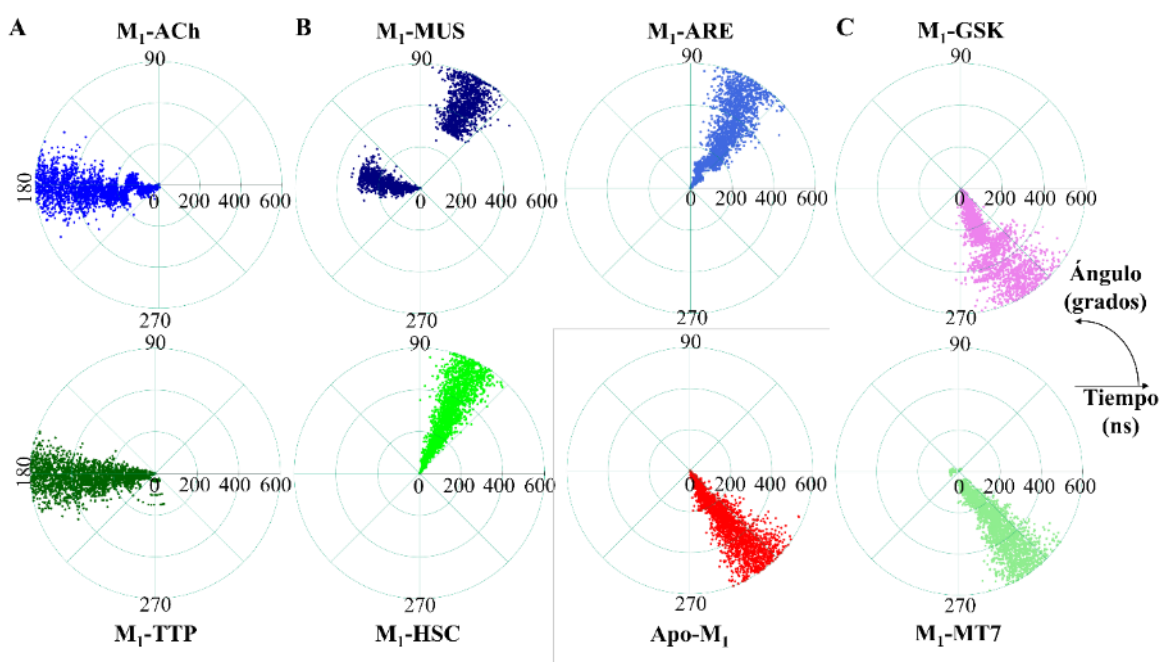


Figura 27. Torsión del residuo Y418^{7.53}. Valores del ángulo diédrico χ_1 para los ocho sistemas estudiados. Agrupándolos por tendencias en los valores se tiene: (A) el sistema del agonista ACh y del tiotropio, (B) los sistemas de los agonistas muscarina y arecolina, y el antagonista hiosciamina, y (C) el agonista parcial GSK1034702, el sistema apo y el complejo con MT7.

II. Configuración de las hélices membranales: Las regiones con mayor curvatura coinciden entre acetilcolina y apo, e hiosciamina y toxina muscarínica 7

Las hélices transmembranales adoptaron configuraciones distintivas que como en el caso de los receptores CCR5 y δ , tienen relación con el estado funcional y el colectivo conformacional alcanzado por el sistema en las condiciones dadas. Las hélices transmembranales 5 y 6 (TM5 y TM6) de los sistemas activos permanecieron cercanas de manera predominante en la cara intracelular (IC),

alineándose paralelamente en múltiples ocasiones, mientras que en los sistemas no activos (estativo/inactivo, apo e inactivo alostérico), (a) una curva endeble en el disyuntor de transmisión, o (b) una curvatura característica en la compuerta iónica, ambos en TM6, condujeron a un alejamiento de TM5, y separándose del dominio transmembranal (TMD) del lado IC (**Figura 28**).

- 1) En los sistemas activos, representados por el sistema M₁-ACh, las curvaturas medias más extremas se presentaron en las regiones superiores al sitio central de coordinación (CCS; residuos I74^{2.53}, T76^{2.55}, F77^{2.56} y S78^{2.57}) en TM2, W157^{4.57}, A160^{4.60} e I161^{4.61} en TM4, el entorno del disyuntor de transmisión (W378^{6.48}, T379^{6.49}, Y381^{6.51}) en TM6, incluyendo el propio residuo disyuntor y un residuo de tirosina del sitio ortostérico (OSS), y el segmento de C407^{7.34} a N414^{7.48} en TM7, incluyendo varios de los residuos implicados en la coordinación del sodio. Además, la hélice yuxtamembranal (H8) presentó una mayor curvatura hacia el centro del segmento.
- 2) En los sistemas estativos, representados con el complejo M₁-HSC, las regiones de máxima curvatura helicoidal comprenden la parte superior al CCS, aunque en menor medida (residuos L72^{2.51} e I73^{2.52}), E214^{5.64} y T215^{5.65}, I370^{6.40}, L371^{6.41} y L372^{6.42}, y el segmento entre T398^{7.25} y Y404^{7.31}, del OSS.
- 3) En el sistema basal, apo-M₁, las regiones de mayores curvaturas se comparten con los sistemas activos, además de una torsión extrema en TM6 en el entorno de la compuerta iónica, que separó gran parte de la hélice de TM5.
- 4) El sistema del inactivador alostérico MT7, las regiones de curvaturas máximas coinciden aproximadamente con aquellas de los sistemas estativos, y como el sistema basal, la curvatura extrema en TM6 caracterizó este colectivo.

Los sistemas con ligandos tropánicos (hiosciamina y tiotropio) comparten múltiples características en las curvaturas de las hélices, mientras que entre los agonistas, muscarina y arecolina tienen mayores similitudes entre ellos. El complejo del agonista parcial GSK1034702 presentó una extensión importante en la hélice H8, lo cual fue característico de este sistema, y que se obtuvo también previamente en algunos sistemas proactivos o activos. Los detalles de las torsiones medias por sistema se presentan en el anexo (**Figura M3**).

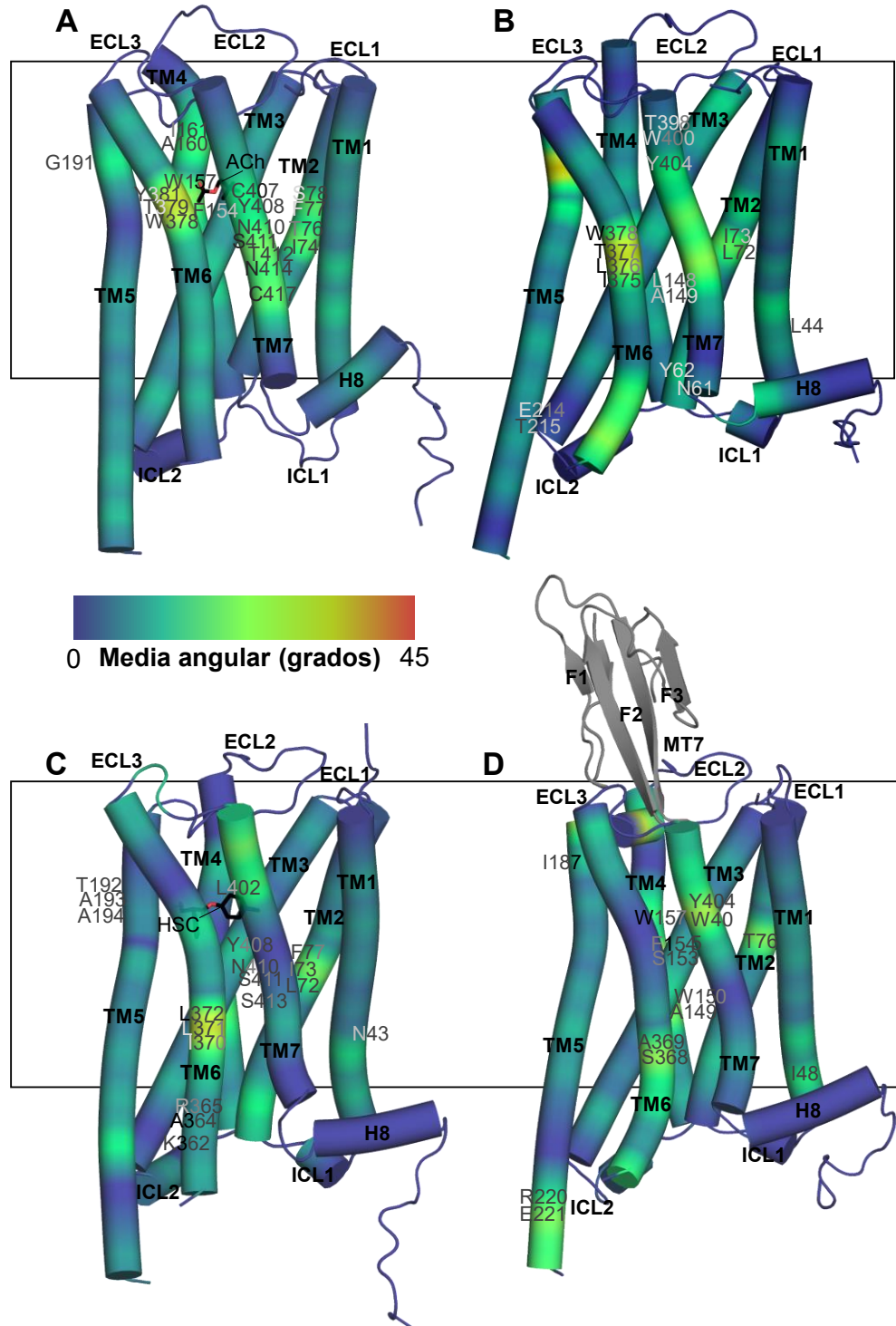


Figura 28. Curvatura media de las hélices respecto a su eje para los sistemas muscarínicos. La escala de color indica el valor de media circular para el ángulo en cada residuo en las siete TMs en los conformeros representativos. Sistemas con (A) acetilcolina, (B) hiosciamina, (C) aporreceptor, y (D) toxina muscarínica 7 como representativos de los estados funcionales activo, inactivo, apo e inactivo por ligando alostérico. TM: Hélice transmembranal, H8: hélice yuxtamembranal, F1-3: segmentos dactilos 1 a 3.

III. Distribuciones de contactos

Los contactos entre las hélices del receptor en los sistemas muscarínicos se intuyen desde el análisis de las curvaturas helicoidales, y de manera cuantitativa, los pares de hélices que lograron separar los sistemas al agrupar los conteos de residuos estableciendo contactos en distancias menores a 0.45 nm, son los contactos entre TM4, TM5, TM6, TM7, TM1 y TM2.

Interacciones TM7-TM1-TM2. Los sistemas del receptor en complejo con acetilcolina, muscarina y arecolina se distinguieron por establecer un número consistente y mayor de contactos entre TM7-TM1 y TM1-TM2, de manera similar al complejo con la toxina muscarínica 7. En contraste, el sistema con el agonista parcial extendido GSK1034702 formó una cantidad menor de contactos en ambos casos, de manera similar al sistema apo. La distribución de contactos en los agonistas totales tiene una característica de tipo platicúrtica, como se observa en los gráficos de curvas de nivel, mientras que en el caso del agonista parcial y el sistema apo, en TM7-TM1, tienen una característica leptocúrtica, mientras que entre TM1-TM2 es mesocúrtica, y suave para los sistemas estativos/inactivos (**Figura 29**).

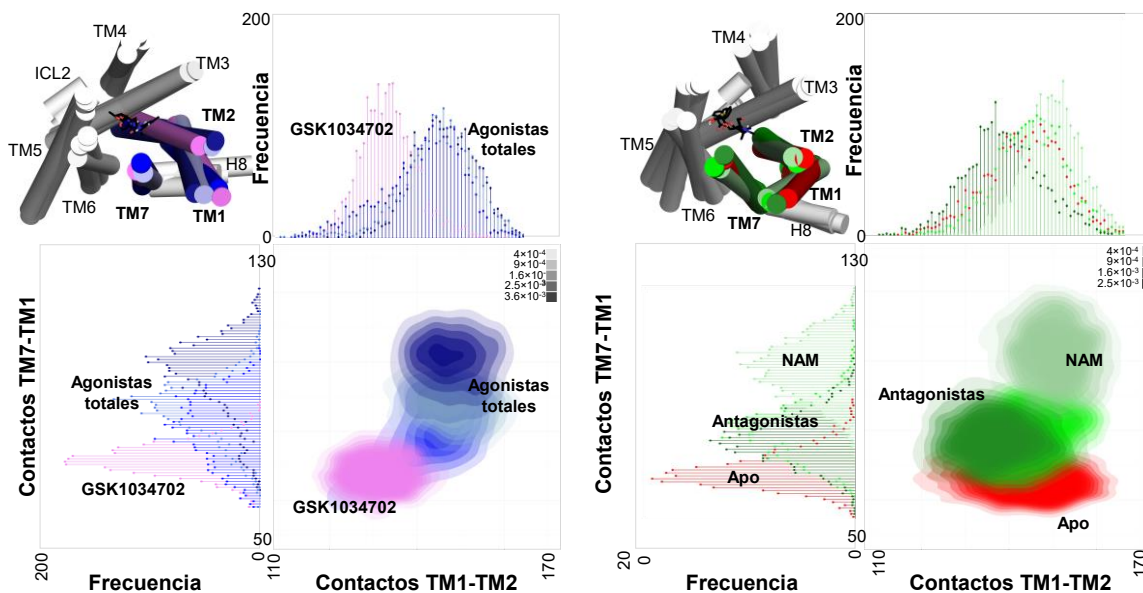


Figura 29. Distribuciones de número de contactos entre TM7, TM1 y TM2 a través del tiempo de simulación, para los sistemas activos (izquierda) e inactivos (derecha). Los gráficos laterales frecuencia, en líneas, representan la frecuencia de contactos, y el gráfico de gradiente representa la densidad de contactos de las parejas ordenadas de contactos entre las hélices. El rango de distancia para considerar un contacto fue de 0.45 nm. TM: Hélice transmembranal, H8: hélice yuxtamembranal.

Interacciones TM4-TM5-TM6. Los complejos con los agonistas totales establecieron un número de contactos muy variable y amplio, de manera sobresaliente entre TM4-TM5, y de manera similar sólo entre TM4-TM5 el sistema apo. Los sistemas estativos establecieron contactos

numerosos sólo entre TM5-TM6, y un intervalo estrecho de ellos entre TM4-TM5, de manera similar al complejo con el agonista parcial, aunque en un intervalo mayor entre TM5-TM6. Los sistemas estativos y con el agonista parcial poseen distribuciones de contactos leptocúrticas y con muy alta frecuencia en TM4-TM5, mientras que los agonistas totales son claramente platicúrticas (**Figura 30**).

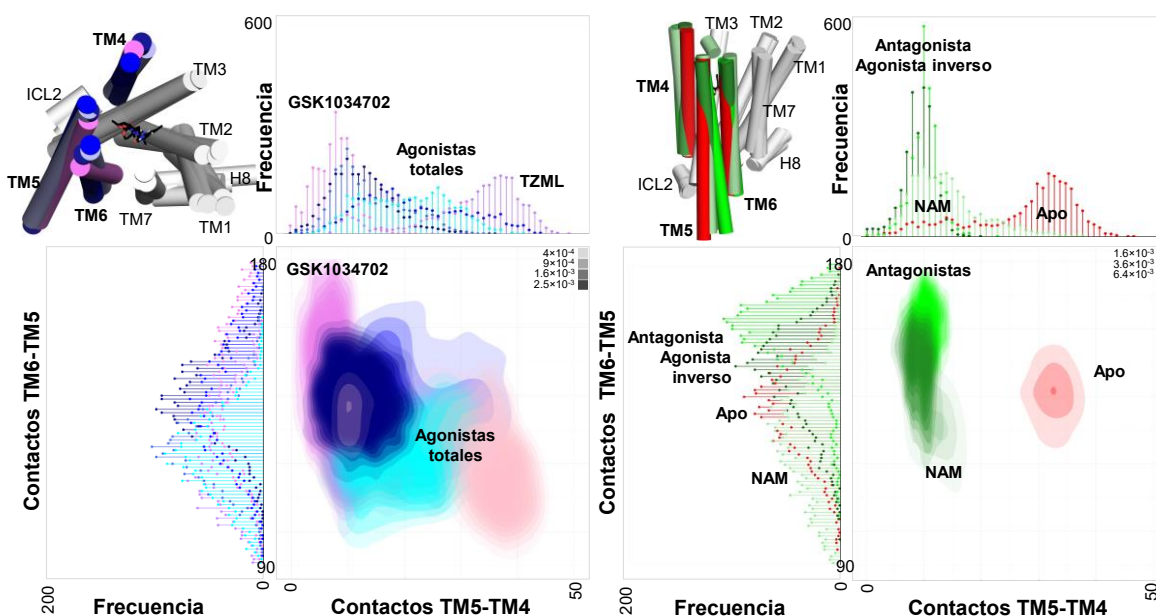


Figura 30. Distribuciones de número de contactos entre TM4, TM5 y TM6 a través del tiempo de simulación, para los sistemas activos (izquierda) e inactivos (derecha). Los gráficos laterales frecuencia, en líneas, representan la frecuencia de contactos, y el gráfico de gradiente representa la densidad de contactos de las parejas ordenadas de contactos entre las hélices. El rango de distancia para considerar un contacto fue de 0.45 nm. Hélice transmembranal, H8: hélice yuxtamembranal.

Las distribuciones de contactos son de utilidad para identificar las similitudes y diferencias entre los sistemas, agrupándolos de manera distintiva y funcional en relación con la actividad del ligando o de manera general, con el estado funcional al que pertenecen como colectivos conformacionales.

IV. Interacciones con las moléculas de agua: Los sistemas activos van aumentando la cantidad de moléculas de agua en el poro

Como en los casos de estudio anteriores, el ingreso de moléculas de agua en el poro interhelicoidal es una característica indicativa del estado funcional de los GPCRs. En M_1 , los patrones de tendencia de la presencia de moléculas de agua permitieron relacionar estas variables con su estado funcional. En la mayoría de los casos, la presencia simultánea de una mediana entre 20 y 40 moléculas de agua en el poro interhelicoidal (**Figura 31**), mayoritariamente en las regiones adyacentes a la zona EC e IC, es la característica común. Al analizar los sistemas con agonistas en

todo el tiempo de simulación, la asimetría negativa (o izquierda) de las distribuciones de moléculas de agua, constituyendo los numerosos valores atípicos en los gráficos de cajas, fue una característica que se interpreta como el ingreso gradual de moléculas de agua hasta alcanzar la hidratación correspondiente al estado activo de cada sistema.

En los casos de los sistemas no activos, los complejos con los antagonistas hiosciamina y tiotropio, presentaron distribuciones de moléculas de aguas muy simétricas y sin valores atípicos en el conteo, lo que es congruente con el patrón característico en el poro, que denota una estatividad del receptor en complejo con antagonistas. El sistema de aporreceptor, tuvo una tendencia a presentar incrementos en el número de moléculas de agua, representados como escasos valores atípicos en su distribución.

El complejo con la toxina muscarínica 7 fue el sistema con mayores cambios en el número de moléculas de aguas en el poro interhelicoidal. La distribución de las moléculas a través del tiempo permitió ver que el sistema tuvo la mayor hidratación, así como una varianza muy extensa en el conteo, variando desde menos de 10 hasta poco más de 60 moléculas, claramente muy diferente de los sistemas con ligandos ortostéricos y el sistema apo. De igual manera, aunque las estructuras representativas del estado comparten similitudes conformacionales, el análisis de moléculas de agua permitió separar este caso particular del resto de los estudiados.

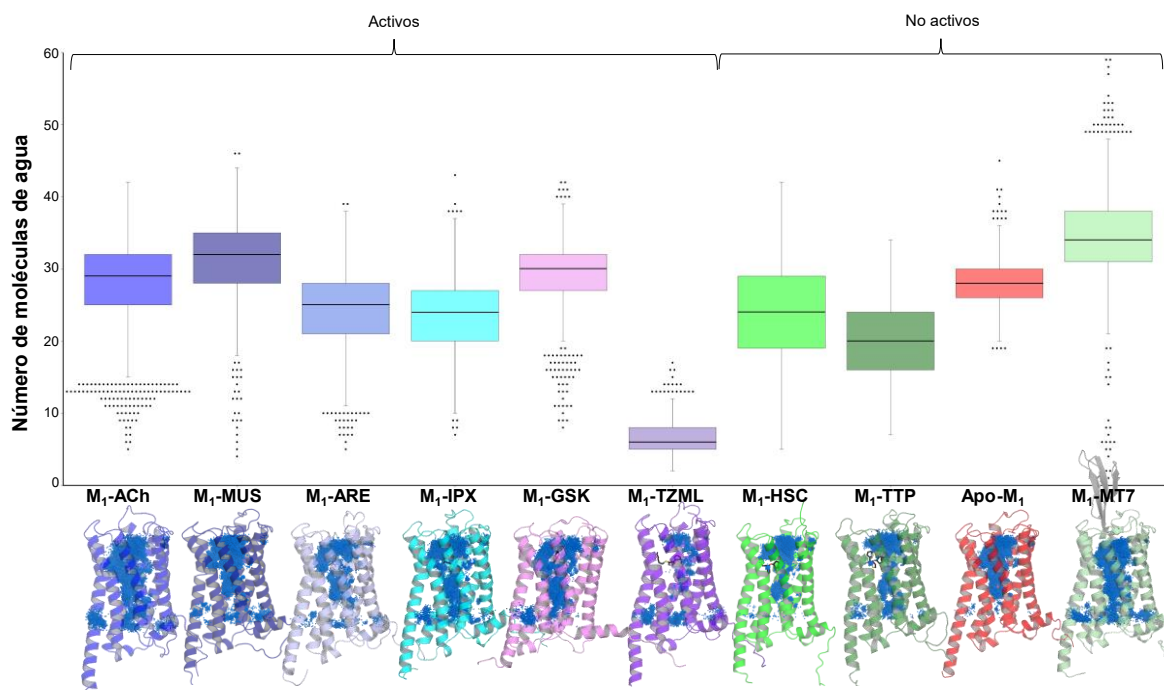


Figura 31. Distribuciones de las moléculas de agua en el poro interhelicoidal en el tiempo, en los diferentes sistemas del receptor. Los gráficos de caja representan el valor mediano, el primer y tercer cuartil de la distribución (el límite inferior y el superior de cada caja, respectivamente), y los correspondientes intervalos estimados de número mínimo y máximo. Los valores atípicos se representan con puntos.

V. Interacciones de M_1 con lípidos membranales: Los lípidos interactúan de maneras distintas dependiendo del estado funcional del receptor

Las interacciones de los GPCRs con los lípidos membranales están bien documentadas, así como el papel de la composición de la membrana en la que se encuentran embebidos [297]. La presencia de colesterol membranal es ubicua, y en efecto, influye en la presión lateral de los lípidos membranales y por ende, en la actividad del receptor ante los mismos estímulos [45,298]. Los sistemas muscarínicos, con composiciones similares en las membranas (**Figura M4**) mostraron características membranales que coinciden con colectivos conformacionales distintos del receptor.

En los sistemas en complejo con agonistas totales y antagonistas, la periferia del receptor se caracterizó por la baja magnitud de cambios en la simulación, del área media normalizada, formando una estructura tipo anular y un patrón de incremento del cambio al aumentar la distancia al receptor, mientras que en el complejo con el agonista parcial GSK1034702, toxina muscarínica 7 y aporreceptor, no se observó la estructura anular de baja movilidad, sino un patrón de dispersión a través de la capa (**Figura 32**).

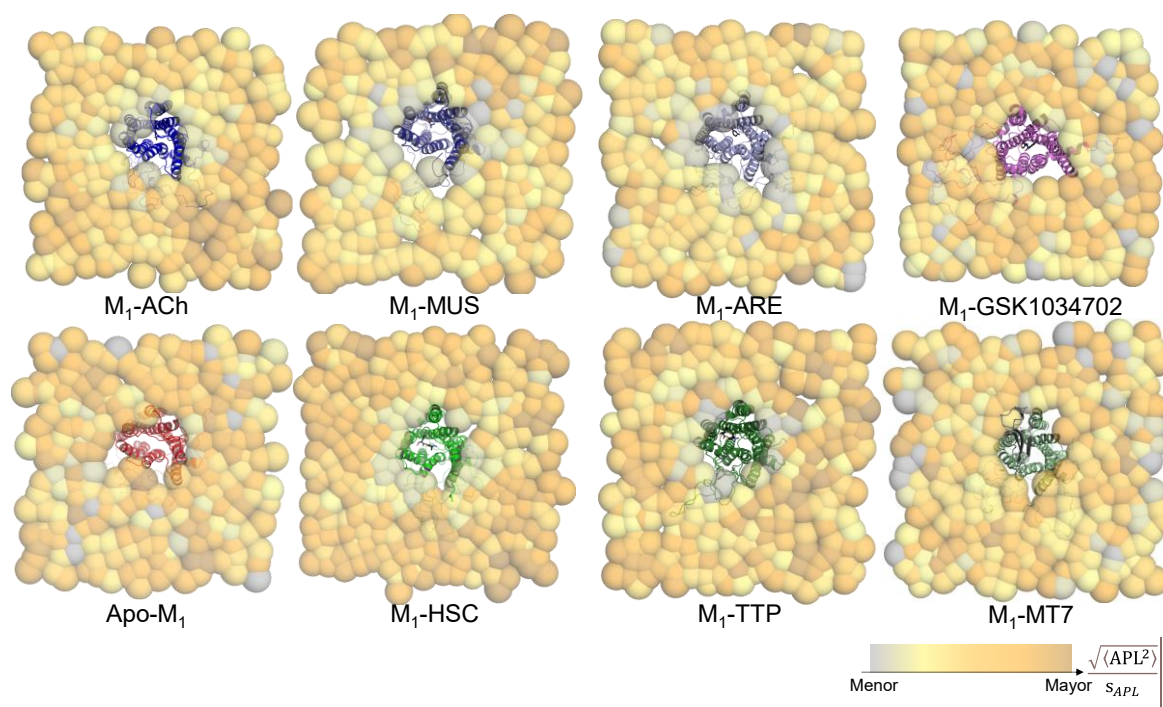


Figura 32. Variación del área por lípido cabezas lipídicas en el eje normal a la membrana. Cada esfera representa la cabeza de los lípidos membranales. El parámetro de cuantificación es la media cuadrática normalizada del área por lípido (APL) en la capa extracelular, proyectado en la configuración inicial. Es notable la menor variación en la periferia del receptor en los sistemas de complejo con agonista total (Acetilcolina, muscarina y arecolina), y con antagonistas (hiosciamina y tiotropio), en los que además se observó un patrón de cambio más uniforme en el resto de la membrana que con los sistemas con agonistas.

La planaridad escasa de la bicapa es un fenómeno evidente desde el inicio de las producciones de MD, que se debe principalmente a los cambios en el área de las moléculas de los lípidos, y a cambios en la posición normal (z) de las cabezas lipídicas: fosfato y el alcohol secundario 3 β -OH del colesterol. Las fluctuaciones de las cabezas lipídicas en la posición z, en ambas caras de la membrana fue considerablemente mayor en los sistemas apo-M₁ y M₁-hiosciamina, mientras que en el resto fue menor (**Figura 33**). Una diferencia entre ambos tropanos antagonistas reside en que el tiotropio contiene un grupo amonio cuaternario, mientras que la hiosciamina tiene un grupo de amonio terciario, y experimentalmente, el tiotropio funge como un agonista inverso en el receptor relacionado M₂, mientras que la hiosciamina sólo como antagonista. Considerando el menor cambio en el estado funcional que se espera que experimenten apo-M₁ y M₁-HSC, dado que el tiotropio podría poseer una eficacia intrínseca negativa mayor que la hiosciamina, la mayor fluctuación de la posición z responde a la mayor fluctuación de las cadenas laterales en estos dos sistemas, dado que los cambios conformacionales a nivel de las hélices son menores, como se observa en los gráficos de diferencia de RMSF de las cadenas laterales y de RMSF esencial proyectado en el autosistema apo-M₁ (**Figura M5**).

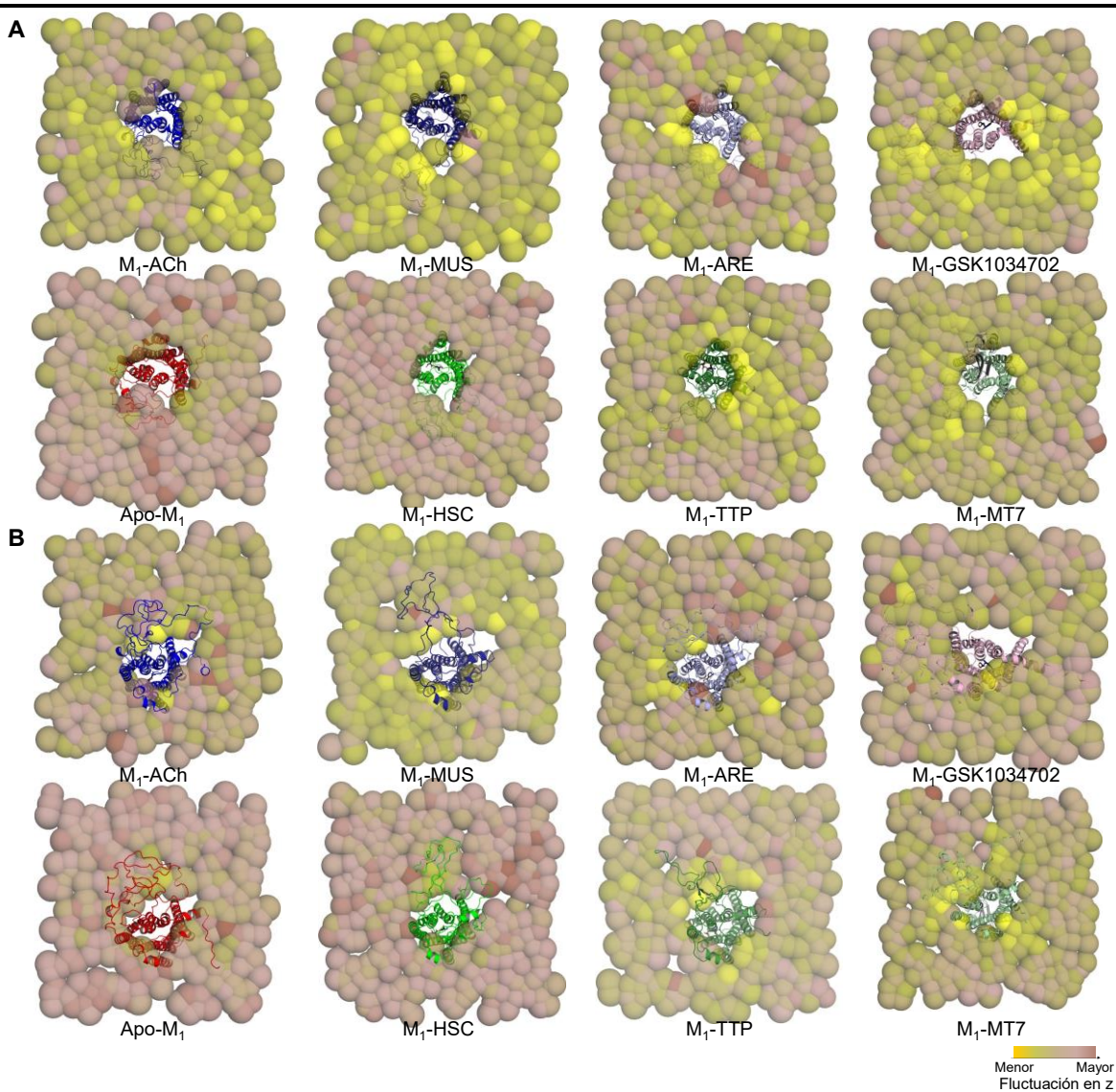


Figura 33. Fluctuación de las cabezas lipídicas en el eje normal a la membrana. El parámetro de cuantificación es la desviación estándar de la posición z (nm). (A) Capa extracelular, y (B) capa intracelular.

Conclusiones

Con estos hallazgos, es posible identificar los receptores que se encuentran en un colectivo conformacional asociado al estado funcional que coincide con el inducido por la actividad de los ligandos con los que forman complejos, más allá de la clasificación de agonista /antagonista, ya que las diferencias mecánicas entre los ligandos de la misma categoría funcional, como los casos comparativos entre hiosciamina y tiotropio, y muscarina-arecolina y acetilcolina. Estos patrones conformacionales en M1 son de utilidad para reconocer la actividad funcional inducida por un ligando de interés, develando detalles relevantes en la dinámica del receptor.

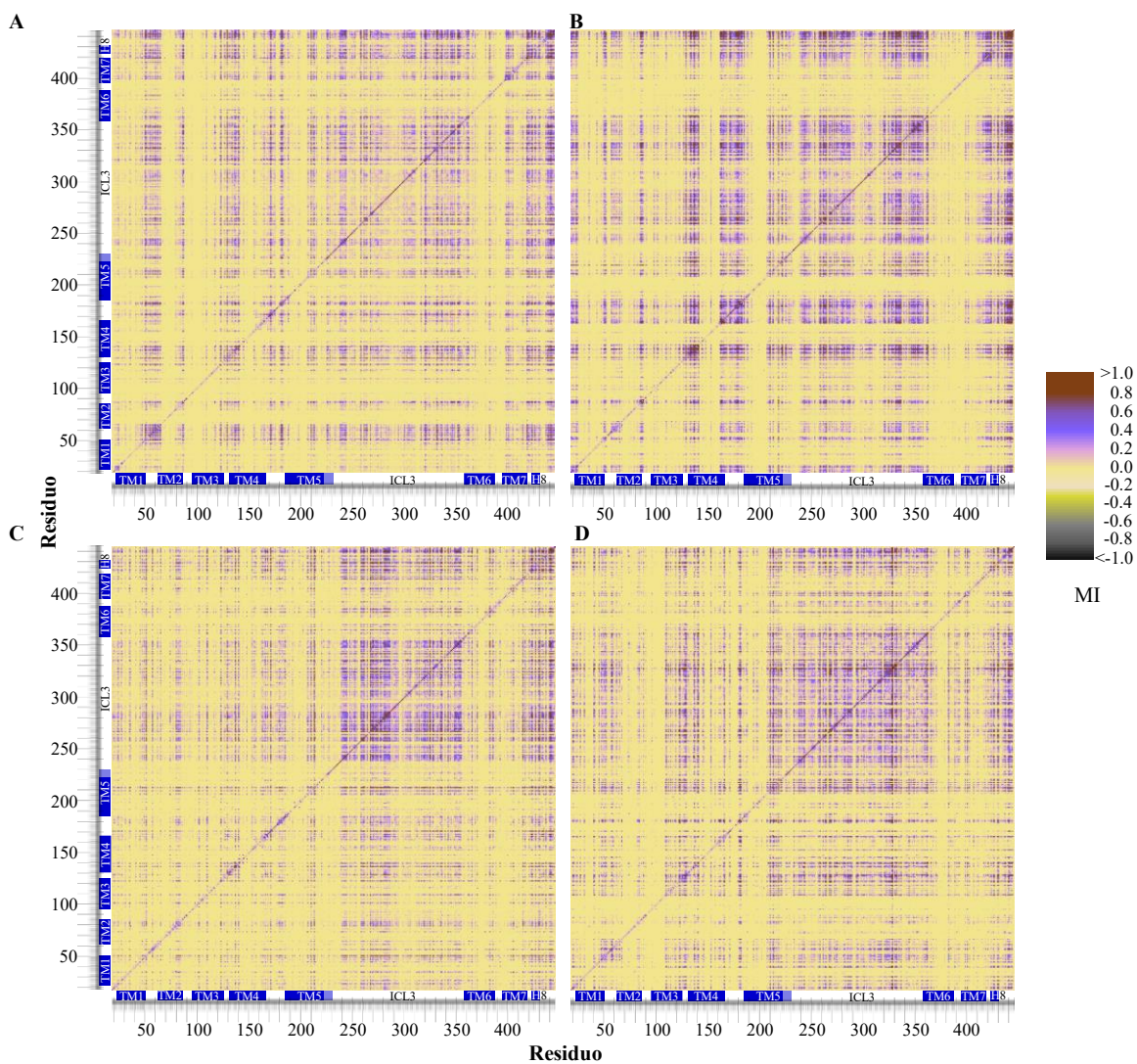


Figura M1. Matrices de información mutua torsional para los sistemas en complejo con agonistas. (A) Muscarina, (B) arecolina, (C) acetilcolina y (D) GSK1034702.

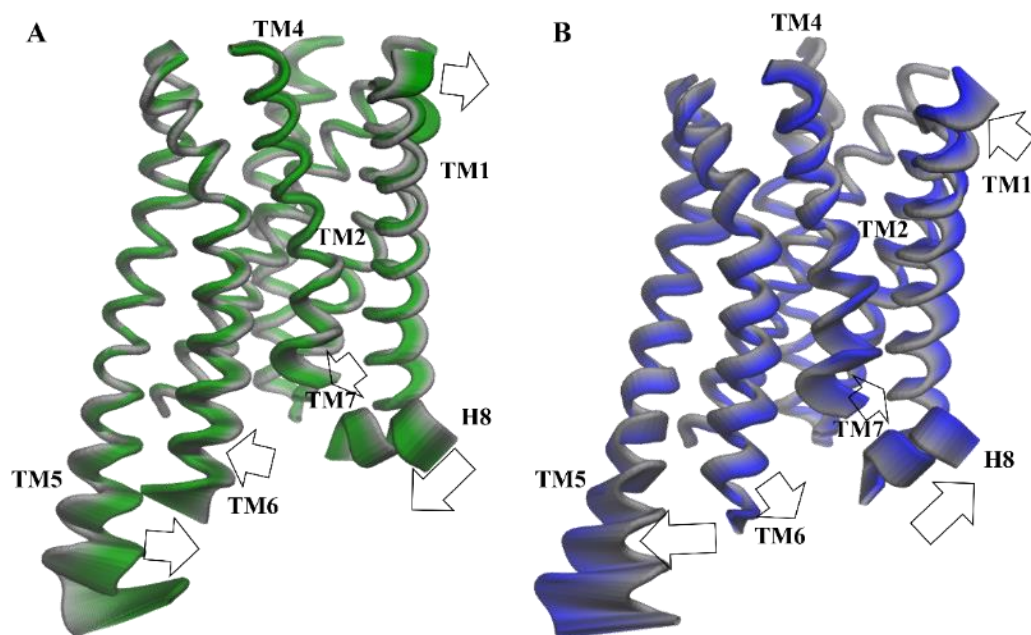


Figura M2. Segundo modo principal. (A). Del sistema M1HSC, representando el 12.94% de la varianza total, y (B) del sistema M1ACh, con 18.15% de varianza.

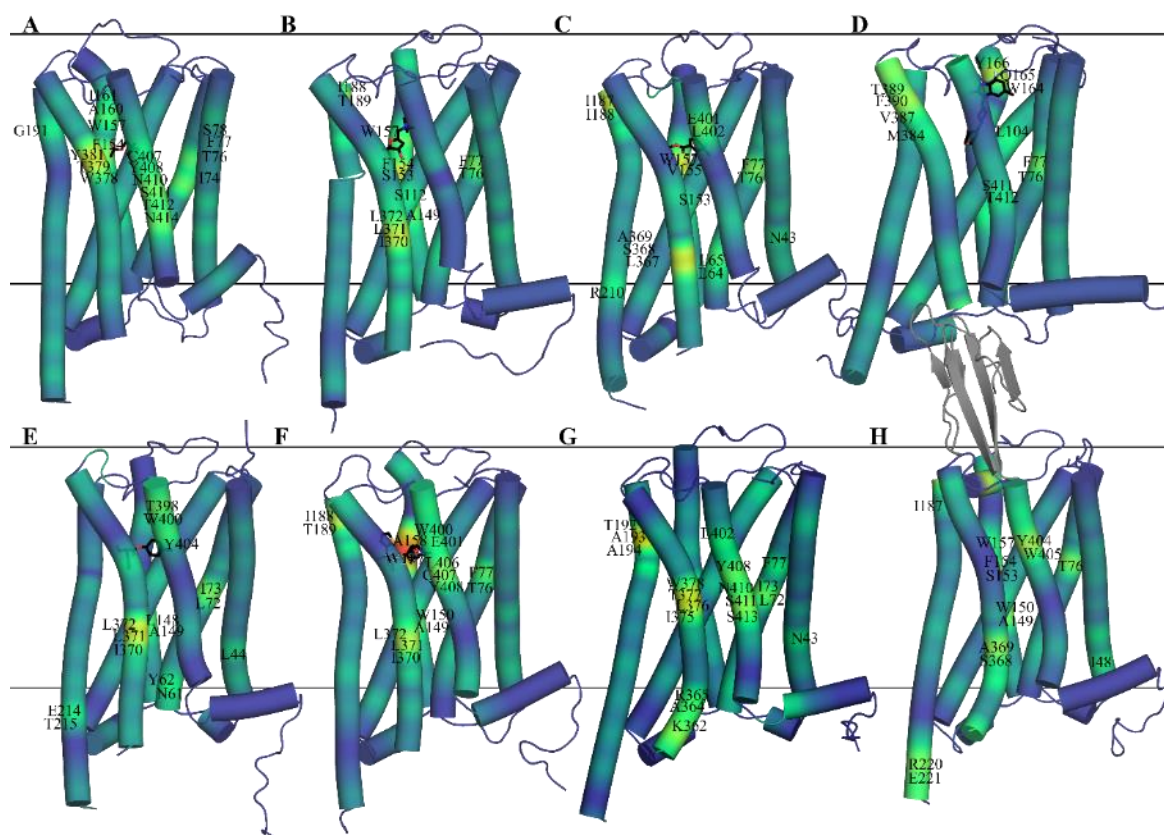


Figura M3. Curvaturas medias en las hélices de los sistemas muscarínicos. El sistema del complejo con tiotropio presentó una torsión máxima en TM4, en el segmento en contacto con los grupos tienilo (adyacente a W157^{4.57}) ausente en el sistema análogo del complejo con hiosciamina.

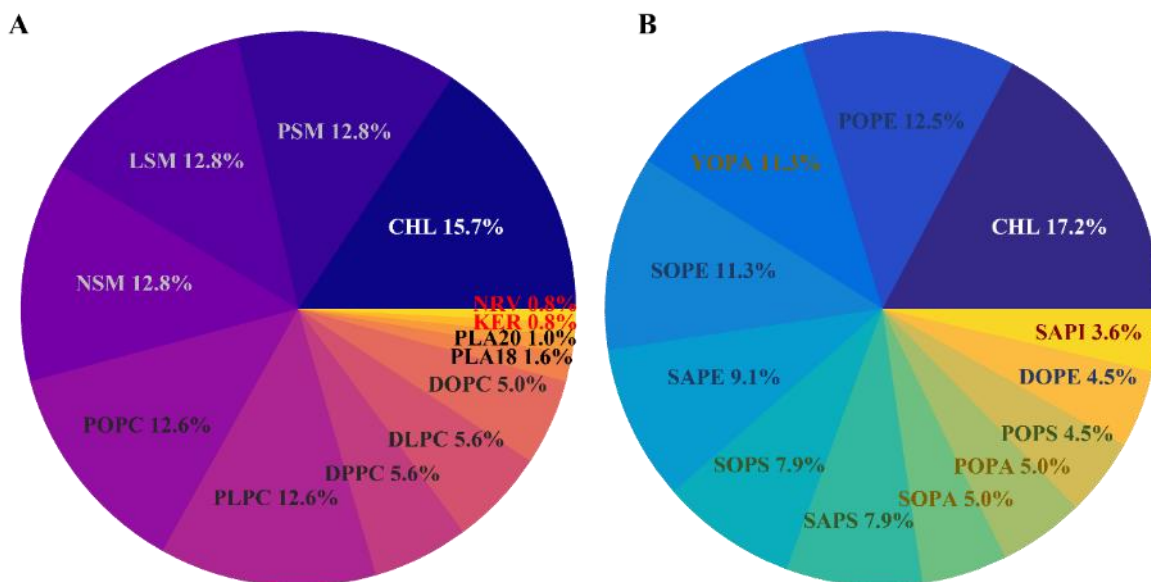


Figura M4. Composición media porcentual de las membrana para los sistemas del receptor M₁. (A) Capa extracelular y (B) capa intracelular.

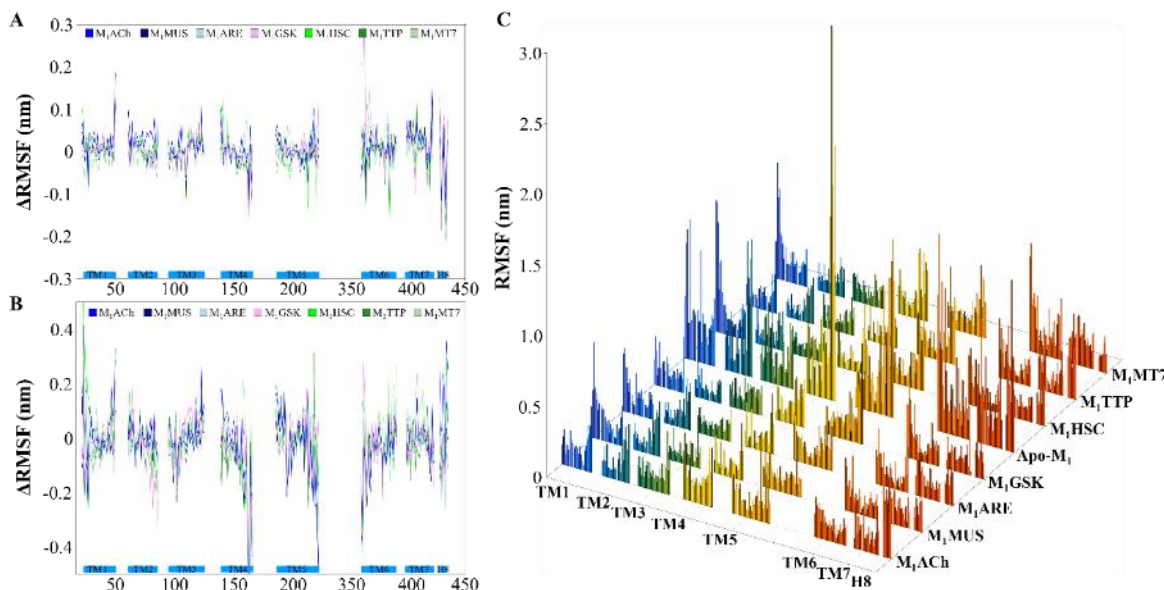


Figura M5. Gráficos de la raíz cuadrada de la fluctuación cuadrática media (RMSF) para los sistemas del receptor M₁. (A) Diferencia de RMSF respecto al sistema apo-M₁. (B) Diferencia del RMSF esencial, respecto al sistema apo-M₁, a través de la proyección de los autovalores de los sistemas en los autovectores de la referencia. (C) Gráfico de RMSF esencial para cada sistema. Este análisis de componentes principales se realizó a partir de la matriz de covarianza de los componentes de las posición, centrada en las coordenadas iniciales.

El estudio de los GPCRs con herramientas computacionales permitió conocer sus características conformacionales y dinámicas en un nivel detallado, con resultados congruentes con la evidencia experimental y con los efectos esperados dadas las condiciones iniciales; e inclusive, reveló características particulares de los sistemas que tienen relación directa con la actividad inducida por los respectivos ligandos (o ausencia de ellos), como son indicadores de actividades parciales o sesgadas. Estos hallazgos son totalmente congruentes toda vez que la actividad farmacológica de los múltiples ligandos descritos no se describe adecuadamente de manera binaria ni ternaria, sino que forman un espectro continuo de actividades, de manera análoga a la continuidad conformacional de cada estado funcional de los receptores.

Estos hallazgos contribuyen de manera sustancial al entendimiento de la funcionalidad de los GPCRs, se suma y fortalecen las bases para un posterior diseño racional de sustancias bioactivas de interés farmacológico, en situaciones clínicas tan complejas como la EA, y las múltiples entidades patológicas en las que se ven involucrados estos receptores.

El estudio del receptor CCR5 constituyó un desafío inicial debido a la cantidad limitada de información disponible, pero consolidó los rasgos y conocimientos necesarios, de manera general, para el estudio de GPCRs. El receptor δ (DOR) posee la característica de que su dinámica tiene muy alta correlación con las descripciones funcionales, tanto computacionales externas e internas como experimentales, por lo que constituye un excelente objeto de estudio para entender las bases de la dinámica de estos receptores. Finalmente, la dinámica del receptor M_1 (mAChR1) se caracterizó por eventos menos explícitos que con DOR, similares a CCR5 en este sentido, pero suficientes para caracterizarse con las variadas herramientas utilizadas en sus estudios.

En los tres casos de estudio, fue manifiesto el hecho de que un solo parámetro de orden no es suficiente para describir a un receptor en un sistema específico, sino que es necesario evaluar y analizar varias variables de la dinámica de los sistemas, abordando los resultados por numerosos enfoques, para integrar los resultados sobre la discusión de los fenómenos, y emitir juicios sustentados sobre ellos (**Tabla 7**). En los 26 sistemas complejo estudiados de los tres receptores, la mayoría de ellos verificó de manera unívoca la correspondencia entre actividad descrita y estado funcional deducido. Las diferencias más notables fueron las diferencias entre los ligandos de CCR5, compuesto 21 y 34 (con actividad descrita como “inactivadores” pero que mostraron perfiles parcialmente distintos), el ligando SYK657 de δ (descrito como agonista inverso total pero cuyo complejo presentó características estativas, lo cual se puede atribuir a la existencia de los subtipos δ_1 y δ_2 , los cuales no están especificados para éste), y el complejo de muscarina, la cual parece inducir un colectivo activo distinto). En la mayoría de los casos, por lo menos un indicador no coincidió con los resultados esperados, pero se pueden relacionar con el resto de la información, y constituir una descripción única de cada sistema, porque cada receptor posee características únicas que dificultan el generalizar los mecanismos entre ellos, pero que a su vez enriquecen las oportunidades de estudio y abordaje de estos sistemas tan relevantes en la señalización, bioquímica y farmacología.

CONCLUSIONES, COMENTARIOS FINALES Y PERSPECTIVAS

Tabla 7. Características comparativas de todos los sistemas estudiados de GPCRs.

Receptor	Sistema	Ligando	Actividad descrita del ligando ¹	Estado funcional alcanzado ²	Características más notable del sistema
CCR5	apoCCR5	-	-	Estativo y partitivo ³	Agua interhelicoidal y región IC
	CCR5MRV	Maraviroc	Agonista inverso parcial	Estativo/inactivo parcial	Curvatura en TM5
	CCR5C21	Compuesto 21	Antagonista	Estativo	Extremos IC de TM5 y TM6
	CCR5C34	Compuesto 34	Antagonista	Partitivo/estativo	Extremos IC de TM5 y TM6
	CCR5CCL5	CCL5	Agonista total	Activo	Extremos IC de TM5 y TM6
δ	apoδ	-	-	Predominio transitivo	Configuración de TM5 y TM6
	δNLT	Naltrindol	Antagonista selectivo	Estativo	Extremos IC de TM5 y TM6
	δBPNF	Buprenorfina	Antagonista	Estativo/partitivo	Extremos IC de TM5 y TM6
	δNLX	Naloxona	Antagonista	Estativo, tres colectivos ⁴	Curvatura de TM1
	δDPP	DIPP-NH ₂	Antagonista bifuncional	Estativo	Configuración de TM5 y TM6
	δCmp4	Compuesto 4	Antagonista selectivo	Estativo	Configuración de TM5 y TM6,
	δNLR	Nalorfina	Agonista parcial	Estativo/partitivo	Configuración de TM1 y 5-6,
	δPN6	PN6047	Agonista sesgado	Partitivo	Configuración de TM5-6 y H8
	δDPI	DPI287	Agonista	Partitivo/activo	Configuración de TM5 y TM6
	δBW	BW373U86	Agonista	Activo	Configuración de TM5-6 y H8
	δMRP	Morfina	Agonista	Activo	Configuración de TM5 y TM6
	δKGCH	KGCHM07	Agonista selectivo	Activo	Configuración de TM5-7 y H8
	δENKL	Encefalina L	Agonista	Activo	Configuración de TM6 y H8
	δDLTR	Deltorfina II	Agonista	Activo	Configuración de TM6
	δSYK	SYK657	Agonista inverso total	Estativo	Configuración de TM5 y TM6
δTPP	TIPPψ	Agonista inverso	Inactivo	Configuración de TM5-7 y H8	
M ₁	apoM ₁	-	-	Predominio partitivo ⁵	Poros acuoso, región IC y TM4
	M ₁ ACh	Acetilcolina	Agonista total	Activo, dos colectivos ⁶	Extremos IC de TM5 y TM6
	M ₁ MUS	Muscarina	Agonista	Activo/partitivo sesgado ⁷	Extremos IC de TM5 y TM6
	M ₁ ARE	Arecolina	Agonista	Activo/partitivo	Configuración de TM5 y TM6
	M ₁ GSK	GSK1034702	Agonista parcial extendido	Transitivo/partitivo	Región IC y H8
	M ₁ HSC	Hiosciamina	Antagonista	Estativo	Curvatura en TM5
	M ₁ TTP	Tiotropio	Agonista inverso	Inactivo	Curvatura en TM5
	M ₁ MT7	Toxina muscarínica 7	Modulador alostérico negativo (NAM)	No activo, similitudes con transitivos-inactivos ⁸	Poros acuoso, región IC y vestibulo

1. Actividad experimental descrita en la bibliografía citada. 2. Conclusión obtenida de los múltiples análisis efectuados a cada sistema. 3. Las réplicas del sistema apoCCR5 mostraron indicadores de estados funcionales distintos, aunque relacionados. 4. El complejo con naloxona presentaron de manera general características estativas, pero el ligando experimentó cambios importantes entre las réplicas. 5. El sistema apoM₁ mostró características de estado cambiante. 6. El complejo con acetilcolina se caracterizó por un estado activo con diferencias en la configuración del ligando, de manera similar al complejo con naloxona. 7. El colectivo del complejo con muscarina fue divergente a los otros ensamblajes activos del receptor. 8. El sistema de la toxina muscarínica 7 fue único en su colectivo conformacional, y presentó características de no activación. TM: hélice transmembranal, H8: hélice yuxtamembranal, EC: extracelular, IC: intracelular.

Como perspectivas de este trabajo, enfocadas en caracterizar los colectivos y la influencia de los ligandos, se encuentran la extensión de los tiempos de simulación a más de 1 μ s, el empleo de intercambio de réplicas entre sistemas afines, con el objetivo de identificar los indicadores de cambio funcional, el modelado de sistemas adicionales de las categorías más escasas, como son agonistas parciales, agonistas inversos y moduladores alostéricos, estudios de los complejos y el correspondiente heterotrímero de proteínas $G_{i/o}$ y de estar disponible la información, con β -arrestinas; el estudio de los dímeros δ_1 y δ_2 , la modificación de las composiciones membranales, estudios enfocados al asa intracelular 3 (ICL3) del receptor M_1 como un segmento intrínsecamente desordenado, y estudios más profundos de las vías de propagación de la correlación o información mutua a través de cada receptor, éste último encontrándose en proceso de elaboración como trabajo adicional de este proyecto. Todos estos estudios contribuirían al entendimiento detallado de los mecanismos de cambio funcional de los GPCRs, de tal manera que se puedan identificar los determinantes estructurales de los ligandos, que inducen los cambios conformacionales respectivos, y de qué maneras se puede modificar o modular el cambio de estado funcional.

Como perspectivas del estudio de los GPCRs, la tipificación de la actividad específica de los ligandos, y la cuantificación que conduzcan a índices de eficacia, serán muy valiosos para los estudios computacionales y el desarrollo racional de fármacos.

Este trabajo contribuye sustancialmente al entendimiento de las interacciones de las moléculas de compuestos bioactivos con sus receptores, a nivel atómico y molecular, que es crucial para el diseño racional de compuestos de interés farmacológico, primariamente mediante el establecimiento de relaciones estructura-actividad (SAR) descriptivas, así como eventuales propiedades cuantitativas de éstas (QSAR), y secundariamente, al relacionar los eventos conformacionales expuestos en este trabajo, con las respuestas de estos receptores ante condiciones similares, así como ligandos de interés.

8. HIPÓTESIS ETIOLÓGICAS

8.1. PROTEINOPATÍAS Y ESTADO AMILOIDE: HIPÓTESIS AMILOIDOGÉNICA

Las modificaciones en la estructura de las proteínas se reconocen como causa de varias enfermedades. Estos cambios pueden ser debidos a mutaciones puntuales, modificaciones postraduccionales, proteínas truncas o quiméricas, o por plegamientos no nativos. El impacto sobre la funcionalidad de las proteínas puede derivar en pérdida o ganancia de función, como se observa en numerosas enfermedades. Dada la disfunción proteica primaria estas enfermedades se engloban en la categoría de proteinopatías. En varias de estas enfermedades, y de manera sobresaliente en las enfermedades neurodegenerativas como la EA, el plegamiento no nativo patognomónico es de tipo amiloide, el cual toma su nombre de la apariencia microscópica de estos depósitos similar a gránulos de almidón observados en tejidos vegetales. estado amiloide no es propio de los péptidos β -amiloides, sino de un gran número de proteinopatías amiloidóticas.[299] La conexión de los depósitos de la amiloidopatía con la tauopatía, es decir, la proteinopatía que afecta a las isoformas de Tau, se establece a través del sistema noradrenérgico; los oligómeros de péptidos A β 42 funcionan como activadores alostéricos sesgados del receptor adrenérgico α_{2A} , dirigiendo la señalización hacia la activación de la enzima glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK β 3), la cual fosforila a la proteína Tau.[300] Una controversia suscitada el 21 de Julio de 2022 pone en duda la identidad patogénica de una especie amiloide, A β *56,[301] y el 25 de Octubre de 2022 se planteó que el desencadenante de la EA no es el depósito de amiloides, sino la disminución del nivel de A β 42 soluble en líquido cefalorraquídeo.[302]

8.2. DISFUNCIÓN NICOTÍNICA CENTRAL: HIPÓTESIS COLINÉRGICA

La importancia del sistema colinérgico en la formación y consolidación de la memoria se ha demostrado con numerosas evidencias experimentales y clínicas. La afectación colinérgica leve, aguda, transitoria y reversible que se observa clínicamente por un grado variable de amnesia, como la inducida por el efecto central de fármacos como la atropina y varios antiparkinsonianos anticolinérgicos como el trihexifenidilo y biperideno,[203,215,303] así como el refuerzo cognitivo de agentes colinérgicos como la nicotina,[304–307] desvela la importancia fundamental de la ACh en las vías implicadas en la memoria. En las etapas iniciales de la EA, el sistema nicotínico central conformado por los receptores neuronales nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) comienza un deterioro de sus funciones al disminuir la activación de las vías intracelulares JAK2-STAT3, MEK-ERK y PI3K-Akt, involucradas en múltiples funciones celulares, y favoreciendo la fosforilación en Tau y otras proteínas;[42] e impactando posteriormente al sistema muscarínico central, cuyos receptores son los mAChRs. La afectación colinérgica se ha relacionado con una disfunción general de las neuronas colinérgicas, abundantes en el telencéfalo, además de degeneración en las funciones de algunas cinasas intracelulares activadas por los receptores colinérgicos activados. Asimismo, la prolongación y reforzamiento de la actividad colinérgica en pacientes con EA ha mostrado una

mejoría cognitiva leve en las primeras etapas de la enfermedad,[308–310] por lo que la disfunción colinérgica central se ha establecido como una causa etiológica probable.

8.3. EVIDENCIAS DE LA HIPÓTESIS “NEUROINMUNOMICROENDÓCRINA”

Además de las hipótesis amiloide y colinérgica que son complementarias, se han detectado numerosos hallazgos que involucran a otros sistemas del organismo, tanto en modelos animales de la enfermedad como en pacientes humanos. Entre estos están los cambios inflamatorios periféricos de bajo grado observados en la obesidad, aterosclerosis, diabetes tipo II, dislipidemias, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y sedentarismo,[12,16,17,311] traumatismos repetitivos en la cabeza,[312] alteraciones crónicas de las poblaciones de la microbiota oral e intestinal, ciertos tipos de gingivitis y periodontitis, estrés crónico, varios contaminantes neurotóxicos como cadmio y mercurio,[37,313] etc.

8.4. TIPOS DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

8.4.1. PROTEÍNAS PATOGNOMÓNICAS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Proteína precursora de amiloide, APP.

La proteína precursora de amiloide, APP, es una proteína bitópica tipo I con un dominio extracelular largo, con dominios de unión a cobre, heparina e integrinas. APP es sustrato de dos tipos de enzimas dando origen a dos vías de procesamiento distintas. Las α -secretasas, como ADAM10 y ADAM17, escinden su dominio extracelular y producen una forma soluble sAPP y el remanente celular CTD α , conocida como vía de procesamiento no amiloidogénica. Por otra parte, la enzima membranal β -secretasa o BACE1 produce el remanente celular CTD β , el cual a su vez es sustrato del complejo γ -secretasa, produciendo los péptidos β -amiloides de, por ejemplo, 37, 38, 39, 40 y 42 aminoácidos, éste último con la propensión a formar depósitos de agregados amiloides oligoméricos neurotóxicos y depósitos amiloides en el espacio extracelular.[27,28,30,32] Estos depósitos inducen a otras proteínas a adoptar un estado amiloide, y pueden ser reconocidas por las microglías.[314] Estos agregados se eliminan efectivamente cuando son generados por situaciones no neurodegenerativas como el insomnio, el sueño no reparador y el estrés. Cuando las placas amiloides no son depuradas y en cambio permanecen, reclutando así la deposición de otras proteínas y albergando iones como Cu(II), Zn(II), Al(III) y Fe(II), así como AGEs, y un entorno oxidante, se denominan placas seniles, las cuales son una de al menos tres características distintiva de la EA.

Proteína Tau asociada a microtúbulos, MAPT.

La proteína Tau cumple funciones estabilizadoras en los microtúbulos del citoesqueleto neuronal, formando parte de uno de los mecanismos de regulación de estos. La proteína Tau está sujeta a fosforilaciones en diversos residuos que modifican su actividad funcional. Determinados patrones de fosforilación en Tau, que generan formas de Tau hiperfosforilada, poseen una actividad

desestabilizadora importante en los microtúbulos, deteriorando así el tráfico intracelular y otras funciones celulares. Las formas de Tau hiperfosforilada forman agregados intracelulares conocidos como ovillos neurofibrilares, conduciendo a una degeneración neuronal.[25,315] El origen de estas formas de Tau hiperfosforilada no es claro, pero se ha vinculado con la actividad disfuncional de ciertas cinasas reguladas por los NnAChRs, inducción extracelular de éstas por péptidos amiloides como A β 42, inducción por la actividad intracelular de proteasas de cisteína bacterianas conocidas como gingipaínas, producidas y secretadas por *Porphyromonas gingivalis*, causante primario de periodontitis que aparentemente se translocan al SNC a partir de las bacteriemias espontáneas de origen gingival;[316] así como la infección de las neuronas por virus herpes tipo 1 y 6[317] y posterior inducción de cinasas por los provirus integrados en el genoma. También se ha propuesto que algunas isoformas de Tau hiperfosforilada pueden transportarse al espacio extracelular y fungir como ligandos agonistas de algunos receptores de quimiocinas microgliales como CX3CR1,[318] teniendo un efecto de activación en estas células.

9. GENERALIDADES DE DINÁMICA MOLECULAR CLÁSICA (MD)

Sean $\mathcal{R}^3(\mathbb{R}^3, d)$ el espacio euclidiano y $P\Theta\Phi(\mathbb{R}^+ \cup \{0\}, ff)$ un espacio esférico con topología ff *force field*, y $\mathcal{E}(X \times Y \times Z, d) \subset \mathcal{R}^3$, $\mathcal{U}(B \times A \times T, tpr) \subset P\Theta\Phi$ dos subespacios con métrica d y topología relativa $tpr \subset ff$, respectivamente.

La transformación $P: \mathcal{E} \mapsto \mathcal{U}$ se llama parametrización P de las $\{A_{m \subset N}\} \in \mathcal{E}$ entidades químicas con masa $m_A = \sum_{i=1}^{m \subset N} m_i$, que pueden ser m moléculas, N átomos o n iones. Cada $A_m(pdb, itp)$ posee una configuración $pdb \in \mathcal{E}$ y una topología heredada (*inherited topology*) itp tales que $\cup A_m = \mathcal{E}$ y $\cup itp = tpr$.

Sea $\tau = \mathcal{E} \oplus t$ la trayectoria temporal de \mathcal{E} , y sean las funciones $\vec{r}_i := \mathcal{E}_{xyz;i}$, $\vec{v}_i := \frac{d\vec{r}_i}{dt}$, $\vec{a}_i := \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2}$ y $\vec{F}_i := m_i \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2}$ la posición, la velocidad, la aceleración y la fuerza de la i -ésimo átomo, respectivamente. El cambio de posición respecto al tiempo, $\vec{r}_i(t + \Delta t)$, se puede expresar como una serie de Maclaurin:

$$\begin{aligned} \vec{r}_i(t + \Delta t) &= \vec{r}_{0,i} + \Delta t \left. \frac{d\vec{r}_i}{dt} \right|_{t_0} + \frac{\Delta t^2}{2} \left. \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} \right|_{t_0} + \frac{\Delta t^3}{6} \left. \frac{d^3\vec{r}_i}{dt^3} \right|_{t_0} + \dots + \frac{\Delta t^n}{n!} \left. \frac{d^n\vec{r}_i}{dt^n} \right|_{t_0} + e_0 \\ \vec{r}_i(t - \Delta t) &= \vec{r}_{0,i} - \Delta t \left. \frac{d\vec{r}_i}{dt} \right|_{t_0} + \frac{\Delta t^2}{2} \left. \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} \right|_{t_0} - \frac{\Delta t^3}{6} \left. \frac{d^3\vec{r}_i}{dt^3} \right|_{t_0} + \dots + \frac{(-\Delta t)^n}{n!} \left. \frac{d^n\vec{r}_i}{dt^n} \right|_{t_0} + e_0 \end{aligned}$$

De tal manera que al sumar ambas expansiones y truncando hasta el cuarto término, se obtiene la nueva posición $\vec{r}_i(t + \Delta t) + \vec{r}_i(t - \Delta t) = 2\vec{r}_{0,i} + \frac{\Delta t^2}{2} \left. \frac{d^2\vec{r}_i}{dt^2} \right|_{t_0} + \dots + e_0$, que equivale a $\vec{r}_{1,i} \cong \vec{r}_{0,i} + \frac{\Delta t^2}{2} \vec{a}_{0,i}$.

Las velocidades iniciales $\vec{v}_{0,i}$ se generan a partir de la distribución de Maxwell-Boltzmann, y con ellas se calculan las nuevas velocidades $\vec{v}_{1,i} = \vec{v}_{0,i} + \frac{\Delta t}{m_i} \vec{F}_{0,i}$, donde las fuerzas se calculan con base en la relación $\vec{F}_t = -\nabla U_t$ (ver adelante). Posteriormente, se calcula la nueva posición $\vec{r}_{1,i} = \vec{r}_{0,i} + \Delta t \vec{v}_{0,i} + \frac{\Delta t^2}{2m_i} \vec{F}_{0,i}$, y la nueva velocidad $\vec{v}_{1,i} = \vec{v}_{0,i} + \frac{\Delta t}{m_i} \vec{F}_{0,i}$. Este método se conoce como *leap frog* o Euler-delante, Euler-detrás.

Las funcionales $E_j: \mathcal{U} \mapsto U$ son las contribuciones de energía tales que $U = \cup E_j$, y $U_t = E_t + K_t$, con

$$\begin{aligned} E_t &= \sum_i E_{t,j} = E_{b;t,\{i\}_1^2} + E_{ang;t,\{i\}_1^3} + E_{dih;t,\{i\}_1^4} + E_{cou;t,\{i\}_1^2} + E_{LJ;t,\{i\}_1^2} \\ E_t &= \sum_{i \neq j}^N \frac{k_{b;ij}}{2} (r_{t,ij} - r_{eq;ij})^2 + \sum_{ijk}^N \frac{k_{\theta;ijk}}{2} (\theta_{t;ijk} - \theta_{eq;ijk})^2 + \sum_{ijkl} k_{\alpha;ijkl} (1 + \cos(\nu \alpha_{ijkl} - \alpha_{eq;ijkl})) \\ &\quad + \sum_{ijkl} \frac{k_{\xi;ijkl}}{2} (\xi_{t;ijkl} - \xi_{eq;ijkl})^2 + \sum_{i < j}^N \sum_j^{N-1} \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon \epsilon_0 r_{t,ij}} + \sum_{i < j}^N \sum_j^{N-1} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{t,ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{t,ij}} \right)^6 \right] \end{aligned}$$

que es la energía potencial total al tiempo t , y $K_t = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i \vec{v}_{t,i} \otimes \vec{v}_{t,i}$ es la energía cinética total al tiempo t . El cálculo de las fuerzas $\vec{F}_{t,i}$ se efectúa a través de las constantes en ff, heredadas en itp y compiladas en tpr.

9.1. MUESTREO ACELERADO GAUSSIANO (GaMD)

Conceptualmente, a partir del cálculo de la energía potencial total se estima la N-variedad de energía total del sistema. Una manera de suavizar esta N-variedad es mediante la adición de un potencial armónico de realce de mínimos (Figura 9.1) [242]. Sea U_{min} una cota superior de la N-variedad, tal que y $U'_t = U_t + \delta U_t$, donde $\delta U_t = \frac{1}{2} k (U_{min} - U_t)^2$; y k es una constante armónica de la fuerza \vec{F}_t . El potencial de realce debe cumplir dos criterios:

1. Para dos valores de potencial arbitrarios $U_1, U_2 \in U_t \mid U_1 < U_2$, δU_t es una función monótona (es decir, $U'_1 < U'_2$).
2. $U'_2 - U'_1 < U_2 - U_1$.

Estos criterios se satisfacen cuando $k \leq k_0 \frac{1}{U_{max} - U_{min}}$, con $0 < k_0 \leq 1$.

3. La desviación estándar de δU_t debe ser suficientemente pequeña para generar una distribución leptocúrtica: $s_{\delta U} = \sqrt{\left(\frac{\partial \delta U}{\partial U} \Big|_{U=\langle U \rangle}\right)^2 s_U^2} = k(U_t - \langle U \rangle) s_U \leq s_0$, donde $\langle U \rangle$ y s_U son la media y la desviación estándar muestral de la N-variedad en un subintervalo temporal elegido de la trayectoria, y $s_{\delta U}$ es la desviación estándar muestral de δU con $s_0 \sim 10 k_B T$.

Esta característica se logra cuando $k_0 \leq \frac{s_0}{s_U} \frac{U_{max} - U_{min}}{U_{max} - \langle U \rangle}$.

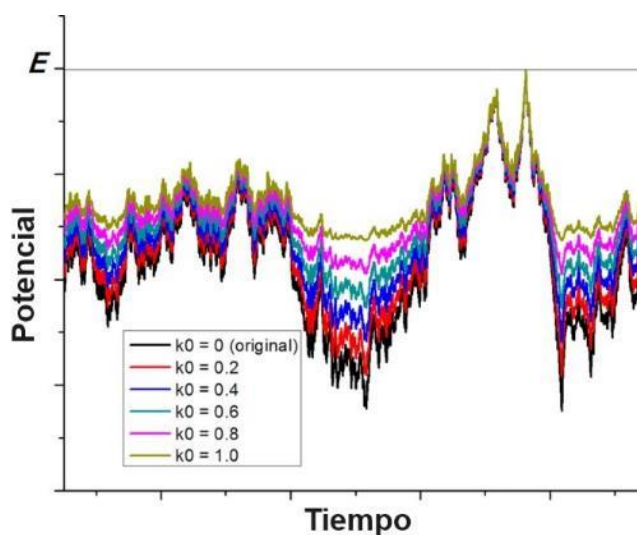


Figura 9.1. Variedad de energía potencial U en una trayectoria definida τ . El aumento en el valor de k_0 suaviza los mínimos de la variedad de manera gaussiana (Modificado de Yinglong Miao, Victoria A. Feher y J. Andrew McCammon. *J. Chem. Theory Comput.*, **2015**;11(8), 3584-3595).

RESEARCH ARTICLE

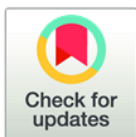
Computational study of the structural ensemble of CC chemokine receptor type 5 (CCR5) and its interactions with different ligands

Guillermo Goode-Romero , Laura Dominguez* 

Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

 These authors contributed equally to this work.

* lauradd@unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Goode-Romero G, Dominguez L (2022) Computational study of the structural ensemble of CC chemokine receptor type 5 (CCR5) and its interactions with different ligands. PLoS ONE 17(10): e0275269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275269>

Editor: L. Michel Espinoza-Fonseca, University of Michigan, UNITED STATES

Received: May 26, 2022

Accepted: September 13, 2022

Published: October 17, 2022

Copyright: © 2022 Goode-Romero, Dominguez.

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) in the form of a fellowships to GG-R [749523/857743] and LD [A1-S-8866], and by the Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información in the form of support and supercomputer facilities to LD [LANCAD-UNAM-DGTIC-306]. The funders had no role in study design, data collection and

Abstract

CC Chemokine receptor 5 (CCR5), a member of the Superfamily of G Protein-Coupled Receptors (GPCRs), is an important effector in multiple physiopathological processes such as inflammatory and infectious entities, including central nervous system neuroinflammatory diseases such as Alzheimer's disease, recovery from nervous injuries, and in the HIV-AIDS infective processes. Thus, CCR5 is an attractive target for pharmacological modulation. Since maraviroc was described as a CCR5 ligand that modifies the HIV-AIDS progression, multiple efforts have been developed to describe the functionality of the receptor. In this work, we characterized key structural features of the CCR5 receptor employing extensive atomistic molecular dynamics (MD) in its apo form and in complex with an endogenous agonist, the chemokine CCL5/RANTES, an HIV entry inhibitor, the partial inverse agonist maraviroc, and the experimental antagonists Compound 21 and 34, aiming to elucidate the structural features and mechanistic processes that constitute its functional states, contributing with structural details and a general understanding of this relevant system.

Introduction

The chemokines are a subfamily of cytokines with chemotactic and communication activities, expressed and secreted by many cell types such as white blood cells, smooth-muscle, endothelial and neural-derived cells, in response to several stimuli. They are implicated in multiple physiological and pathological processes, including cell migration and recruitment, immune activation responses, acute inflammation, and survival or death induction of many cell types [1]. This family of small-proteins is classified according to their cysteine-motif in the primary sequences as CXC (or α -chemokines), CC (β -chemokines), XC (γ -chemokine or lymphotactin-1/2) and CX3C (δ -chemokine, CX3CL1 or fractalkine), where X denotes a variable residue. The principal chemokine receptors belong to the G Protein-Coupled Receptor (GPCR) superfamily. CCR5 serves as a receptor of multiple C-C chemokines, mainly CCL5, CCL8/MCP-2,

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

and CCL3/MIP-1 α , with important roles in inflammatory and neuroinflammatory processes seen in both acute and chronic, peripheral, and central damage. Like many other surface receptors, CCR5 is a receptor of external proteins, particularly of viral origin. Importantly, it acts as one of the most common coreceptors of the glycoprotein 120 of the spike from human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) [2–4].

The CCL5 chemokine was first described in T-cell lymphocytes with cDNA libraries as the Regulated (increased production) upon Activation expressed by Normal T cells (as well as other cells) and presumably (now confirmed) Secreted factor (RANTES) [5]. Later, it was identified as a chemokine involved in multiple physiological and pathological signaling and processes. As the principal co-receptor for the HIV-1 virus, many efforts have been performed to target CCR5 to offer a small-molecule drug able to interfere with the HIV-1 infective process. The first marketed drug with blocking activity on CCR5, maraviroc (MRV), was obtained from a rational investigation and computer-aided development as a novel mechanism to fight the HIV-AIDS pandemic [6–8]. The CCR5-MRV complex was elucidated by X-ray crystallography, and a large series of CCR5 ligands have been under investigation [9]. Importantly, during the past ten years, the modulation of CCR5 has also been studied as a potential therapeutic target for central nervous system (CNS) pathologies, such as stroke and acute brain traumatic injury [10], autoimmune encephalomyelitis [11], acute injury of the spinal cord [12], some models of epilepsy in animals [13], metastatic cancer [14–16], and in COVID-19 disease [17]. In fact, CCR5, along with other chemokine receptors [18–27] have also been recognized as key participants in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and other neuroinflammatory entities.

In this work, we employed extensive atomistic Molecular Dynamics (MD) simulations to describe the structural ensemble of CCR5 in its apo and ligand-bound forms and to characterize important CCR5 ligand-bound interactions that lead to CCR5 activation. This structural information will certainly be useful for developing treatments for such complex neurological diseases.

Material and methods

In this study, we performed extensive atomistic MD simulations of the CCR5 system in its apo form and also in the presence of ligands maraviroc and the chemokine CCL5, with two replicates (namely I and II). Additionally, we characterized the structural ensemble of CCR5 in complex with the experimental antagonists compound 21 (C21) and compound 34 (C34).

The MD simulations were performed using, as initial coordinates, the experimental elucidated structure of CCR5 in complex with the partial inverse agonist [28] maraviroc (MRV) deposited in the Protein Data Bank (PDB ID: 4MBS [9]). For the agonist system, we based our CCR5-CCL5 model on the CCR5-[5P7]CCL5 complex (PDB: 5UIW [29] with the full CCL5 [24–91] isoform (UniProt: P13501 [30])). We also took as initial models the ligand complexes of CCR5 with antagonists, bioactive molecules Compound 21 (C21) and Compound C34 (C34), that are also deposited in the PDB (PDB IDs: 6AKX and 6AKY respectively [31]). CCR5 tyrosine residues Y10 and Y14 were modeled as tyrosine-sulfate amino acids, according to experimental findings [32–34], and parameterized with ACPYPE [35]. All our models were membrane-oriented with the PPM server [36], and then embedded in a palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) lipid bilayer surrounded in water with NaCl 0.15 M using the CHARMM-GUI server [37, 38]. MD simulations were performed using GROMACS 5.0.4 package [39], with LINCS constraint algorithm for bonds involving hydrogen atoms [40], V-rescale thermostat at a reference temperature of 310 K [41], and semi-isotropic Parrinello-Rahman barostat with a reference pressure of 1 bar [42]. All simulations completed 600 ns, and the

Table 1. Simulated CCR5 systems and PDB IDs employed to build our initial structures.

System	CCR5 system details	Functional state	PDB ID	Simulated time (ns)	
				cMD	GaMD
CCR5	Apo	Basal	4MBS	600, 600	90
CCR5-MRV	Maraviroc	Inactivated	4MBS	600, 600	-
CCR5-CCL5	CCL5[24–91]	Agonized	5UIW, 6FGP	1000, 1000	150
CCR5-C21	Compound 21	Antagonized	6AKX	600	-
CCR5-C34	Compound 34	Antagonized	6AKY	600	-

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275269.t001>

chemokine system was extended for 1 μ s due to the temporal scale of activation of this system [43, 44]. Additionally, to assess the long-timescale of the functional changes of the GPCRs, and to compare our conventional MD (cMD) results, we performed Gaussian accelerated Molecular Dynamics (GaMD) sampling for the apo-receptor and CCL5-bounded complex systems. Initially, we performed a cMD using the SHAKE constraint algorithm for bonds containing hydrogens [45], a reference temperature of 310 K, and a Monte Carlo barostat with a reference pressure of 1.0 bar. Then, the GaMD sampling with dual boost on dihedral and total potential energy was performed in an NVT ensemble with upper limits of the standard deviation of the gaussian reweighting for both contributions of 6.0 kcal/mol was performed with AMBER 18 [46–49]. For the analysis of our simulations, we used ChExVis [50] to detect the interhelix water pore, in-home MDAnalysis scripts [51] to analyze the aqueous pore, R packages [52] to characterize the cross-correlation analysis of residues, and Bendix [53] to plot the helix bendings. PyMOL [54], VMD [55], and ISIS/Draw [56] software were used to make Figures and plots. Our CCR5 simulated systems are summarized in Table 1, and a 2D representation of their ligand structures is shown in Fig 1. The initial apo-CCR5 system was modeled from the CCR5-MRV structure without MRV.

Results and discussion

1. Intracellular extremes of transmembrane helices 3, 5 and 6 are key regions to characterize the CCR5 functional state

From our simulations, we were able to group our simulated systems into two categories based on their conformational similarities: (1) the *non-active state*, led by the partial inverse agonist ligand MRV (which presumably decreases the constitutive CCR5 activity [57, 58]) and the apo-receptor system, and (2) the *fully active state* that consists of CCR5 bound to the agonist CCL5 which is described to induce the activation of the receptor. Through a clustering analysis of transmembrane helices (TM), we found the most representative structures of each system (shown in Fig 2) and revealed some important differences among them:

- I. The non-active state systems (apo-CCR5 and CCR5-MRV) showed a particular bending in TM5, which is very pronounced in CCR5-MRV (as found in a previous computational study of the mechanism of maraviroc [59]), and apo-CCR5 simulated systems. Also, a smaller tilt angle in TM6 for the simulated CCR5-MRV system (S1 and S2 Figs).
- II. The *active state* system is constituted solely by our CCR5-CCL5 simulated system, mainly the chemokine interacting with the extracellular (EC) regions. The helicity of the intracellular (IC) segment of TM3 was extended in CCR5-CCL5 through the simulation time to the intracellular loop 2 (ICL2). The tilt angle in TM1 was increased, and the helicity of the IC extreme of TM5 and TM6 was decreased. We analyzed these findings by exploring the bending and tilt angles of the TM helices (S1 and S2 Figs).

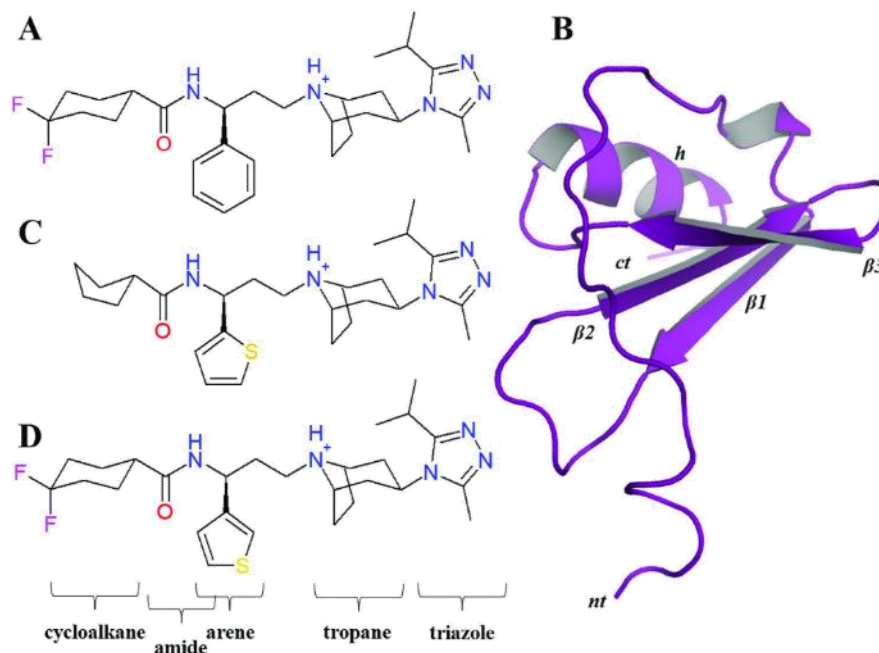


Fig 1. Structure of the ligands of CCR5. 2D representation of small-molecule ligands (A) maraviroc (MRV), (B) bounded chemokine CCL5[24–91]. The experimental ligands (C) Compound 21 (C21) and (D) Compound 34 (C34). Substructures of the ligands are indicated at the bottom of the figure. In CCL5 the segment at amine terminus is inserted in the part of the orthosteric site that overlaps with those of the small-molecule ligands. For the chemokine, *nt*: amino terminus, *ct*: carboxyl terminus, $\beta 1$ – $\beta 3$: beta sheets 1–3, *h*: helix.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275269.g001>

2. The ligand interactions with a tetrad of residues of the orthosteric site are crucial for CCR5 activation

The CCR5 orthosteric site comprises an extensive region of CCR5 N-terminus (NT), extracellular loop 2 (ECL2), and a narrow hydrophobic cavity located at the extracellular side of the receptor where MRV binds, and also where the amino terminus (*nt*) from CCL5 first interacts to get inserted deep into the receptor interhelix region [28, 60]. Hereafter, the common part of the orthosteric site (OSS) consists of the hydrophobic cavity formed by a tetrad of residues: Y37^{1.39}, W86^{2.60}, Y251^{6.51}, and E283^{7.39} (here, we use the Ballesteros-Weinstein nomenclature for the receptor residues [61]).

In our MD simulations, the apo-CCR5 system replicates show an expected configuration within the OSS since the basal state tends to adopt pro-inactive features. Thus, the CCR5-I and CCR5-II replicates resemble the CCR5-MRV-I system, particularly in the orientation and position of the tetrad (Fig 3). The CCR5-MRV-II replicate shows a different configuration within the OSS than the replicate I, although both, apo-CCR5 and CCR5-MRV, are congruent in an adjacent region to OSS, as we explain below. Also, the simulated receptor-ligand complexes stayed at the orthosteric site and conserved similar interactions to the crystallographic structures and published computational studies on CCR5 [59, 62–64]. Particularly, the interactions of the protonated tropane of MRV and E283^{7.39} and the hydrogen bond of the triazole with Y37^{1.39} are highly conserved.

Moreover, MRV interacts with T195^{5.39} through its fluorine atoms, in agreement with the experimental structure [9]. The triazole group stacks with W86^{2.60}, whereas the indole

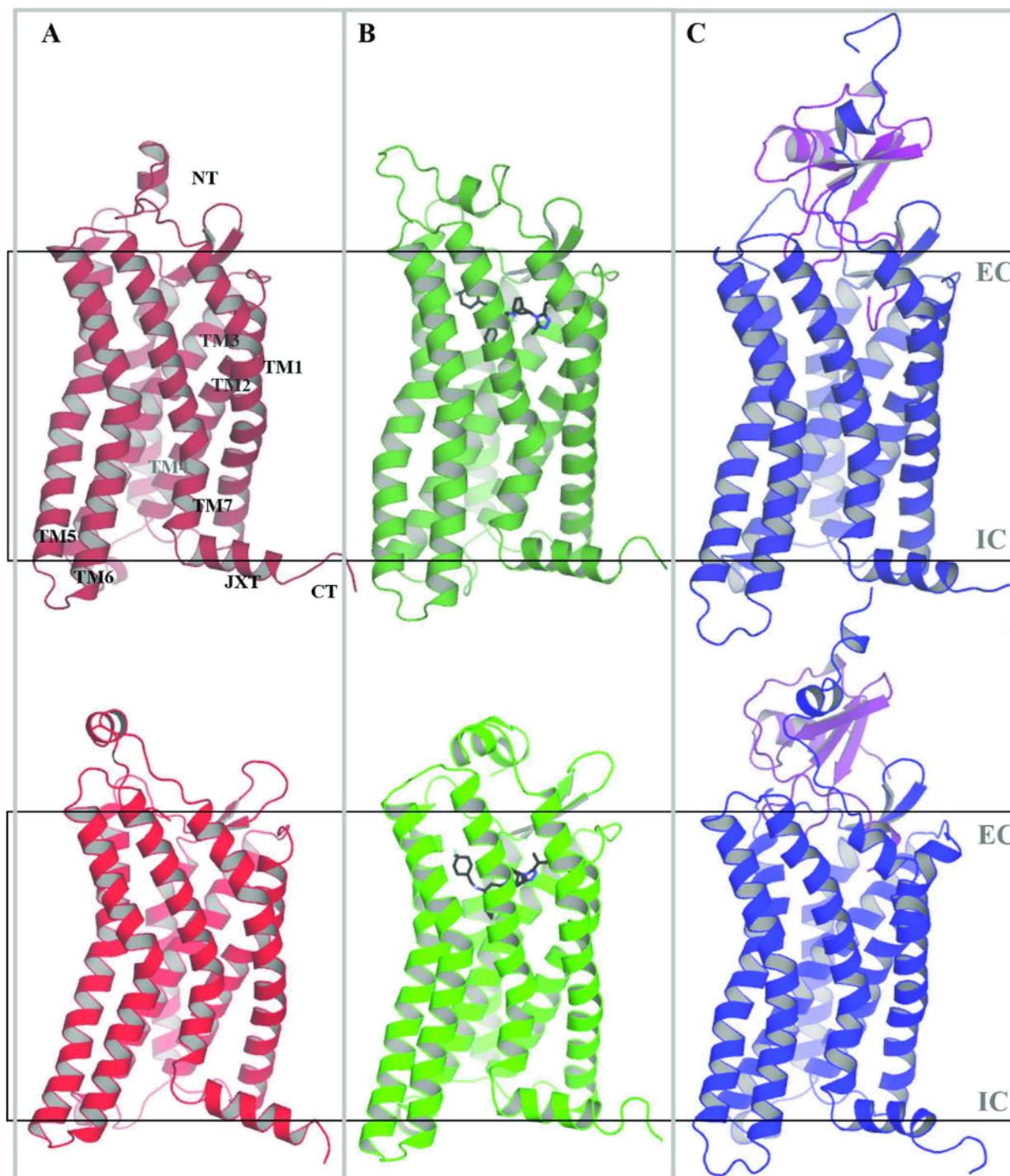


Fig 2. Representative structures of the systems of CCR5. (A) Apo-receptor-I (top) and II (bottom), and CCR5 in complex with (B) maraviroc-I and -II, and (C) chemokine CCL5-I and -II. Apo-CCR5 and CCR5-MRV adopt similar conformers. The chemokine in CCR5-CCL5 (in purple color) induces several structural changes quite distinctive to the MRV complex. EC: Extracellular side, IC: Intracellular side, TM1-6: Transmembrane helices 1 to 6, H8: Juxtamembrane helix (H8), NT: N-terminus, CT: C-terminus.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275269.g002>

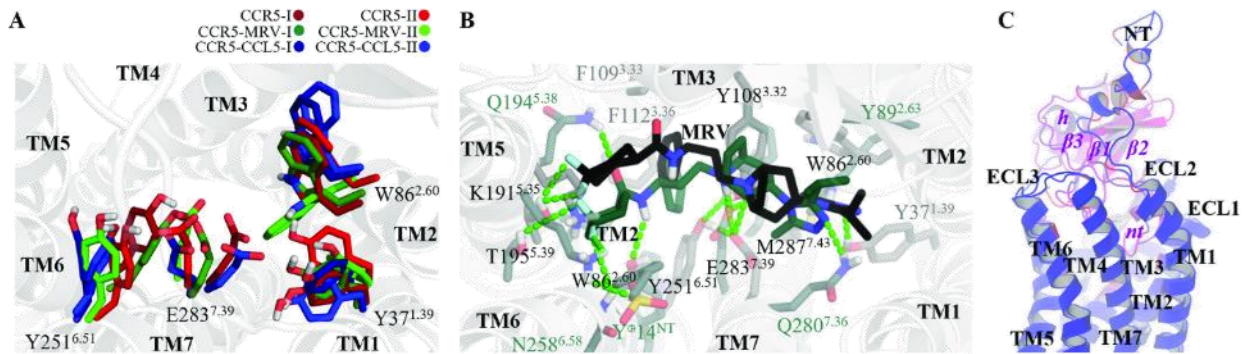


Fig 3. Orthosteric site of CCR5. Representative configuration of the OSS of the (A) three systems with replicates and complexes with (B) MRV and (C) CCL5. In the clustered configurations, the main interactions are the saline bridge between the tropane moiety with E283^{7,39} or Y108^{3,32}, the ion-dipole E283^{7,39} with Y251^{6,51} or with Y108^{3,32}, the hydrogen-bond between the triazole ring and Y37^{1,39}, the aromatic interaction triazole-W86^{2,60}, the interaction between at least one fluor atom and T195^{5,39}, the aromatic interactions among the phenyl group of MRV and F109^{3,33} and F112^{3,36}, and the hydrogen-bond between the ligand amide and Y251^{6,51}. The interactions receptor-chemokine include the NT and all the TMs helices but TM4, as well as ECL2 and ECL3. The most variable contacts are those that are located within the NT due to its inherent higher mobility. The regions in CCL5 indicated in lowercase and italic text labels include the most extended peptide fragment except for helix (*h*). Despite its disordered segments, the unfolded residues of CCL5 do not exhibit greater motions than the NT of the receptor. The detailed contacts of CCL5 with CCR5 are presented in S3 Fig.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275269.g003>

sidechain points towards TM3. More detailed interactions of CCR5 with the ligands are in S3 and S4 Figs.

CCR5 and CCL5 interact through multiple residues and establish several types of interactions (S3 Fig). E283^{7,39} interacts with the backbone of the amino extreme of CCL5, and chemokine residues (referred to with lowercase code) *p25*, *y26*, and *s27* interact with Y37^{1,39} and W86^{2,60} of the orthosteric tetrad, and Y89^{2,63}. The deep location of residues *p25* and *y26* allows them to interact with M287^{7,43}, which leads to local rearrangements in TM7 and influences the activation of CCR5, in agreement with previous experimental findings [34]. Y251^{6,51} showed high mobility and a small number of contacts with the chemokine, in contrast with MRV, these facts impact its interaction with the transmission switch W248^{6,48}. The N-terminus region of the receptor forms predominantly ionic and ionic-backbone interactions with the chemokine residues; D2 and the two tyrosine sulfate residues Y10 and Y14 interact with lysine and arginine residues, *r40*, *k68*, and *r70* from the chemokine. Several important residues in CCL5 that are post-translationally modified, such as the *s27* and *s28* that can be glycosylated, *m90* that can be sulfoxidated [65], and the *s24-y26* tripeptide, that can be cleaved in many isoforms of CCL5, establish multiple contacts with CCR5. More details of the chemokine residues contacting CCL5 are also shown in S3 Fig. Sodium cations that interact with the apo-receptor but not with MRV nor CCL5 complexes are reported in S5 Fig.

Interestingly, residue Y251^{6,51}, which is part of the OSS, interacts with the adjacent *transmission switch*. The transmission switch is composed of conserved residues that link the binding site with the movement of the TM helices that activate the receptor. In CCR5, this transmission switch is formed by W248^{6,48}, and is located at the conserved WXPY motif [9, 34, 58] and has been previously used as an indicator of the functional state of Class A GPCRs [43, 66]. The switching amino acid couples the orthosteric site, through Y251^{6,51}, and the *aromatic connector* [34], that is the hydrophobic region formed by Y108^{3,32}, F109^{3,33}, and F112^{3,36}, immersed in turn in the *hydrophobic layer 1* (HL1) [67], which is a region that in CCR5 contains four phenylalanine and one tyrosine residue. The distances between Y251^{6,51} and Y108^{3,32} from E283^{7,39} are indicators of activation switching since the greater distance among them allows the coupling between the orthosteric site and the transmission switch

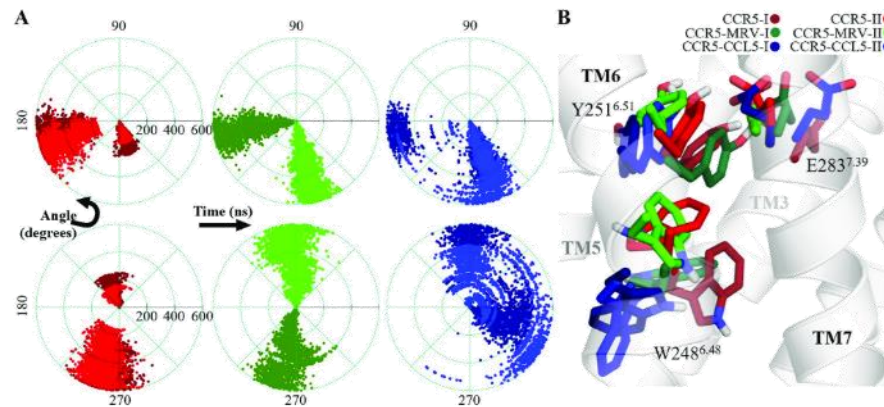


Fig 4. The link between the orthosteric site and the transmission switch. (A) Angular plots of the rotamers of W248^{6,48}, and (B) superposed configurations and the pair Y251^{6,51}-E283^{7,39}, where W248^{6,48} is oriented towards TM5 only in the chemokine complex. The angular plots are for χ_1 (top) and χ_2 (bottom) dihedrals of W248^{6,48}.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275269.g004>

(S6 Fig), and thus, W248^{6,48} positions its indole ring either close to TM5 or towards the receptor pore. In the apo-CCR5 and CCR5-MRV systems, the configuration of Y251^{6,51} and E283^{7,39} are equivalent, with a displacement of TM7 in the replicate I of the complex, with respect to replicate II of the apo-system (Fig 4).

In the CCR5-CCL5 system, Y251^{6,51} access rotamers that direct its sidechain to the W248^{6,48} vicinity and the *PIF* cluster (P206^{2,50}, I116^{3,40}, and Y244^{6,44}), diminishing the interaction with E283^{7,39} and the ligand. The χ_1 and χ_2 dihedrals of W248^{6,48}, which are formed by the atoms N-C α -C β -C γ and C α -C β -C γ -C δ 1, respectively, show distinctive values that indicate the torsion related to the activation of this transmission switch (Fig 4). The activation of the transmission switch collapses HL1 and determines the remodeling of the interhelix pore. In our extended simulation of 1 μ s and in the GaMD simulations of CCR5-CCL5, the torsion W248^{6,48} is consistent with the observed in the 600 ns of cMD simulation. In the prior, the torsion is maintained until the last, and for the latter, the torsion is reached from the beginning (S7 Fig), confirming that the orientation of this residue is a conformational hallmark of the activation of CCR5, according to the reported for other GPCRs of Class A. The GaMD simulation of apo-CCR5 also shows the initial torsion of the transmission switch in the first 230 ns of the cMD simulation, suggesting that the latter may tend to a non-active functional state that in the prior is not accessible.

3. Water penetration of the whole interhelix pore characterizes the activating state of CCR5

The collapse of HL1 in CCR5-CCL5 system leads to water entrance from the OSS through the interhelix pore and hydrating the path to the central coordination site (CCS) at the middle, where a conserved residue D76^{2,50} is present. In contrast, the CCR5-MRV water presence pattern remains dehydrated in a wide region in HL1 (Fig 5). We calculated the number of water molecules in the pore through axial segments of 0.5 nm every 100 ns for these two systems. Counting the water molecules within the heptahelical bundle, the inactive system exhibits less overall water presence in the pore, moreover HL1. In the continuous path of hydration in the chemokine system, the hydrophobic layer 2 (HL2) [67] constitute a bottleneck that is very straight at the beginning of the simulation and then relaxes. HL2 is comprised of several hydrophobic residues such as L69^{2,43}, L72^{2,46}, I119^{3,43}, L122^{3,46}, M210^{5,54}, Y214^{5,58}, L236^{6,36},

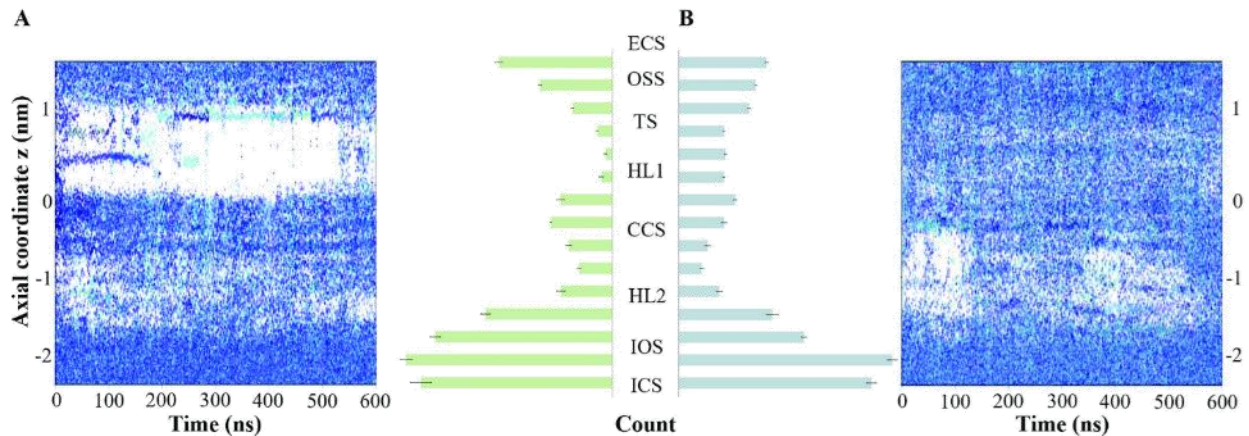


Fig 5. Water molecules are present in the interhelix pore through the axial coordinate. (A) the CCR5-MRV, and (B) CCR5-CCL5 systems. In the center, the barplot represents the average and standard error of the mean of the number of water molecules over intervals of 100 ns from the equilibrated structure to the 600 ns. Each bar comprises the partition time and segments for an average of 0.5 nm through the axial coordinate. For the inactive system, the region ranging the orthosteric site (OSS), the transmission switch (TS) is predominantly dehydrated, with the hydrophobic layer 1 well conformed, whereas the CCS and the ionic lock switch (IOS) is hydrated. In the agonized system, the presence of water molecules is extended through all the pore beyond the 140 and until the 600 ns, without integration of HL1. The histograms also show the collapse of the HL1 in the inactive system, as well a high abundance of water within the pore.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275269.g005>

I237^{6.37}, I240^{6.40}, and Y297^{7.53}. These residues are part of two functional regions. The pair L236^{6.36} and I237^{6.37} represents a hydrophobic switch whose configuration determines the features of the bottleneck. (S8–S10 Figs). When the sidechains of these residues due to a rotation of TM7, as principal component analysis (PCA) showed (S11 Fig), HL2 collapses, and then the water molecules penetrate from CCS to the ionic lock site, the adjacent region formed by Y214^{5.58} and Y297^{7.53}, part of HL2; R126^{3.50} and R235^{6.35}.

The pentad of D125^{3.49}, R126^{3.50}, Y214^{5.58}, R235^{6.35}, and Y297^{7.53} form several paired interactions, some of them related to the TM6 rotation and water presence in the pore (S12 Fig). The ionic interaction between R232^{6.32} and E302 predominates in CCR5-CCL5, whilst in apo-CCR5, it is infrequent. The rotamers that lay the sidechain of L236^{6.36} towards the pore are frequent in the apo-system, whilst those with MRV and CCL5 clear the pore of the sidechain. These interactions suggest the reordering of the IC region of TM3 and TM5-TM7. The water presence in the IC part of the pore seems to influence most of these interactions and motions.

4. The activation mechanism of CCR5 involves Y251^{6.51} pushing onto W248^{6.48}, TM5 and TM6 tilting outward, and the modification of the ionic lock as the information propagation path from the orthosteric site to internal CCR5 regions

The cross-correlation analysis of the CCR5-CCL5 α -carbons dynamics shows that a cluster of residues in TM1, TM2, and juxtamembrane helix (H8) forms a community highly correlated with the CCS and indicates the concerted motion of TM1 and TM2 by the H8 gyration shown in S11 Fig. The negative cross-correlation values include three clusters of residues: a) The subdomain from CCS to EC through TM1-3, including Y108^{3.32} and the kink at TM1; b) the EC part of TM6 with H8. And c) two subdomains of the IC segments of TM5 with TM6 (S13 Fig). These findings show a concerted motion between the surrounding of Y108^{3.32} and D76^{2.50} and thus, the orthosteric site and the CCS; the opening of the pore by the movement outward of the EC part of TM6 with the downward bend of H8, and the scissoring motions of the IC parts of TM5 and TM6, which were also evident in our PCA analysis.

The community network analysis among the five different systems also suggests the multiple differences in the receptor dynamics. The larger communities suggest extensive concerted motions, such as CCR5-MRV, that are consistent with the aqueous pore features. In contrast, the fragmented communities along the receptor may be related to the water dynamics through the pore (S14 Fig). Since apo- and MRV systems have lesser water within the pore, the ligand absence and the Na⁺ coordination may be responsible for the multiple communities in that system. We found that CCR5-MRV has communities that involve many residues, distinct from the rest of the systems. Nevertheless, the cross-correlation networks respond to multiple variables and not only to the water presence. We analyzed the shortest paths of propagation between different subdomains in CCR5 through two approaches: the entire backbone and the TM domain (TMD) with the ECLs and ICLs. Focusing on the EC and the IC subdomains as extremes, we found that the N-terminus participates in the paths, including the two tyrosine sulfate residues, the EC part of TM1, ECL2 (including the orthosteric site), and passes across TM2, TM5, TM6, and H8, spanning several important regions but not some key residues such as D76^{2,50}, E283^{7,39}, W248^{6,48}, or Y297^{7,53}. Nevertheless, analyzing the TMD backbone, the orthosteric site, and the ionic lock-associated residues as extremes, the paths include all the residues that we examined above, *i.e.*, those from the orthosteric site, transmission switch, HL1, central coordination site, and ionic lock site (Fig 6). In the TMD network analysis, TM1-3, TM6-7, and H8 are important for the shortest propagation paths; and to a lesser extent, TM5. To inquire about the connection between multiple regions, we also searched for communication paths between subzones in the TMD that revealed several networks among the different switches. These paths connect different key regions, such as the orthosteric site with the transmission switch and the ionic lock site, the central coordination site, and the ionic pair R232^{6,32}-E302^{H8} (S15 Fig).

Integrating all the findings, we found that the partial inverse agonistic mechanism of MRV involves primarily the Y251^{6,51}-E283^{7,39} interaction and the W248^{6,48} rotamer directed to the pore or TM7, as well as the HL1 and its dehydrated surrounding. The barrel-shaped adopted by the TMD allows longer distances and certain rotamers within some residues at the ionic lock site. Our apo-CCR5 system shares many features with the inactive system, but some features are distinguishable, such as the dehydration of HL2 and the interaction with sodium cations, absent in the other systems. For the chemokine system, we claim that the activation mechanism of CCR5 with the bound chemokine CCL5 in our system involves a large network of residues located in the orthosteric site, through Y251^{6,51} and W248^{6,48} as a communication pathway, both disrupting and collapsing HL1 and allowing the water molecule patterns into the interhelix pore. This differential hallmark in the CCR5-CCL5 activating system influences the reordering of the receptor IC, with motions such as the gyration of helix segments, scissoring, and bending of helix extremes. And at the amino acid level, we found torsions and interactions in key residues that, altogether with the rest of the mentioned conformational events, result in the conformational ensemble of an activated receptor uncoupled from the G protein complex. Nevertheless, our multiple activation-related findings agree with the reported features from active ensembles in class A GPCRs. Additionally to this concordance, we compared the experimental structure of CCR5 with a modified version of CCL5, the super-agonist [6P4] CCL5, deposited in the Protein Data Bank once we started with this study (PDB ID: 7O7F [34]) to identify similarities. From these analyses, we found that in our extended simulation of CCR5-CCL5, a decrease in the backbone RMSD of our simulated system with respect to the experimental structure 7O7F, from 0.33 to 0.15 nm (S16 Fig), suggesting a feasible convergence of our conformational ensemble with the experimentally determined fully-activated configuration, despite the absence of the G protein coupling.

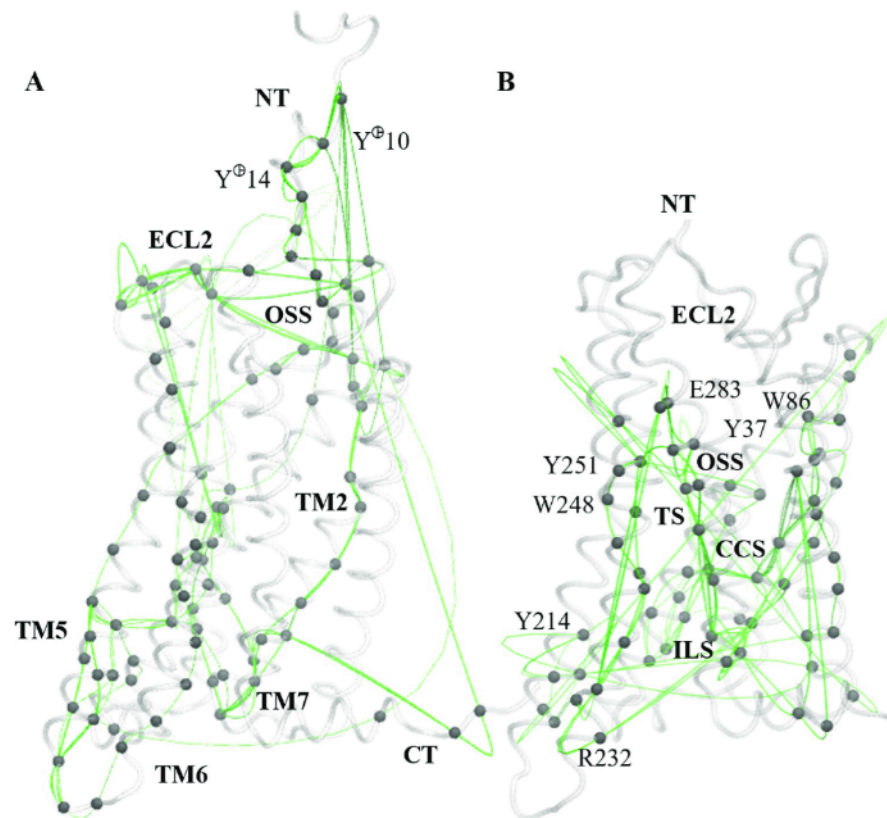


Fig 6. Cross-correlation network analysis of the CCR5-CCL5 system shows similar propagation paths of correlated motions. We looked for pathways of correlated amino acid motions from the EC side to the IC side of the receptor. (A) Paths involving the N-terminus and EC side of TMD to the IC region. Correlated motion pathways pass through TM2, TM5, and TM6 predominantly, and are not included in many of the key sites. (B) The paths from the orthosteric site (OSS) to the ionic lock site (ILS) span an extensive part of the TMD and include notable residues such as Y37^{1,39}, W86^{2,60}, Y251^{6,51}, and E283^{7,39} from OSS; W248^{6,48} from the transmission switch (TS), part of HL1, D76^{2,50} in the central coordination site (CCS), and Y214^{5,58}, R232^{6,32}, L236^{6,36} and Y297^{7,53} within the ionic lock site (ILS). Other path analyses are illustrated in S15 Fig.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275269.g006>

5. CCR5 structural features induced by the binding of a partial inverse agonist, maraviroc, are distinctive to those led by the binding of antagonists compound 21 and compound 34

MD simulations that started from the experimentally determined structures of CCR5 bonded to antagonists C21, and C34 sampled similar structural ensembles to the apo-receptor. From the clustering analysis mentioned in the first section of the study and shown in Fig 2, the receptor in the presence of C21 and C34 exhibited similar conformations of TM5 and TM6 to the ones sampled by the apo-CCR5 simulations. The general structure of CCR5-C21 and -C34 did not show a barrel-shaped geometry (S17 Fig). Nevertheless, the orientation of the transmission switch W248^{6,48} for the C21 complex resembles CCR5-MRV-II, whilst the transmission switch orientation in the C34 complex agrees with the CCR5-MRV-I replicate, both as non-active states (S18 Fig). Analyzing the interactions of these bioactive antagonists, we found similar patterns to the CCR5-MRV ensemble, such as the torsion of W86^{2,60} and the hydrogen bond between Y37^{1,39} and the triazole of the small-molecule ligands. Nevertheless, C34 presented a

subtle displacement within the orthosteric tetrad that led to a disruption of the ionic bridge between E283^{7,39} and the protonated tropane in favor of the Y108^{3,32} interaction (S4 and S19 Figs). C21 and C34 complexes presented a dehydrated interhelix pore, similar to the non-active systems (S8–S10 Figs).

Conclusions

Using extensive atomistic MD simulations, we identified key CCR5 conformational changes induced by the binding of a partial inverse agonist that are quite distinctive to those led by the presence of CCR5 antagonists. Although there are some similarities, we consider that these changes may constitute another functional state in CCR5 within the spectrum of functional conformational states known for GPCRs. Thus, in the presence of the partial inverse agonist MRV, the receptor reaches an inactive state with the constitutive activity diminished. Whereas our MD simulations of the CCR5 receptor in complex with C21 and C34 constitute antagonized states, different from the inactive state that we refer to as the *static* states, due to the known blockade of the antagonists in the functional state change and the binding of agonists.

Supporting information

S1 Fig. Curvature of the TM helices of the five systems of CCR5, in degrees through the simulation time. Despite the many differences between CCR5 and CCR5-MRV with CCR5-C21, the bending of their helices is very similar. In contrast, the systems CCR5-C34 and CCR5-CCL5 display a TM3 extension that imply the high curvature of the helix to continue with the ICL2.
(TIF)

S2 Fig. Tilt angles of the helices. The selection of the segments to the calculation of the tilts were based on the helicity of the residues, mostly at the kinks, through the simulation time. The circular plots display the extracellular (EC) and intracellular (IC) portions of the helices, except TM3 and H8. The most notable differences are: TM1-EC between MRV and CCL5, TM1-IC between C21 and CCL5, TM2-IC between MRV and CCL5, TM2-EC between C34 and CCL5, TM3 between MRV and C34, TM4-IC between C21 and CCL5, TM4-EC between MRV and CCL5, TM5-EC between C34 and CCL5, TM5-IC between C34 and apo, TM6-IC between apo and CCL5, TM6-EC between MRV and CCL5, TM7-EC between apo and CCL5, TM7-IC between C21 and CCL5, and H8 among apo and MRV, C21 and C34. The relevant findings are the greater difference in inclination between the inactive system CCR5-MRV, with the chemokine complex CCR5-CCL5, maximal in TM4, TM5, TM6 and TM7; the difference in apo-CCR5 in TM5m TM6-IC and TM7; and the multiple differences among the complexes of MRV, C21 and C34.
(TIF)

S3 Fig. Contacts in the receptor-ligand complexes. (A) Barplot of the scaled distances lesser than 4.5 Å, among the three small-molecules MRV (replicates I and II), C21 and C34 with each residue in CCR5. (B) Plot of the proportion of the distance value for the amide, tropane, and triazole moieties in the small-molecule ligands, with respect the distance in the experimental structures. (C) Interactions of CCL5 in the CCR5 representative conformer of the replicates I and II. The chemokine residues are in lowercase. (D) Plot of the interaction types in the CCR5-CCL5 complex. The inner ring counts for the hydrophobic and the outer for the polar interactions between the receptor and the chemokine. Each color represents the type of interaction, and the relative size of the circles indicates the closeness of the CCR5 residue to CCL5.
(TIF)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Graphics and Modelling

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmglm

Computational study of the conformational ensemble of CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1) and its interactions with antagonist and agonist ligands

Guillermo Goode-Romero, Laura Dominguez*

Facultad de Química, Departamento de Fisicoquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Molecular dynamics
CX3CR1
Fractalkine
Chemokine
Neuroinflammation

ABSTRACT

The CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1), a member of the class A of G Protein-Coupled Receptors (GPCR) superfamily, and its ligand fractalkine constitute an important biochemical axis that influence many cellular pathways involving homeostatic and inflammatory processes. They participate in the activation, chemotaxis and recruitment of multiple immunological cells such as microglia, macrophages and monocytes, and play a critical role in neuroinflammatory conditions such as Alzheimer's disease and multiple sclerosis, in the recovery from central nervous system injuries, in several chronic, peripheral inflammatory entities and in some infective processes including HIV-AIDS. In this work we present the study of the CX3CR1 receptor employing extensive atomistic Molecular Dynamics (MD) simulations with the aim to characterize the conformational ensemble of the receptor in the presence of its antagonist and agonist ligands. We analyzed the receptor conformational changes and described interactions within its key regions and the bounded ligands to identify their notable differences. Finally, we classify the features that would allow the identification of patterns that characterize a functional state to contribute to the understanding of the complexity of the GPCR superfamily.

1. Introduction

The chemokines constitute a family of chemotactic small-proteins that are expressed in many cellular lineages such as myeloid- and lymphoid-cells, smooth-muscle, endothelial and neural-derived cells. They are implicated in multiple physiological and pathological processes including cell migration and recruitment, immune activation responses, acute inflammation and survival or death induction [1]. The family of cytokines are classified according to their cysteine-motif in the primary sequences, as CXC (α -chemokines), CC (β -chemokines), XC (γ -chemokine or lymphotactin-1/2) and CX3C (δ -chemokine, CX3CL1 or fractalkine), where X denotes a variable residue. Chemokine receptors belong to the G Protein-Coupled Receptor (GPCR) superfamily. CX3CR1 is the sole member of the δ -chemokine receptor, its ligand fractalkine (FKN), a.k.a. neurotactin, has unique structural features [2,3]; FKN possesses the GNITC motif with a complex glycosylated N (asparagine) residue [4], and the chemokine itself is expressed both as an integrin containing the chemokine domain at the N-terminus, and this domain itself as a soluble chemotactic CX3CL1 [5,6].

The system CX3CR1-FKN is involved in multiple physiological and

pathological processes, therefore its study has acquired notable relevance in the last twenty years. CX3CR1 is expressed predominantly in lymphocytes, monocytes, NK cells and microglia, whilst FKN is produced in endothelial cells, where it participates in the adhesion and tethering of leukocytes, and notably in neurons [7–10]. The CX3CR1-FKN determines inflammatory and recruitment responses in several diseases such as Alzheimer's disease [11–17], central nervous system injury and recovery [18–20], multiple sclerosis [21,22], vascular damage in atherosclerosis [23–25], rheumatoid arthritis [26–28], Crohn's disease, and ulcerous colitis [29,30]. Despite the little knowledge concerning the structural details of the receptor, its ligand FKN has crystallographic [31] and NMR-elucidated structures [32]. The studies of CX3CR1 in an atomistic level include two models that support the experimental findings of several mutations in the receptor [33,34].

In this work we studied the CX3CR1 conformational ensemble with extensive atomistic molecular dynamics (MD) simulations in complex with two chemokine isoforms as agonists and several antagonists. In this study we characterized differences between the receptor active and non-active functional states and identified conformational events that lead to each class of response. This structural information contributes to the

* Corresponding author.

E-mail address: lauradd@unam.mx (L. Dominguez).<https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2022.108278>

Received 5 December 2021; Received in revised form 14 July 2022; Accepted 15 July 2022

Available online 7 August 2022

1093-3263/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

knowledge of the structural properties and activation mechanism of the CX3CR1-FKN system, which recently have been proposed as a potential therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric and neurodegenerative diseases with altered inflammatory responses. The patterns of key residues of CX3CR1 in each functional state that we describe in this work, could highlight the features required for the ligands to reach some functional activity within the receptor, with the aim to the further development of molecules that target CX3CR1 with therapeutic purposes.

We found our CX3CR1 study on the receptor functional activity [35–38] which comprises four states: (1) the basal state in which the receptor stays without a specified functionality, (2) the non-active state or inactive, (3) the meta-states are intermediate states towards receptor activation, and (4) the agonized or active state.

2. Material and methods

We built our initial CX3CR1 basal (apo) model using the *I-TASSER* server [39] which uses a hierarchical approach for the protein structure prediction. The structural information and receptor sequence alignment is summarize [40–44] in Table S11 and Figure S11 from the Supplementary Information (SI). The disulfide bridge between C120 and C175 was modeled according to the UniProt database [45]. To build initial coordinates of our initial inactive (apo), intermediate (apo) and active (apo) models, we employed homology models of CX3CR1 from the *GPCRdb* [46], their missing coils were modeled from our previously described basal (apo) model. Our basal apo model was also used to build initial coordinates of the protein-ligand models: the orthosteric antagonists E6130 [21] and JMS172 [47,48], and the negative allosteric modulator (NAM) AZD8797 (KAND 567) [19,49,50]. Through bioisostere comparative replacement from CCR5 structures [51] (PDB IDs: 4MBS [52], 6AKX and 6AKY [53]) and 20 docking replicates using AutoDock4.2 [54] (Figure S12), we based the binding modes of the different ligands on our CX3CR1 model. The server Chemicalize was used for prediction of pKa, December 2017 [https://chemicalize.com/developed by ChemAxon](https://chemicalize.com/developed%20by%20ChemAxon) (<http://www.chemaxon.com>). Finally, to build initial coordinates of CX3CR1 with its agonist ligands, AFKN and FKN, we used the chemokine pose systems and the protonation states from the US28–FKN structure (PDB ID: 4XT1 and 4XT3 [31]). The chemokine binding mode was used as a template to build the aglycone fractalkine isoform (AFKN), and the carbohydrate for the fractalkine glycan counterpart was modeled in *Glycan Fragment Database* (GFDB) [55]. The glycosylation was modeled for the complex biantennary carbohydrate glycoform G2S2 (FKN) [56]. All these models were membrane-oriented in the PPM server [57] and then constructed into the monocomponent POPC membrane systems, TIP3 model of water [58] and NaCl 0.15 M using the *CHARMM-GUI* server [59,60]. All the system components were parametrized with the CHARMM36 m force-field [61]. The full description of the systems is shown in Table S12. To assess the adequacy of the POPC membrane model and justify the simplification of the composition, we analyzed the basal apo system embedded in a multicomponent [62] membrane model that we discussed in Figure S13. Our studied models of CX3CR1 are listed in Table 1.

Table 1
CX3CR1 systems that we studied with MD simulations.

System	Replicates	Simulation length (ns)	Ligand activity
Basal (apo)	2	600, 600	
Inactive apo	2	600, 600	
Intermediate apo	2	600, 600	
Active apo	2	600, 600	
CX3CR1-JMS172	3	600, 1000, 600	Antagonist
CX3CR1-AZD8797	3	600, 600, 600	NAM
CX3CR1-E6130	3	600, 600, 600	Antagonist
CX3CR1-AFKN	3	600,600,600	Agonist
CX3CR1-FKN	3	1000,1000,1000	Agonist

The molecular dynamics (MD) simulations were performed using *GROMACS* 5.0.7 [63], with periodic boundary conditions and a PME approach [64], LINCS constraints [65] were imposed on hydrogen atoms, we employed the V-rescale thermostat [66] at a reference temperature of 310 K and a semi-isotropic, Parrinello-Rahman barostat [67] to maintain a pressure of 1 bar. We simulated two and three replicates per apo and protein-ligand complex systems respectively, and each of the simulations completed 600 ns and 1000 ns for the FKN system. We accomplished three additional bootstrapping replicates that started from the end frame of the simulated systems and compared the backbone RMSD among them to ensure a full convergence of the systems (Figure S14). With *GROMACS* 5.0.7 we performed clustering analysis with Gromos method and a cutoff equal or lesser than 1.0 Å, using the elbow method [68], mass-weighted RMSD and RMSF profiles for backbone and sidechains respectively, calculation of distances and angles, and principal component analysis (PCA) for key regions from the covariance matrices. Also we used ChExVis [69] to identify the residues lining the interhelix pore, in-home MDAnalysis [70] scripts for the water molecule count in the simulations within a distance range, and tilt calculations, R package Bio3D [71,72] to assess the Pearson cross-correlation, community analysis and network analysis among carbon alpha of key residues. PyMOL [73], VMD [74] and ISIS/Draw [75] software were used to make Figures and plots.

Our CX3CR1 models have an average RMSD of 10 Å of the TMD backbone with respect to the AlphaFold model deposited in UniProt [76, 77].

3. Results and discussion

We selected the threading model that preserved the folding of the juxtamembrane helix, in agreement with experimental information. The validation parameter C-score value, a confidence score for estimating the quality of predicted models [39], for our basal apo model (C-score = −3.11) falls within the interval reported as acceptable (from −5 to 2). The Ramachandran plot for 353 residues shows that 78.6% of the dihedrals are in most favored regions, 16.5% in additional allowed regions, 1.8% in generously allowed regions and only 3.1% are in the disallowed regions. The latter dihedral values were adjusted through the equilibration of the system. For the three homology models, the predominant template, and its respective resolution for each of them was an inverse agonized CCR5 complex for the inactive (51.1%, 2.2 Å), an antagonized CCR2 complex for the intermediate (56.6%, 2.8 Å), and an active mu-opioid receptor complex for the initial models of our active system (35.1%, 2.1 Å). More information is detailed in Table S1.

3.1. System generalities

Employing a clustering analysis of the single transmembrane domain (TMD) region we were able to identify major conformational differences between our CX3CR1 systems. We relate these major differences of our simulated systems with the three functional state ensembles: Inactive, intermediate, and active states. Each of these groups include general features that correspond to the inactive or non-active, *activating* or intermediate, and active functional states respectively. The bootstrapping of the simulations shows RMSD profiles that are convergent in most or all the comparisons. Thus, we infer that the simulations are sampling homeomorphic potential energy varieties. The classification of the states and its hallmarks are summarized in Fig. 1 and Figures S14–6 of the SI.

- (1) **Inactive (apo) structural ensemble.** The most notable features observed within the MD simulations of our basal apo, JMS172 (RJMS) and AZD8797 (RAZD) systems is a distinctive barrel-shaped geometry triggered by a bending in TM5 and in lesser extent TM6, that cause their partial separation from the TMD, mostly at the middle of the helices, and nearby the intracellular (IC) and extracellular (EC) sides.

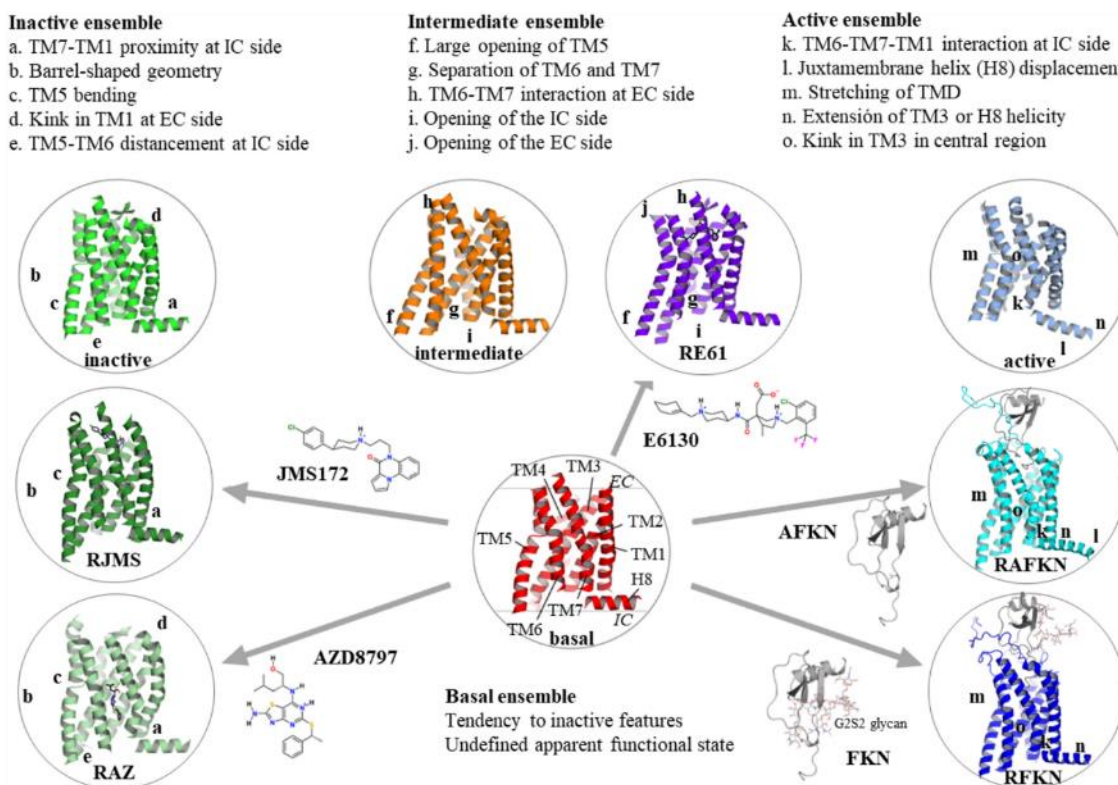


Fig. 1. Representative cluster conformers of each CX3CR1 systems. These are some common geometrical features of the most frequent conformers, that we show for visual purposes as three general, functional ensembles: The inactive/non-active for the antagonized receptor, the intermediate state ensemble for the activating receptor, and active state for the agonized receptor. The indicated characteristics for each those general classes are a part of the accessible conformational space for CX3CR1 in this study.

- Intermediate (apo) structural ensemble.** For the intermediate apo and the E6130 (RE61) simulated systems, we found a coordinated motion of the IC section of TM5 and TM6 away from the rest of TMD, and the separation of TM6 and TM7 in the IC zone.
- Active structural ensemble.** Our active simulated systems, comprised by the active (apo), AFKN (RAFKN) and FKN (RFKN), shared some features with the intermediate systems; TM5, TM6 and TM7 stood out straight and we also observed a slight reduction in the length of TM1 and TM5 at the IC side caused by the loss of secondary structure. In the other hand, we observed a helical extension of TM3 and the juxtamembrane helix (H8). Additionally we also observed an increased angle between TM7 and H8 [78], particularly in the RAFKN system.

3.1.1. Basal apo simulated systems share some similarities with the inactive state

Since our basal apo system was modeled from many receptors (Table S11), and due to the lack of a bounded ligand, we assumed that this system might adopt similar features to the inactive state. During our 600 ns MD simulations, the basal apo simulated system apo adopted two conformational similarities with the inactive apo and the RAZD systems: first, a bend at the IC portion of TM5 caused by a kink around residues G1995.46 and P2035.50, and second a low helix propensity of C2105.57 (Here we use the transmembrane helix notation of Ballesteros-Weinstein, BW [79]).

3.1.2. Active simulated systems show larger overall fluctuations

Differences between the TM sidechains mass-weighted root mean square fluctuation (RMSF) of our receptor systems revealed a notable

feature; the comparative average RMSF of each simulated system, with respect to the overall average RMSF (Δ RMSF, Fig. 2) showed that our active apo, RE61 and RAZD simulated systems have larger fluctuations through the simulated time, whilst basal apo and RJMS systems showed smaller Δ RMSF relative values. Considering that the inactive, intermediate, and active apo systems were modeled from ligand complexes deposited in the PDB, it may be expected that they underwent many readjustment-like conformational changes in the absence of any ligand. Interestingly, for the CX3CR1-ligand systems, tendencies of greater mobility for the active systems and lesser mobility for the inactive are consistent with reported patterns of flexibility for their respective functional states [80]. Therefore, we suggest that increased motions in residue sidechains of the active simulated systems are caused by the increased water content at the main receptor pore, as we present and analyzed further.

3.2. Many orthosteric and allosteric interactions between CX3CR1 and other class A GPCRs are conserved and may function as GPCR switches

The orthosteric binding site is formed by the extracellular (EC) loops and the cavity within the TM helices, and it is the site where the endogenous ligands, the chemokines, interact with the receptor. The cavity of the orthosteric site is located primarily among TM7, and TM1-3 [81], and it is known as the transmembrane site 1 (TMS1). TMS1 constitutes the region where the orthosteric ligands are bound, based on the CCR5 complexes deposited in PDB. The ionic interaction between a protonated basic or neutral nitrogen atom in the ligands and residue E2837.39 (in CCR5) is an interaction hallmark in many GPCR-ligand complexes. In agreement with available structural data, during our MD simulations we found that residues Y381.39, W872.60 and in lesser



Fig. 2. Comparative of the general mobility of the simulated system sidechains through a Δ RMSF from each system with respect to the overall average. The plots show the average RMSF for replicate of each simulated system with respect to the overall average RMSF for: **A)** The apo-receptor systems. **B)** The ligand-receptor complex systems. A secondary structure representation (blue = helix, red = beta sheet, green = bend, yellow = turn) is shown at the bottom of each plot. In the two set of systems, the higher Δ RMSF predominate in the active systems, active apo, RAFKN and RE61 complexes. For the prior, the basal apo system had the lesser fluctuations, whilst the inactive and intermediate were the median. For the ligand-receptor complexes, the smaller fluctuation pattern corresponds to the RJMS system and the inactive apo, whilst RAFKN system remained with larger fluctuations along with the whole RFKN structure except for its extracellular loops (ECLs) due the bounded chemokine. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

extent Y2476.51 constitute along E2797.39, the most prevalent protein contact site for the orthosteric ligands (Fig. 3A and B). W872.60 rotamers are related with the functional ensemble, keeping a specific torsion in most of the cases.

For the **inactive ensembles**, the binding mode of JMS172 in the three replicates comprises two related poses, contacting TM1, TM2, ECL2 and NT, that is distinctive with respect other experimental, chemokine receptor bounded ligand structures [52,53]. The docked complexes also found this configuration (Figure S12). Based on our results, JMS172 seems to induce a distinct inactive conformation, as it had been suggested for the β 2 adrenergic receptor [36]. Additionally, Y179ECL2, Q184ECL2, W187ECL2, and R1915.38 residues interact with JMS172. A detailed description of these interactions is provided in Figure S17.

The allosteric proposed site for AZD8797 is located within the interhelix pore, and formed by D772.50, S1163.39, A2827.42, H2857.45, C2867.46 and N2897.49. In the presence of AZD8797, our simulated systems showed noticeable interactions between the sodium-chelating zone, or central coordination site (CCS), with the conserved D772.50 and S1163.39 amino acids (Fig. 3C). These systems also share several features with the antagonized systems, like the closing of TM5 and TM6 with respect to the rest of the TMs [82], and a distinctive bending of TM5.

Molecular interactions in the **active ensembles** of CX3CR1 with the chemokine glycoforms AFKN and FKN are mainly of ionic and hydrogen bonding nature. E2797.39 interacted with the two adjacent histidine residues of the chemokines (we refer to the chemokine residues in italics and lowercases to distinguish them from those of the receptor), *h26* and *h27*, at the two polar hydrogen atoms of the backbone and the hydrogen atom of the imidazole rings, whereas there were less interactions with

the protonated N-terminus (Fig. 3D and E) of *q25*. S2767.36 and T2807.40 established hydrogen bonds with the backbone of the chemokine and the imidazole ring of *h27* and *h26* respectively. Thus, the two-histidine segment seemed to be a peptide equivalent of the piperidinium substructure of the small-molecule JMS172 and E6130 ligands, even in absence of any cationic group.

The comparative protein-ligand interaction patterns were extracted from a scaled distance-based frequency of contacts (Fig. 3D). From this analysis, it is possible to observe that the different ligands share several interactions since the ligand structures have similar groups. These patterns and the rotamers of W872.60 are showed in Figure S18.

Interestingly, we found a recurrent interaction of the glycan G2S2 with the outer side of the upper membrane leaflet, rather than with CX3CR1 in two of the three replicates of the RFKN systems. G2S2 also interacted with several chemokine and receptor sidechains (Fig. 3F).

From our MD simulations, we found that E2797.39, Y2476.51, and R2727.32 are residues that constitute the GPCR switch in charge of the conformational propagation (Fig. 4). Aiming to verify the activation mechanism of the RFKN system, and due the timescale reported for GPCR activation, we extended the simulation time to 1 μ s. The permanence and preponderance of the activation mechanism were consistent in our simulated replicates and are detailed in Figures S19-12.

3.3. The active systems exhibited important differences along four switches compared to the inactive systems

- The polar-anionic interaction between Y2476.51 and E2797.39 is prevalent in the apo systems, particularly in the basal but not in the active. The tyrosine residue Y2476.51 in the second system

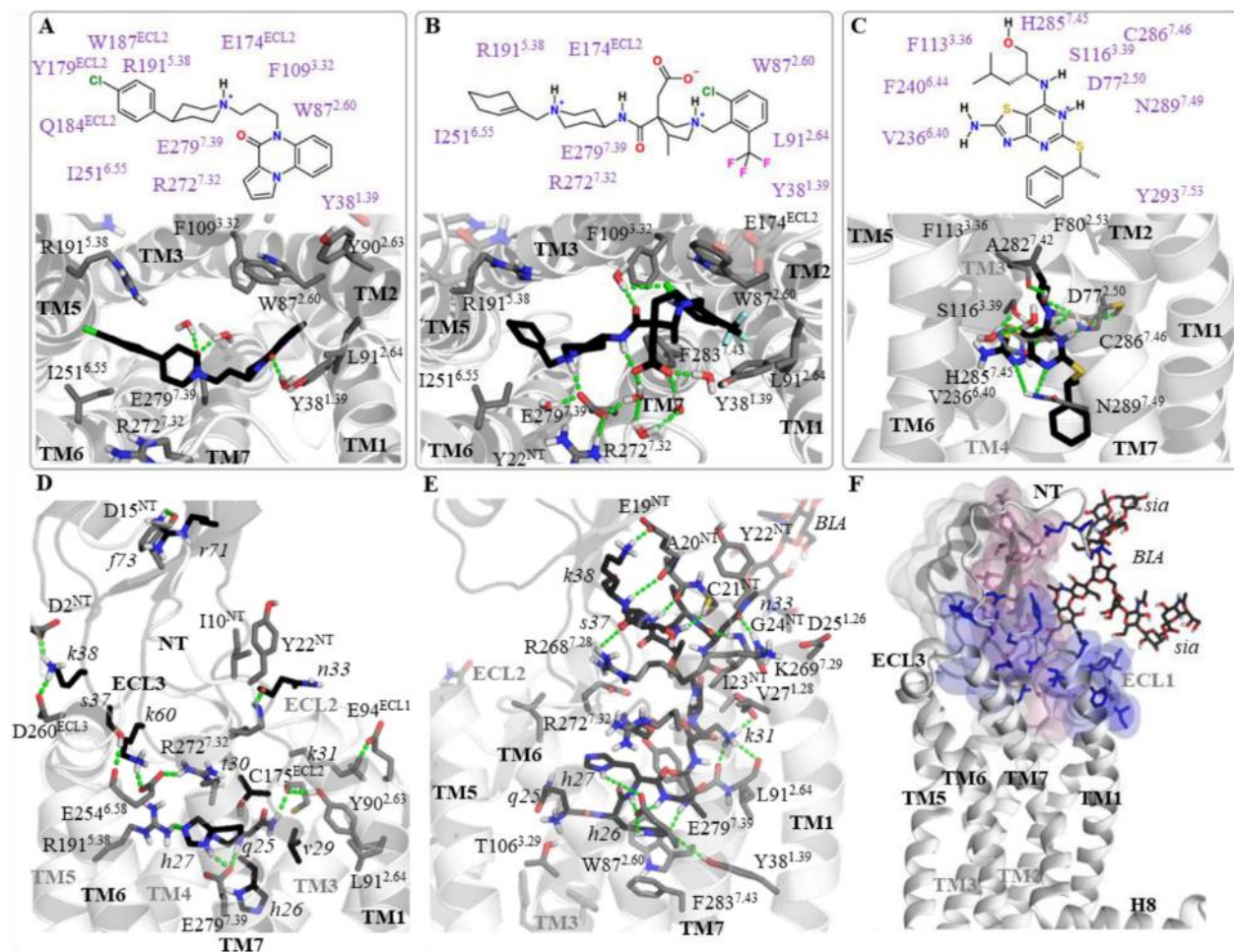


Fig. 3. Noticeable contacts of our simulations of CX3CR1 with the small molecule-ligands JMS172, E6130, and AZD8797, and chemokines AFKN and FKN, based in distances. The interactions were obtained from clustering analysis with cutoff of 0.2 nm at the TMS1, orthosteric binding site for: A) JMS172, B) E6130 and the proposed allosteric site for C) AZD8797. For the chemokines, D) Aglyco-FKN, and E) FKN. F) Contacts of the glycan with the receptor residues (in blue) and the chemokine peptide (in pink). The BW nomenclature was omitted for clarity. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

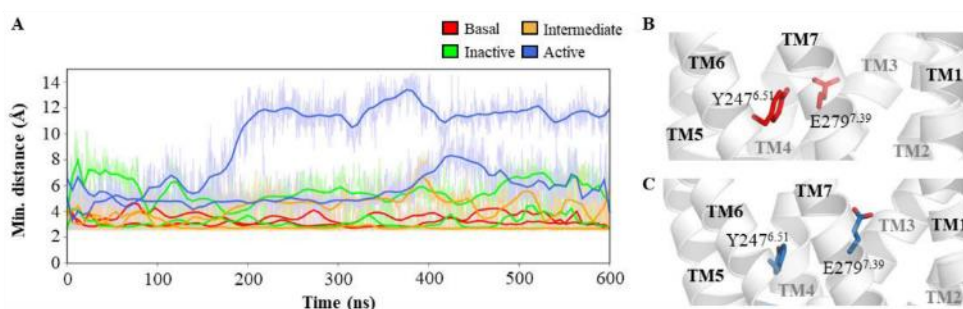


Fig. 4. Relations between Y247^{6.51} and E279^{7.39} in the orthosteric binding site. A) Minimal distance between the hydroxyl and carboxylate groups of their side-chains, respectively. It is notable the large distance in the active apo systems whereas it is minimal for basal apo and intermediate apo. Average configurations over all the simulation for the pair in B) Basal apo system (in red), and C) Active apo system (in blue). Y247^{6.51} is more capable to interact with the residue W244^{6.48} when the distance-based interaction with E279^{7.39} became weak or null. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

experienced a displacement towards the opposite direction from the glutamate sidechain (Fig. 4A).

b. The transmission switch consists of two conformations of W244.48. In fact, the interaction between Y2476.51 and W244.48 is related to the formation of a water cavity, according to several studies [83–85].

For the ligand-receptor complexes, we did not find a notable change between E2797.39 and Y2476.51, which is consistent with the occupied orthosteric site (Fig. 4B). The propagation of the transmission switch may respond to a prolonged ionic interaction between the ligand and E2797.39, which leads to a perturbation in Y2476.51 that affects the tryptophan vicinity. When the distance between both residues increases, the tyrosine sidechain moves closer to the tryptophan ring, and induces a rotation of its indole ring (Fig. 4C). This motion has been related to the activation mechanism of many GPCRs [86,87].

Therefore, the transmission switch (a.k.a. rotamer switch or toggle switch) consists of the sidechain rotation of W2446.48 that may occlude the interhelical pore. Consequently, we measured the tryptophane dihedral angles γ_1 and γ_2 (formed by N-CA-CB-CG and CA-CB-CG-CD1 atoms respectively) over the simulated time to identify torsional poses of W2446.48 (Fig. 5A) since it has been previously described that the torsion of this residue is related to the displacement of TM5 away from the whole TMD that leads to the receptor activation [82–84,87].

For our active ensembles, our active apo, RAFKN and RFKN simulated systems we were able to identify these W2446.48 changes, whilst in the basal apo simulated systems the tryptophane did not undergo this rotation. Interestingly, in the RFKN simulated systems we did not observe this motion until the simulation reached more than 600 ns, therefore, the extension of this simulation confirmed a very relevant feature of CX3CR1 activation (Figure S19). A 2-D representation of the predominant rotamer configurations of W2446.48 found in the basal apo and RFKN simulated systems are shown in Fig. 5B, and for the active apo simulated systems the predominant W2446.48 conformations are presented in Fig. 5C. During a long interval of time, in our simulations of the RFKN system, the tryptophan rotamer remained in a similar position to our basal apo system, until it experienced the activating-related torsion at 389–550 ns in one replicate, and near the 600 ns in the second replicate. Nevertheless, in the RAFKN system the rotamer of this residue remains unchanged. As we mentioned above, when the distance between E2797.39 and Y2476.51 increases, the latter becomes closer to the tryptophan which rotates towards TM5 and makes contacts with P2035.50 and G1995.46 that are located at the TM5 kink. A further principal component analysis (PCA) of the three residues, confirmed

that the motions of the tyrosine and tryptophan away from glutamate are correlated (Fig. 5D). The intermediate and inactive simulated systems did not show this feature.

c. Another important region in class A GPCRs is formed by residue Y2937.53, part of the conserved NPXXY motif and its vicinity. This residue exhibits an important role in the functional state as an adjacent member of the ionic lock region [85,87], composed by one acidic and one basic residue in TM3 and TM6 respectively. The rotamers and interactions of Y2937.53 with its adjacent residues determine, the position of the IC segment of TM7 and its contacts with TM6. Y2937.53 is able to adopt two predominant rotamers (Fig. 6A and B).

We found that one of these rotamers is a common feature of the basal and inactive apo systems, and RE61, RAFKN and RFKN. RJMS left this configuration beyond the 600 ns of simulation (Figure S110). The second rotamer was found in our intermediate (acquired about the 400 ns), active apo, and the RAZD simulated systems. These findings may suggest that the apo systems were unable to remain in their respective functional states, due the absence of any ligand to endure these changes which is consistent with the Na⁺ coordination in the orthosteric site (see Section V below). In the other hand, the basal system, Y2937.53 was able to adopt the two rotamer configurations. The EC- or up-oriented, (–)-synclinal rotamer of Y2937.53 is observed in the active systems RAFKN and RFKN, but also in the fractalkine complex replicates this rotamer changes to the IC- or down-oriented, (±)-antiperiplanar. It seems to be functional in this system at the beginning of the simulation time, before it changes. Further details of the Y2937.53 rotamers are provided in Figure S110. Interestingly, we found a striking feature in two replicates of the RJMS system and its Y2937.53 rotamers, as well as many features at the backbone and sidechains that are not consistent with an antagonist bound to the receptor. Its bounded ligand has been described as an antagonist but in our simulations, we found that the RJMS system shares similar characteristics to the active systems. Although the individual switches may not be sufficient to characterize the whole functional state, we extended the replicate II of the RJMS system to 1000 ns. This simulation showed more consistent results with the expected patterns for an antagonist (Figures S19–10), but the

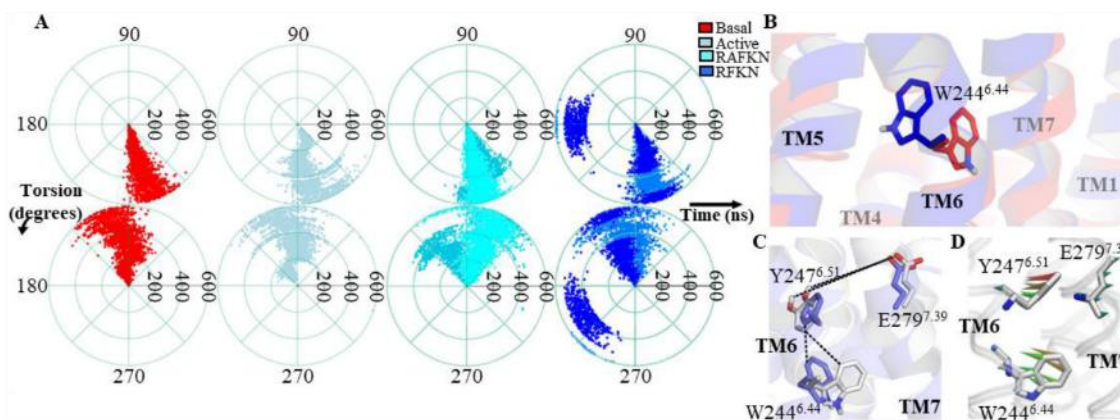


Fig. 5. The transmission switch represented with W244^{6.48} torsions. **A)** 2-D angular plots of the dihedral angles γ_1 (N-CA-CB-CG, top) and γ_2 (CA-CB-CG-CD1, bottom) showing the rotamer differences between the basal and active apo, and RAFKN and the RFKN systems. The tryptophan sidechain experiences a unique torsion in basal apo, but in active apo and RAFKN, with γ_1 profile very similar although at different times, whilst γ_2 in RAFKN locates at the 60° or 120° (showing two replicates), apart from the γ_2 in active apo. For RFKN, the activating-related torsion was reached within 380–550 ns in one replicate and at 600 ns in the second, with a symmetrical angle γ_2 with respect to RAFKN, of 220° approximately. **B)** Configurations of the sidechain in the basal apo (red) and active apo (blue) systems. **C)** Configuration of the pair Y247^{6.51} and E279^{7.39} with W244^{6.48}, and the approximation over the indole ring. The tyrosine residue is more capable to interact with the tryptophan when the interaction with glutamate is weak or null. **D)** Porcupine representation of the first principal mode (57.6% of the motion variance) of the three residues of active apo showing the evident coordinated motion of Y247^{6.51} and W244^{6.48} away from E279^{7.39}. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

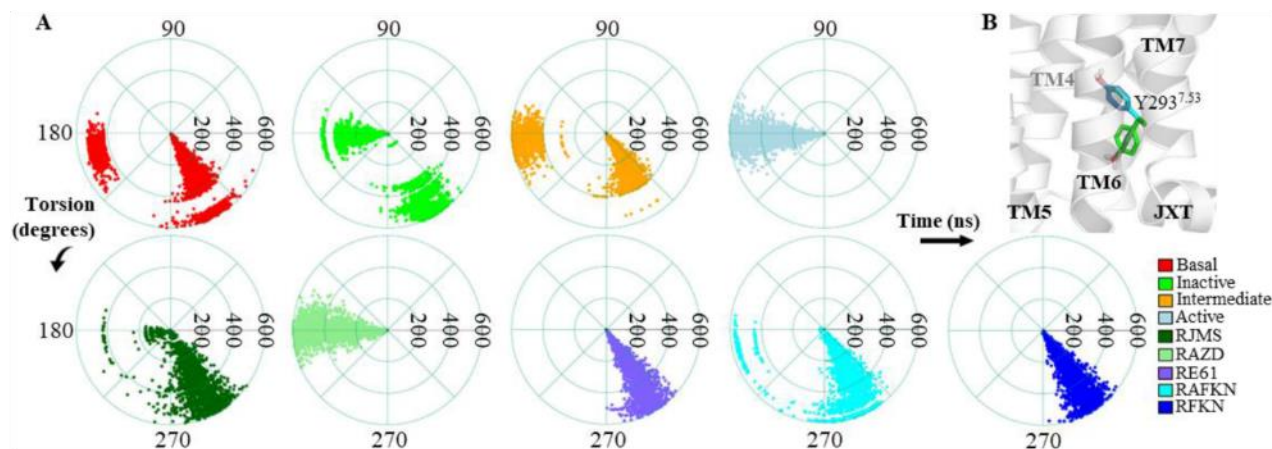


Fig. 6. Rotamers of the residue Y2937.53, the conserved residue of the NPXXY motif and an adjacent residue of the ionic lock region. **A)** Angular plots for the χ_1 dihedral for all systems. The basal, inactive, and intermediate apo systems showed variable rotations of (\pm)-antiperiplanar (down-oriented sidechain) to ($-$)-synclinal (up-oriented sidechain), but active apo only the latter configuration. For the ligand-CX3CR1 systems, is notable the difference for the allosteric system RAZD with (\pm)-antiperiplanar, and the RJMS and the agonized ones with ($-$)-synclinal configurations. **B)** The main rotamers of Y2937.53, where the upper-oriented (in blue color) sidechain is related but is not exclusive for the active systems and the lower-oriented (in green color) with the non-active systems. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

replicates I and III exhibit patterns distinct from those of inactivation. Based on these findings, we propose that the ligand may possess an additional activity on the receptor.

The ionic lock-associated region, a pentad of residues formed by D1263.49, R1273.50, Y2115.58 and K2316.35 along with Y2937.53 form some paired interactions. These detailed interactions are described in Figure S11.

d. Another noteworthy interaction is the saline bridge between the sidechains of K228^{6.32} and E298^{H8}, that keeps the IC side of TM6 closer to TM7 and H8. This latter interaction is capable to let the IC side of the receptor to remain closed or open, an important hallmark of the receptor functional state, since the open form can interact with

G proteins where Y293^{7.53} stabilizes the CT of $G\alpha$ protein [85,86]. Our findings regarding the K228^{6.32} and E298^{H8} interaction are detailed in Figure S12.

3.4. Increased water presence and water exchange in the GPCR pore is a key feature of the active systems

The GPCRs transmembrane region forms a water pore where either waters may form a continuous water flux or only have a defined hydrated region [83–85]. To analyze the water dynamics in the receptor, we quantify the number of water molecules inside the water pore. We counted the number of water molecules inside the water pore together with their relative z-axial position through the simulated time (Fig. 7).

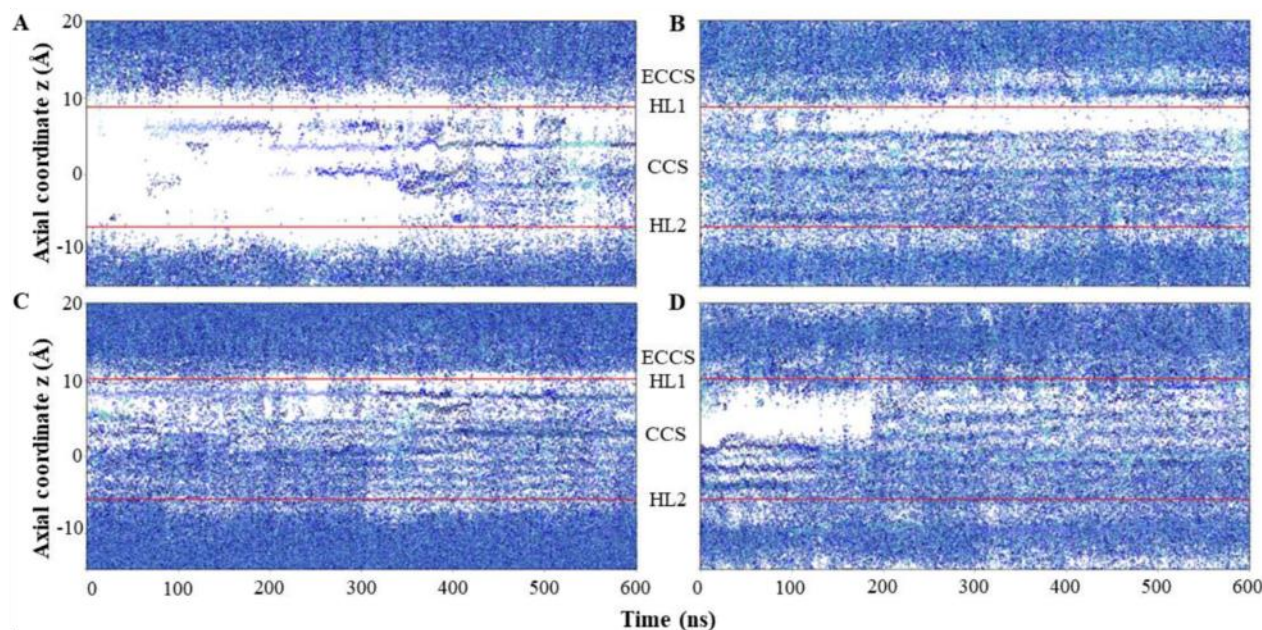


Fig. 7. Water dynamics for the apo-CX3CR1 systems, showing the presence of water molecules in the z-axial coordinate. In many cases the hydrophobic layer 1 (HL1) were visual evident as a non-hydrated region. The hydrophobic layer 2 (HL2) is disassembled or joined with HL1. **A)** basal, **B)** inactive, **C)** intermediate and **D)** active.

In the apo systems we were able to identify that, for the basal system, there is a large region at the central position of the pore that connected two hydrophobic layers and that are named HL1 and HL2 by several authors [84,85]. These hydrophobic regions are located below the cavity of the orthosteric site and up to the ionic lock zone respectively. The basal system had in average 331 water molecules inside the pore through the whole simulated time. At 250 ns of the simulation, a subtle structural change allowed the pass of a few water molecules that stay inside the pore. In the inactive system, the dry region is circumscriptive to HL1, and the number of water molecules through the simulation stayed low, 224 water molecules in average. For the intermediate system, the number of water molecules is comparable to the inactive system, 255 average, but the dry zones experience deformations. HL1 is detectable only for a few intervals, with a similar hydration pattern to the inactive. The active system shows an analogous water presence to inactive and intermediate, but it forms a continuous region of water molecules from 200 to 600 ns, with a count of water molecules more similar to the basal, 289 molecules, although with a higher water presence at the orthosteric-extracellular coordination site (ECCS), showing only a narrowing bottleneck but not obstructive dehydration of the aqueous pore at HL1. Whilst the intermediate system exhibits a slight dehydration, at about 300 ns, the active system shows a continuous water hydration through the pore.

In contrast, water analysis of the MD simulations of our ligand-receptor systems showed that their water dynamics are quite different (Fig. 8) compared to the apo systems. For the RJMS and RAZD systems, the hydrophobic layers 1 and 2 remain dehydrated, with only 93 and 94 average water molecules, as reported for non-active receptors [85]. Although our RE61 systems share many structural features with our intermediate systems, we found many differences in the water dynamic patterns. The ECCS and the intracellular coordination site (ICCS) are profusely hydrated, with a larger water bulk at the EC site than at the IC side that solvates the trivalent ionic E6130 molecule and almost disintegrates the HL1 zone. In the RAFKN and RFKN systems, the water path is continuous. Particularly, the latter system (with 110 average molecules) shows a high number of exchangeable water molecules represented by different blue colors in Fig. 8. This finding has been reported previously, the bottleneck pore shape narrows the pore at the HL2

region due to the Y2937.53, I2336.37, L2346.38 and M2075.54 interactions [83,85,88]. The opening of this bottleneck is led by the relative TM6 rotation and the Y2937.53 distinctive rotamer. Details are presented in Figure S113.

Within the more hydrated zones at the ECCS, we found at least three sites able to coordinate Na⁺ ions around the orthosteric site. In the basal and intermediate systems, we found a sodium cation solvated near to E2797.39 and adjacent to Y2476.51 (Figure S114), along with a water molecule network from the ECCS, through the transmission switch to the CCS where D772.50 locates. Several residues participate in this hydration cluster, such as S1163.39 and N2897.49, that interact in the RAZD system with the allosteric ligand. In the other hand, in the active apo system the coordination site of the cation was located at the orthosteric site itself, over the HL1 residues and with the formation of interactions with E2546.54 and R2727.32, some of the residues implicated in the chemokine contacts. In the RAZD system, the ECCS contains two coordination subsites, one with E2797.39 and another with the backbone of V1604.56, Q1644.60 and E1945.41. The Na⁺ presence in the cavity of the orthosteric site may exclude the binding of any ligand due to its interaction with E2797.39 and the water molecule network. Analogously with the binding of Na⁺ to D772.50 and the activation are mutually excluding events [84], the binding of another molecule to the orthosteric site must be capable to displace the ion(s) and disintegrate the water molecule network, in an comparable desolvation processes for both.

3.5. Collective motion patterns of the TM helices, particularly TM5 and TM6, characterize extensive displacements related to the activation

Different common features are shared within the proposed general functional classes in our simulated systems. We merged the different replicates of each system in a sole trajectory and performed a PCA analysis (Fig. 9). For the **inactive ensembles**, the main motion confirmed the bending of TM5 and TM6 with respect to the rest of the TM helices. The thickening of the TMD allows the formation of hydrophobic zones, such as HL1 and HL2, and the shortening of water bulks inside the pore. RJMS and RAZD systems experienced small global motions, its principal mode only represent 37.7% and 40.7% of the

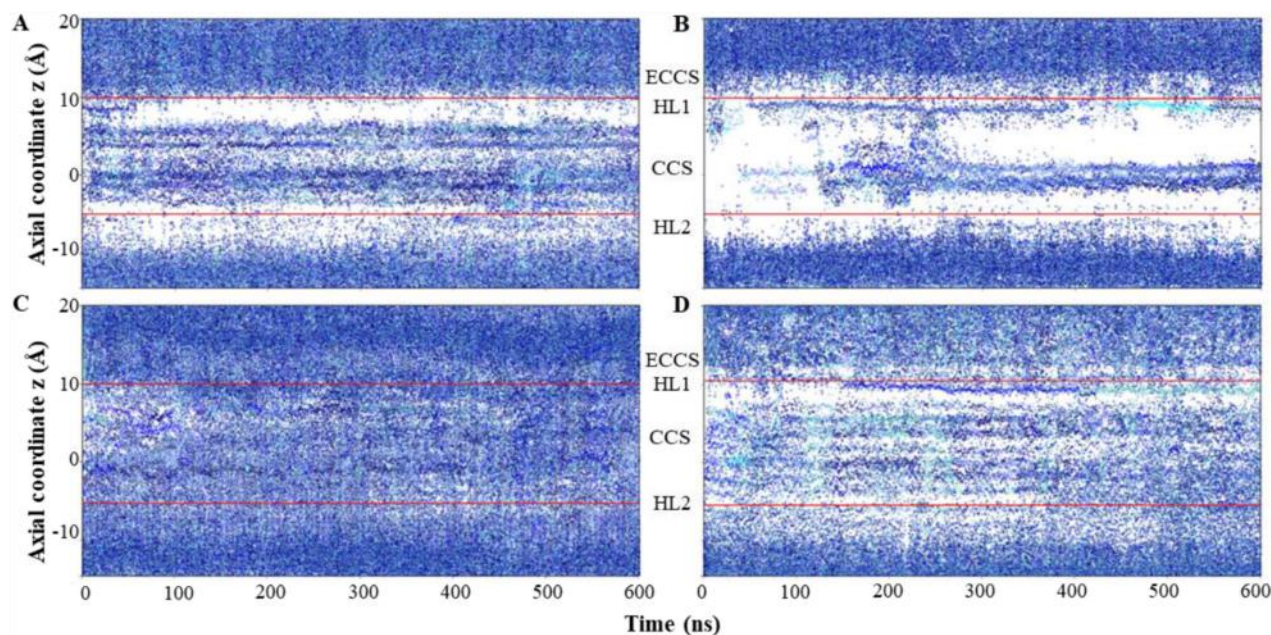


Fig. 8. Water dynamics of the ligand-receptor complexes for systems A) RJMS, B) RAZD, C) RE61, and D) RFKN.

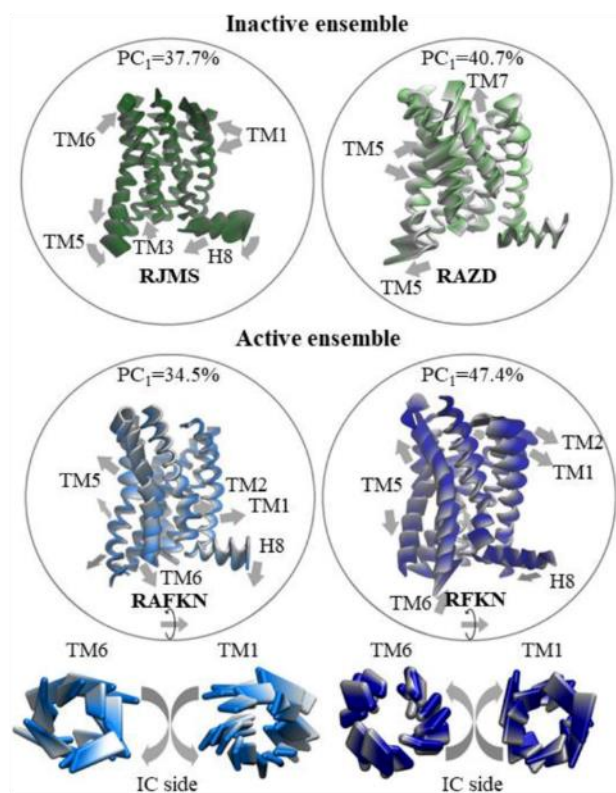


Fig. 9. Principal modes of CX3CR1 in the systems RJMS, RAZD, RAFKN and RFKN. The presented modes were calculated from a PCA analysis (the direction of the motion is represented in the color scale, from gray to green/blue). In the RJMS system, the first modes capture the motion of TM5 and the H8 helix. In RAZD, the main modes also capture the ascending of TM6, and TM7, and in the two non-active systems it is noticeable the bending of TM5. In the RAFKN system, the ascending TM6 and TM7, and the descending TM1. For the RFKN systems, it is noticeable a large displacement of TM5 and TM6 in opposite directions. For the two chemokine systems, the helices TM1 and TM6 experience anti-rotatory motions, in opposite direction in the RAFKN and RFKN at the IC side. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

motion variance. For the **active ensemble**, the first mode in the RAFKN system showed similar features to the activation mechanism of the receptor, such as the separation of the IC extreme of TM5 from the TM bundle and the up and down displacement of TM6 with respect the TMD. The RFKN system, showed similar motions to the prior system, however exhibited many displacements and re-ordering of the TMs mainchain, such as the descending of TM5, ascending of TM6 (both with respect to the TM bundle), as well as the opening of the EC interhelix section that resulted by the separation of TM1 and TM5 extremes. Additionally, a dynamic cross-correlation analysis was performed to identify the propagation of the conformational changes (see Figure S115-17 for details). With these findings, we conclude that the RFKN system through the replicates and the 2.6 μ s of total simulation reached an active state. And our RAFKN system showed many features of activation (Figures S114-16), that might constitute a biased activation.

4. Discussion

Employing MD simulations of multiple CX3CR1 systems we were able to characterize how different ligands interact with the CX3CR1 receptor at the orthosteric site, mainly through Y2476.51-E2797.39 amino acids. We were also able to describe atomistic features of the

GPCRs Class A activation: (1) rotation of the W2446.48 side chain of the transmission switch towards TM5, (2) disintegration of the adjacent HL1 that leads to an increased water flux dynamics through the pore, and (3) changes at the ionic lock-associated pentad, including Y2937.53.

Our apo simulated systems exhibited many characteristics of the different functional states, these systems served as a guidance to study receptor-ligand complexes and their identification in a functional class. Based on our findings, the ligand JMS172 in CX3CR1, showed a different profile compared to our AZD8797 system, a ligand with a well-documented blocker activity. It exerted extensive conformational changes in the receptor in two of three replicates, such as a TM inclination pattern similar to what we observed in the intermediate ensemble, extension in the H8 fold, a large bending in TM7, and also a distinctive binding mode.

The CX3CR1 simulations with the modulator E6130, showed the ability to induce conformational changes related to the transitive class, like the tilts in TM5 and TM6, and the large opening of the IC side of the TM bundle, particularly when its systems were compared to the intermediate apo system. Therefore, we conclude that E6130 has a partial or biased agonist activity on CX3CR1. Our CX3CR1 simulations with the ligand AZD8797 exhibited multiple changes in the receptor structure, similarly to what we expect for an antagonist behavior, despite its allosteric binding site. These changes are quite distinguishable from the active systems and agree with the available data for other antagonized GPCRs. Our CX3CR1 simulations in the presence of chemokine glycoforms of fractalkine, the aglycone and the G2S2 glycan, revealed the importance of the carbohydrate in the receptor, since the AFKN system showed incomplete activation features compared to the FKN system, in agreement to other GPCR activation studies. Nevertheless, the experimental incoming information for the CX3CR1-FKN axis will enlighten the importance of studying the CX3CR1 receptor, that is involved in multiple and complex physiological and pathological processes.

The complexity of the GPCRs dynamics makes its state structural classification a very difficult task. In this study we analyzed many conformational events of CX3CR1 to understand its molecular mechanism and activation process and contribute to the general knowledge of the complex GPCRs family.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

G. Goode-Romero (No. 749523/857743) is grateful to CONACyT for the fellowships granted and to the *Ciencia Básica* funding (A1-S-8866). The authors gratefully acknowledge the support of supercomputer facilities at Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de Información (LANCAD-UNAM-DGTIC-306).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2022.108278>.

References

- [1] A.D. Luster, Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation, *N. Engl. J. Med.* 338 (1998) 436–445.

- [2] J.F. Bazan, K.B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D.R. Greaves, A. Zlotnik, T.J. Schall, A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif, *Nature* 385 (1997) 640–644, <https://doi.org/10.1038/385640a0>.
- [3] L.S. Mizoue, J.F. Bazan, E.C. Johnson, T.M. Handel, Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1, *Biochemistry* 38 (1999) 1402–1414.
- [4] W.S. York, R. Mazumder, R. Ranzinger, N. Edwards, R. Khasay, K.F. Aoki-Kinoshita, M.P. Campbell, R.D. Cummings, T. Feizi, M. Martin, D.A. Natale, N. H. Packer, R.J. Woods, G. Agarwal, S. Arpinar, S. Bhat, J. Blake, L.J.G. Castro, B. Fochtman, J. Gildersleeve, R. Goldman, X. Holmes, V. Jain, S. Kulkarni, R. Mahadik, A. Mehta, R. Mousavi, S. Nakarokkumma, R. Navelkar, N. Pattabiraman, M.J. Pierce, K. Ross, P. Vasudev, J. Vora, T. Williamson, W. Zhang, GlyGen: computational and informatics resources for glycoscience, *Glycobiology* 30 (2020) 72–73, <https://doi.org/10.1093/glycob/cvz080>.
- [5] Y. Pan, C. Lloyd, H. Zhou, S. Dolich, J. Deeds, J.A. Gonzalo, J. Vath, M. Gosselin, J. Ma, B. Dussault, E. Woolf, G. Alperin, J. Culpepper, J.C. Gutierrez-Ramos, D. Gearing, Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation, *Nature* 387 (1997) 611–617, <https://doi.org/10.1038/42491>.
- [6] M. Fujita, Y.K. Takada, Y. Takada, Integrins $\alpha\beta3$ and $\alpha4\beta1$ act as coreceptors for fractalkine, and the integrin-binding defective mutant of fractalkine is an antagonist of CX3CR1, *J. Immunol.* 189 (2012) 5809–5819, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200889>.
- [7] M. Lee, Y. Lee, J. Song, J. Lee, S.-Y. Chang, Tissue-specific role of CX3CR1 expressing immune cells and their relationships with human disease, *Immune Netw* 18 (2018) e5.
- [8] C.S. Atwood, R.N. Martins, M.A. Smith, G. Perry, Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid- β peptide and associated proteins, *Peptides* 23 (2002) 1343–1350, [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(02\)00070-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(02)00070-0).
- [9] Z.-X. Xu, G.H. Kim, J.-W. Tan, A.E. Riso, Y. Sun, E.Y. Xu, G.-Y. Liao, H. Xu, S.-H. Lee, N.-Y. Do, C.H. Lee, A.E. Clipperton-Allen, S. Kwon, D.T. Page, K.J. Lee, B. Xu, Elevated protein synthesis in microglia causes autism-like synaptic and behavioral aberrations, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1797, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15530-3>.
- [10] G.T. Norris, J. Kipnis, Immune cells and CNS physiology: microglia and beyond, *J. Exp. Med.* 216 (2018) 60–70.
- [11] M. Bolós, M. Llorens-Martín, J.R. Perea, J. Jurado-Arjona, A. Rábano, J. Ávila, Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia, *Mol. Neurodegener.* 12 (2017).
- [12] A. López-López, E. Gelpi, D.M. Lopategui, J.M. Vidal-taboada, Association of the CX3CR1-V249I variant with neurofibrillary pathology progression in late-onset Alzheimer’s disease, *Mol. Neurobiol.* (2017), <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0489-3>.
- [13] K. Bhaskar, M. Konerth, O. Kokiko-Cochran, A. Cardona, R. Ransohoff, B. Lamb, Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor, *Neuron* 68 (2010) 19–31.
- [14] A.-L. Hemonnot-Girard, A.J. Valverde, J. Hua, C. Delaygue, N. Linck, T. Maurice, F. Rassendren, H. Hirbec, Analysis of CX3CR1 haploinsufficiency in male and female APP(swe)/PSEN1(dE9) mice along Alzheimer disease progression, *Brain Behav. Immun.* 91 (2021) 404–417, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.021>.
- [15] S.E. Hickman, E.K. Allison, U. Coleman, N.D. Kingery-Gallagher, J. El Khoury, Heterozygous CX3CR1 deficiency in microglia restores neuronal β -amyloid clearance pathways and slows progression of Alzheimer’s like-disease in PS1-APP mice, *Front. Immunol.* 10 (2019) 2780, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02780>.
- [16] B. Du, M. Liang, H. Zheng, C. Fan, H. Zhang, X. Lu, Z. Du, Y. Lian, Y. Zhang, X. Bi, Anti-mouse CX3CR1 antibody alleviates cognitive impairment, neuronal loss and myelin deficits in an animal model of brain ischemia, *Neuroscience* 438 (2020) 169–181, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.05.011>.
- [17] S.-H. Cho, B. Sun, Y. Zhou, T.M. Kauppinen, B. Halabisky, P. Wes, R.M. Ransohoff, L. Gan, CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 32713–32722, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.254268>.
- [18] C.M. Freria, J.C.E. Hall, P. Wei, Z. Guan, D.M. McTigue, P.G. Popovich, Deletion of the fractalkine receptor, CX3CR1, improves endogenous repair, axon sprouting and synaptogenesis after spinal cord injury in mice, *J. Neurosci.* 37 (2017) 3568–3587.
- [19] C. Guozhao, Z. Zhiping, S. Weiping, L. Wang, F. Yan, X. Yang, X. Qin, M. Wu, D. Li, S. Tian, G. Chen, A novel CX3CR1 inhibitor AZD8797 facilitates early recovery of rat acute spinal cord injury by inhibiting inflammation and apoptosis, *Int. J. Mol. Med.* 45 (2020) 1373–1384.
- [20] L.-P. Bernier, E.M. York, A. Kamyabi, H.B. Choi, N.L. Weillinger, B.A. MacVicar, Microglial metabolic flexibility supports immune surveillance of the brain parenchyma, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1559, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15267-z>.
- [21] H. Wakita, T. Yanagawa, Y. Kuboi, T. Imai, E6130, a novel CX3C chemokine receptor 1 (CX3CR1) modulator, attenuates mucosal inflammation and reduces CX3CR1(+) leukocyte trafficking in mice with colitis, *Mol. Pharmacol.* 92 (2017) 502–509, <https://doi.org/10.1124/mol.117.108381>.
- [22] A. Ridderstad Wollberg, A. Ericsson-Dahlstrand, A. Juréus, P. Ekerot, S. Simon, M. Nilsson, S.-J. Wiklund, A.-L. Berg, M. Fern, D. Sunnemark, R. Johansson, Pharmacological inhibition of the chemokine receptor CX3CR1 attenuates disease in a chronic-relapsing rat model for multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 5409–5414, <https://doi.org/10.1073/pnas.1316510111>.
- [23] A.D. Lucas, C. Bursill, T.J. Guzik, J. Sadowski, K.M. Channon, D.R. Greaves, Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1), *Circulation* 108 (2003) 2498–2504, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000097119.57756.EF>.
- [24] C. Li, J. He, X. Zhong, H. Gan, Y. Xia, CX3CL1/CX3CR1 Axis contributes to angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation and inflammatory cytokine production, *Inflammation* 41 (2018) 824–834, <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0736-4>.
- [25] H. Umehara, E.T. Bloom, T. Okazaki, N. Domae, T. Imai, Fractalkine and vascular injury, *Trends Immunol.* 22 (2001) 602–607.
- [26] A.K. Clark, A.A. Staniland, M. Malcangio, Fractalkine/CX3CR1 signalling in chronic pain and inflammation, *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.* 12 (2011) 1707–1714, <https://doi.org/10.2174/138920111798357465>.
- [27] C. Lehner, G. Spitzer, R. Gehwolf, A. Wagner, N. Weissenbacher, C. Deiningner, K. Emmanuel, F. Wichlas, H. Tempfer, A. Traeweger, Tenophages: a novel macrophage-like tendon cell population expressing CX3CL1 and CX3CR1, *Dis. Model. Mech.* 12 (2019), <https://doi.org/10.1242/dmm.041384>.
- [28] K. Hoshino-Negishi, M. Ohkuro, T. Nakatani, Y. Kuboi, M. Nishimura, Y. Ida, J. Kakuta, A. Hamaguchi, M. Kumai, T. Kamisako, F. Sugiyama, W. Ikeda, N. Ishii, N. Yasuda, T. Imai, Role of anti-fractalkine antibody in suppression of joint destruction by inhibiting migration of osteoclast precursors to the synovium in experimental arthritis, *Arthritis Rheumatol.* 71 (2019) 222–231, <https://doi.org/10.1002/art.40688>.
- [29] F. Becker, C. Holthoff, C. Anthoni, E. Rijcken, J.S. Alexander, F.N.E. Gavins, H. U. Spiegel, N. Senninger, T. Vowinkel, Downregulation of CX(3)CR1 ameliorates experimental colitis: evidence for CX(3)CL1-CX(3)CR1-mediated immune cell recruitment, *Int. J. Colorectal Dis.* 32 (2017) 315–324, <https://doi.org/10.1007/s00384-016-2735-y>.
- [30] M. Fernández-Prieto, M.J. Fernández-Aceñero, N. López-Palacios, A. Bodas, S. Ferraís, D. Cuevas, V. Pascual, M.A. Cerón-Nieto, S. Horta-Herrera, L. Espino-Paisán, I. Salazar, C. Núñez, CX3CL1-CX3CR1 Axis: a new player in coliac disease pathogenesis, *Nutrients* 11 (2019), <https://doi.org/10.3390/n11112551>.
- [31] J.S. Burg, J.R. Ingram, A.J. Venkatakrishnan, K.M. Jude, A. Dukkipati, E. N. Feinberg, A. Angelini, D. Waghay, R.O. Dror, H.L. Ploegh, K.C. Garcia, Structural Biology. Structural basis for chemokine recognition and activation of a viral G protein-coupled receptor, *Science* 347 (2015) 1113–1117.
- [32] M. Abayev, J.P.G.L.M. Rodrigues, G. Srivastava, B. Arshava, L. Jaremko, M. Jaremko, F. Naider, M. Levitt, J. Anglister, The solution structure of monomeric CCL5 in complex with a doubly sulfated N-terminal segment of CCR5, *FEBS J.* 285 (2018) 1988–2003.
- [33] K. Ishizuka, Y. Fujita, T. Kawabata, H. Kimura, Y. Iyayama, T. Inada, Y. Okahisa, J. Egawa, M. Usami, I. Kushima, Y. Uno, T. Okada, M. Ikeda, B. Aleksic, D. Mori, T. Someya, T. Yoshikawa, N. Iwata, H. Nakamura, T. Yamashita, N. Ozaki, Rare genetic variants in CX3CR1 and their contribution to the increased risk of schizophrenia and autism spectrum disorders, *Transl. Psychiatry* 7 (2017) e1184.
- [34] S.M. Cardona, S.V. Kim, K.A. Church, V.O. Torres, I.A. Cleary, A.S. Mendiola, R. P. Saville, S.S. Watowich, J. Parker-Thornburg, A. Soto-Ospina, P. Araque, R. M. Ransohoff, A.E. Cardona, Role of the fractalkine receptor in CNS autoimmune inflammation: new approach utilizing a mouse model expressing the human CX3CR1(I249/m280) variant, *Front. Cell. Neurosci.* 12 (2018) 365, <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00365>.
- [35] P.S.-H. Park, D.T. Lodowski, K. Palczewski, Activation of G-protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48 (2008) 107–141.
- [36] R.O. Dror, D.H. Arlow, D.W. Borhani, M.Ø. Jensen, S. Piana, D.E. Shaw, Identification of two distinct inactive conformations of the β 2-adrenergic receptor reconciles structural and biochemical observations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 4689–4694.
- [37] B.K. Kobilka, X. Deupi, Conformational complexity of G-protein-coupled receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 28 (2007) 397–406, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.06.003>.
- [38] R. Alhadef, I. Vorobyov, H. Yoon, A. Warshel, Exploring the free-energy landscape of GPCR activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115 (2018), 201810316, <https://doi.org/10.1073/pnas.1810316115>.
- [39] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinf.* 9 (2008) 1–8, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>.
- [40] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Søding, J.D. Thompson, D.G. Higgins, Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011), <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- [41] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105–132, [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0).
- [42] P. Rice, I. Longden, A. Bleasby, EMBOSS: the European molecular biology open software suite, *Trends Genet.* 16 (2000) 276–277, [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(00\)02024-2](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02024-2).
- [43] D. Eisenberg, R.M. Weiss, T.C. Terwilliger, The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix, *Nature* 299 (1982) 371–374, <https://doi.org/10.1038/299371a0>.
- [44] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291, <https://doi.org/10.1107/s0021889902009944>.
- [45] A. Bateman, M.J. Martin, C. O’Donovan, M. Magrane, E. Alpi, R. Antunes, B. Bely, M. Bingley, C. Bonilla, R. Britto, B. Bursteinas, H. Bye-Ajeer, A. Cowley, A. Da Silva, M. De Giorgi, T. Dogan, F. Fazzini, L.G. Castro, L. Figueira, P. Garmiri, G. Georghiou, D. Gonzalez, E. Hatton-Ellis, W. Li, W. Liu, R. Lopez, J. Luo, Y. Lussi, A. MacDougall, A. Nightingale, B. Palka, K. Pichler, D. Poggioli, S. Pundir,

- L. Pureza, G. Qi, S. Rosanoff, R. Saidi, T. Sawford, A. Shypitsyna, E. Speretta, E. Turner, N. Tyagi, V. Volynkin, T. Wardell, K. Warner, X. Watkins, R. Zaru, H. Zellner, I. Xenarios, L. Bougueleret, A. Bridge, S. Poux, N. Redaschi, L. Aimo, G. ArgoudPuy, A. Auchincloss, K. Axelsen, P. Bansal, D. Baratin, M.C. Blatter, B. Boeckmann, J. Bolleman, E. Boutet, L. Breuza, C. Casal-Casas, E. De Castro, E. Coudert, B. Cuhe, M. Doche, D. Dornevil, S. Duvaud, A. Estreicher, L. Famiglietti, M. Feuermann, E. Gasteiger, S. Gehant, V. Gerritsen, A. Gos, N. Gruaz-Gumowski, U. Hinz, C. Hulo, F. Jungo, G. Keller, V. Lara, P. Lemercier, D. Lieberherr, T. Lombardot, X. Martin, P. Masson, A. Morgat, T. Neto, N. Noupikel, S. Paesano, I. Pedruzzi, S. Pilbout, M. Pizzati, M. Pruess, C. Rivoire, B. Roechert, M. Schneider, C. Sigrist, K. Sonesson, S. Staehli, A. Stutz, S. Sundaram, M. Tognoli, L. Verbruggen, A.L. Veuthy, C.H. Wu, C.N. Arighi, L. Arminski, C. Chen, Y. Chen, J.S. Garavelli, H. Huang, K. Laiho, P. McGarvey, D.A. Natale, K. Ross, C.R. Vinayaka, Q. Wang, Y. Wang, L.S. Yeh, J. Zhang, UniProt: the universal protein knowledgebase, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) D158–D169, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1099>.
- [46] V. Isberg, S. Mordalski, C. Munk, K. Rataj, K. Harpsøe, A.S. Hauser, B. Vroiling, A. J. Bojarski, G. Vriend, E. Gloriam, GPCRdb : an information system for G protein-coupled receptors, *Nucleic Acids Res.* 44 (2017) 356–364, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1178>.
- [47] A. Fatatis, J.M. Salvino, O. Meucci, W.L. Jamieson, WO 2012/078633 a2, 2012.
- [48] F. Shen, Y. Zhang, D.L. Jernigan, X. Feng, J. Yan, F.U. Garcia, O. Meucci, J. M. Salvino, A. Fatatis, Novel small-molecule CX3CR1 antagonist impairs metastatic seeding and colonization of breast cancer cells, *Mol. Cancer Res.* 14 (2016) 518–527, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0013>.
- [49] S. Karlström, G. Nordvall, D. Sohn, A. Hettman, D. Turek, K. Åhlin, A. Kers, M. Claesson, C. Slivo, Y. Lo-Alfredsson, C. Petersson, G. Bessidskaia, P.H. Svensson, T. Rein, E. Jerning, Å. Malmberg, C. Ahlgen, C. Ray, L. Vares, V. Ivanov, R. Johansson, Substituted 7-Amino-5-thio-thiazolo[4,5-d]pyrimidines as potent and selective antagonists of the fractalkine receptor (CX3CR1), *J. Med. Chem.* 56 (2013) 3177–3190, <https://doi.org/10.1021/jm3012273>.
- [50] L. Cederblad, B. Rosengren, E. Ryberg, N.-O. Hermansson, AZD8797 is an allosteric non-competitive modulator of the human CX3CR1 receptor, *Biochem. J.* 473 (2016) 641–649.
- [51] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P.E. Bourne, The protein data bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235–242.
- [52] Q. Tan, Y. Zhu, J. Li, Z. Chen, G.W. Han, I. Kufareva, T. Li, L. Ma, G. Fenalti, J. Li, W. Zhang, X. Xie, H. Yang, H. Jiang, V. Cherezov, H. Liu, R.C. Stevens, Q. Zhao, B. Wu, Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex, *Science* 341 (2013) 1387–1390.
- [53] P. Peng, H. Chen, Y. Zhu, Z. Wang, J. Li, R.H. Luo, J. Wang, L. Chen, L.M. Yang, H. Jiang, X. Hie, B. Wu, Y.T. Zheng, H. Liu, Structure-based design of 1-heteroaryl-1,3-propanediamine derivatives as a novel series of CC-chemokine receptor 5 antagonists, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 9621–9636.
- [54] G.M. Morris, D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, A. J. Olson, Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 16 (2009) 2785–2791.
- [55] S. Jo, W. Im, Glycan fragment database: a database of PDB-based glycan 3D structures, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) D470–D474, <https://doi.org/10.1093/nar/gks987>.
- [56] Y. Hu, P. Shah, D.J. Clark, M. Ao, H. Zhang, Reanalysis of global proteomic and phosphoproteomic data identified a large number of glycopeptides, *Anal. Chem.* 90 (2018) 8065–8071, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01137>.
- [57] M.A. Lomize, A.L. Lomize, I.D. Pogozheva, H.I. Mosberg, OPM: orientations of proteins in membranes database, *Bioinformatics* 22 (2006) 623–625, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk023>.
- [58] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926–935, <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- [59] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, W. Im, CHARMM-GUI : a web-based graphical user interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* 29 (2008) 1859–1865, <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- [60] J. Lee, X. Cheng, J.M. Swails, M.S. Yeom, P.K. Eastman, J.A. Lemkul, S. Wei, J. Buckner, J.C. Jeong, Y. Qi, S. Jo, J.B. Klaue, G. Widmalm, W. Im, CHARMM-GUI Input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM and CHARMM/ OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field, *J. Chem. Theor. Comput.* 12 (2016) 405–413.
- [61] J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki, T. Ran, M. Feig, B.L. de Groot, H. Grubmüller, A.D. MacKerell, CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins, *Nat. Methods* 14 (2017) 71–73, <https://doi.org/10.1038/nmeth.4067>.
- [62] D.G. Cornwell, R.E. Heikkilä, R.S. Bar, G.L. Biagi, Red blood cell lipids and the plasma membrane, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45 (1968) 297–304, <https://doi.org/10.1007/BF02667099>.
- [63] M. Abraham, B. Hess, D. van der Spoel, E. Lindahl, Gromacs 5.0.7. www.Gromacs.Org, 2015, <https://doi.org/10.1007/SpringerReference.28001>.
- [64] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 8577–8593, <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- [65] B. Hess, P-LINCS: a parallel linear constraint solver for molecular simulation, *J. Chem. Theor. Comput.* 4 (2008) 116–122, <https://doi.org/10.1021/ct700200b>.
- [66] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.* 126 (2007), 14101, <https://doi.org/10.1063/1.2408420>.
- [67] M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method, *J. Appl. Phys.* 52 (1981) 7182–7190, <https://doi.org/10.1063/1.328693>.
- [68] S. Raschka, V. Mirjalili, Working with unlabeled data - clustering analysis, in: *Python Mach. Learn., Second*, Packt Publishing, Birmingham, 2017, pp. 347–378.
- [69] T. Bin Masood, S. Sandhya, N. Chandra, V. Natarajan, CHEXVIS: a tool for molecular channel extraction and visualization, *BMC Bioinform.* 16 (2015) 119, <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0545-9>.
- [70] R. Gowers, M. Linke, J. Barnoud, T. Reddy, M. Melo, S. Seyler, J. Domański, K. Dotson, S. Buchoux, I. Kenney, O. Beckstein, MDAAnalysis: a Python package for the rapid analysis of molecular dynamics simulations, *Proc. 15th Python Sci. Conf.* (2016) 98–105, <https://doi.org/10.25080/majora-629e541a-00e>.
- [71] R Core Team, R: a language and environment for statistical computing, *Computing* 1 (2006), [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[3097:CFHIWS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[3097:CFHIWS]2.0.CO;2).
- [72] B.J. Grant, A.P. Rodrigues, K.M. ElSawy, J.A. McCammon, L.S. Cavas, Bio3D: an R package for the comparative analysis of protein structures, *Bioinformatics* 22 (2006) 2695–2696.
- [73] L. Schrödinger, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.2.1, 2015.
- [74] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD – visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38.
- [75] M. Molecular, Design Ltd, ISIS/draw. <https://books.google.com.mx/books?id=kIXFvwEACAAJ>, 1993.
- [76] J. Junper, R. Evans, A. Pritzal, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Zidek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodensteiner, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature* 596 (2021) 583–589, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- [77] T. UniProt Consortium, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) D480–D489, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.
- [78] P.M. Dijkman, J.C. Muñoz-García, S.R. Lavington, P.S. Kumagai, R.I. Dos Reis, D. Yin, P.J. Stansfeld, A.J. Costa-Filho, A. Watts, Conformational dynamics of a G protein-coupled receptor helix 8 in lipid membranes, *Sci. Adv.* 6 (2020), eaav8207, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav8207>.
- [79] J.A. Ballesteros, H. Weinstein, Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors, in: S.C. Sealfon (Ed.), *Methods Neurosci*, Academic Press, 1995, pp. 366–428, 25.
- [80] J. Bemister-Buffington, A.J. Wolf, S. Raschka, L.A. Kuhn, Machine learning to identify flexibility signatures of class A GPCR inhibition, *bioRxiv* (2020), <https://doi.org/10.1101/2020.03.10.986612>, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.
- [81] D.J. Scholten, M. Canals, D. Maussang, L. Roumen, M.J. Smit, M. Wijtmans, C. de Graaf, H.F. Vischer, R. Leurs, Pharmacological modulation of chemokine receptor function, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 1617–1643.
- [82] X. An, Q. Bai, Z. Bing, S. Zhou, D. Shi, H. Liu, X. Yao, How does agonist and antagonist binding lead to different conformational ensemble equilibria of the κ -opioid receptor: insight from long-time Gaussian accelerated molecular dynamics simulation, *ACS Chem. Neurosci.* 10 (2018) 1575–1584.
- [83] Y. Lee, S. Kim, S. Choi, C. Hyeon, Ultraslow water-mediated transmembrane interactions regulate the activation of A2A adenosine receptor, *Biophys. J.* 111 (2016) 1180–1191.
- [84] W. Liu, E. Chun, A.A. Thompson, P. Chubukov, F. Xu, V. Katritch, G.W. Han, C. B. Roth, L.H. Heitman, A.P. IJzerman, V. Cherezov, R.C. Stevens, Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions, *Science* 337 (2012) 232–236.
- [85] S. Yuan, S. Filipek, K. Palczewski, H. Vogel, Activation of G-protein coupled receptors correlates with the formation of a continuous internal water pathway, *Nat. Commun.* 5 (2014) 1–10.
- [86] A.J. Venkatakrisnan, X. Deupi, G. Lebon, C.G. Tate, G.F. Schertler, M.M. Babu, Molecular signatures of G-protein-coupled receptors, *Nature* 494 (2013) 185–194, <https://doi.org/10.1038/nature11896>.
- [87] B. Trzaskowski, D. Latek, S. Yuan, U. Ghoshdastider, A. Debinski, S. Filipek, Action of molecular switches in GPCRs - theoretical and experimental studies, *Curr. Med. Chem.* 19 (2010) 1090–1109.
- [88] R. Nygaard, Y. Zou, R.O. Dror, T.J. Mildorf, D.H. Arlow, A. Manglik, A.C. Pan, C. W. Liu, J.J. Fung, M.P. Bokoch, F.S. Thian, T.S. Kobilka, D.E. Shaw, L. Mueller, R. S. Prosser, B.K. Kobilka, The dynamic process of β_2 -adrenergic receptor activation, *Cell* 152 (2013) 532–542, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.008>.



OPEN New information of dopaminergic agents based on quantum chemistry calculations

Guillermo Goode-Romero^{1✉}, Ulrika Winnberg², Laura Domínguez¹, Ilich A. Ibarra³, Rubicelia Vargas⁴, Elisabeth Winnberg⁵ & Ana Martínez^{6✉}

Dopamine is an important neurotransmitter that plays a key role in a wide range of both locomotive and cognitive functions in humans. Disturbances on the dopaminergic system cause, among others, psychosis, Parkinson's disease and Huntington's disease. Antipsychotics are drugs that interact primarily with the dopamine receptors and are thus important for the control of psychosis and related disorders. These drugs function as agonists or antagonists and are classified as such in the literature. However, there is still much to learn about the underlying mechanism of action of these drugs. The goal of this investigation is to analyze the intrinsic chemical reactivity, more specifically, the electron donor–acceptor capacity of 217 molecules used as dopaminergic substances, particularly focusing on drugs used to treat psychosis. We analyzed 86 molecules categorized as agonists and 131 molecules classified as antagonists, applying Density Functional Theory calculations. Results show that most of the agonists are electron donors, as is dopamine, whereas most of the antagonists are electron acceptors. Therefore, a new characterization based on the electron transfer capacity is proposed in this study. This new classification can guide the clinical decision-making process based on the physiopathological knowledge of the dopaminergic diseases.

During the second half of the last century, a movement referred to as the third revolution in psychiatry emerged, directly related to the development of new antipsychotic drugs for the treatment of psychosis. Treatment of psychosis has evolved with the development of antipsychotic drugs. The dopamine hypothesis, which defines the physiological mechanism of schizophrenia (a type of psychosis) postulates that this is derived from a primary imbalance in the dopaminergic system^{1–44}. Currently, there are at least eleven different types of dopaminergic drugs for the control of psychotic symptoms. To date, all drugs with antipsychotic efficacy show some affinity and activity at the D2 subtype of the dopamine receptor³⁶.

Research focusing on new antipsychotics has led to greater knowledge on their biochemical effects; however, the physiological mechanism of action underlying their pharmacological therapy still requires explanation. For the most part, antipsychotics can be classified as antagonists or agonists, according to their functionality. Antagonist drugs are those that bind to receptors, in this case dopamine receptors and block them, while agonist drugs are those that interact with the receptors, thereby activating them. An agonist produces a conformational change in the dopamine receptors (coupled to a G-protein) that turns on the synthesis of a second messenger. Antagonists also produce a conformational change in the receptor but without change in signal transduction.

Experimentally, drugs are classified as either agonists or antagonists based on complex behavioral analysis, as well as rotational experiments with rats^{25,38,39}. In addition to agonist–antagonist classification, antipsychotics

¹Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior SN, Ciudad Universitaria, CP 04510 Ciudad de México, CDMX, Mexico. ²Departamento Académico de Ingeniería Industrial y Operaciones, Instituto Tecnológico Autónomo de México, Río, Hondo 1, Altavista, Álvaro Obregón, CP 01080 Ciudad de México, CDMX, Mexico. ³Laboratorio de Físicoquímica y Reactividad de Superficies (LaFReS), Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior SN, Ciudad Universitaria, CP 04510 Ciudad de México, CDMX, Mexico. ⁴Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, AP Postal 55-534, CP 09340 Ciudad de México, CDMX, Mexico. ⁵Department of Health Care Sciences, Ersta Sköndal Bräcke University College, Stigbergsgatan 30, 116 28 Stockholm, Sweden. ⁶Departamento de Materiales de Baja Dimensionalidad, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior SN, Ciudad Universitaria, CP 04510 Ciudad de México, CDMX, Mexico. ✉email: guillermo_david_goode@comunidad.unam.mx; martina@unam.mx

5OH-DPAT	Bifeprunox	Dihydroergocryptine	Lisuride	Quinpirole
6Br-APB	(R)-Boldine	Dihydroergotamine	Mesulergine	RDS127
7OH-DPAT	(S)-Boldine	Dinapsoline	Methylphenidate	RO105824
7OH-PIPAT	Blonanserin	Ergocornine	Minaprine	Ropinirole
8OH-DPAT	Brexpirazole	α -Ergocryptine	(R)-Nuciferine	Rotigotine
A412997	Brasofensine	β -Ergocryptine	OSU6162	SKF38393
A77636	Brilaroxazine	α -Ergosine	PD128907	SKF77434
A86929	Bromocryptine	β -Ergosine	PD168077	SKF81297
ACP104	(R)-Bulbocapnine	Ergometrine	Pergolide	SKF82958
Alentemol	(S)-Bulbocapnine	Ergotamine	PF216061	SKF83959
(S)-Amphetamine	Cabergoline	Epicryptine	PF592379	SKF89145
Aplindore	Cariprazine	Fenoldopam	Pardoprunox	Stepholidine
(R)-Apomorphine	Chanoclavine I	Flibanserin	Piribedil	Sumanitrole
(S)-Apomorphine	<i>cis</i> 8-OH-PBZI	(R)-Glauicine	Pramipexole	Talipexole
(R)-Aporphine	Dihydrxidine	(S)-Glauicine	(R)-Pukateine	Trepipam
(S)-Aporphine	Dihydroergocornine	Hordenine	Quinagolide	Vilazodone
Aripiprazole	Dihydroergocristine	Lergotriple	Quinelorane	Zelandopam
Bicifadine				

Table 1. Conventional classification of dopaminergic agents that are agonists reported in alphabetical order.

have been classified according to having affinity for more than one receptor subtype, leading to first and second-generation of antipsychotics⁴⁰.

Previous reports^{45–47} have used quantum chemistry calculations to help describe the pharmacodynamics of antipsychotic drugs, relating biological activity to chemical reactivity indices, such as chemical hardness and first ionization energy. There is also a comparative study of 32 oral antipsychotics used for treatment of schizophrenia (3 partial agonists and 29 antagonists) recently published⁴⁸. Authors report specific aspects for the antipsychotics such as efficacy, quality of life and side effects. They conclude that, because so many antipsychotics options are available, this analysis should help to find the most suitable drug for each patient. They also found efficacy differences between molecules, but drugs differ more in their side effects than in the effectiveness. It is clear that more research is needed to explain the psychopharmacodynamic effect these drugs have.

In spite of all existing research on dopaminergic agents, to date, very little empirical and theoretical data exist to elucidate mechanisms of action. Based on the idea that all molecules have chemical properties that can be described in terms of response functions related to chemical reactivity, the principal aim of this investigation is to examine 86 molecules classified as agonists and 131 molecules classified as antagonists (Tables 1, 2) by applying Density Functional Theory (DFT) calculations. We analyzed electron transfer capacity as a response function, because it can be related to the pharmacodynamics of the molecules that control electrochemical signaling in cells, a function which is imbalanced during e.g. psychosis, Parkinson's disease and Huntington's disease. The aim of the study is to explore the intrinsic properties of D2 ligands without the receptor, in an effort to predict some of their inherent characteristics prior to any biological interactions. We hypothesize that the dichotomy behavior of electron donation or acceptance provides an interesting and more precise way to classify ligands than the conventional agonist/antagonist biological profile.

Results

The hypothesis underlying our investigation is that agonist molecules have electron transfer properties similar to those of dopamine; whereas antagonists of dopamine have a different capacity to transfer charge. At molecular level, this may explain why antagonists bind to the receptors without activating them.

DAM of all studied compounds. We calculated the electrodonating and electroaccepting powers (ω^- and ω^+) of the endogenous neurotransmitter dopamine and the related compounds dopexamine, epinine, etilevodopa, ibopamine, levodopa and melevodopa, as well as dopaminergic ligands and closely related substances (86 agonists and 131 antagonists) in order to analyze their electron transfer properties. Dopamine and related compounds are calculated in order to compare their electron transfer properties with that of the pharmaceuticals studied (Table 3). The results are described in Fig. 1, where we present the DAM of all ligands including the neurotransmitter group. Black squares represent so-called agonists, whereas white squares represent antagonists (see Tables 1, 2). Evidently, there is no clear difference between these two and it is apparent that there are many exceptions to our hypothesis. There are several agonists that are not as good electron donors as dopamine and contrarily, there are many antagonists that have similar electron donor properties to dopamine.

Family I of compounds. Analyzing the information available concerning the characteristics of these drugs, it turns out that certain molecules are neither exclusively agonists nor exclusively antagonists of D2 dopamine (complete list of references are given in Supplementary Information). They bind to multiple receptors or they are used as antidepressants, or they can act as either agonists and/or antagonists, depending on dosage. In order

Abaperidone	Cisapride	Imipramine	Olanzapine	Sertindole
Aceperone	Clebopride	Itopride	Paliperidone	Setoperone
Acepromazine	Cloroperone	Lenperone	Pentipamine	S142907
Acetophenazine	Clotiapine	Levomepromazine	Perphenazine	SCH23390
Alizapride	Clozapine	Lodiperone	Perospirone	Spiperone
Amiperone	Cyclindole	Loxapine	Pimavanserin	Spiroaxtrine
Amisulpride	Declenperone	Lumateperone	Pimethixene	Sulpride
Amoxapine	Desipramine	Lurasidone	Pimozide	Tefluthizol
Aptazapine	Diethazine	Mafoprazine	Pipamperone	Tenilapine
Asenapine	Dixyrazine	Mazapertine	Pipothiazine	Tetrabenazine
Azabuperone	Domperidone	Melperone	Prideperone	Thiethylperazine
Azaperone	Dothiepin	Mequitazine	Primaperone	Thioridazine
Batanopride	Droperidol	Mesoridazine	Proclorperazine	Thiothixene
Benperidol	Ecopipam	Metoclopramide	Promethazine	Tiapride
Biriperone	Enciprazine	Metopimazine	Propiomazine	Timiperone
BL1020	Etoperidone	Metrenperone	Propyperone	Tiospirone
Bromopride	Fananserin	Mindoperone	Quetiapine	Trifluoperazine
Bromperidol	Flucindole	Mirtazapine	Raclopride	Trifluoperidol
Buspirone	Fluphenazine	Molindone	Remoxipride	UH232
Carperone	Flumezapine	Moperone	Renzapride	Veralipride
Carphenazine	Flupenthixol	Mosapride	Rilapine	Yohimbine
Chlorpromazine	Fluperlapine	Nafadotride	Risperidone	Zacopride
Chlorprothixene	Gevotroline	Nemonapride	Roxindole	Zetidoline
Cicarperone	Haloperidol	Nonaperone	Roxoperone	Zicronapine
Cinitapride	Homopipramol	Nortriptyline	Sarizotan	Ziprasidone
Cinuperone	Iloperidone	Ocaperidone	Seridopidine	Zoloperone
				Zuclopenthixol

Table 2. Conventional classification of dopaminergic agents that are antagonists, reported in alphabetical order.

Name	ω^+	ω^-	Notes
Dopamine	0.87	4.23	Endogenous agonist at dopamine receptor subtypes D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ and D ₅ receptors
Dopexamine	0.86	4.20	D ₂ full agonist
Epinine	0.87	4.23	Dopaminergic agonist
Etilevodopa	4.50	1.03	Prodrug of dopamine
Ibopamine	5.24	1.23	Prodrug of dopamine
Levodopa	0.70	3.96	Precursor of dopamine
Melevodopa	1.12	4.75	Prodrug of dopamine

Table 3. Data of neurotransmitter dopamine and related compounds are reported.

to analyze these results more carefully, we divided the system into two new families. Family I consists of those dopamine receptor ligands that can be easily characterized as either agonists or antagonists, and mainly bind to the D₂ receptor of dopamine. In this family, there are 54 molecules classified as agonists and 88 molecules classified as antagonists. The DAM of Family I is reported in Fig. 2 and evidently the ordering is impressive. Apparently, these agonists have values of ω^+ that are lower or equal to 1.5 and the antagonists of this family have values of ω^+ higher than 1.5. All agonists are close to dopamine and the neurotransmitter group, and they are also better electron donors than the antagonists. Antagonists are good electron acceptors in contrast to dopamine, which is a good electron donor. Taking this set of molecules, we can conclude that agonists have similar electron transfer capacity to dopamine, whereas antagonists differ from dopamine in this sense.

Family II of compounds. Family II comprises 76 molecules that are reported as “partial” or “weak” agonists or antagonists, and some of them present binding affinity for multiple receptors. Regardless of whether they are reported as “weak” or “partial” agonists/antagonists, these molecules were included in the conventional classification of agonists/antagonists with antiparkinsonian or antipsychotic effects. Family II form a group that is heterogeneous, with molecules that have affinity for multiple receptors and they are also weak or partial agonists or antagonists. They do not present selectivity to dopamine receptors.

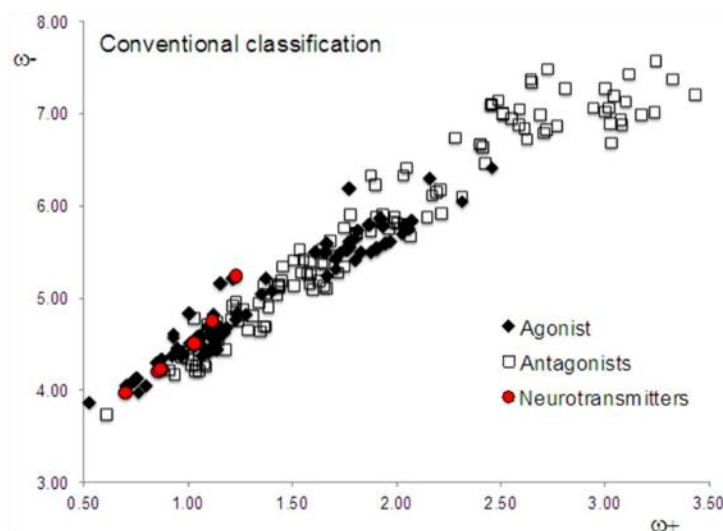


Figure 1. DAM of all the studied compounds. Neurotransmitters are a reference group that includes dopamine and derivatives of dopamine with pharmacological related activity.

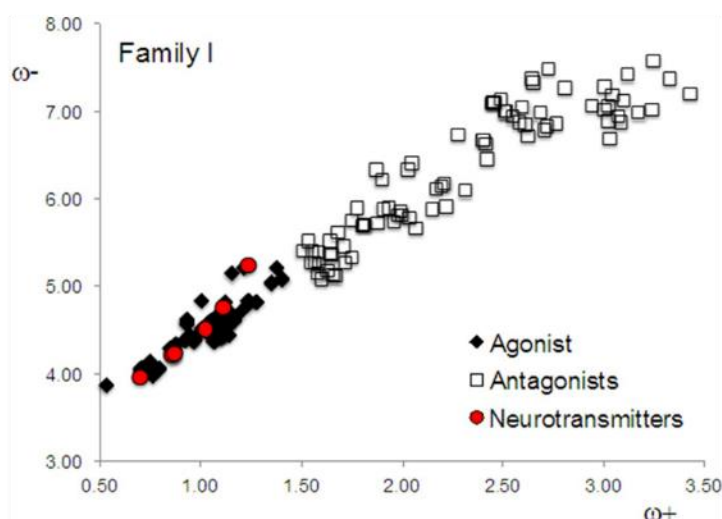


Figure 2. DAM of Family I.

The DAM of Family II is included in Fig. 3. Surprisingly, the tendency is inverted, *i.e.* antagonists have similar electron donor properties to dopamine, whereas agonists have different electron donor properties. It is important to emphasize that previously reported experimental data concerning the reactivity of these molecules is either imprecise or indicates that these molecules bind to multiple receptors. The inverse association found in Family II is difficult to explain, but may be an indication of the complications related to the experimental classification of these drugs. The inherent uncertainty associated with the *ex vivo* or *in vivo* experiments is a non-parametric entity that is composed of at least two levels of contributions: the supramolecular and the organellar-cellular. The supramolecular contribution of that uncertainty is related to the lack of abstraction, or “isolation”, of the modeled system being studied (*i.e.*, interference from other proteins that interact with the receptor, presence of some ligands, significant changes to membrane composition, etcetera). The organellar-cellular contribution of this uncertainty is a “background-noise-like” factor, related to variation in the post-translational modifications of proteins, assimilation of the response signals by several cellular components, termination of these signals by natural mechanisms, among others.

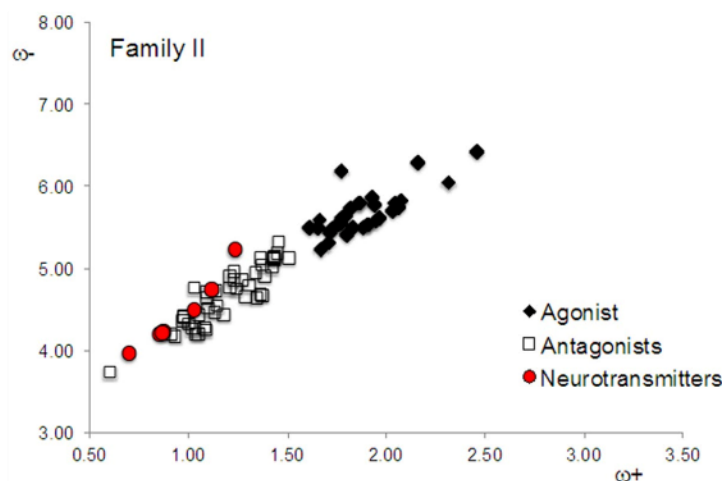


Figure 3. DAM of Family II.

Discussion

Importantly, behavioral experiments undertaken with rats manifest a degree of ambiguity, inherent to the complexity of biological systems and also to the evaluation and interpretation of data. This degree of ambiguity is not present in quantum chemistry calculations. The hypothesis here is that drugs with electron-transfer properties similar to neurotransmitters will also manifest similar action mechanisms. We thus report new information about the electron donor–acceptor properties of the molecules. This new information is presented in Tables 4 and 5 with specific order. The dopamine receptor ligands with ω^+ values below or equal to 1.5 are electron donors and those with ω^+ values greater than 1.5 are electron acceptors. This new information generated the DAM reported in Fig. 4. We also included neurotransmitter-related molecules that constitute good electron donors (Table 3). The value of 1.5 for ω^+ is arbitrary, but this number emerges when we consider experimental information related to the characterization of agonists and antagonists. Within this range, experimental information concurs with theoretical values because all adequately characterized agonists present ω^+ values that are less or equal to 1.5, and all adequately characterized antagonists manifest values that exceed a ω^+ value of 1.5. This enabled us to classify the molecules with reference to reported experimental and theoretical information.

One purpose of antipsychotic treatment is to minimize schizophrenia symptoms, which are caused by a deep imbalance in the dopaminergic system. Reported physiological mechanisms of schizophrenia demonstrate an excess of dopamine activity (direct or indirect) in certain regions of the brain, and little dopamine activity in other regions. We use our information to postulate that electron donors could be useful for modulating schizophrenia symptoms related to little dopamine activity as well as Parkinson's disease and electron acceptors may be useful for controlling psychosis associated with an excess of dopamine activity as well as Huntington's disease. Our findings indicate that electron acceptors bind to dopamine receptors and block or inactivate them. Contrarily, agonists interact and donate electrons, thus activating the receptor in a similar way to dopamine.

The drugs reported here were classified in the literature as agonists or antagonists. Additionally, electrochemical signaling in cells is an essential process in humans, indicating that electron transfer may be related to the functionality of the molecules that control psychosis. Our results agree with this theory and thus, it is in accordance with the currently believed molecular action mechanism of these drugs. Therefore, we corroborate previously reported postulations with quantum chemistry calculations, and also propose new information for this group of antipsychotic drugs.

The main idea of this investigation was to compare intrinsic properties (electron donor–acceptor) between the drugs and neurotransmitters. These intrinsic properties of the molecules are not always in agreement with the conventional classification of agonists and antagonists, specifically for those molecules of Family II that are classified experimentally as “partial” or “weak” agonists/antagonists. The new information reported in this study permits us to define these molecules as “similar to” or “different from” the neurotransmitters.

The design of drugs for specific treatments is very demanding. After chemical synthesis and all characterizations have been accomplished, it is necessary to carry out biological tests on the drugs to determine their efficacy, and also in this specific case to define whether they are conventional agonists or antagonists of dopamine or other neurotransmitters. There are many dopaminergic agents available, which vary in terms of effectiveness and side effects, and no single treatment works for all patients. When it is necessary to change medications for specific patients, it is no easy task to decide which medication will help control symptoms. The perception that emerges from this dilemma is that along with the experimental determinations and biological tests, it is possible to do quantum chemical calculations on the molecules in order to obtain more information about their inherent reactivity and susceptibility for binding to receptors. All this information together, including the comparison of these intrinsic chemical properties, should help medical doctors define the most suitable medication for each individual patient.

Name	ω^+	ω^-	Mechanism of action
5-OH-DPAT	0.74	4.10	D ₂ and D ₃ receptor full agonist
6-Br-APB	1.05	4.58	D ₁ full agonist
7-OH-DPAT	1.03	4.52	Selective D ₃ full agonist
7-OH-PIPAT	1.04	4.53	Selective D ₃ full agonist
A-412997	1.38	5.20	Selective D ₄ full agonist
A-77636	0.75	4.12	Selective D ₁ full agonist
A-86929	1.16	4.63	D ₁ , D ₂ and D ₃ full agonist
Amfetamine	1.00	4.82	Dopaminergic stimulant, agonist-binding
Aplindore	1.07	4.47	Partial D ₂ agonist
Aptazapine	1.00	4.33	Dopamine antagonist
Aripiprazole	1.03	4.48	D ₂ partial agonist
Asenapine	1.03	4.77	D ₁ , D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
Batanopride	1.34	4.95	D ₂ antagonist
BL-1020	1.38	4.68	D ₂ antagonist
Blonanserin	1.28	4.81	D ₂ and D ₃ antagonist
Brasofensine	1.21	5.2	Antidepressant
Bilaroxazine	1.19	4.67	D ₂ , D ₃ and D ₄ partial agonist
Bromopride	1.45	5.18	D ₂ antagonist
Cabergoline	1.12	4.46	D ₁ and D ₃ full agonist and D ₂ , D ₃ and D ₄ partial agonist
Cariprazine	1.24	4.83	D ₂ and D ₃ partial agonist
Chanoclavine I	1.11	4.43	Dopamine agonist
Chlorpromazine	1.37	4.69	D ₁ , D ₂ , D ₃ and D ₅ antagonist
<i>cis</i> -8-OH-PBZI	1.05	4.57	D ₃ selective full agonist
Cyclindole	1.02	4.27	D ₂ antagonist
Desipramine	1.09	4.64	Antidepressant
Diethazine	1.18	4.44	Dopamine antagonist
Dihydroexidine	1.17	4.62	D ₁ and D ₂ agonist
Dihydroergocornine	1.10	4.43	D ₁ and D ₂ antagonist
Dihydroergocristine	1.11	4.43	Dopamine partial agonist
Dihydroergocryptine	1.11	4.45	D ₂ full agonist and D ₁ and D ₃ partial agonist
Dihydroergotamine	1.12	4.45	Dopaminergic ligand
Dinapsoline	1.11	4.62	Selective D ₅ full agonist
Dixyrazine	1.04	4.26	Dopamine antagonist
Dosulepin	1.43	5.02	Antidepressant
Ecopipam	1.21	4.91	D ₁ and D ₃ antagonist
Enciprazine	0.61	3.73	Antipsychotic and anxiolytic
Epicriptine	1.09	4.41	D ₂ full agonist and D ₁ and D ₃ partial agonist
Etoperidone	1.14	4.73	Weak dopamine antagonist
Fenoldopam	1.14	4.71	Selective D ₁ and D ₅ full agonist
Flibanserin	1.40	5.08	Selective D ₄ partial agonist
Flucindole	1.10	4.51	D ₂ antagonist
Gevotroline	1.24	4.75	D ₂ antagonist
Hordenine	0.71	4.05	D ₂ agonist
Imipramine	0.94	4.17	Antidepressant
Lergotril	1.14	4.55	Dopamine agonist
Levomepromazine	1.09	4.25	D ₂ antagonist
Lodiperone	1.43	5.12	Dopamine antagonist
Mafoprazine	0.97	4.35	D ₂ antagonist
Mazapertine	1.51	5.12	D ₂ antagonist
Mequitazine	1.08	4.27	Dopamine antagonist
Mesulergine	1.14	4.44	D ₂ partial agonist
Methylphenidate	1.15	5.15	D ₂ ligand
Metoclopramide	1.27	4.86	D ₂ antagonist
Mirtazapine	1.31	4.80	Dopamine antagonist
Nortriptyline	1.37	5.13	Antidepressant
Pardoprunox	0.95	4.44	D ₂ and D ₃ partial agonist
Continued			

Name	ω^+	ω^-	Mechanism of action
PD-128,907	1.23	4.76	An experimental, selective D ₂ and D ₃ agonist
Perfenazine	1.29	4.65	D ₂ antagonist
Pergolide	1.07	4.37	Dopaminergic full agonist
PF-219061	1.12	4.82	Selective D ₃ agonist
PF-592379	1.35	5.04	Selective D ₃ agonist
Pimozide	0.98	4.41	D ₂ and D ₃ antagonist
Pramipexole	0.77	3.97	D ₂ , D ₃ and D ₄ full agonist
Prochlorperazine	1.35	4.63	D ₁ and D ₂ antagonist
Promethazine	1.14	4.47	Dopamine antagonist
Quinagolide	0.88	4.32	D ₁ and D ₂ full agonist
Quinpirole	0.53	3.87	D ₂ and D ₃ full agonist
RDS-127	0.92	4.38	Selective D ₂ agonist
Remoxipride	1.46	5.33	D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
Ropinrole	1.09	4.68	D ₂ , D ₃ and D ₄ agonist
Rotigotine	0.71	4.04	D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ and D ₅ agonist
S-14297	1.05	4.44	Dopamine antagonist
SCH-23390	1.23	4.96	Selective D ₁ and D ₃ antagonist
Sertindole	1.39	4.90	D ₂ antagonist
SKF-38393	1.10	4.58	D ₁ and D ₃ partial agonist
SKF-77434	0.97	4.38	D ₁ partial agonist
SKF-81297	1.12	4.69	D ₁ full agonist
SKF-82958	1.05	4.58	A D ₁ full agonist
SKF-83959	1.06	4.59	D ₁ full agonist
SKF-89145	1.14	4.67	Selective D ₁ agonist
Spiroxitrine	0.92	4.21	Dopamine antagonist
Stepholidine	0.97	4.37	Dopamine antagonist
Sumanitrole	1.01	4.50	Selective D ₂ full agonist
Talipexole	0.80	4.04	D ₂ , D ₃ and D ₄ full agonist
Thiethylperazine	1.05	4.20	D ₁ , D ₂ and D ₄ antagonist
Thioridazine	1.03	4.20	D ₁ and D ₂ antagonist
Trepipam	0.93	4.61	D ₁ agonist
Yohimbine	1.14	4.54	D ₂ and D ₃ antagonist
Zelandopam	0.97	4.41	A selective D ₁ agonist
Zetidoline	1.09	4.71	D ₂ antagonist
Zoloperone	1.44	5.11	Very weak dopamine antagonist

Table 4. Pharmaceuticals with electron donor properties ($\omega^+ < 1.5$) similar to dopamine and related neurotransmitters, presented in alphabetical order.

Notably, in this analysis we do not include dopamine receptors in the form of G-Protein-Coupled Receptors (GPCRs). This is because the principal aim of this investigation was to report information of the dopaminergic agents based on theoretical Density Functional Theory response functions, related to the electron transfer process. Previously⁴⁵ it was reported that drugs are like light bulbs and receptors (GPCR proteins) resemble the sockets of a light bulb. Certain light bulb characteristics are independent of the sockets (for example, light bulbs can have different colors or voltage); in the same way that electron transfer properties of dopaminergic agents are independent of the receptors. This analogy is helpful in explaining the relevance of this information. All of these dopaminergic agents, ordered according to this new information, are reported in Tables 3 and 4. We also include Table 1S as supporting information with all the information reported until now about these drugs. We hope this information will be useful for better and rational treatment of psychosis.

Conclusions

In this study, new information of 217 antipsychotics is presented based on the theoretical response functions related to the electron transfer process. In order to bind to dopamine receptors and inactivate them, molecules should be electron acceptors. Contrarily, agonists donate electrons and activate them, as dopamine does.

As reported previously, clinical use of these drugs is based on their classification as agonists or antagonists, and many times these classifications (based on experiments with animals) is not precise and is insufficient. For this reason, we hope that this new and more rational information will be functional as a guide in the clinical use of the drugs, improving treatment of psychosis, Parkinson's disease and Huntington's disease. This research

Name	ω^+	ω^-	Mechanism of action
Abaperidone	2.55	6.94	D ₂ antagonist
Aceperone	2.51	6.99	Dopamine antagonist
Acepromazine	3.17	6.97	Dopamine antagonist
Acetophenazine	3.24	7.00	D ₁ and D ₂ antagonist
Alentemol	1.83	5.49	Selective D _{2S} agonist
Alizapride	2.59	6.87	D ₂ antagonist
Amiperone	2.60	7.04	Dopamine antagonist
Amisulpride	1.56	5.41	D _{2S} , D _{2L} and D ₃ antagonist
Amoxapine	2.21	6.17	D ₁ and D ₂ antagonist
Apomorphine	1.77	5.55	D ₁ and D ₂ full agonist
Aporphine	1.86	5.79	D ₁ and D ₂ antagonist
Azabuperone	3.12	7.42	Dopamine antagonist
Azaperone	3.04	7.19	Dopamine antagonist
Benperidol	2.71	6.78	D ₂ antagonist
Bifeprunox	1.66	5.50	Weak D ₂ partial agonist
Biriperone	3.08	6.93	Dopamine antagonist
Boldine	1.71	5.31	Dopamine antagonist
Brexiprazole	2.32	6.03	D ₂ partial agonist
Bromocryptine	2.04	5.79	D ₁ , D ₂ , D ₃ and D ₅ agonist and D ₄ antagonist
Bromperidol	2.51	6.99	Dopamine antagonist
Bulbocapnine	1.73	5.47	Dopamine antagonist
Buspirone	1.75	5.75	Weak D ₂ antagonist
Carperone	2.64	7.37	Dopamine antagonist
Carphenazine	3.09	6.87	D ₁ , D ₂ and D ₅ antagonist
Chlorprothixene	1.96	5.74	D ₁ , D ₂ , D ₃ antagonist
Cicarperone	2.73	7.48	Dopamine antagonist
Cinuperone	2.31	6.09	D ₂ antagonist
Cloroperone	2.65	7.33	Dopamine antagonist
Clotiapine	1.99	5.86	Dopamine antagonist
Clozapine	2.04	5.79	D ₁ , D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
Declenperone	2.77	6.86	Dopamine antagonist
Droperidol	2.72	6.82	D ₂ antagonist
Ergocornine	2.03	5.69	Dopamine agonist
α -Ergocryptine	1.97	5.61	Dopamine agonist
β -Ergocryptine	1.88	5.49	Dopamine agonist
Ergometrine	1.95	5.58	Dopamine agonist
α -Ergosine	1.90	5.53	Dopamine agonist
β -Ergosine	1.91	5.53	Dopamine agonist
Ergotamine	2.06	5.74	Dopamine agonist
Fananserin	2.94	7.06	D ₄ antagonist
Flufenazine	1.67	5.11	D ₁ and D ₂ antagonist
Flumezapine	1.75	5.33	Dopamine agonist
Flupenthixol	1.99	5.81	D ₁ and D ₂ , antagonist
Fluperlapine	1.71	5.45	Dopamine antagonist
Glaucine	1.8	5.64	D ₁ and D ₅ antagonist
Haloperidol	2.51	6.99	D ₁ and D ₂ antagonist and a D ₃ and D ₄ inverse agonist
Homopipramol	5.87	2.15	Antidepressant with some antipsychotic effects
Iloperidone	2.40	6.66	Dopamine antagonist
Lenperone	2.49	7.14	Dopamine antagonist
Lisuride	1.80	5.40	D ₂ , D ₃ and D ₄ full agonist, and D ₁ and D ₅ antagonist
Loxapine	2.20	6.14	D ₁ and D ₂ antagonist
Lumateperone	3.03	6.68	D _{2S} and D _{2L} partial agonist
Lurasidone	1.81	5.69	D ₂ antagonist
Melperone	2.46	7.10	D ₂ antagonist
Mesoridazine	1.63	5.17	D ₂ antagonist
Metopimazine	2.22	5.90	Dopamine antagonist
Continued			

Name	ω^+	ω^-	Mechanism of action
Metrenperone	2.63	6.72	Dopamine antagonist
Minaprine	1.93	5.85	D ₁ and D ₂ agonist
Moperone	2.81	7.26	A D ₂ antagonist
Nafadotride	3.01	7.27	D ₃ and D ₂ antagonist
Nemonapride	1.59	5.25	D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
Nonaperone	2.45	7.09	Dopamine antagonist
Norclozapine	2.08	5.83	Dopamine antagonist
Nuciferine	1.82	5.72	Dopamine weak antagonist
Ocaperidone	2.43	6.45	Dopamine antagonist
Olanzapine	1.72	5.27	D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ and D ₅ antagonist
OSU-6162	1.77	6.19	D ₂ partial agonist
Paliperidone	1.78	5.89	D ₁ , D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
PD-168,077	2.16	6.28	Selective D ₁ full agonist
Pentiapine	1.68	5.61	Dopamine antagonist
Perospirone	1.81	5.70	D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
Pimethixene	1.65	5.36	Dopamine antagonist
Pipamperone	2.62	6.83	D ₄ and D ₂ antagonist
Pipotiazine	2.07	5.65	D ₁ and D ₂ antagonist
Piribedil	1.77	5.61	D ₂ and D ₃ agonist
Prideperone	2.03	6.33	Dopamine antagonist
Primaperone	2.46	7.10	Dopamine antagonist
Propiomazine	3.03	6.88	Dopamine antagonist
Propyperone	3.33	7.37	Dopamine antagonist
Pukateine	1.76	5.52	Dopamine antagonist
Quetiapine	1.88	5.72	D ₁ and D ₂ antagonist
Quinelorane	1.66	5.58	D ₂ and D ₃ agonist
Raclopride	2.40	6.66	D ₂ and D ₃ antagonist
Rilapine	3.02	7.06	Dopamine antagonist
Risperidone	1.54	5.51	D ₁ , D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
Ro10-5824	1.61	5.49	Selective D ₄ partial agonist
Roxindole	1.6	5.09	D _{2s} , D ₃ and D ₄ antagonist
Roxoperone	2.45	7.09	Dopamine antagonist
Sarizotan	1.94	5.89	D ₂ antagonist
Setoperone	2.69	6.98	Dopamine antagonist
Spiperone	3.00	7.01	D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
Sulpiride	2.05	6.40	D ₂ and D ₃ antagonist
Tefluthixol	1.59	5.39	Dopamine antagonist
Tenilapine	3.25	7.57	Dopamine antagonist
Tetrabenazine	1.65	5.52	D ₂ ligand
Thiothixene	2.18	6.10	D ₁ and D ₂ antagonist
Tiapride	1.90	6.22	D ₂ and D ₃ and D ₄ antagonist
Timiperone	3.10	7.12	Dopamine antagonist
Tiospirone	1.81	5.70	Dopamine antagonist
Trifluoperazine	1.66	5.12	D ₂ antagonist
Trifluoperidol	2.46	7.10	D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
UH-232	1.91	5.88	D ₂ antagonist and D ₃ partial agonist
Veralipride	2.28	6.73	Dopamine antagonist
Vilazodone	2.46	6.41	D ₂ weak agonist
Ziprasidone	1.81	5.70	D ₂ , D ₃ and D ₄ antagonist
Zuclopenthixol	2.00	5.81	D ₁ , D ₂ and D ₃ antagonist

Table 5. Pharmaceuticals with electron acceptor properties ($\omega^+ > 1.5$), presented in alphabetical order.

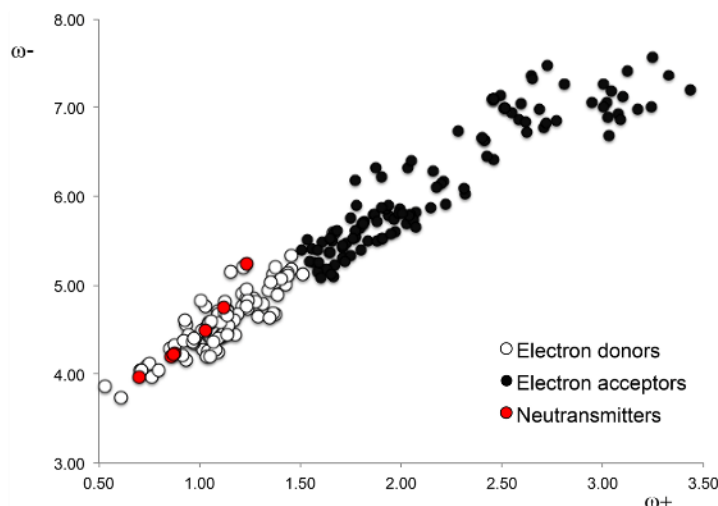


Figure 4. DAM of all compounds considering the information of Tables 4 and 5.

provides new information concerning intrinsic properties of dopaminergic agents, which may be apt for their classification, once affinities for other receptors and biological effects have been taken into account.

Methods

From the databases UniProt⁵⁰, DrugBank 5.0⁵¹, Guide to Pharmacology⁵² and Inxight: Drugs⁵³ pharmaceuticals with dopamine receptor affinity used as antipsychotics were selected for this study, particularly focusing on drugs used to treat psychosis. In total 217 (86 molecules categorized as agonists and 131 molecules classified as antagonists) compounds (Tables 1, 2) were selected and analyzed applying Density Functional Theory (DFT) calculations.

Gaussian09 was used for all electronic calculations⁵⁴. Initial structures were taken from PubChem⁵⁵ when available or several initial structures were used for the optimization. Geometry optimizations without symmetry constraints were implemented at M06/6–311+G(2d,p) level of theory^{56–59}, while applying the continuum solvation model density (SMD) with water, in order to mimic a polar environment⁶⁰. M06 is one of the hybrid exchange correlation functional designed for main group thermochemistry. This functional has 27% of exact exchange; for the systems studied in this investigation higher percent is not required. Since negative ions are calculated, a triple- ζ basis set was used with diffuse and polarized functions. Harmonic analyses were calculated to verify local minima (zero imaginary frequencies). We considered protonated states of all drugs following the available experimental evidence. All molecular data of the optimized structures are available on request.

The response functions that we used in this investigation are the electro-donating (ω^-) and electro-accepting (ω^+) powers, previously reported by Gázquez et al.^{61,62}. These authors defined the propensity to donate charge or ω^- (1) as follows:

$$\omega^- = (3I + A)^2 / 16(I - A) \quad (1)$$

whereas the propensity to accept charge or ω^+ (2) is defined as

$$\omega^+ = (I + 3A)^2 / 16(I - A) \quad (2)$$

I and A are vertical ionization energy and vertical electron affinity, respectively. Note that in ω^- the ionization energy has a higher weight in the equation and in ω^+ electron affinity, which is in accordance with chemical intuition. Lower values of ω^- imply greater capacity for donating charge. Higher values of ω^+ imply greater capacity for accepting charge. In contrast to I and A , ω^- and ω^+ refer to charge transfers, not necessarily from one electron. This definition is based on a simple charge transfer model expressed in terms of chemical potential and hardness. The Donor–Acceptor Map previously defined⁴⁹ is a useful graphical tool that has been used successfully in many different chemical systems^{63–65}. We have plotted ω^- and ω^+ (Fig. 5) on this map, enabling us to classify substances as either electron donors or acceptors. Electrons are transferred from good donor systems (down to the left of the map) to good electron acceptor systems (up to the right of the map). In order to analyze electron-donor acceptor properties, vertical ionization energy (I) and vertical electron affinity (A) were obtained from single point calculations of the corresponding cationic and anionic molecules, using the optimized structure of the neutrals. The same level of theory was used for all computations.

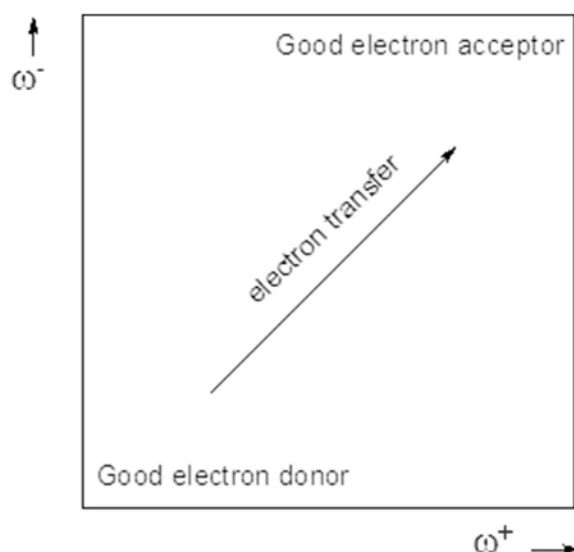


Figure 5. Donor-acceptor map (DAM).

Received: 27 August 2020; Accepted: 18 November 2020

Published online: 09 December 2020

References

- Perala, J. *et al.* Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch. Gen. Psychiatry* **64**, 19–28 (2007).
- American-Psychiatric-Association, D. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (American Psychiatric Association, Philadelphia, 2013).
- Volk, D. W. D. A. *Lewis In Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease* (Academic Press, Cambridge, 2015).
- Konopaske, G. T. & Coyle, J. T. Schizophrenia. In *Neurobiology of Brain Disorders* (eds Zigmond, M. J. *et al.*) 639–654 (Academic Press, Cambridge, 2015).
- Fröhlich, F. *Network Neuroscience* (Academic Press, Cambridge, 2016).
- Zielasek, J. & Gaebel, W. Schizophrenia. In *International Encyclopedia of Social & Behavioral Sciences* (ed. Wright, J. D.) 9–15 (Elsevier, Amsterdam, 2015).
- Hosak, I. & Hosakova, J. The complex etiology of schizophrenia—general state of the art. *Neuroendocrinol. Lett.* **36**, 631–637 (2015).
- Rădulescu, A. A multi-etiology model of systemic degeneration in schizophrenia. *J. Theor. Biol.* **259**, 269–279 (2009).
- Walter, E., Kestler, L., Bollini, A. & Hochman, K. M. SCHIZOPHRENIA: etiology and course. *Annu. Rev. Psychol.* **55**, 401–430 (2004).
- Dean, B. Neurochemistry of schizophrenia: the contribution of neuroimaging postmortem pathology and neurochemistry in Schizophrenia. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 2375–2392 (2012).
- Li, P., Snyder, G. L. & Vanover, K. E. Dopamine targeting drugs for the treatment of schizophrenia: past, present and future. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**, 3385–3403 (2016).
- Wickelgren, I. A new route to treating schizophrenia?. *Science (80-)* **281**, 1264–1265 (1998).
- Marino, M. J., Knutsen, L. J. & Williams, M. Emerging opportunities for antipsychotic drug discovery in the postgenomic era. *J. Med. Chem.* **51**, 1077–1107 (2008).
- Forray, C. & Buller, R. Challenges and opportunities for the development of new antipsychotic drugs. *Biochem. Pharmacol.* **143**, 10–24 (2017).
- Delay, J., Deniker, P. & Harl, J. M. Therapeutic method derived from hiberno-therapy in excitation and agitation states. *Ann. Med. Psychol. (Paris)* **110**, 267–273 (1952).
- Chauhan, A., Mittal, A. & Arora, P. K. Atypical antipsychotics from scratch to the present. *Int. J. Pharm. Sci.* **4**, 184–204 (2013).
- Potkin, S. G. *et al.* Aripiprazole, an antipsychotic with a novel mechanism of action, and risperidone vs placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* **60**, 681–690 (2003).
- Burriss, K. D. *et al.* Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 381–389 (2002).
- Mauri, M. C. *et al.* Clinical pharmacology of atypical antipsychotics: an update. *Exp. Clin. Sci. Int. Online J. Adv. Sci.* **13**, 1163–1191 (2014).
- Kapur, S. & Seeman, P. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am. J. Psychiatry* **158**, 360–369 (2001).
- Geddes, J., Freemantle, N., Harrison, P. & Bebbington, P. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia: systematic overview and meta-regression analysis. *Br. Med. J.* **321**, 1371–1376 (2000).
- Ananth, J., Burgoyne, K. S., Gadasalli, R. & Aquino, S. How do the atypical antipsychotics work?. *J. Psychiatry Neurosci.* **26**, 385–394 (2001).
- Seeman, P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can. J. Psychiatry* **47**, 27–38 (2002).
- Horacek, J. *et al.* Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia. *CNS Drugs* **20**, 389–409 (2006).
- Miyamoto, S., Duncan, G. E., Marx, C. E. & Lieberman, J. A. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol. Psychiatry* **10**, 79–104 (2005).

26. Stahl, S. M. Drugs for psychosis and mood: unique actions at D3, D2, and D1 dopamine receptor subtypes. *CNS Spectr.* **22**, 375–384 (2017).
27. Stepnicki, P., Kondej, M. & Kaczor, A. Current concepts and treatments of schizophrenia. *Molecules* **23**, 2087 (2018).
28. Laborit, H., Huguenard, P. & Aullaume, R. Un nouveau stabilisateur végétatif (le 4560 R.P.). *Le Press Médicale* **60**, 206–208 (1952).
29. López-Muñoz, F. *et al.* History of the discovery and clinical introduction of chlorpromazine. *Ann. Clin. Psychiatry* **17**, 113–135 (2005).
30. Mitchell, P. Chlorpromazine turns forty. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* **27**, 370–373 (1993).
31. Rosenbloom, M. Chlorpromazine and the psychopharmacologic revolution. *J. Am. Med. Assoc.* **287**, 1860–1861 (2002).
32. Boyd-Kimball, D. *et al.* Classics in chemical neuroscience: chlorpromazine. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 79–88 (2019).
33. Meltzer, H. Y., Bastani, B., Ramirez, L. & Matsubara, S. Clozapine: new research on efficacy and mechanism of action. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **238**, 332–339 (1989).
34. Wenthur, C. J. & Lindsley, C. W. Classics in chemical neuroscience: clozapine. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 1018–1025 (2013).
35. Seeman, P. Clozapine, a fast-off-D2 antipsychotic. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 24–29 (2014).
36. Chopko, T. C. & Lindsley, C. W. Classics in chemical neuroscience: risperidone. *ACS Chem. Neurosci.* **9**, 1520–1529 (2018).
37. Tyler, M. W., Zaldivar-Diez, J. & Haggarty, S. J. Classics in chemical neuroscience: ketamine. *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 444–453 (2017).
38. Robinson, T. E. Behavioral sensitization: characterization of enduring changes in rotational behavior produced by intermittent injections of amphetamine in male and female rats. *Psychopharmacology* **84**, 466–475 (1984).
39. Robinson, T. E. & Becker, J. B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res.* **396**, 157–198 (1986).
40. Herrera-Marschitz, M. Effect of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 on rotational behaviour induced by apomorphine and pergolide in 6-hydroxy-dopamine denervated rats. *Eur. J. Pharmacol.* **109**, 349–354 (1985).
41. Carlsson, A. Thirty years of dopamine research. *Adv. Neurol.* **60**, 1–10 (1993).
42. Stahl, S. M. & Shayegan, D. K. The psychopharmacology of ziprasidone: receptor-binding properties and real-world psychiatric practice. *J. Clin. Psychiatry* **64**, 6–12 (2003).
43. Edwards, A. C., Bacanu, S.-A., Bigdeli, T. B., Moscati, A. & Kendler, K. S. Evaluating the dopamine hypothesis of schizophrenia in a large-scale genome-wide association study. *Schizophr. Res.* **176**, 136–140 (2016).
44. Mailman, R. B. & Gay, E. A. Novel mechanisms of drug action: functional selectivity at D2 dopamine receptors. *Med. Chem. Res.* **13**, 115–126 (2004).
45. Martínez, A., Ibarra, I. A. & Vargas, R. A quantum chemical approach representing a new perspective concerning agonist and antagonist drugs in the context of schizophrenia and Parkinson's disease. *PLoS ONE* **14**, e0224691 (2019).
46. Martínez, A. & Vargas, R. A component of the puzzle, when attempting to understand antipsychotics: a theoretical study of chemical reactivity indexes. *J. Pharmacol. Pharm. Res.* **1**, 1–8 (2018).
47. Martínez, A. Dopamine antagonists for the treatment of drug addiction: PF-4363467 and related compounds. *Eur. J. Chem.* **11**, 84–90 (2020).
48. Huhn, M. *et al.* Comparative efficacy and tolerability of 32 oral antipsychotics for the acute treatment of adults with multi-episode schizophrenia: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet* **394**, 939–951 (2019).
49. Martínez, A., Rodríguez-Gironés, M. A., Barbosa, A. & Costas, M. Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *J. Phys. Chem. A* **112**, 9037–9042 (2008).
50. Bateman, A. *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **45**, D158–D169 (2017).
51. Wishart, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1074–D1082 (2018).
52. Harding, S. D. *et al.* The IUPHAR/BPS guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY. *Nucleic Acids Res.* **46**, D1091–D1106 (2018).
53. NCATS. NCATS Creates Drug Development Data Portal. *National Center for Advancing* (2020).
54. Frisch, M. J. *et al.* Gaussian 09, Revision A.08. (2009).
55. Kim, S. *et al.* PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res.* **44**, D1202–D1213 (2016).
56. Petersson, G. A. *et al.* A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. *J. Chem. Phys.* **89**, 2193–2218 (1988).
57. Petersson, G. A. & Al-Laham, M. A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. *J. Chem. Phys.* **94**, 6081–6090 (1991).
58. McLean, A. D. & Chandler, G. S. Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11–18. *J. Chem. Phys.* **72**, 5639–5648 (1980).
59. Krishnan, R., Binkley, J. S., Seeger, R. & Pople, J. A. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *J. Chem. Phys.* **72**, 650–654 (1980).
60. Marenich, A. V., Cramer, C. J. & Truhlar, D. G. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Chem. Phys. B* **113**, 6378–6396 (2009).
61. Gázquez, J. L., Cedillo, A. & Vela, A. Electrodonating and electroaccepting powers. *J. Phys. Chem. A* **111**, 1966–1970 (2007).
62. Gázquez, J. L. Perspectives on the density functional theory of chemical reactivity. *J. Mex. Chem. Soc.* **52**, 3–10 (2008).
63. Martínez, A. Donator acceptor map of psittacofulvins and anthocyanins: are they good antioxidant substances?. *J. Phys. Chem. B* **113**, 4915–4921 (2009).
64. Cerón-Carrasco, J. P., Bastida, A., Requena, A., Zuñiga, J. & Miguel, B. A. Theoretical study of the reaction of β -carotene with the nitrogen dioxide radical in solution. *J. Phys. Chem. B* **114**, 4366–4372 (2010).
65. Alfaro, R. A. D., Gómez-Sandoval, Z. & Mammìno, L. Evaluation of the antiradical activity of hyperjovino-A utilizing donor-acceptor maps. *J. Mol. Model.* **20**, 2337 (2014).

Acknowledgements

This study was funded by DGAPA-PAPIIT and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Guillermo Goode-Romero is very grateful with CONACyT (No. 749523/857743). This work was carried out using *Miztli* HP Cluster 3000 supercomputer, provided by Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Authors would like to acknowledge Oralia L Jiménez, María Teresa Vázquez and Cain González for their technical support. Guillermo Goode-Romero and Laura Dominguez thank to LANCAD-UNAM-DGTIC-306. Ana Martínez thanks to LANCAD-UNAM-DGTIC-141. Dedicated to Antonio Martínez.

Author contributions

All the authors contributed to the manuscript text. All authors reviewed the manuscript.



Contents lists available at ScienceDirect

Computational and Theoretical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/comptc

Analyzing the interaction energy between dopaminergic agents and DRD2: Is there any difference between risperidone (antagonist), aripiprazole (partial agonist) and pramipexole (agonist)?

Guillermo Goode-Romero^a, Laura Dominguez^a, Rubicelia Vargas^b, Ilich A. Ibarra^c, Ana Martínez^{c,*}

^a Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior SN, Ciudad Universitaria, CP 04510 CDMX, Mexico

^b Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa. AP Postal 55-534, CP 09340 CDMX, Mexico

^c Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior SN, Ciudad Universitaria, CP 04510 CDMX, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Antipsychotic
Schizophrenia
Adverse effects
DFT
Electron donor

ABSTRACT

Agonists and antagonists of dopamine are drugs commonly used to control psychosis. The action mechanism of these drugs is however, contrary. Agonists bind to the receptor and activate it, whereas antagonists interact and block the receptor. Even though the effects of these treatments on patients have been documented, the mechanism of action of these drugs is not fully understood. In this investigation, we perform quantum chemical calculations for risperidone (antagonist), aripiprazole (partial agonist), pramipexole (agonist) and dopamine, within the cavity at the binding site of the dopamine D2 receptor. Risperidone is the only molecule that is able to replace dopamine at its receptor. This may explain the efficiency of this drug for controlling the symptoms of schizophrenia and likewise its adverse effects. The greater the electron acceptor capacity of the ligand, the more it interacts with the dopamine cavity. This information will help elucidate the action mechanism of these molecules.

1. Introduction

Psychiatric disorders are a very important cause of social and occupational disability, worldwide [1–3]. The increase in affective and psychotic diseases is an emergent issue in public health. Schizophrenia is a mental disorder associated with negative symptoms (catatonia and diminished emotional expression) and positive behavior (disorganized speech, delusions, hallucinations, and psychomotor abnormality) [4–6]. For the purpose of controlling these symptoms, first-line treatment in psychiatry requires the use of neuroleptic drugs such as dopaminergic agents [7–9]. Patients with schizophrenia and other forms of psychosis present a biochemical imbalance involving the neurotransmitter dopamine and its signaling pathways. To control this imbalance, most of the neuroleptic drugs in clinical use are molecules that interact with proteins, which are the dopamine D2 receptor (DRD2). The hydrophobic nature of neuroleptic drugs causes these molecules to interact, not only with protein receptors, but also with lipids that make up the membrane

bilayer [10]. Among these drugs, there are some dopamine antagonists at its receptors. These molecules bind and block DRD2. Other drugs are agonists and contrarily, they interact and activate DRD2, in the same way as dopamine [7,11,12]. There are also molecules that activate the receptor to a lesser extent than dopamine. These are known as partial agonists and function as modulators of the dopaminergic systems [13]. In summary, dopaminergic agents are molecules that bind to the same receptor (DRD2), but they manifest different action mechanisms.

Theoretical calculations for many ligand-receptor complexes have indeed highlighted key properties [14,15]. Apparently, agonists and dopamine have similarities, as both interact and activate DRD2. It is possible to surmise that they share an intrinsic property, not shared by antagonists. Based on these ideas, we previously [16–18] undertook a quantum chemistry study to assess the electron donor-acceptor capacity of these drugs, concluding that this may influence the action mechanism. This represents a significant aspect pertaining to the dopaminergic group of drugs. Dopamine and its agonists are molecules with higher

* Corresponding author.

E-mail address: martina@unam.mx (A. Martínez).

<https://doi.org/10.1016/j.comptc.2020.113125>

Received 27 September 2020; Received in revised form 8 December 2020; Accepted 12 December 2020

Available online 17 December 2020

2210-271X/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

electron donor capacity than antagonists, which are good electron acceptors. These properties are conserved within the agonist and antagonist groups that we studied.

In spite of previous studies, details concerning the interaction of these drugs with the receptor are lacking. The study of molecules with agonist or antagonist properties interacting with the DRD2 receptor may provide information about the action mechanism. In this work, we report theoretical calculations of the energetic profiles of four ligands: one antagonist (risperidone), one partial agonist (aripiprazole) and one agonist (pramipexole), within a model of the binding site of the DRD2 receptor. Dopamine is also included for comparison. The energetic cost of the complex formation and the displacement energy of dopamine by the other ligands are reported. These results will help elucidate the action mechanism of these neuroleptic drugs.

1.1. Computational details

Structural information is available for risperidone and the DRD2 receptor at the *Protein Databank* (PDB ID: 6CM4) [19]. The structural data were prepared, taking into account information essential to our study. The dopamine-binding structure is modeled with the experimental data for dopamine analogs at β 1-adrenergic receptor [20], by making bioisosteric comparisons. The backbone of the receptors at the 6CM4 and 6H7J structures were aligned with PyMOL [21], so that our model would better fit the binding mode for dopamine in DRD2 receptor from the isoprenaline- β 1-adrenergic complex. We verified that the interactions of the bioisosteric subgroups, such as the catechol moiety and protonated amino group were preserved, as in the experimental data of the analogs, with the equivalent residues; serine 194 and serine 197, and aspartate 114, respectively. The interactions for our dopamine-binding model were also compared to the agonist salbutamol and dobutamine positions at the adrenergic receptor in the structures 6H7M and 6HTM, in order to review the hydrogen bonds and the salt bridge. For aripiprazole and pramipexole, there are no reports of PDB structures. The binding scheme for risperidone [22] and related ligands was used to construct the structures of these two systems; applying the same method. The ligands were located at the orthosteric site replacing key functional groups of the risperidone with the bio-isosteric counterparts in each ligand (aripiprazole, pramipexole and dopamine), before the energy minimization in MD simulations.

We first performed an energy minimization going from the initial structure of DRD2, in complex with risperidone and embedded in a POPC lipid bilayer, using the steepest descent algorithm with an optimization step of 0.05 nm. Then, we performed a 100 ps simulation to equilibrate our system in an isochoric-isothermic ensemble (NVT), at a reference temperature of 310 K and tau time constant of 1.0 ps^{-1} , using Berendsen and a velocity rescale thermostat, followed by 500 ps of semi-isotropic isobaric-isothermic ensemble (NPT) with a reference pressure of 1 bar and tau-P time constant of 5.0 ps^{-1} and a Parrinello-Rahman barostat, using GROMACS v5.0.7 software [23,24]. From about 20 ns of simulation for the dopamine, risperidone, aripiprazole and pramipexole complexes, we observed that the root-mean-square deviation (RMSD) of the ligands without fitting and did not display greater variations than those apparent after approximately the first 10 ns. We performed a clustering analysis of the backbone-fitted receptor to obtain representative conformations, based on the similarity of RMSD values for the backbone atoms of the receptor and all atoms of the ligands. We took the median configuration of the larger cluster for the ligand, and the surrounding residues consisting of the binding region at the orthosteric site. This structure is known as the cavity. The cavities for all systems have the same number of atoms [$\text{C}_{146}\text{H}_{222}\text{N}_{19}\text{O}_{23}\text{S}$]. The truncated backbone of the residues of the cavity was capped with *N*-acetylated and *N*-methylamide for the N- and C-terminus respectively, to emulate the continuity of the peptide bonds of the extracted residues. We took the ligand configuration from the same median structure. Once the cavity with the corresponding ligand was obtained, we performed

partial optimizations using Gaussian09 software [25] at BLYP-D3/LANL2DZ level of theory [26,27]. The positions of the ligands' atoms in the cavity were optimized whilst the atoms of the cavity remained fixed. The isolated ligands were extracted from the optimized ligands of the ligand-cavity system. Fig. 1 presents the methodology that was used to build the cavity and to obtain the isolated ligands.

All electronic calculations were performed using Gaussian09 software [25] at BLYP-D3/LANL2DZ level of theory [26,27]. To consider polar solvent, single point calculations were performed using SMD model and water as solvent [28]. With this methodology, the total energy of the DRD2 cavity forming complexes with four ligands (risperidone, aripiprazole, pramipexole and dopamine) was obtained. The total energy of the receptor corresponding cavity without the ligands (R) and the total energy of the ligands (L) were also calculated in water to obtain the dissociation energy (E-DIS).

2. Results and discussion

In order to better understand the action mechanism, we analyzed the dissociation energy (E-DIS). The E-DIS is an indication of the strength of the interaction between the ligands (L) and the atoms in the cavity that corresponds to the receptor (R). All R have the same number of atoms, but the atomic configuration varies because the ligands are distinct and each R was optimized interacting with the corresponding ligand. We removed the ligand in order to calculate E-DIS, but preserved the structure of R. Fig. 2 presents a schematic representation of the dissociation reaction that we consider here. In Figs. 3–6, we report the calculated structures of the four systems, along with the values of E-DIS that we obtained.

Comparing dissociation energies (E-DIS), it is possible to confirm that by a small degree, risperidone manifests the strongest bond to its corresponding cavity, followed by aripiprazole. Pramipexole is weakest bonded to its DRD2 cavity. These results give us an idea of the interaction strength of these ligands with their corresponding cavities, and the conclusion is that all ligands interact strongly, as the dissociation energy exceeds 50 kcal/mol. However, this is not a direct comparison because the fitted cavities have the same number of atoms, but the configuration of the structure varies.

For a better comparison, it is possible to use the dopamine-fitted cavity as reference (R_{dopamine} in Fig. 7). Dopamine is the neurotransmitter that naturally interacts with DRD2. The ligands risperidone and aripiprazole are antipsychotics, and pramipexole is an antiparkinsonian drug (medications), which are only present in patients when the dopaminergic system is not physiologically balanced. Before any medication is introduced, it is assumed that the structure of the DRD2 receptor is that of the DRD2 receptor in a high dopamine concentration, that must be consistent with the DRD2^{high} state. It is thus interesting to discern the dissociation energy with respect to the DRD2 cavity under natural conditions (with dopamine). The results of E-DIS_{dopa} are summarized in Table 1.

E-DIS_{dopa} is positive for the two antipsychotic ligands risperidone and aripiprazole and greater for risperidone than for the others. This means that the interaction of risperidone with the dopamine-fixed cavity, or DRD2^{high} cavity, is stronger than it is for aripiprazole. E-DIS_{dopa} for pramipexole is negative, indicating that the dissociation reaction is not energetically feasible. This means that the structure of the cavity and also the geometry of the ligand are modified when the complex is formed. Pramipexole binds to its cavity but this is not the case when the cavity has the structure of the fitted-complex with dopamine. This reveals an important difference between these three dopaminergic agents. Table 1 also presents the electroaccepting and electrodonating powers (ω^+ and ω^- , respectively) that were previously reported for these systems [16]. These values thus indicate that risperidone is the best electron acceptor (ω^+ is the largest) and pramipexole is the best electron donor (ω^- is the smallest). Apparently, a correlation exists between the capacity to donate or accept electrons and the strength of the interaction with the

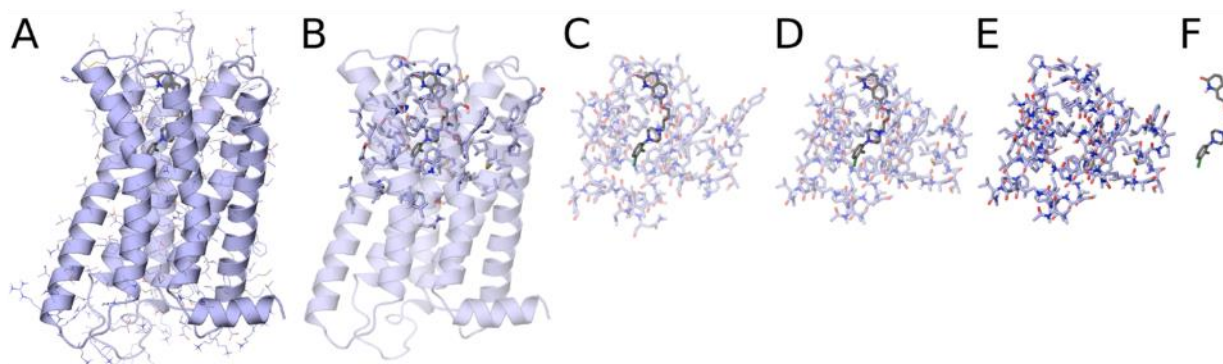


Fig. 1. Methodology to obtain the cavity and the ligand conformer is reported. **A.** Predominant clustering median configuration of the receptor and the ligand; **B.** Identification of the residues next to the ligand within the binding site; **C.** Extraction of the cavity and the ligand; **D.** Capping of the truncated bonds to obtain the cavity-ligand complex (this system was partially optimized at BLYP-3D/LANL2DZ level); **E.** Isolation of the cavity without ligand; **F.** Isolation of the ligand.

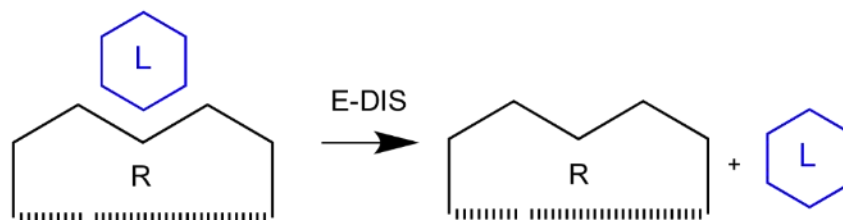


Fig. 2. Schematic representation of the dissociation reaction analyzed. E-DIS is the energy difference between $E(R) + E(L)$ and the energy of the complex $E(R-L)$. In this system, R is the corresponding cavity of each ligand (L). All R has the same number of atoms, but the atomic configuration is varying because the ligands are distinct.

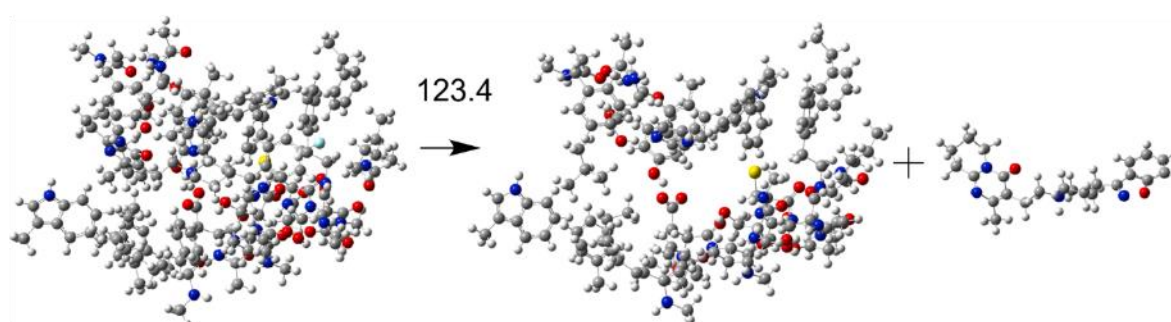


Fig. 3. Calculated structures and E-DIS (in kcal/mol) of the system with risperidone. Calculations at BLYP-D3/LANL2DZ/smd/water level.

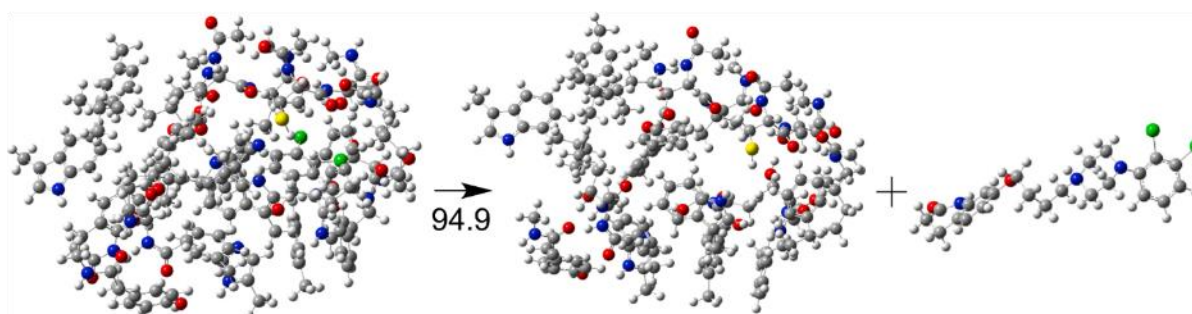


Fig. 4. Calculated structures and E-DIS (in kcal/mol) of the system with aripiprazole. Calculations at BLYP-D3/LANL2DZ/smd/water level.

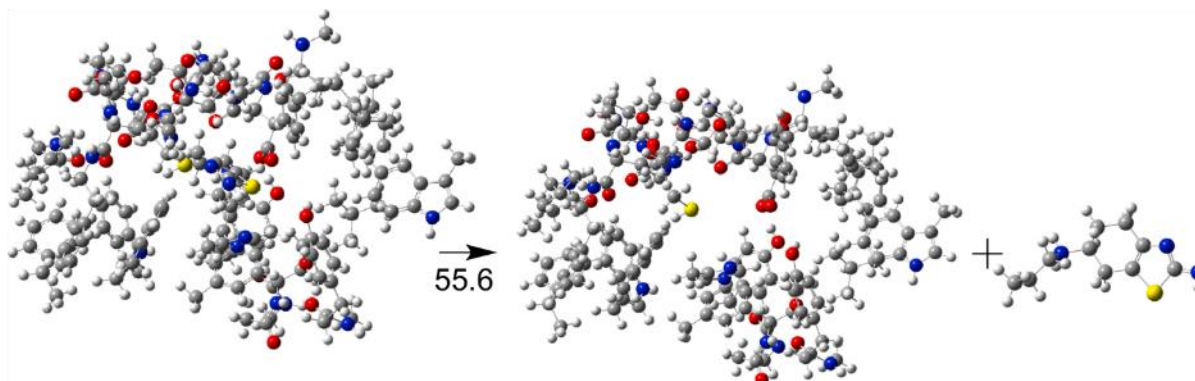


Fig. 5. Calculated structures and E-DIS (in kcal/mol) of the system with pramipexole. Calculations at BLYP-D3/LANDL2DZ/smd/water level.

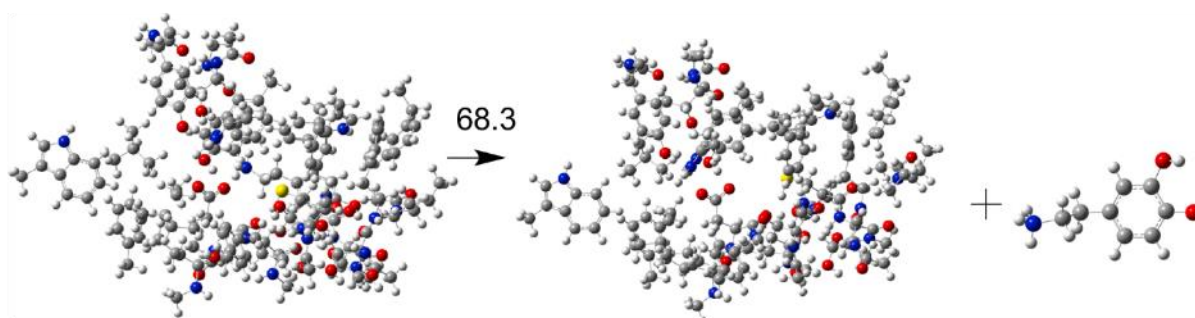


Fig. 6. Calculated structures and E-DIS (in kcal/mol) of the system with dopamine. Calculations at BLYP-D3/LANDL2DZ/smd/water level.



Fig. 7. Schematic representation of the dissociation reaction considering dopamine as reference.

Table 1

E-DIS_{dopa} and E-EXC reported in kcal/mol (BLYP-D3/water/smd). ω^+ and ω^- reported values represents the electroaccepting and electrodonating powers [29].

Molecule	E-DIS _{dopa}	E-EXC	ω^+	ω^-
Risperidone	199.8	-131.5	1.54	5.51
Aripiprazole	76.2	-7.9	1.03	4.48
Pramipexole	-27.3	95.6	0.77	3.97

DRD2 dopamine-fitted cavity. In summary, according with our results, the greater the electron acceptor capacity of the ligand, the more it interacts with the dopamine-fitted cavity.

We conclude that risperidone, an antagonist of dopamine and a good electron acceptor, is strongly bonded to the dopamine-fitted cavity. Aripiprazole is known to be a modulator of the dopaminergic system, which acts as a weak agonist at DRD2 receptor, when there is excess of dopamine, and as a partial agonist, when there is a deficit of dopamine; to some degree buffering the extremes of dopamine signaling. The E-DIS_{dopa} of aripiprazole is less than the E-DIS_{dopa} of risperidone,

suggesting weaker interaction on the part of this partial agonist. The interaction of pramipexole with the dopamine-fitted cavity is the weakest, and this molecule is also the worst electron acceptor among the studied molecules. This comparison enabled us to predict the more stable complexes within the dopamine-fitted cavity and correlate these with electron acceptor capacity.

Another important feature of the energetic profiles that we are analyzing is the so-called exchange energy (E-EXC). This process of exchange or replacement is represented schematically in Fig. 8. E-EXC is the energy cost of replacing dopamine at this binding site within the cavity, with another ligand. We assume that under natural conditions, dopamine is bound to the receptor when both are available. When the dopaminergic drugs are administered, it may be possible for the drug to replace dopamine.

Table 1 also reports the E-EXC. With these values, we can estimate the energetic cost of replacing dopamine with the other ligands. Risperidone and aripiprazole present a negative value of E-EXC but the value for aripiprazole is very small (less than 10 kcal/mol). These results indicate that only risperidone is able to remove the neurotransmitter from the cavity to form its complex. This fact may be related to the blockade effect of risperidone over the DRD2 receptor, and this concurs

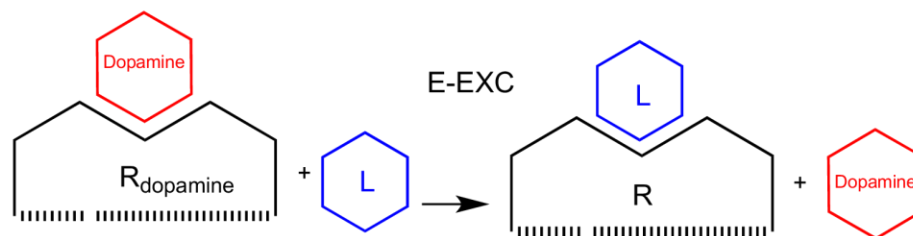


Fig. 8. Schematic representation of the exchange (displacement) reaction.

with the fact that risperidone will have an antagonist effect under any dopaminergic condition (excess or deficit of dopamine). Aripiprazole, the dopamine system modulator, is not able to displace dopamine from the receptor. This could explain why this drug acts as a weak agonist when there is a deficit of dopamine in the dopaminergic system. This molecule is not able to replace dopamine in its binding site; however, when there is a deficit of dopamine it interacts and activates the receptor. The E-EXC of pramipexole, an agonist, is positive and greater than the value of aripiprazole. These results suggest that when dopamine binds to DRD2, the pramipexole molecule is unable to interact, but when the amount of dopamine is deficient, depleting the DRD2^{high} availability state, and no ligand is interacting with the receptor, pramipexole binds to the DRD2 receptor.

In an interpretative scenario, we may assume that DRD2 receptors, molecules of dopamine and other ligands are available. Those molecules that have greater E-DIS_{dopa} bind to the site at the DRD2. When dopamine is forming a complex with DRD2, as occurs under physiological conditions, only the risperidone is able to displace dopamine, due to a more favorable binding energy. Risperidone interacts strongly with the receptor, which may explain the efficacy of this drug for controlling the symptoms of schizophrenia, and also the presence of the associated adverse effects. In contrast, the partial agonist aripiprazole and the agonist pramipexole do not seem to be capable of displacing dopamine from the binding site. Instead, the aripiprazole binds to the DRD2 and does not interfere with the dopamine complexes, permitting their physiological roles. Activity of aripiprazole and pramipexole is conditioned by the availability of the receptors, as they are not capable of displacing the dopamine from the occupied DRD2. This may relate to the diminished perturbation of the dopaminergic pathways induced by these drugs and therefore the lesser incidence of adverse anti-dopaminergic effects, when compared to risperidone.

Nevertheless, different factors were not taken into consideration in this analysis, as for example the influence of the membrane bilayer and also the full contribution of the whole receptor. However, the energy trends should be preserved as it is assumed that these variables affect all systems equally. Regardless of the real value, the interaction of risperidone with the cavity of dopamine is stronger than that of aripiprazole, and in the case of pramipexole, the dissociation energy is the weakest. Analyzing the interaction between dopaminergic agents and DRD2, it is possible to conclude that there are disparities between these molecules that may explain different functional mechanisms of action. Our findings may indicate the reasons for the broad differences between these agents, in terms of their molecular details when used clinically and may also establish the relationship with the psychopathology of each neuropsychiatric illness, so that the therapeutic response within patients can be improved.

3. Conclusions

There is a correlation between the capacity to donate or accept charge and the strength of the interaction with the DRD2 dopamine cavity. The greater the electron acceptor capacity of the ligand, the more it interacts with the dopamine cavity. Risperidone is the only molecule known to have the capacity to displace dopamine, when dopamine has

formed a complex with DRD2. Risperidone forms a strong bond with the receptor, which may explain the efficacy of this drug for controlling the symptoms of schizophrenia, but likewise its secondary effects. In contrast, aripiprazole (partial agonist) and pramipexole (agonist) do not seem to be capable of displacing dopamine from its binding site. Therefore, the effect of these two drugs is conditioned by the availability of receptors. When there is a deficit of dopamine, aripiprazole and pramipexole interact with DRD2 and act on it. This may relate to the low perturbation of the dopaminergic pathways induced by aripiprazole and therefore, the lesser incidence of adverse effects compared to risperidone.

In conclusion, it is possible that the differences reported here between these particular agonists and antagonist could help to explain its diverse mechanism of action. Our findings reveal an energetic profile that may contribute to elucidate the marked differences between these dopaminergic agents.

4. Credit author statement

All authors participated in the discussion and revised the text. The original idea is from Ana Martínez and Guillermo Goode-Romero.

Declaration of Competing Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was carried out using Miztli HP Cluster 3000 supercomputer, provided by Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Authors would like to acknowledge Oralia L Jiménez, María Teresa Vázquez and Cain González for their technical support. Guillermo Goode-Romero and Laura Dominguez thank to LANCAD-UNAM-DGTIC-306. Ana Martínez thanks to LANCAD-UNAM-DGTIC-141.

References

- [1] WHO, Schizophrenia, (2019).
- [2] WHO, Depression, (2020).
- [3] WHO, Mental health in the workplace, (2019).
- [4] G.T. Konopaske, J.T. Coyle, Schizophrenia, in: M.J. Zigmond, J.T. Coyle, L. Rowland (Eds.), Neurobiol. Brain Disord., Academic Press, New York, 2015: pp. 639–654.
- [5] J. Zielasek, W. Gaebel, Schizophrenia, in: J.D. Wright (Ed.), Int. Encycl. Soc. Behav. Sci., Elsevier, Cambridge, 2015: p. 9–15.
- [6] L. Hosak, J. Hosakova, The complex etiology of schizophrenia - general state of the art, Neuroendocrinology Lett. 36 (2015) 631–637.
- [7] P. Li, G.L. Snyder, K.E. Vanover, Dopamine targeting drugs for the treatment of schizophrenia: past, present and future, Curr. Top. Med. Chem. 16 (2016) 3385–3403.
- [8] J. Horacek, V. Bubenikova-Valesova, M. Kopecek, T. Palenicek, C. Dockery, P. Mohr, C. Höschk, Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia, CNS Drugs 20 (2006) 389–409.
- [9] P. Stepnicki, M. Kondej, A. Kaczor, Current Concepts and Treatments of Schizophrenia, Molecules 23 (2018) 2087.

- [10] R. Pérez-Isidoro, M. Costas, The effect of neuroleptic drugs on DPPC/sphingomyelin/cholesterol membranes, *Chem. Phys. Lipids* 229 (2020), 104913.
- [11] V. Katritch, V. Cherezov, R. Stevens, Structure-Function of the G-protein-Coupled Receptor Superfamily, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53 (2013) 531–556, <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923>. Structure-Function.
- [12] D. Wacker, R.C. Stevens, B.L. Roth, How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology, *Cell* 170 (2017) 414–427.
- [13] K.D. Burris, T.F. Molski, C. Xu, E. Ryan, K. Tottori, T. Kikuchi, F.D. Yocca, P. B. Molinoff, Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302 (2002) 381–389.
- [14] M. Zhang, X. Zhu, Computational investigation of flavonol-based GLP-1R agonists using DFT calculations and molecular docking, *Comput. Theor. Chem.* 1190 (2020), 113005.
- [15] K.B. Mota, J.X. Lima Neto, A.H. Lima Costa, J.I.N. Oliveira, K.S. Bezerra, E. L. Albuquerque, E.W.S. Caetano, V.N. Freire, U.L. Fulco, A quantum biochemistry model of the interaction between the estrogen receptor and the two antagonists used in breast cancer treatment, *Comput. Theor. Chem.* 1089 (2016) 21–27.
- [16] A. Martínez, I.A. Ibarra, R. Vargas, A quantum chemical approach representing a new perspective concerning agonist and antagonist drugs in the context of schizophrenia and Parkinson's disease, *PlosOne*. 14 (2019), e0224691.
- [17] A. Martínez, R. Vargas, A Component of the Puzzle, When Attempting to Understand Antipsychotics: A Theoretical Study of Chemical Reactivity Indexes, *J. Pharmacol. Pharm. Res.* 1 (2018) 1–8.
- [18] A. Martínez, Dopamine antagonists for the treatment of drug addiction: PF-4363467 and related compounds, *Eur. J. Chem.* 11 (2020) 84–90.
- [19] S. Wang, T. Che, A. Levit, B.K. Shoichet, D. Wacker, B.L. Roth, Structure of the D2 dopamine receptor bound to the atypical antipsychotic drug risperidone, *Nature* 555 (2018) 269–273.
- [20] T. Warne, P.C. Edwards, A.S. Dore, A.G.W. Leslie, C.G. Tate, Molecular basis for high-affinity agonist binding in GPCRs, *Science* (80-). 364 (2019) 775–778.
- [21] Schrödinger, The PyMOL Molecular Graphics System, (n.d.) 1.2r3pre.
- [22] L. Fan, L. Tan, Z. Chen, J. Qi, F. Nie, Z. Luo, J. Chen, S. Wang, Haloperidol bound D2 dopamine receptor structure inspired the discovery of subtype selective ligands, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1074.
- [23] M. Abraham, B. Hess, D. van der Spoel, E. Lindahl, Gromacs 5.0.7, *Www.Gromacs.Org.* (2015). https://doi.org/10.1007/SpringerReference_28001.
- [24] D. van der Spoel, B. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, GROMACS: Fast, flexible and free, *J. Comp. Chem.* 26 (2005) 1701–1719.
- [25] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C.J. Gonzalez, A. Pople, *Gaussian 09, Revision A.08*, (2009).
- [26] S.J. Grimme, Accurate description of van der Waals complexes by density functional theory including empirical corrections, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1463–1473.
- [27] A.V. Marenich, C.J. Cramer, D.G. Truhlar, Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 6378–6396.
- [28] J.T.H. Dunning, P.J. Hay, *Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations*, in: *Mod. Theor. Chem.*, H. F. Schaefer III, New York, 1977: pp. 1–28.
- [29] J.L. Gázquez, A. Cedillo, A. Vela, *Electrodonating and electroaccepting powers*, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 1966–1970.

Electron Donor–Acceptor Properties of Different Muscarinic Ligands: On the Road to Control Schizophrenia

Guillermo Goode-Romero, Laura Dominguez, and Ana Martínez*


 Cite This: *J. Chem. Inf. Model.* 2021, 61, 5117–5124


Read Online

ACCESS |



Metrics & More

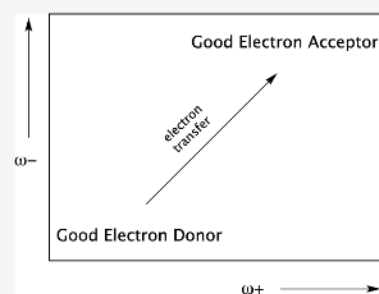


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Schizophrenia is a severe neuropsychiatric disorder that deteriorates perception, affection, and cognitive mental functions. The current treatments are mainly focused on the dopamine system, but the so-named dopamine hypothesis of schizophrenia fails to explain all the symptoms. Previous studies have shown that there is a reciprocal relationship between muscarinic acetylcholine receptors and dopamine receptor function. Some muscarinic ligands show antidopaminergic activity, and therefore, they should have some antipsychotic efficacy. In this work, conceptual density functional theory is employed to analyze the properties of acetylcholine's agonists, partial agonists, or antagonists. The aim is to establish a classification of the antipsychotic-like or pro-psychotic activities of these molecules based on the electron-donor and electron-acceptor properties. Most of the agonists and antagonists are better electron donors and worse electron acceptors than partial agonists. We found that acetylcholine antagonists that clinically promote psychotic symptoms are good electron-donor molecules, and acetylcholine agonists that clinically relieve symptoms of psychosis are good electron donors. These results represent a further advance on the road to understanding the charge-transfer properties of drugs used as possible treatments for schizophrenia.



INTRODUCTION

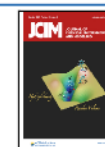
Schizophrenia is a type of psychosis that affects approximately 1% of the population. It is a devastating disorder with several broad symptoms¹ that generally appear in late adolescence or early adulthood. Schizophrenia includes positive, negative, and cognitive symptoms. The positive symptoms are related to hallucinations and delusions; the negative symptoms are poor thinking, agitated responses, and reduced social interactions; and the cognitive conditions include impairments in working memory and attention. It has been reported that the improvement of the cognitive symptoms is the critical component for the reintegration of the patients into society.²

Dopamine was discovered as a neurotransmitter in the late 1950s and was associated with schizophrenia in the so-named dopamine hypothesis. However, the dopamine hypothesis fails to explain all the symptoms associated with this disorder, and it seems clear that there are other neurotransmitters involved in the pathophysiology of schizophrenia such as acetylcholine.³ Acetylcholine is a neurotransmitter and the endogenous agonist of the muscarinic cholinergic system. The name muscarinic comes from muscarine, which is the prototypical agonist for all muscarinic receptors. It is a natural product derived from several species of fungi, and it is associated with toxicity when poisonous mushrooms are ingested. Many physiological functions such as memory, learning, attention, visceral and vascular contractions, cardiac contractility, and glandular functions are related to muscarinic acetylcholine receptors^{4–6} when they are bonded to muscarinic ligands.

Although acetylcholine is the endogenous agonist ligand of muscarinic acetylcholine receptors, its clinical use is not feasible due to serious potentially dangerous and adverse side effects throughout the cholinergic system. In contrast, muscarinic drugs such as acetylcholine agonists or enhancers are used in the treatment of cognitive impairment and Alzheimer's disease.⁷ Based on the experience, the new approach to treating schizophrenia is with compounds that activate certain subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. This is the so-called muscarinic cholinergic hypothesis theory.^{2,8} Previous studies have shown that there is a reciprocal relationship between muscarinic acetylcholine receptors and dopamine receptor function.² Some muscarinic ligands show antidopaminergic activity, and therefore, they should have some antipsychotic efficacy. Several partial agonists of muscarinic acetylcholine receptors, such as xanomeline, have antipsychotic-like and pro-cognitive activity and decrease psychotic symptoms. They are also typical antipsychotic drugs that have high affinity for muscarinic receptors⁹ such as clozapine, olanzapine, and in lesser extent quetiapine,¹⁰ and it had been proposed that muscarinic activity is required for a

Received: July 1, 2021

Published: September 24, 2021



clozapine-like antipsychotic effect.^{11–13} For all these reasons, the recent research is focused on developing subtype-selective muscarinic agonists and positive allosteric modulators that have reduced side effects but retain the therapeutic benefit.

In spite of all these reports, there are no quantum chemical investigations concerning the properties of acetylcholine agonists, partial agonists, or antagonists focused to make a proper classification of these muscarinic drugs. It was previously reported¹⁴ that an extensive study of many drugs has been proposed to treat schizophrenia and other neuropsychiatric disorders. The electron donor–acceptor properties were used to make a classification that can help in the design of new drugs. On the road to control schizophrenia, in this new investigation, we analyze different muscarinic ligands (see Table 1). We also analyze the influence of different

Table 1. Muscarinic Ligands as Drugs with Possible Antipsychotic Activity

agonists	partial agonists	antagonists
acetylcholine	alvameline	atropine
arecoline	milameline	benactyzine
bethanechol	sabcomeline	benzotropine
carbachol	xanomeline	biperiden
iperoxo		cyclopentolate
muscarine		homatropine
oxotremorine-M		octatropine
pilocarpine		oxybutynin
talsaclidine		procyclidine
tazomeline		solifenacin
		trihexphenidyl
		tropicamide

substituents on tazomeline, a drug with potential activity for the treatment of neuropsychiatric disorders. The results reported here indicate that electron donor–acceptor properties are useful information to help classify antipsychotic drugs.

METHODS

Gaussian09 was used for all electronic calculations.¹⁵ Geometry optimizations without symmetry constraints were obtained at the M062x/6-311+G(2d,p) level of theory,^{16–20} applying the continuum solvation model density with water in order to mimic the polar environment.²¹ Harmonic analyses verified local minima (zero imaginary frequencies). PubChem configurations were used as initial geometries.²² Biologically active species were considered for all molecules taking into account the pK_a values of the molecules and pH under physiological conditions. We considered the effect of chirality and enantiomer forms, but the results remain quite similar.

Conceptual density functional theory (DFT) is a chemical reactivity theory founded on DFT-based concepts.^{23–29} Within this theory, there are response functions that help us understand the chemical reactivity. The response functions that we used in this investigation are the electrodonating (ω^-) and electroaccepting (ω^+) powers, previously reported by Gázquez et al.^{28,29} These authors defined the propensity to donate electrons or ω^- as follows:

$$\omega^- = (3I + A)^2 / 16(I - A) \quad (1)$$

whereas the propensity to accept electrons or ω^+ is defined as

$$\omega^+ = (I + 3A)^2 / 16(I - A) \quad (2)$$

I and A are vertical ionization energy and vertical electron affinity, respectively. Lower values of ω^- imply greater capacity for donating electrons. Higher values of ω^+ imply greater capacity for accepting electrons. In contrast to I and A , ω^- and ω^+ refer to charge transfers, not necessarily from one electron. This definition is based on a simple electron-transfer model expressed in terms of chemical potential and hardness. With these parameters, it is possible to determine the electron donor–acceptor MAP (DAM) (see Figure 1). These chemical descriptors have been used successfully in many different chemical systems.^{14,30–41}

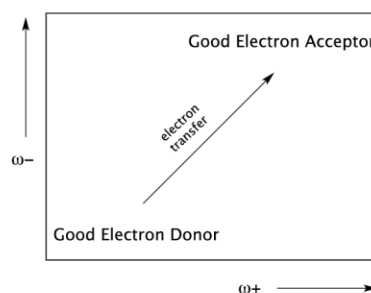


Figure 1. Electron DAM.

RESULTS AND DISCUSSION

The studied molecules are muscarinic ligands that are classified as agonist, partial agonist, and antagonist (see Table 1). Figure 2 presents the molecular formulas of the study compounds. Among muscarinic agonists, the alkaloid arecoline has an antipsychotic-like effect.⁴² Bethanechol and carbachol are non-hydrolysable analogues of acetylcholine and exhibit strong, systemic cholinergic actions useful in cholinergic research. Iperoxo and oxotremorine-M are full agonists that are extremely efficient, so they are considered superagonists. Muscarine is the prototypical full agonist of all muscarinic receptors. Talsaclidine is an agonist that can decrease avoidance similar to dopamine receptor antipsychotic drugs, suggesting that this ligand may provide an alternative approach to the treatment of psychosis. Tazomeline is a cognition-enhancing drug that was in clinical trials for the treatment of Alzheimer's disease and schizophrenia.⁴³ Pilocarpine is in current clinical use only to reduce pressure inside the eye, but it may induce a transient delirium state that resembles paranoid psychosis.⁴⁴

Amid the partial agonists, alvameline and milameline have cognition-enhancing effects, but clinical trials were discontinued. Sabcomeline and xanomeline are experimental, selective partial agonists investigated for the treatment of Alzheimer's disease, schizophrenia, and major depressive disorder, with promising results. They were under clinical trials.

Antagonists are anticholinergic agents that block the action of acetylcholine at synapses in the central and peripheral nervous system. Atropine is an antidote in organ phosphorus poisonings. It is used to dilate the pupils, and it also helps to relieve the extrapyramidal symptoms due to the antipsychotic use as it can cross the blood–brain barrier. There are reports that indicate that atropine induced psychosis.⁴⁵ Benzotropine, homatropine, and octatropine are atropine analogues administered directly in ophthalmic procedures. These atropine-like

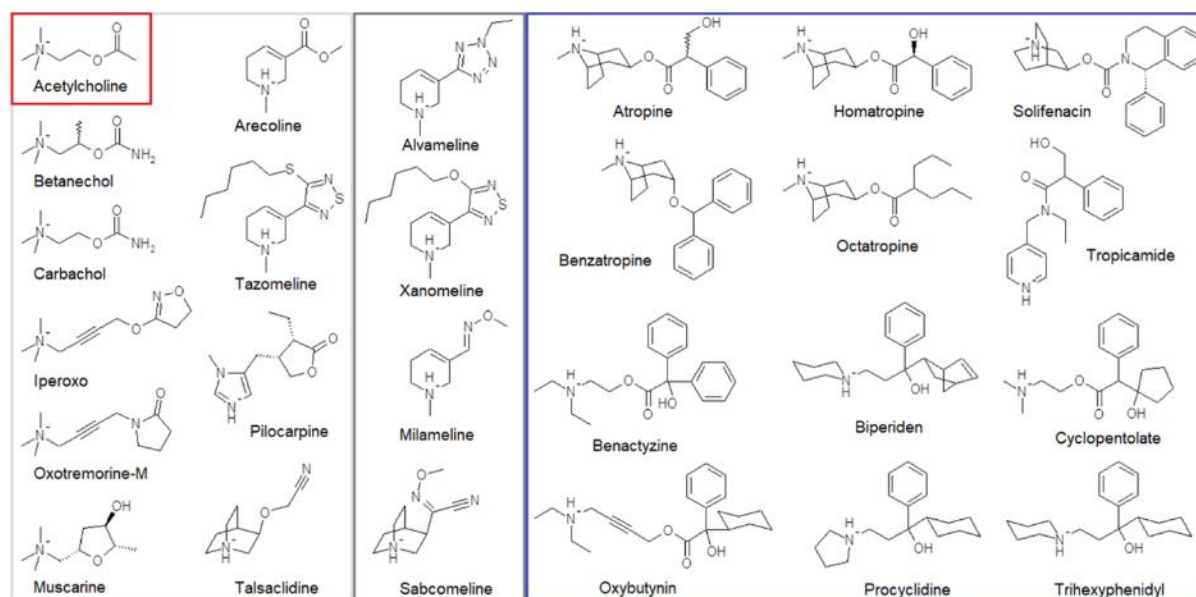


Figure 2. Schematic representation of the muscarinic ligands studied in this investigation.

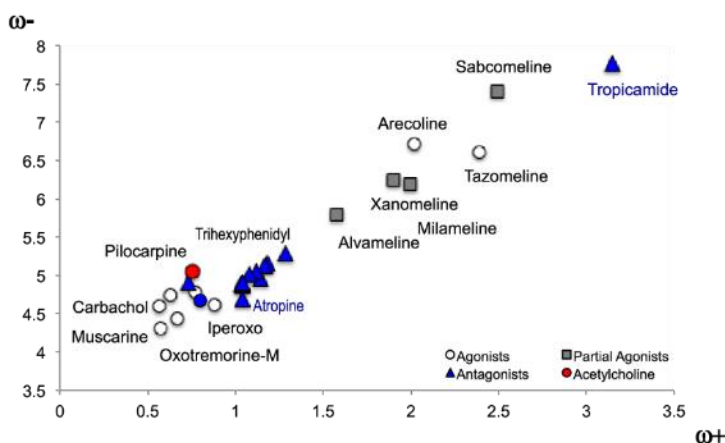


Figure 3. DAM of the muscarinic ligands studied in this investigation. Values are expressed in eV.

drugs include procyclidine and trihexyphenidyl. In high dose or in very susceptible persons, these antimuscarinic drugs cause an atropine-like psychosis,^{45–47} with the exception of trihexyphenidyl. Approved anticholinergic agents for the treatment of the Parkinson's disease are benactyzine, biperiden, and trihexyphenidyl, but they have cognitive detrimental effects. Cyclopentolate is an anticholinergic, antimuscarinic with atropine-like actions. A case of acute psychosis induced by topical cyclopentolate eye drops was reported in an elderly patient.⁴⁸ Oxybutynin, solifenacin, and tropicamide might have adverse effects including memory impairment, confusion, delirium, and hallucinations in elderly patients.^{49,50}

The results of the electron donor–acceptor capacity of all the studied compounds are reported in Figure 3, which are in the good electron-donor zone ($\omega^- < 6$; $\omega^+ < 1.5$). This indicates that they can donate electrons in a similar way as acetylcholine, which is also found in this area. Agonists and antagonists are similar according to this property. Despite

being in the same zone in DAM, most of the agonists are better electron donors than antagonists. Iperoxo and oxotremorine-M are considered super-agonists, and they are good electron donors, being muscarine the best electron donor of all the molecules under study. Partial agonists are worse electron donors and better electron acceptors than the previous molecules that we analyzed, and tropicamide is an antagonist that is the best electron acceptor. Arecoline and tazomeline are full agonists, but they are located close to partial agonists in the map. This means that the electron-acceptor capacity is similar. In summary, most of the agonists and antagonists are better electron donors and worse electron acceptors than partial agonists. There are three exceptions in the DAM of Figure 3: arecoline and tazomeline, which are agonists that are good electron acceptors, and tropicamide, an antagonist that is also a good electron acceptor.

Within the electron-donor molecules, there are several molecules that not only do not control the symptoms of

Table 2. Labels and IUPAC Names of the Analogues of Tazomeline^{22,52}

label	IUPAC names	activity
AroT	3-hexylsulfanyl-4-(1-methylpyridin-1-ium-3-yl)-1,2,5-thiadiazole	treatment of schizophrenia
CarbaT	3-heptyl-4-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-thiadiazole	mAChR1 agonist
DeMT	3-hexylsulfanyl-4-(1,2,3,6-tetrahydropyridin-5-yl)-1,2,5-thiadiazole	anxiolytic
DesT	3-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-thiadiazole	mAChR1 agonist
DiHT	3-hexylsulfanyl-4-(1-methylpiperidin-3-yl)-1,2,5-thiadiazole	
MeTZM	3-(1,1-dimethyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-1-ium-5-yl)-4-hexylsulfanyl-1,2,5-thiadiazole	
NorTZM	4-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-thiadiazole-3-thione/3-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-thiadiazole-3-thiol	
OxaTZM	3-hexylsulfanyl-4-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-oxadiazole	antipsychotic
OxaXML	3-hexoxy-4-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-oxadiazole	mAChR1 agonist
TSO2	3-hexylsulfanyl-4-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-thiadiazole	mAChR1 agonist
TSOR	3-hexylsulfanyl-4-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-thiadiazole	mAChR1 agonist
TSOS		
TZMLh1	3-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-4-pentylsulfanyl-1,2,5-thiadiazole	mAChR1 agonist
TZMLh2	3-butylsulfanyl-4-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-thiadiazole	mAChR1 and mAChR4 agonist
TZMLh3	3-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-4-propylsulfanyl-1,2,5-thiadiazole	antipsychotic and a muscarinic agonist
TZMLh4	3-ethylsulfanyl-4-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-1,2,5-thiadiazole	antipsychotic
TZMLh5	3-(1-methyl-3,6-dihydro-2H-pyridin-5-yl)-4-methylsulfanyl-1,2,5-thiadiazole	mAChR1, mAChR3 and mAChR4 agonist

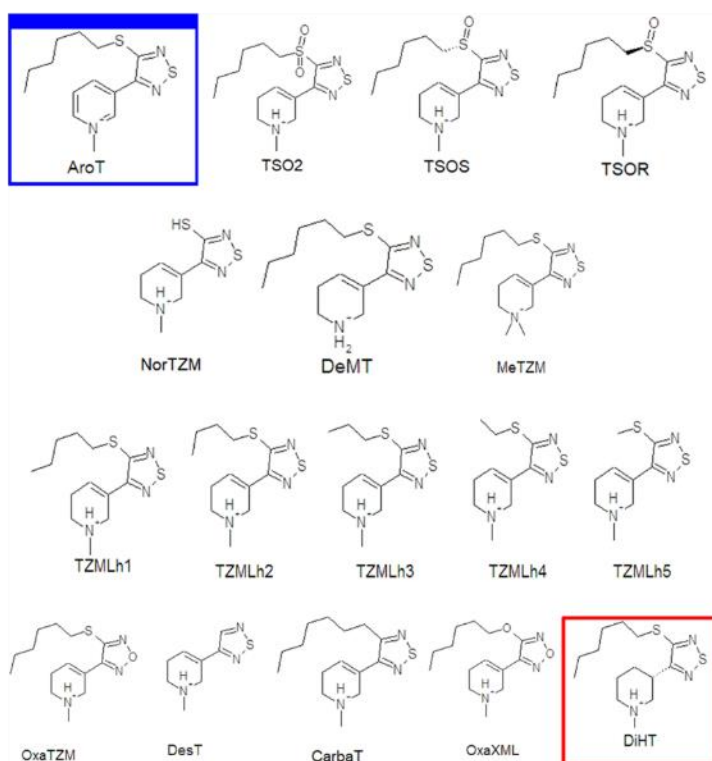


Figure 4. Schematic representations for the analogues of tazomeline with different substituents. The best electron acceptor is indicated in blue, and the best electron donor is indicated in red. They are presented in order, according to their ability to accept electrons.

schizophrenia but can also induce psychosis. These molecules are atropine, benztropine, cyclopentolate, homatropine, octatropine, oxybutynin, pilocarpine, procyclidine, solifenacin, and tropicamide. All of them are antagonists with the exception of pilocarpine. Being an antagonist with good electron-donor properties could be related to the induction of psychotic symptoms. Alvimeline, arecoline, milameline, tazomeline, sabcomeline, and xanomeline are all good electron-acceptor

molecules, with $\omega+$ greater than 1.5. Neither of these drugs produces psychotic effects. On the contrary, they have promising characteristics for the treatment of schizophrenia since they control the dopaminergic system or have the ability to enhance cognition. These molecules are located very close in the DAM. They are good electron acceptors and bad electron donors. This is something that could indicate that the reaction of these antipsychotics is controlled by charge transfer

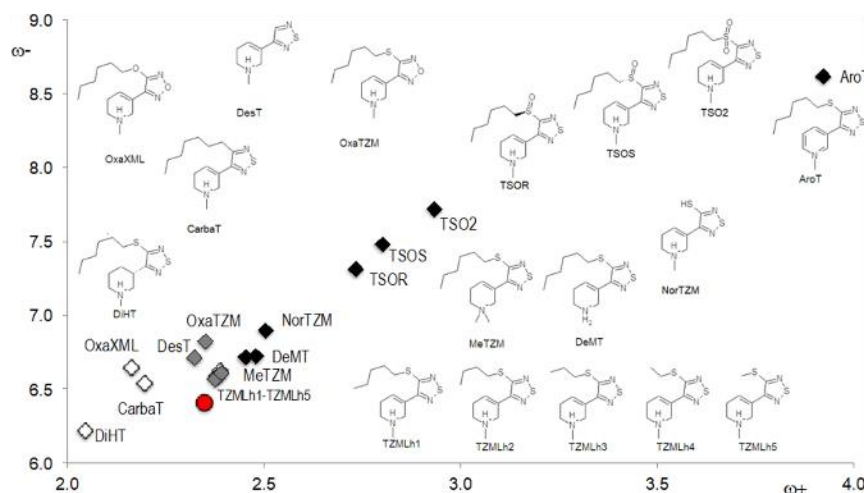


Figure 5. DAM of the studied analogues of tazomeline. Values are expressed in eV.

and could be considered to describe the agonist or antagonist patterns of the antipsychotics drugs.

Tropicamide is the only antagonist that is a good electron-acceptor molecule and a bad electron donor. Actually, it is the best electron donor–acceptor molecule among all the molecules of Figure 2. It was reported that tropicamide might have adverse effects including delirium and hallucinations in elderly patients. In a previous investigation, the DAM of agonists and antagonists of dopamine was reported.¹⁴ Agonists and dopamine were located at the good electron-donor zone, while antagonists were found at the good electron-acceptor zone. Agonists of dopamine possess similar electron-transfer properties than dopamine, but antagonists are the contrary. This allows us to make a classification based on these data. The results of the muscarinic ligands are different since both, agonists and antagonists, could have electron donor–acceptor properties similar to those of acetylcholine. Antagonists block the action of acetylcholine at synapses in the central and peripheral nervous system, but apparently, this is not related to the electron-transfer properties.

Analyzing carefully the reported information concerning the clinical activity of all muscarinic ligands to treat schizophrenia, partial agonists show promising results, but this is not the case for antagonists since most of them do not reduce psychotic symptoms; on the contrary, these molecules promote symptoms of schizophrenia. We named these molecules pro-psychotics. In Figure 3, they are indicated in blue color. Pilocarpine is agonist that is also pro-psychotic. These pro-psychotic molecules have similar capacity to donor electrons than acetylcholine (ω^- is similar, the exception is tropicamide). These ligands promote psychosis when in high doses similar to what happens when there is a lot of dopamine. An excess of dopamine encourages psychosis, and for that reason, there are antipsychotics that are antagonists of dopamine. Antagonists of dopamine block the receptor and extra dopamine cannot bind to the receptor. From these results, we can conclude that it is important to analyze the electron-transfer properties. In this case, antagonists are good electron donors that promote psychotic symptoms, and agonists are good electron donors that may relieve psychosis. Tropicamide is the exception since it is the best electron acceptor and it is a pro-psychotic. However, in his case, only

one case of an 87 year-old female was reported with acute delirium psychosis after use of tropicamide for the treatment of glaucoma deterioration. Tropicamide is an anticholinergic drug that works by non-selectively blocking muscarinic receptors, but it has relatively high selectivity for the M_4 receptor subtype, and also it has been used to reduce the side effects of clozapine in patients with schizophrenia.⁵¹ More information is needed to determine the safe use of this drug to treat psychosis.

Tazomeline is a cognition-enhancing drug that was in clinical trials for the treatment of Alzheimer's disease and schizophrenia. It is a good electron acceptor with promising results for the management of psychosis. Many analogues of tazomeline with different substituents have been reported.⁵² In the quest to analyze the influence of different substructures on the electron donor–acceptor properties, we focus our study on 17 analogues of tazomeline (see Table 2). Figure 4 reports the schematic representation of the compounds that we used in this investigation. The DAM of these analogues is reported in Figure 5.

The first thing to note is that all of these molecules are not as good electron donors as acetylcholine, nor as the agonists and pro-psychotics reported in Figure 3. All are good electron acceptors with ω^+ greater than 1.5. Neither of these drugs had been reported as pro-psychotic. On the contrary, they have promising characteristics for the treatment of schizophrenia, anxiety, and psychosis. These molecules are good electron acceptors and bad electron donors. Within these molecules, the best electron acceptor is AroT (see Table 2). This molecule is similar to tazomeline, but the difference is that the six-membered ring is aromatic. The best electron donor is DiHT, and the difference with tazomeline is that there are no double bonds in the six-membered ring. Apparently, the aromaticity or the number of double bonds determines that the electron-transfer capacity is more important than the aromatic effect. CarbaT and OxaXML are worse electron donors and worse electron acceptors than tazomeline. The structural difference of these two molecules is located in the side chain since sulfur atoms have been replaced by a carbon atom (CarbaT) or by one oxygen atom (OxaXML). Also for OxaXML, there is an oxygen atom replacing a sulfur atom in the five-membered ring. Similar results are found for DesT and all TZMLh ligands. They are all different from a structural point of view, as they

have a different number of atoms in the side chain. However, they are all located close to tazomeline in the DAM, indicating that the electron donor–acceptor properties are similar. Apparently, there is not a large effect of the size of the side chain on the ability to accept–donate electrons. There is an exception, NorTZM. The side chain of this molecule is a thiol group, and this promotes the electron-acceptor capacity (this is a better electron acceptor). OxaTZM is different because it has an oxygen atom instead of the sulfur atom of the five-membered ring, but it is located in the same zone in the DAM. These molecules are worse electron donors but remain close to tazomeline in the DAM. The structural difference of DeMT and MeTZM compared to tazomeline is in the atoms that are attached to the six-membered ring. The effect on electron-transfer properties is that this improves the ability to accept electrons. TSOR, TSOS, and TSO2 are tentative tazomeline metabolite molecules that have S=O groups in the side chain. The presence of these groups enhances the electron-accepting capacity, and two oxygen atoms have more effect than one (TSO2 is a better electron acceptor than the other two molecules).

All the molecules reported in Figure 4 and Table 2 are agonists with some antipsychotic activity, and they are also good electron acceptors. Concerning the electron-transfer properties, they are not similar to acetylcholine, but they have some antipsychotic efficacy. The action mechanism of this new approach to treating schizophrenia with compounds that activate certain subtypes of muscarinic acetylcholine receptors is not fully understood but could be related to the electron-acceptor properties. The main conclusion that we can offer is that all analogues of tazomeline that are agonists of acetylcholine and show some antipsychotics activity are also good electron acceptors.

It is important to note that these quantities are global descriptors, and therefore, there is no information as to which atoms in the molecules are responsible for the acceptance or donation of electrons. There are other descriptors^{53–55} that can be used to provide better and more knowledge about these systems, which we will use to investigate the mechanism of action of these drugs in future work.

CONCLUSIONS

Due to the nature of the reactivity indices of the electro-donating and electroaccepting powers, it is suggested that the mechanism of action should have a step involving the transfer of charge. The antipsychotic-like activity of the muscarinic ligands might be related to their electron-acceptor properties. Muscarinic ligands to treat schizophrenia that are partial agonists show promising results, but this is not the case for antagonists since most of them do not reduce psychotic symptoms; on the contrary, these molecules are pro-psychotics. These pro-psychotic molecules have similar capacity to donor electrons than acetylcholine, and they promote psychosis when in high doses, similar to what happens when there is a lot of dopamine.

Acetylcholine antagonists that clinically promote psychotic symptoms are good electron-donor molecules, and acetylcholine agonists that clinically relieve symptoms of psychosis are also good electron donors.

The analogues of tazomeline are not as good electron donors as acetylcholine, nor as the agonists and pro-psychotics ligands. All are good electron acceptors with ω^+ greater than 1.5. Neither of these drugs had been reported as pro-psychotic.

On the contrary, they have promising characteristics for the treatment of schizophrenia, anxiety, and psychosis. All analogues of tazomeline that are agonists of acetylcholine and show some antipsychotic activity are also good electron acceptors.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Molecular structures were obtained from the PubChem database considering protonation states based on the available Protein Data Bank (PDB). The estimated and measurable acid dissociation constant data was from PubChem and published works.^{56,57} Optimized structure coordinates are available under request. DFT calculations were done using Gaussian software version 09¹⁵ under the license for the Miztli HP Cluster 3000 supercomputer of Dirección General de Cómputo y Tecnologías de la Información (DGTIC) from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.1c00780>.

Ionization energies, electron affinities, and Cartesian coordinates of all the optimized structures (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Ana Martínez – Departamento de Materiales de Baja Dimensionalidad, Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 Ciudad de México, Mexico; Present Address: Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior SN, Ciudad Universitaria, CP 04510, CDMX, México; orcid.org/0000-0002-0515-1946; Email: martina@unam.mx

Authors

Guillermo Goode-Romero – Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 Ciudad de México, Mexico

Laura Dominguez – Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510 Ciudad de México, Mexico

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jcim.1c00780>

Author Contributions

All authors contributed with ideas for the discussion and analysis of results. The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was carried out using the Miztli HP Cluster 3000 supercomputer provided by Dirección General de Cómputo y Tecnologías de Información y Comunicación (DGTIC), LANCAD-UNAM-DGTIC-141, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We acknowledge the partial financial support from DGAPA, UNAM PAPIIT. G.G.-R. thanks CONACyT for the scholarship 749523/857743.

REFERENCES

- (1) WHO. *Schizophrenia*; World Health Organization, 2019.
- (2) McKinzie, D. L.; Bymaster, F. P. Muscarinic Mechanisms in Psychotic Disorders. In *Novel Antischizophrenia Treatments*; Geyer, M., Gross, G., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2012.
- (3) Raedler, T. J.; Tandon, R. Cholinergic Mechanisms in Schizophrenia: Current Concepts. *Curr. Psychos. Ther. Rep.* **2006**, *4*, 20–26.
- (4) Isberg, V.; Mordalski, S.; Munk, C.; Rataj, K.; Harpsøe, K.; Hauser, A. S.; Vroling, B.; Bojarski, A. J.; Vriend, G.; Gloriam, E. GPCRdb: An Information System for G Protein-Coupled Receptors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D356–D364.
- (5) Wacker, D.; Stevens, R. C.; Roth, B. L. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell* **2017**, *170*, 414–427.
- (6) Odoemelam, C. S.; Percival, B.; Wallis, H.; Chang, M.-W.; Ahmad, Z.; Scholey, D.; Burton, E.; Williams, I. H.; Kamerlin, C. L.; Wilson, P. B. G-Protein Coupled Receptors: Structure and Function in Drug Discovery. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 36337.
- (7) Messer, W. S. The Utility of Muscarinic Agonists in the Treatment of Alzheimer's Disease. *J. Mol. Neurosci.* **2002**, *19*, 187–193.
- (8) Thal, D. M.; Sun, B.; Feng, D.; Nawaratne, V.; Leach, K.; Felder, C. C.; Bures, M. G.; Evans, D. A.; Weis, W. I.; Bachhawat, P.; Kobilka, T. S.; Sexton, P. M.; Kobilka, B. K.; Christopoulos, A. Crystal Structures of the M1 and M4 Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Nature* **2016**, *531*, 335–340.
- (9) Chew, M. L.; Mulsant, B. H.; Pollock, B. G.; Lehman, M. E.; Greenspan, A.; Kirshner, M. A.; Bies, R. R.; Kapur, S.; Gharabawi, G. A Model of Anticholinergic Activity of Atypical Antipsychotic Medications. *Schizophr. Res.* **2006**, *88*, 63–72.
- (10) Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Guo, A. C.; Lo, E. J.; Marcu, A.; Grant, J. R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; Assempour, N.; Iynkkaran, I.; Liu, Y.; Maciejewski, A.; Gale, N.; Wilson, A.; Chin, L.; Cummings, R.; Le, D.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M. DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D1074–D1082.
- (11) Sur, C.; Mallorga, P. J.; Wittmann, M.; Jacobson, M. A.; Pascarella, D.; Williams, J. B.; Brandish, P. E.; Pettibone, D. J.; Scolnick, E. M.; Conn, P. J. N-Desmethylozapine, an Allosteric Agonist at Muscarinic 1 Receptor, Potentiates N-Methyl-D-Aspartate Receptor Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 13674–13679.
- (12) Davies, M. A.; Compton-Toth, B. A.; Hufeisen, S. J.; Meltzer, H. Y.; Roth, B. L. The Highly Efficacious Actions of N-Desmethylozapine at Muscarinic Receptors Are Unique and Not a Common Property of Either Typical or Atypical Antipsychotic Drugs: Is M1 Agonism a Pre-Requisite for Mimicking Clozapine's Actions? *Psychopharmacology* **2005**, *178*, 451–460.
- (13) Spalding, T. A.; Ma, J.-N.; Ott, T. R.; Friberg, M.; Bajpai, A.; Bradley, S. R.; Davis, R. E.; Brann, M. R.; Burstein, E. S. Structural Requirements of Transmembrane Domain 3 for Activation by the M1 Muscarinic Receptor Agonists AC-42, AC-260584, Clozapine, and N-Desmethylozapine: Evidence for Three Distinct Modes of Receptor Activation. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1974–1983.
- (14) Goode-Romero, G.; Winnberg, U.; Domínguez, L.; Ibarra, I. A.; Vargas, R.; Winnberg, E.; Martínez, A. New Classification of Dopaminergic Agents Based on Quantum Chemistry Calculations. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21581.
- (15) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C. J.; Pople, A. *Gaussian 09*, Revision A.08, Wallingford, CT, 2009.
- (16) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-Class Functionals and 12 Other Function. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120*, 215–241.
- (17) Petersson, G. A.; Bennett, A.; Tensfeldt, T. G.; Al-Laham, M. A.; Shirley, W. A.; Mantzaris, J. A Complete Basis Set Model Chemistry. I. The Total Energies of Closed-shell Atoms and Hydrides of the First-row Elements. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2193–2218.
- (18) Petersson, G. A.; Al-Laham, M. A. A Complete Basis Set Model Chemistry. II. Open-shell Systems and the Total Energies of the First-row Atoms. *J. Chem. Phys.* **1991**, *94*, 6081–6090.
- (19) McLean, A. D.; Chandler, G. S. Contracted Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations. I. Second Row Atoms, Z=11–18. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 5639–5648.
- (20) Krishnan, R.; Binkley, J. S.; Seeger, R.; Pople, J. A. Self-consistent Molecular Orbital Methods. XX. A Basis Set for Correlated Wave Functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650–654.
- (21) Marenich, A. V.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6378–6396.
- (22) Kim, S.; Thiessen, P. A.; Bolton, E. E.; Chen, J.; Fu, G.; Gindulyte, A.; Han, L.; He, J.; He, S.; Shoemaker, B. A.; Wang, J.; Yu, B.; Zhang, J.; Bryant, S. H. PubChem Substance and Compound Databases. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1202–D1213.
- (23) Geerlings, P.; Chamorro, E.; Chattaraj, P. K.; De Proft, F.; Gázquez, J. L.; Liu, S.; Morell, C.; Toro-Labbé, A.; Vela, A.; Ayers, P. Conceptual Density Functional Theory: Status, Prospects, Issues. *Theor. Chem. Acc.* **2020**, *139*, 36.
- (24) Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. Conceptual Density Functional Theory. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793–1874.
- (25) Chermette, H. Chemical Reactivity Indexes in Density Functional Theory. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 129–154.
- (26) Liu, S.-B. Conceptual Density Functional Theory and Some Recent Developments. *Acta Phys. Chim. Sin.* **2009**, *25*, 590.
- (27) Wang, B.; Rong, C.; Chattaraj, P. K.; Liu, S. A Comparative Study to Predict Regioselectivity, Electrophilicity and Nucleophilicity with Fukui Function and Hirshfeld Charge. *Theor. Chem. Acc.* **2019**, *138*, 124.
- (28) Gázquez, J. L.; Cedillo, A.; Vela, A. Electrodonating and Electroaccepting Powers. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1966–1970.
- (29) Gázquez, J. L. Perspectives on the Density Functional Theory of Chemical Reactivity. *J. Mex. Chem. Soc.* **2008**, *52*, 3–10.
- (30) Martínez, A.; Rodríguez-Gironés, M. A.; Barbosa, A.; Costas, M. Donor Acceptor Map for Carotenoids, Melatonin and Vitamins. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 9037–9042.
- (31) Martínez, A. Donor Acceptor Map of Psittacofulvins and Anthocyanins: Are They Good Antioxidant Substances? *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 4915–4921.
- (32) Martínez, A.; Vargas, R. A component of the puzzle, when attempting to understand antipsychotics: a theoretical study of chemical reactivity indexes. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2018**, *1*, 1–8.
- (33) Martínez, A.; Ibarra, I. A.; Vargas, R. A quantum chemical approach representing a new perspective concerning agonist and antagonist drugs in the context of schizophrenia and Parkinson's disease. *PLoS One* **2019**, *14*, No. e0224691.
- (34) Martínez, A. Dopamine antagonists for the treatment of drug addiction: PF-4363467 and related compounds. *Eur. J. Chem.* **2020**, *11*, 84–90.

- (35) Martínez, A. Electron donor-acceptor capacity of selected pharmaceuticals. *Antioxidants* **2021**, *10*, 979.
- (36) Castillo, R. M.; Ramos, E.; Martínez, A. Interaction of graphene with antipsychotic drugs: is there any charge transfer process? *J. Comput. Chem.* **2021**, *42*, 60–65.
- (37) Goode-Romero, G.; Dominguez, L.; Vargas, R.; Ibarra, I. A.; Martínez, A. Analyzing the Interaction Energy between Dopaminergic Agents and DRD2: Is There Any Difference between Risperidone (Antagonist), Aripiprazole (Partial Agonist) and Pramipexole (Agonist)? *Comput. Theor. Chem.* **2021**, *1197*, 113125.
- (38) Cerón-Carrasco, J. P.; Bastida, A.; Requena, A.; Zúñiga, J.; Miguel, B. Theoretical Study of the Reaction of β -Carotene with the Nitrogen Dioxide Radical in Solution. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 4366–4372.
- (39) Alfaro, R. A. D.; Gómez-Sandoval, Z.; Mammìno, L. Evaluation of the Antiradical Activity of Hyperjovitol-A Utilizing Donor-Acceptor Maps. *J. Mol. Model.* **2014**, *20*, 2337.
- (40) García-Hernández, E.; Garza, J. Reactivity Sites in Dopamine Depend on Its Intramolecular Hydrogen Bond. *J. Mex. Chem. Soc.* **2017**, *61*, 222.
- (41) Semeniuk, A.; Kalinowska-Tluscik, J.; Nitek, W.; Oleksyn, B. J. Intermolecular Interactions in Crystalline Hydroxychloroquine Sulfate in Comparison with Those in Selected Antimalarial Drugs. *J. Chem. Crystallogr.* **2008**, *38*, 333–338.
- (42) Coppola, M.; Mondola, R. Potential Action of Betel Alkaloids on Positive and Negative Symptoms of Schizophrenia: A Review. *Nord. J. Psychiatr.* **2012**, *66*, 73–78.
- (43) Volpato, D.; Holzgrabe, U. Designing Hybrids Targeting the Cholinergic System by Modulating the Muscarinic and Nicotinic Receptors: A Concept to Treat Alzheimer's Disease. *Molecules* **2018**, *23*, 3230.
- (44) Sirois, F. J. Pilocarpine Psychosis. *Psychosomatics* **2005**, *46*, 88.
- (45) Nooreen, M.; Habeeb, A.; Fatima, Z. Atropine Induced Psychosis: A Consequence during the Organophosphate Poisoning Treatment, 2018.
- (46) Ananth, J. V.; Jain, R. C. Benztropine Psychosis. *Can. Psychiatr. Assoc. J.* **1973**, *18*, 409–414.
- (47) Weinstein, M. R.; Fischer, A. Benztropine Toxicity and Atropine Psychosis. *J. Am. Med. Assoc.* **1972**, *220*, 1616–1617.
- (48) Rajappa, N.; Patra, S.; Bhalsing, S.; Lune, A. A Case of Acute Psychosis Induced by Topical Cyclopentolate Eye Drops in an Elderly Patient. *Med. J. D Y Patil Univ.* **2014**, *7*, 68.
- (49) Gulsun, M.; Pinar, M.; Sabanci, U. Psychotic Disorder Induced by Oxybutynin: Presentation of Two Cases. *Clin. Drug Invest.* **2006**, *26*, 603–606.
- (50) Štuhec, M. Solifenacin-Induced Delirium and Hallucinations. *Gen. Hosp. Psychiatr.* **2013**, *35*, 682.e3–682.e4.
- (51) Kilic, O.; Ozturk, M.; Ata Gozcelioglu, E. Tropicamide Ophthalmic Solution Reduces Clozapine-Induced Sialorrhea: A Case Report. *Psychiatry Clin. Psychopharmacol.* **2017**, *27*, 431–434.
- (52) Sauerberg, P.; Olesen, P. H. Method of Treating Glaucoma Using Oxadiazolyl or Thiadiazolyl Tetrahydropyridines. U.S. Patent 5,559,138 A, 1996.
- (53) Liu, S.; Rong, C.; Lu, T. Information Conservation Principle Determines Electrophilicity, Nucleophilicity, and Regioselectivity. *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 3698–3704.
- (54) Wang, B.; Rong, C.; Chattaraj, P. K.; Liu, S. A comparative study to predict regioselectivity, electrophilicity and nucleophilicity with Fukui function and Hirshfeld charge. *Theor. Chem. Acc.* **2019**, *138*, 124.
- (55) Rong, C.; Wang, B.; Zho, D.; Liu, S. Information-theoretic approach in density functional theory and its recent applications to chemical problems. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2020**, *10*, No. e1461.
- (56) Manallack, D. T. The PKa Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspect. Med. Chem.* **2007**, *1*, 1177391X0700100.
- (57) Meloun, M.; Černohorský, P. Thermodynamic Dissociation Constants of Isocaine, Physostigmine and Pilocarpine by Regression Analysis of Potentiometric Data. *Talanta* **2000**, *52*, 931–945.

1. Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev.* 2011;7: 137–152.
2. Querfurth HW, Laferla FM. Alzheimer's Disease. *Clin Trials.* 2010;9: 329–344.
3. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacol Reports.* 2015;67: 195–203. doi:10.1016/j.pharep.2014.09.004
4. Mucke L. Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature.* 2009;461: 895–7. doi:10.1038/461895a
5. Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G. Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid- β peptide and associated proteins. *Peptides.* 2002;23: 1343–1350. doi:10.1016/S0196-9781(02)00070-0
6. Penazzi L, Tackenberg C, Ghori A, Golovyashkina N, Niewidok B, Selle K, et al. A β -mediated spine changes in the hippocampus are microtubule-dependent and can be reversed by a subnanomolar concentration of the microtubule-stabilizing agent epothilone D. *Neuropharmacology.* 2016;105: 84–95. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.01.002
7. Alzheimer's Disease International P. The global voice on dementia. In: *Dementia facts & figures.* 2021.
8. López-López A, Gelpi E, Lopategui DM, Vidal-taboada JM. Association of the CX3CR1 -V249I Variant with Neurofibrillary Pathology Progression in Late-Onset Alzheimer ' s Disease. *Mol Neurobiol.* 2017. doi:10.1007/s12035-017-0489-3
9. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer.* 2015;113: 365–371. doi:10.1038/bjc.2015.233
10. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole G, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2000;21: 383–421.
11. Ishii T, Haga S. Identification of components of immunoglobulins in senile palques by means of fluorescent antibody technique. *Acta Neuropathol.* 1975;32: 157–162.
12. Zani I, Stephen S, Mughal N, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft S, et al. Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells.* 2015;4: 178–201. doi:10.3390/cells4020178
13. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Domae N, Imai T. Fractalkine and vascular injury. *TRENDS Immunol.* 2001;22: 602–607.
14. Heneka MT. T cells make a home in the degenerating brain. *Nature.* 2020;577: 322–323.
15. Abdel-Haq R, Schlachetzki CM, Glass CK, Mazmanian SK. Microbiome-microglia connections

-
- via the gut-brain axis. *J Exp Med*. 2019;216: 41–59.
16. Ferreira LSS, Fernandes CS, Vieira MNN, De Felice FG. Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*. 2018;12.
 17. Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang H-Y, Ahima RS, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol*. 2018;14: 168–181.
 18. Marchant NL, Lovland LR, Jones R, Binette AP, Gonneaud J, Arenaza-Urquijo EM, et al. Repetitive negative thinking is associated with amyloid, tau, and cognitive decline. *Alzheimer's Dement*. 2020;16: 1054– 1064.
 19. Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*. 2005;436: 801–806.
 20. AlzOrg. Stages of Alzheimer's. In: Alzheimer's Association. 2018.
 21. Khan UA, Liu L, Provenzano FA, Berman DE, Profaci CP, Sloan R, et al. Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2014;17: 304–311.
 22. Mathieu-Kia AM, Fan L-Q, Kreek MJ, Simon EJ, Hiller JM. μ -, δ - and κ -opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of Alzheimer's disease patients. *Brain Res*. 2001;893: 121–134.
 23. Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* (80-). 1992;258: 304–307.
 24. Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, et al. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron*. 2006;49: 671–682.
 25. Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of Tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3: 1–25. doi:10.1101/cshperspect.a006247
 26. Arendt T, Stieler JT, Holzer M. Tau and tauopathies. *Brain Res Bull*. 2016;126: 238–292. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.08.018
 27. Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18: 281–298.
 28. Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2014;129: 756–769.
 29. Palop JJ, Mucke L. Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from

-
- synapses toward neural networks. *NatNeurosci.* 2010;13: 812–818. doi:10.1038/nn.2583
30. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;55: 6448–6453.
 31. Xiao Y, Ma B, McElheny D, Parthasarathy S, Long F, Hoshi M, et al. A β (1-42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22: 499–505. doi:10.1038/nsmb.2991
 32. Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2013;501: 45–51. doi:10.1038/nature12481
 33. Yan T, Jingjing L, Gao J, Wang L, Fujioka H, The Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative O, et al. FAM222A encodes a protein which accumulates in plaques in Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2020;11: 1–16.
 34. Robinson S, Noone D, Krill J, Halliday G. Most amyloid plaques contain ferritin-rich cells. *Alzheimer's Res.* 1995;1: 191–196.
 35. Grundke-Iqbal I, Fleming J, Tung Y, Lassmann H, Iqbal K, Joshi J. Ferritin is a component of the neuritic (senile) plaque in Alzheimer dementia. *Acta Neuropathol.* 1990;81: 105–110.
 36. Snow A, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato M, Suzuki S. The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic agiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1988;133: 456–463.
 37. Ji HF, Zhang HY. A new strategy to combat Alzheimer's disease. Combining radical-scavenging potential with metal-protein-attenuating ability in one molecule. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2005;15: 21–24. doi:10.1016/j.bmcl.2004.10.047
 38. Esteve P, Rueda-Carrasco J, Mateo MI, Martin-Bermejo MJ, Draffin J, Pereyra G, et al. Elevated levels of Secreted-Frizzled-Related-Protein 1 contribute to Alzheimer's disease pathogenesis. *Nat Neurosci.* 2019;22: 1258–1268.
 39. Lee M, Lee Y, Song J, Lee J, Chang S-Y. Tissue-specific role of CX3CR1 expressing immune cells and their relationships with human disease. *Immune Netw.* 2018;18: e5.
 40. Bhaskar K, Konerth M, Kokiko-Cochran O, Cardona A, Ransohoff R, Lamb B. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron.* 2010;68: 19–31.
 41. Garton K, Gough P, Blobel C, Murphy G, Greaves D, Dempsey P. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem.* 2001;276: 37993–38001.
 42. Buckingham SD, Jones AK, Brown LA, Sattelle DB. Nicotinic acetylcholine receptor signalling: Roles in alzheimer's disease and amyloid neuroprotection. *Pharmacol Rev.* 2009;61: 39–61.

doi:10.1124/pr.108.000562

43. Carroll CM, Li YM. Physiological and pathological roles of the γ -secretase complex. *Brain Res Bull.* 2016;126: 199–206. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.04.019
44. Johns Hopkins University, Baltimore M. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. In: ALZHEIMER DISEASE 3. 2017 p. MIM Number: 607822.
45. Dominguez L, Foster L, Straub JE, Thirumalai D. Impact of membrane lipid composition on the structure and stability of the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113.
46. Aguayo-Ortiz R, Straub JE, Domínguez L. Influence of membrane lipid composition on the structure and activity of γ -secretase. *Phys Chem Chem Phys.* 2018.
47. Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor- α by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* 1989;491: 394–397.
48. Norris GT, Kipnis J. Immune Cells and CNS physiology: Microglia and beyond. *J Exp Med.* 2018;216: 60–70.
49. Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, et al. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci.* 2008;11: 1392–1401.
50. Psachoulia K, Jamen F, Young K, Richardson W. Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain. *Neuron Glia Biol.* 2009;5: 57–67.
51. Xu Z-X, Kim GH, Tan J-W, Riso AE, Sun Y, Xu EY, et al. Elevated protein synthesis in microglia causes autism-like synaptic and behavioral aberrations. *Nat Commun.* 2020;11: 1797. doi:10.1038/s41467-020-15530-3
52. Ishizuka K, Fujita Y, Kawabata T, Kimura H, Iyawama Y, Inada T, et al. Rare genetic variants in CX3CR1 and their contribution to the increased risk of schizophrenia and autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry.* 2017;7: e1184.
53. Ashwell K. Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Dev Brain Res.* 1990;55: 219–230.
54. Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia.* 2007;55: 233–238.
55. Thériault P, Elali A, Rivest S. The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2015;7: 1–10. doi:10.1186/s13195-015-0125-2
56. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2014;10: 217–224.

57. Marin-Teva J, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*. 2004;41: 535–547.
58. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*. 2004;4: 1–4. doi:10.1186/1742-2094-1-14
59. Odoemelam CS, Percival B, Wallis H, Chang M-W, Ahmad Z, Scholey D, et al. G-Protein coupled receptors: structure and function in drug discovery. *RSC Adv*. 2020;10: 36337.
60. Constanzi S, Wang K. The GPCR Crystallography Boom: Providing an Invaluable Source of Structural Information and Expanding the Scope of Homology Modeling. In: Filizola M, editor. *G Protein-Coupled Receptors - Modeling and Simulation*. New York: Springer Dordrecht Heidelberg; 2014. pp. 3–13.
61. Latorraca NR, Venkatakrisnan AJ, Dror RO. GPCR Dynamics : Structures in Motion. *Chem Rev*. 2017;117: 139–155. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00177
62. Wacker D, Stevens RC, Roth BL. How Ligands Illuminate GPCR Molecular Pharmacology. *Cell*. 2017;170: 414–427.
63. Isberg V, Mordalski S, Munk C, Rataj K, Harpsøe K, Hauser AS, et al. GPCRdb : an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res*. 2017;44: 356–364. doi:10.1093/nar/gkv1178
64. Thathiah A, De Strooper B. The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12: 73–87.
65. Vilardaga J-P. Studying ligand efficacy at G protein-coupled receptors using FRET. *Methods Mol Biol*. 2011;756: 133–148. doi:10.1007/978-1-61779-160-4_6
66. Harrison C, Traynor JR. The [35S]GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci*. 2003;74: 489–508. doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.07.005
67. Park PS-H, Lodowski DT, Palczewski K. Activation of G-Protein-Coupled Receptors: Beyond Two-State Models and Tertiary Conformational Changes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48: 107–141.
68. Dror RO, Arlow DH, Maragakis P, Mildorf TJ, Pan AC, Xu H, et al. Activation mechanism of the β2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108: 18684–18689.
69. Deupi X, Kobilka B. Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiology*. 2010;25 5: 293–303.
70. Fuxe K, Marcellino D, Borroto-Escuela DO, Frankowska M, Ferraro L, Guidolin D, et al. The changing world of G protein-coupled receptors: from monomers to dimers and receptor mosaics with allosteric receptor–receptor interactions. *J Recept Signal Transduct*. 2010;30: 272–283. doi:10.3109/10799893.2010.506191

71. Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA. Heterodimerization of μ and δ Opioid Receptors: A Role in Opiate Synergy. *J Neurosci*. 2000;20: RC110 LP-RC110. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-22-j0007.2000
72. George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, et al. Oligomerization of β - and γ -Opioid Receptors: GENERATION OF NOVEL FUNCTIONAL PROPERTIES *. *J Biol Chem*. 2000;275: 26128–26135. doi:10.1074/jbc.M000345200
73. Levac BAR, O'Dowd BF, George SR. Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Curr Opin Pharmacol*. 2002;2: 76–81. doi:10.1016/s1471-4892(02)00124-8
74. Portoghese PS, Ronsisvalle G, Larson DL, Yim CB, Sayre LM, Takemori AE. Opioid agonist and antagonist bivalent ligands as receptor probes. *Life Sci*. 1982;31: 1283–1286. doi:10.1016/0024-3205(82)90362-9
75. Erez M, Takemori AE, Portoghese PS. Narcotic antagonistic potency of bivalent ligands which contain beta-naltrexamine. Evidence for bridging between proximal recognition sites. *J Med Chem*. 1982;25: 847–849. doi:10.1021/jm00349a016
76. Asher WB, Geggier P, Holsey MD, Gilmore GT, Pati AK, Meszaros J, et al. Single-molecule FRET imaging of GPCR dimers in living cells. *Nat Methods*. 2021;18: 397–405. doi:10.1038/s41592-021-01081-y
77. Fujita W, Gomes I, Devi LA. Revolution in GPCR signalling: opioid receptor heteromers as novel therapeutic targets: IUPHAR review 10. *Br J Pharmacol*. 2014;171: 4155–4176. doi:10.1111/bph.12798
78. Möller J, Isbilir A, Sungkaworn T, Osberg B, Karathanasis C, Sunkara V, et al. Single-molecule analysis reveals agonist-specific dimer formation of μ -opioid receptors. *Nat Chem Biol*. 2020;16: 946–954. doi:10.1038/s41589-020-0566-1
79. Louboutin JP, Strayer DS. Relation Between the Chemokine Receptor CCR5 and Microglia in Neurological Disorders: Consequences of Targeting CCR5 on Neuroinflammation, Neuronal Death and Regeneration in a Model of Epilepsy. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*. 2013;12: 815–829.
80. al-Aoukaty A, Schall TJ, Maghazachi AA. Differential coupling of CC chemokine receptors to multiple heterotrimeric G proteins in human interleukin-2-activated natural killer cells. *Blood*. 1996;87: 4255–4260.
81. Zhao J, Ma L, Wu YL, Wang P, Hu W, Pei G. Chemokine receptor CCR5 functionally couples to inhibitory G proteins and undergoes desensitization. *J Cell Biochem*. 1998;71: 36–45. doi:10.1002/(sici)1097-4644(19981001)71:1<36::aid-jcb4>3.0.co;2-2
82. UniProt Consortium T. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49: D480–D489. doi:10.1093/nar/gkaa1100

83. Schnur E, Noah E, Ayzenshtat I, Sargsyan H, Inui T, Ding F-X, et al. The conformation and orientation of a 27-residue CCR5 peptide in a ternary complex with HIV-1 gp120 and a CD4-mimic peptide. *J Mol Biol.* 2011;410: 778–797. doi:10.1016/j.jmb.2011.04.023
84. Tan Q, Zhu Y, Li J, Chen Z, Han GW, Kufareva I, et al. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science* (80-). 2013;341: 1387–1390.
85. Zheng Y, Han GW, Abagyan R, Wu B, Stevens RC, Cherezov V, et al. Structure of CC chemokine receptor 5 with a potent chemokine antagonist reveals mechanisms of chemokine recognition and molecular mimicry by HIV. *Immunity.* 2017;46: 1005–1017.
86. Kim S, Hahn YK, Podhaizer EM, McLane VD, Zou S, Hauser KF, et al. A central role for glial CCR5 in directing the neuropathological interactions of HIV-1 Tat and opiates. *J Neuroinflammation.* 2018;15: 1–15.
87. Gaertner H, Lebeau O, Borlat I, Cerini F, Dufour B, Kuenzi G, et al. Highly potent HIV inhibition: engineering a key anti-HIV structure from PSC-RANTES into MIP-1 beta/CCL4. *Protein Eng Des Sel.* 2008;21: 65–72.
88. Hartley O, Gaertner H, Wilken J, Thompson D, Fish R, Ramos A, et al. Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: Development of highly potent HIV entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: 16460 LP – 16465. doi:10.1073/pnas.0404802101
89. Mi GS, Hee PM, Mun YH, Bae HS, Wan OK, Ju SD, et al. CCR5 knockout suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Oncotarget.* 2016;7: 15382–15393.
90. Li F, Cheng B, Cheng J, Wang D, Li H, He X. CCR5 blockade promotes M2 macrophage activation and improves locomotor recovery after spinal cord injury in mice. *Inflammation.* 2015;38: 126–133.
91. Joy MT, Ben Assayag E, Shabashov-Stone D, Liraz, Zaltsman S, Mazzitelli J, Arenas M, et al. CCR5 is a therapeutic target for recovery after stroke and traumatic brain injury. *Cell.* 2019;176: 1143–1157.
92. Freria CM, Hall JCE, Wei P, Guan Z, McTigue DM, Popovich PG. Deletion of the fractalkine receptor, CX3CR1, improves endogenous repair, axon sprouting and synaptogenesis after spinal cord injury in mice. *J Neurosci.* 2017;37: 3568–3587.
93. Käufer C, Chhatbar C, Bröer S, Waltl I, Ghita L, Gerhauser I, et al. Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 regulate viral encephalitis-induced hippocampal damage but not seizures. *Proc Natl Acad Sci.* 2018;115: E8929–E8938.
94. Ferain T, Hoveyda H, Ooms F, Schols D, Bernard J, Fraser G. Agonist-induced internalization of CC chemokine receptor 5 as a mechanism to inhibit HIV replication. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;337: 655–662.

95. Scholten DJ, Canals M, Maussang D, Roumen L, Smit MJ, Wijtmans M, et al. Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *Br J Pharmacol*. 2012;165: 1617–1643.
96. Takeuchi T, Kameda H. What is the future of CCR5 antagonists in rheumatoid arthritis? *Arthritis research & therapy*. 2012. p. 114. doi:10.1186/ar3775
97. Peng P, Chen H, Zhu Y, Wang Z, Li J, Luo RH, et al. Structure-based design of 1-heteroaryl-1,3-propanediamine derivatives as a novel series of CC-chemokine receptor 5 antagonists. *J Med Chem*. 2018;61: 9621–9636.
98. Garcia-Perez J, Rueda P, Staropoli I, Kellenberger E, Alcami J, Arenzana-Seisdedos F, et al. New Insights into the Mechanisms whereby Low Molecular Weight CCR5 Ligands Inhibit HIV-1 Infection. *J Biol Chem*. 2011;286: 4978–4990. doi:10.1074/jbc.M110.168955
99. Strizki JM, Tremblay C, Xu S, Wojcik L, Wagner N, Gonsiorek W, et al. Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49: 4911–4919. doi:10.1128/AAC.49.12.4911-4919.2005
100. Shin N, Solomon K, Zhou N, Wang KH, Garlapati V, Thomas B, et al. Identification and characterization of INCB9471, an allosteric noncompetitive small-molecule antagonist of C-C chemokine receptor 5 with potent inhibitory activity against monocyte migration and HIV-1 infection. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;338: 228–239. doi:10.1124/jpet.111.179531
101. Xue C-B, Chen L, Cao G, Zhang K, Wang A, Meloni D, et al. Discovery of INCB9471, a Potent, Selective, and Orally Bioavailable CCR5 Antagonist with Potent Anti-HIV-1 Activity. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1: 483–487. doi:10.1021/ml1001536
102. Maeda K, Yoshimura K, Shibayama S, Habashita H, Tada H, Sagawa K, et al. Novel low molecular weight spirodiketopiperazine derivatives potently inhibit R5 HIV-1 infection through their antagonistic effects on CCR5. *J Biol Chem*. 2001;276: 35194–35200. doi:10.1074/jbc.M105670200
103. Currier J, Lazzarin A, Sloan L, Clumeck N, Slims J, McCarty D, et al. Antiviral activity and safety of aplaviroc with lamivudine/zidovudine in HIV-infected, therapy-naive patients: the ASCENT (CCR102881) study. *Antivir Ther*. 2008;13: 297–306.
104. Nichols WG, Steel HM, Bonny T, Adkison K, Curtis L, Millard J, et al. Hepatotoxicity observed in clinical trials of aplaviroc (GW873140). *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52: 858–865. doi:10.1128/AAC.00821-07
105. Imamura S, Ichikawa T, Nishikawa Y, Kanzaki N, Takashima K, Niwa S, et al. Discovery of a piperidine-4-carboxamide CCR5 antagonist (TAK-220) with highly potent Anti-HIV-1 activity. *J Med Chem*. 2006;49: 2784–2793. doi:10.1021/jm051034q
106. Tremblay CL, Giguel F, Guan Y, Chou T-C, Takashima K, Hirsch MS. TAK-220, a novel small-

- molecule CCR5 antagonist, has favorable anti-human immunodeficiency virus interactions with other antiretrovirals in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49: 3483–3485. doi:10.1128/AAC.49.8.3483-3485.2005
107. Cumming JG, Tucker H, Oldfield J, Fielding C, Highton A, Faull A, et al. Balancing hERG affinity and absorption in the discovery of AZD5672, an orally active CCR5 antagonist for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22: 1655–1659. doi:10.1016/j.bmcl.2011.12.117
108. Gerlag DM, Hollis S, Layton M, Vencovský J, Szekanecz Z, Braddock M, et al. Preclinical and clinical investigation of a CCR5 antagonist, AZD5672, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2010;62: 3154–3160. doi:10.1002/art.27652
109. Ray P, Wangzhou A, Ghneim N, Yousuf M, Paige C, Tavares-Ferreira D, et al. A Pharmacological Interactome between COVID-19 Patient Samples and Human Sensory Neurons Reveals Potential Drivers of Neurogenic Pulmonary Dysfunction. SSRN. 2020. p. 3581446. doi:10.2139/ssrn.3581446
110. Anstee QM, Neuschwander-Tetri BA, Wong VW-S, Abdelmalek MF, Younossi ZM, Yuan J, et al. Cenicriviroc for the treatment of liver fibrosis in adults with nonalcoholic steatohepatitis: AURORA Phase 3 study design. *Contemp Clin Trials.* 2020;89: 105922. doi:10.1016/j.cct.2019.105922
111. Tacke F. Cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2018;27: 301–311. doi:10.1080/13543784.2018.1442436
112. Zhang X, Haney KM, Richardson AC, Wilson E, Gewirtz DA, Ware JL, et al. Anibamine, a natural product CCR5 antagonist, as a novel lead for the development of anti-prostate cancer agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010/06/08. 2010;20: 4627–4630. doi:10.1016/j.bmcl.2010.06.003
113. Lefranc M-P, Giudicelli V, Duroux P, Jabado-Michaloud J, Folch G, Aouinti S, et al. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic Acids Res.* 2015;43: D413-22. doi:10.1093/nar/gku1056
114. Abel S, van der Ryst E, Rosario MC, Ridgway CE, Medhurst CG, Taylor-Worth RJ, et al. Assessment of the pharmacokinetics, safety and tolerability of maraviroc, a novel CCR5 antagonist, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2008;65 Suppl 1: 5–18. doi:10.1111/j.1365-2125.2008.03130.x
115. FDA. NDA 22-128 SELZENTRY (maraviroc). 2007. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022128s000_MedR.pdf
116. NIDDK. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. In: LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD).

- [Internet]. 2019. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548266/>
117. Kiefel JM, Rossi GC, Bodnar RJ. Medullary μ and δ opioid receptors modulate mesencephalic morphine analgesia in rats. *Brain Res.* 1993;624: 151–161. doi:[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90073-V](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90073-V)
 118. Stevens CW. The evolution of vertebrate opioid receptors. *Front Biosci (Landmark Ed.)* 2009;14: 1247–1269. doi:10.2741/3306
 119. Claff T, Yu J, Blais V, Patel N, Martin C, Wu L, et al. Elucidating the active δ -opioid receptor crystal structure with peptide and small-molecule agonists. *Sci Adv.* 2019;5: eaax9115. doi:10.1126/sciadv.aax9115
 120. Quock RM, Burkey TH, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell SM, et al. The δ -Opioid Receptor: Molecular Pharmacology, Signal Transduction, and the Determination of Drug Efficacy. *Pharmacol Rev.* 1999;51: 503 LP – 532. Available: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/51/3/503.abstract>
 121. Diez M, Danner S, Frey P, Sommer B, Staufienbiel M, Wiederhold K-H, et al. Neuropeptide alterations in the hippocampal formation and cortex of transgenic mice overexpressing β -amyloid precursor protein (APP) with the Swedish double mutation (APP23). *Neurobiol Dis.* 2003;14: 579–594. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.08.003>
 122. Brantl V, Teschemacher H, Henschen A, Lottspeich F. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1979;360: 1211–1216. doi:10.1515/bchm2.1979.360.2.1211
 123. Henschen A, Lottspeich F, Brantl V, Teschemacher H. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1979;360: 1217–1224.
 124. Hirata H, Sonoda S, Agui S, Yoshida M, Ohinata K, Yoshikawa M. Rubiscolin-6, a delta opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating sigma1 and dopamine D1 receptors. *Peptides.* 2007;28: 1998–2003. doi:10.1016/j.peptides.2007.07.024
 125. Cassell RJ, Mores KL, Zerfas BL, Mahmoud AH, Lill MA, Trader DJ, et al. Rubiscolins are naturally occurring G protein-biased delta opioid receptor peptides. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2019;29: 450–456. doi:<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.12.013>
 126. Erspamer V, Melchiorri P, Falconieri-Erspamer G, Negri L, Corsi R, Severini C, et al. Deltorphins: a family of naturally occurring peptides with high affinity and selectivity for delta opioid binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86: 5188–5192. doi:10.1073/pnas.86.13.5188
 127. Bondanelli M, Ambrosio MR, Franceschetti P, Guerrini R, Valentini A, degli Uberti EC. Effect

-
- of delta-opioid receptor agonist deltorphin on circulating concentrations of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in healthy fertile women. *Hum Reprod.* 1998;13: 1159–1162. doi:10.1093/humrep/13.5.1159
128. degli Uberti EC, Trasforini G, Salvadori S, Margutti A, Tomatis R, Rotola C, et al. Stimulatory effect of dermorphin, a new synthetic potent opiate-like peptide, on human growth hormone secretion. *Neuroendocrinology.* 1983;37: 280–283. doi:10.1159/000123559
129. Lottspeich F, Henschen A, Brantl V, Teschemacher H. Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). III. Synthetic peptides corresponding to components from bovine casein peptone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1980;361: 1835–1839. doi:10.1515/bchm2.1980.361.2.1835
130. Grecksch G, Schweigert C, Matthies H. Evidence for analgesic activity of beta-casomorphin in rats. *Neurosci Lett.* 1981;27: 325–328. doi:10.1016/0304-3940(81)90451-1
131. Brantl V, Teschemacher H, Bläsigg J, Henschen A, Lottspeich F. Opioid activities of beta-casomorphins. *Life Sci.* 1981;28: 1903–1909. doi:10.1016/0024-3205(81)90297-6
132. Woodford KB. Casomorphins and Gliadorphins Have Diverse Systemic Effects Spanning Gut, Brain and Internal Organs. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18. doi:10.3390/ijerph18157911
133. Ashkenazi A, Idar D, Simantov R. Effect of Naloxone on the Mitogenic Activity of Pure Gliadin-derived Peptides. *Pediatr Res.* 1986;20: 695. doi:10.1203/00006450-198607000-00057
134. Sun Z, Cade R. Findings in normal rats following administration of gliadorphin-7 (GD-7). *Peptides.* 2003;24: 321–323. doi:https://doi.org/10.1016/S0196-9781(03)00043-3
135. Yang S, Yunden J, Sonoda S, Doyama N, Lipkowski AW, Kawamura Y, et al. Rubiscolin, a delta selective opioid peptide derived from plant Rubisco. *FEBS Lett.* 2001;509: 213–217. doi:10.1016/s0014-5793(01)03042-3
136. Yang S, Y. K, M. Y. Effect of rubiscolin, a delta opioid peptide derived from Rubisco, on memory consolidation. *Peptides.* 2003;24: 325–328. doi:10.1016/s0196-9781(03)00044-5
137. Mathieu-Kia A-M, Fan L-Q, Kreek MJ, Simon EJ, Hiller JM. μ -, δ - and κ -opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* 2001;893: 121–134. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03302-3
138. Hirayama S, Iwai T, Higashi E, Nakamura M, Iwamatsu C, Itoh K, et al. Discovery of δ Opioid Receptor Full Inverse Agonists and Their Effects on Restraint Stress-Induced Cognitive Impairment in Mice. *ACS Chem Neurosci.* 2019;10: 2237–2242. doi:10.1021/acchemneuro.9b00067

139. Cai Z, Ratka A. Opioid system and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 2012;14: 91–111.
140. Meilandt W, Yu G-Q, Chin J, Roberson ED, Palop JJ, Wu T, et al. Enkephalin Elevations Contribute to Neuronal and Behavioral Impairments in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 2008;28: 5007–5017.
141. DiCello JJ, Carbone SE, Saito A, Rajasekhar P, Ceredig RA, Pham V, et al. Mu and Delta Opioid Receptors Are Coexpressed and Functionally Interact in the Enteric Nervous System of the Mouse Colon. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020;9: 465–483. doi:10.1016/j.jcmgh.2019.11.006
142. Nagata K, Nagase H, Okuzumi A, Nishiyama C. Delta Opioid Receptor Agonists Ameliorate Colonic Inflammation by Modulating Immune Responses. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/fimmu.2021.730706
143. Pello OM, Martínez-Muñoz L, Parrillas V, Serrano A, Rodríguez-Frade JM, Toro MJ, et al. Ligand stabilization of CXCR4/delta-opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation. *Eur J Immunol.* 2008;38: 537–549. doi:10.1002/eji.200737630
144. Bushlin I, Gupta A, Stockton SDJ, Miller LK, Devi LA. Dimerization with cannabinoid receptors allosterically modulates delta opioid receptor activity during neuropathic pain. *PLoS One.* 2012;7: e49789. doi:10.1371/journal.pone.0049789
145. George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, et al. Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem.* 2000;275: 26128–26135. doi:10.1074/jbc.M000345200
146. Portoghese PS, Lunzer MM. Identity of the putative δ 1-opioid receptor as a δ - κ heteromer in the mouse spinal cord. *Eur J Pharmacol.* 2003;467: 233–234. doi:https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01599-1
147. Turchan J, Przewłocka B, Toth G, Lasoń W, Borsodi A, Przewłocki R. The effect of repeated administration of morphine, cocaine and ethanol on mu and delta opioid receptor density in the nucleus accumbens and striatum of the rat. *Neuroscience.* 1999;91: 971–977. doi:https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00637-X
148. Van Rijn R, Whistler J. The delta1 Opioid Receptor Is a Heterodimer That Opposes the Actions of the delta2 Receptor on Alcohol Intake. *Biol Psychiatry.* 2009;66: 777–784. doi:10.1016/j.biopsych.2009.05.019
149. Cechova K, Lan C, Macik M, Barthes NPF, Jung M, Ulbrich MH. Kappa but not delta or mu opioid receptors form homodimers at low membrane densities. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78: 7557–7568. doi:10.1007/s00018-021-03963-y
150. Toll L, Berzetei-Gurske IP, Polgar WE, Brandt SR, Adapa ID, Rodriguez L, et al. Standard

-
- binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. *NIDA Res Monogr.* 1998;178: 440–466.
151. Goldstein A, Naidu A. Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures. *Mol Pharmacol.* 1989;36: 265–272.
152. Quirion B, Bergeron F, Blais V, Gendron L. The Delta-Opioid Receptor; a Target for the Treatment of Pain. *Front Mol Neurosci.* 2020;13. doi:10.3389/fnmol.2020.00052
153. Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL. Delta opioid receptor analgesia: recent contributions from pharmacology and molecular approaches. *Behav Pharmacol.* 2011;22: 405–414. doi:10.1097/FBP.0b013e32834a1f2c
154. Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol.* 2002;66: 285–306. doi:https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00008-4
155. Conibear AE, Asghar J, Hill R, Henderson G, Borbely E, Tekus V, et al. A Novel G Protein-Biased Agonist at the δ Opioid Receptor with Analgesic Efficacy in Models of Chronic Pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2020;372: 224–236. doi:10.1124/jpet.119.258640
156. Raehal KM, Walker JKL, Bohn LM. Morphine Side Effects in β -Arrestin 2 Knockout Mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314: 1195–1201. doi:10.1124/jpet.105.087254
157. Sherman MM, Ungureanu S, Rey JA. Naltrexone/Bupropion ER (Contrave): Newly Approved Treatment Option for Chronic Weight Management in Obese Adults. *P T.* 2016;41: 164–172.
158. Granier S, Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, Thian FS, Weis WI, et al. Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature.* 2012;485: 400–404. doi:10.1038/nature11111
159. Fenalti G, Giguere PM, Katritch V, Huang X-P, Thompson AA, Cherezov V, et al. Molecular control of δ -opioid receptor signalling. *Nature.* 2014;506: 191–196. doi:10.1038/nature12944
160. Nemoto T, Iihara Y, Hirayama S, Iwai T, Higashi E, Fujii H, et al. Naltrindole derivatives with fluorinated ethyl substituents on the 17-nitrogen as δ opioid receptor inverse agonists. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25: 2927–2930. doi:https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.05.038
161. Iwamatsu C, Hayakawa D, Kono T, Honjo A, Ishizaki S, Hirayama S, et al. Effects of N-Substituents on the Functional Activities of Naltrindole Derivatives for the δ Opioid Receptor: Synthesis and Evaluation of Sulfonamide Derivatives. *Molecules.* 2020;25. doi:10.3390/molecules25173792
162. Comer SD, Hoenicke EM, Sable AI, McNutt RW, Chang KJ, De Costa BR, et al. Convulsive effects of systemic administration of the delta opioid agonist BW373U86 in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;267: 888–895.
163. Jutkiewicz EM, Rice KC, Traynor JR, Woods JH. Separation of the convulsions and antidepressant-like effects produced by the delta-opioid agonist SNC80 in rats.

-
- Psychopharmacology (Berl). 2005;182: 588–596. doi:10.1007/s00213-005-0138-9
164. Jutkiewicz EM. The antidepressant-like effects of delta-opioid receptor agonists. *Mol Interv.* 2006;6: 162–169. doi:10.1124/mi.6.3.7
165. Fenalti G, Zatspein NA, Betti C, Giguere P, Han GW, Ishchenko A, et al. Structural basis for bifunctional peptide recognition at human δ -opioid receptor. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22: 265–268. doi:10.1038/nsmb.2965
166. Schiller PW, Weltrowska G, Nguyen TM, Wilkes BC, Chung NN, Lemieux C. TIPPP[psi]: a highly potent and stable pseudopeptide delta opioid receptor antagonist with extraordinary delta selectivity. *J Med Chem.* 1993;36: 3182–3187. doi:10.1021/jm00073a020
167. Maeda S, Xu J, N Kadji FM, Clark MJ, Zhao J, Tsutsumi N, et al. Structure and selectivity engineering of the M(1) muscarinic receptor toxin complex. *Science.* 2020;369: 161–167. doi:10.1126/science.aax2517
168. Ko IY, Kim DK, Chung KY. Structural analysis of muscarinic acetylcholine receptor type 1 intracellular loop 3 by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Protein Pept Lett.* 2015;22: 94–100. doi:10.2174/0929866521666141003112127
169. Burford NT, Nahorski SR. Muscarinic m1 receptor-stimulated adenylate cyclase activity in Chinese hamster ovary cells is mediated by Gs alpha and is not a consequence of phosphoinositidase C activation. *Biochem J.* 1996;315 (Pt 3: 883–888. doi:10.1042/bj3150883
170. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023;51: D523–D531. doi:10.1093/nar/gkac1052
171. Birdsall NJM, Bradley S, Brown DA, Buckley NJ, Challiss RAJ, Christopoulos A, et al. Acetylcholine receptors (muscarinic) in GtoPdb v.2023.1. *IUPHAR/BPS Guid to Pharmacol CITE.* 2023;2023. doi:10.2218/gtopdb/F2/2023.1
172. NCATS. NCATS Creates Drug Development Data Portal. In: National Center for Advancing. 2020.
173. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2018;46: D1074–D1082.
174. Lurie Y, Wasser SP, Taha M, Shehade H, Nijim J, Hoffmann Y, et al. Mushroom poisoning from species of genus *Inocybe* (fiber head mushroom): a case series with exact species identification. *Clin Toxicol.* 2009;47: 562–565. doi:10.1080/15563650903008448
175. Downs AM, Fan X, Donsante C, Jinnah HA, Hess EJ. Trihexyphenidyl rescues the deficit in dopamine neurotransmission in a mouse model of DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis.* 2019;125: 115–122. doi:10.1016/j.nbd.2019.01.012

-
176. Jilani TN, Sabir S, Sharma S. Trihexyphenidyl. Treasure Island (FL); 2023.
177. Wolf A V, Hodge HC. Effects of atropine sulfate, methylatropine nitrate (metropine) and homatropine hydrobromide on adult human eyes. *Arch Ophthalmol.* 1946;36: 293–301. doi:10.1001/archopht.1946.00890210300003
178. Small MD. Diphenidol, A new antiemetic: A double-blind, placebo-controlled study. *Am J Dig Dis.* 1966;11: 648–651. doi:10.1007/BF02233513
179. Liu H, Zheng Q, Farley JM. Antimuscarinic actions of antihistamines on the heart. *J Biomed Sci.* 2006;13: 395–401. doi:10.1007/s11373-005-9053-7
180. Hockstein NG, Samadi DS, Gendron K, Handler SD. Sialorrhea: a management challenge. *Am Fam Physician.* 2004;69: 2628–2634.
181. Feldman GJ, Edin A. The combination of umeclidinium bromide and vilanterol in the management of chronic obstructive pulmonary disease: current evidence and future prospects. *Ther Adv Respir Dis.* 2013;7: 311–319. doi:10.1177/1753465813499789
182. Mann K V, Leon AL, Tietze KJ. Use of ipratropium bromide in obstructive lung disease. *Clin Pharm.* 1988;7: 670–680.
183. Carmine AA, Brogden RN. Pirenzepine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in peptic ulcer disease and other allied diseases. *Drugs.* 1985;30: 85–126. doi:10.2165/00003495-198530020-00001
184. Tytgat GN. Hyoscine butylbromide: a review of its use in the treatment of abdominal cramping and pain. *Drugs.* 2007;67: 1343–1357. doi:10.2165/00003495-200767090-00007
185. Cazzola M, Page CP, Matera MG. Acridinium bromide for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14: 1205–1214. doi:10.1517/14656566.2013.789021
186. Decramer M, Maltais F, Feldman G, Brooks J, Harris S, Mehta R, et al. Bronchodilation of umeclidinium, a new long-acting muscarinic antagonist, in COPD patients. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;185: 393–399. doi:10.1016/j.resp.2012.08.022
187. Price D, Sharma A, Cerasoli F. Biochemical properties, pharmacokinetics and pharmacological response of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease patients. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5: 417–424. doi:10.1517/17425250902828337
188. Evangelista S. Otilonium bromide: a selective spasmolytic for the gastrointestinal tract. *J Int Med Res.* 1999;27: 207–222. doi:10.1177/030006059902700501
189. Kreder KJ. Solifenacin. *Urol Clin North Am.* 2006;33: 483–90, ix. doi:10.1016/j.ucl.2006.06.008
190. Doroshenko O, Fuhr U. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of solifenacin.

-
- Clin Pharmacokinet. 2009;48: 281–302. doi:10.2165/00003088-200948050-00001
191. Haab F. Darifenacin in the treatment of overactive bladder. *Drugs Today (Barc)*. 2005;41: 441–452. doi:10.1358/dot.2005.41.7.891719
 192. Biastre K, Burnakis T. Trosipium Chloride Treatment of Overactive Bladder. *Ann Pharmacother*. 2009;43: 283–295. doi:10.1345/aph.1L160
 193. Rehse M, Bartolovic M, Baum K, Richter D, Weisbrod M, Roesch-Ely D. Influence of Antipsychotic and Anticholinergic Loads on Cognitive Functions in Patients with Schizophrenia. Citrome L, editor. *Schizophr Res Treatment*. 2016;2016: 8213165. doi:10.1155/2016/8213165
 194. McKinzie DL, Bymaster FP. Muscarinic Mechanisms in Psychotic Disorders. Handbook o. In: Geyer M, Gross G, editors. *Novel Antischizophrenia Treatments*. Handbook o. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012.
 195. Coppola M, Mondola R. Potential action of betel alkaloids on positive and negative symptoms of schizophrenia: a review. *Nord J Psychiatry*. 2012;66: 73–78. doi:10.3109/08039488.2011.605172
 196. Raedler TJ, Tandon R. Cholinergic mechanisms in schizophrenia: Current concepts. *Curr Psychos Ther Rep*. 2006;4: 20–26. doi:10.1007/BF02629410
 197. Sur C, Mallorga PJ, Wittmann M, Jacobson MA, Pascarella D, Williams JB, et al. N-desmethylozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100: 13674–13679. doi:10.1073/pnas.1835612100
 198. Davies MA, Compton-Toth BA, Hufeisen SJ, Meltzer HY, Roth BL. The highly efficacious actions of N-desmethylozapine at muscarinic receptors are unique and not a common property of either typical or atypical antipsychotic drugs: is M1 agonism a pre-requisite for mimicking clozapine's actions? *Psychopharmacology (Berl)*. 2005;178: 451–460. doi:10.1007/s00213-004-2017-1
 199. Colloby SJ, Nathan PJ, McKeith IG, Bakker G, O'Brien JT, Taylor J-P. Cholinergic muscarinic M1/M4 receptor networks in dementia with Lewy bodies. *Brain Commun*. 2020;2. doi:10.1093/braincomms/fcaa098
 200. Trollor JN, Sachdev PS, Haindl W, Brodaty H, Wen W, Walker BM. Combined cerebral blood flow effects of a cholinergic agonist (milameline) and a verbal recognition task in early Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2006;60: 616–625. doi:10.1111/j.1440-1819.2006.01567.x
 201. Yamamoto S, Nishiyama S, Kawamata M, Ohba H, Wakuda T, Takei N, et al. Muscarinic receptor occupancy and cognitive impairment: a PET study with [¹¹C](+)-3-MPB and

-
- scopolamine in conscious monkeys. *Neuropsychopharmacology*. 2011/03/23. 2011;36: 1455–1465. doi:10.1038/npp.2011.31
202. Messer WSJ. The utility of muscarinic agonists in the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci*. 2002;19: 187–193.
203. Roldán G, Bolaños-Badillo E, González-Sánchez H, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Selective M1 muscarinic receptor antagonists disrupt memory consolidation of inhibitory avoidance in rats. *Neurosci Lett*. 1997;230: 93–96.
204. Kitamura Y, Kaneda T, Nomura Y. Effects of nebracetam (WEB 1881 FU), a novel nootropic, as a M1-muscarinic agonist. *Jpn J Pharmacol*. 1991;55: 177–180. doi:10.1254/jjp.55.177
205. Nordberg A, Winblad B. Brain Nicotinic and Muscarinic Receptors in Normal Aging and Dementia BT - Alzheimer's and Parkinson's Disease: Strategies for Research and Development. In: Fisher A, Hanin I, Lachman C, editors. Boston, MA: Springer US; 1986. pp. 95–108. doi:10.1007/978-1-4613-2179-8_12
206. Ono M, Takamura E, Shinozaki K, Tsumura T, Hamano T, Yagi Y, et al. Therapeutic effect of cevimeline on dry eye in patients with Sjögren's syndrome: a randomized, double-blind clinical study. *Am J Ophthalmol*. 2004;138: 6–17. doi:10.1016/j.ajo.2004.02.010
207. Gornitsky M, Shenouda G, Sultanem K, Katz H, Hier M, Black M, et al. Double-blind randomized, placebo-controlled study of pilocarpine to salvage salivary gland function during radiotherapy of patients with head and neck cancer. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98: 45–52. doi:10.1016/j.tripleo.2004.04.009
208. Chew ML, Mulsant BH, Pollock BG, Lehman ME, Greenspan A, Kirshner MA, et al. A model of anticholinergic activity of atypical antipsychotic medications. *Schizophr Res*. 2006;88: 63–72. doi:10.1016/j.schres.2006.07.011
209. Gulsun M, Pinar M, Sabanci U. Psychotic disorder induced by oxybutynin: Presentation of two cases. *Clin Drug Investig*. 2006;26: 603–606. doi:10.2165/00044011-200626100-00007
210. Perry EK, Smith CJ, Court JA, Perry RH. Cholinergic nicotinic and muscarinic receptors in dementia of Alzheimer, Parkinson and Lewy body types. *J neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1990;2: 149–158.
211. Maehara S, Hikichi H, Satow A, Okuda S, Ohta H. Antipsychotic property of a muscarinic receptor agonist in animal models for schizophrenia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008;91: 140–149. doi:https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.06.023
212. Jones CK, Brady AE, Davis AA, Xiang Z, Bubser M, Tantawy MN, et al. Novel selective allosteric activator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor regulates amyloid processing and produces antipsychotic-like activity in rats. *J Neurosci*. 2008;28: 10422–10433.

213. Štuhec M. Solifenacin-induced delirium and hallucinations. *Gen Hosp Psychiatry*. 2013;35: 682.e3–4. doi:10.1016/j.genhosppsy.2013.06.002
214. McKinzie DL, Bymaster FP. Muscarinic Mechanisms in Psychotic Disorders BT - Novel Antischizophrenia Treatments. In: Geyer MA, Gross G, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. pp. 233–265. doi:10.1007/978-3-642-25758-2_9
215. Kimura Y, Ohue M, Kitaura T, Kihira K. Amnesic effects of the anticholinergic drugs, trihexyphenidyl and biperiden: differences in binding properties to the brain muscarinic receptor. *Brain Res*. 1999;834: 6–12.
216. Harding SD, Sharma JL, Faccenda E, Southan C, Pawson AJ, Ireland S, et al. The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY. *Nucleic Acids Res*. 2018;46: D1091–D1106.
217. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res*. 2016;44: D1202–D1213. doi:10.1093/nar/gkv951
218. Dallanoce C, Conti P, De Amici M, De Micheli C, Barocelli E, Chiavarini M, et al. Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *Bioorg Med Chem*. 1999;7: 1539–1547. doi:https://doi.org/10.1016/S0968-0896(99)00107-8
219. Kloeckner J, Schmitz J, Holzgrabe U. Convergent, short synthesis of the muscarinic superagonist iperoxo. *Tetrahedron Lett*. 2010;51: 3470–3472. doi:https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.04.130
220. Broad LM, Sanger HE, Mogg AJ, Colvin EM, Zwart R, Evans DA, et al. Identification and pharmacological profile of SPP1, a potent, functionally selective and brain penetrant agonist at muscarinic M(1) receptors. *Br J Pharmacol*. 2019;176: 110–126. doi:10.1111/bph.14510
221. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*. 2000;28: 235–242.
222. Abayev M, Rodrigues JPGLM, Srivastava G, Arshava B, Jaremko L, Jaremko M, et al. The solution structure of monomeric CCL5 in complex with a doubly sulfated N-terminal segment of CCR5. *FEBS J*. 2018;285: 1988–2003.
223. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, et al. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*. 2014;42: 252–258. doi:10.1093/nar/gku340
224. Blanpain C, Wittamer V, Vanderwinden J-M, Boom A, Renneboog B, Lee B, et al. Palmitoylation of CCR5 Is Critical for Receptor Trafficking and Efficient Activation of Intracellular Signaling Pathways*. *J Biol Chem*. 2001;276: 23795–23804. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M100583200

225. Sofuoglu M, Portoghese PS, Takemori AE. Differential antagonism of delta opioid agonists by naltrindole and its benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for delta opioid receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;257: 676–680.
226. Wang Y, Zhuang Y, DiBerto JF, Zhou XE, Schmitz GP, Yuan Q, et al. Structures of the entire human opioid receptor family. *Cell.* 2023;186: 413-427.e17. doi:10.1016/j.cell.2022.12.026
227. Thal DM, Sun B, Feng D, Nawaratne V, Leach K, Felder CC, et al. Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. *Nature.* 2016;531: 335–340. doi:10.1038/nature17188
228. Brown AJH, Bradley SJ, Marshall FH, Brown GA, Bennett KA, Brown J, et al. From structure to clinic: Design of a muscarinic M1 receptor agonist with the potential to treat Alzheimer's disease. *Cell.* 2021;184: 5886-5901.e22. doi:10.1016/j.cell.2021.11.001
229. Cornwell DG, Heikkila RE, Bar RS, Biagi GL. Red blood cell lipids and the plasma membrane. *J Am Oil Chem Soc.* 1968;45: 297–304. doi:10.1007/BF02667099
230. Lomize MA, Lomize AL, Pogozheva ID, Mosberg HI. OPM: Orientations of Proteins in Membranes database. *Bioinformatics.* 2006;22: 623–625. doi:10.1093/bioinformatics/btk023
231. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J Comput Chem.* 2008;29: 1859–1865. doi:10.1002/jcc
232. Lee J, Cheng X, Swails JM, Yeom MS, Eastman PK, Lemkul JA, et al. CHARMM-GUI Input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *J Chem Theory Comput.* 2016;12: 405–413.
233. Sousa da Silva AW, Vranken WF. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Res Notes.* 2012;5: 367. doi:10.1186/1756-0500-5-367
234. van der Spoel D, Lindahl B, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJC. GROMACS: Fast, flexible and free. *J Comp Chem.* 2005;26: 1701–1719.
235. Abraham M, Hess B, Spoel D van der, Lindahl E. Gromacs 5.0.7. *WwwGromacsOrg.* 2015. doi:10.1007/SpringerReference_28001
236. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys.* 1993;98: 10089–10092. doi:10.1063/1.464397
237. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys.* 1995;103: 8577–8593. doi:10.1063/1.470117
238. Hess B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput.* 2008;4: 116–122. doi:10.1021/ct700200b
239. Ryckaert J-P, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J Comput Phys.*

-
- 1977;23: 327–341. doi:[https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)
240. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *J Appl Phys.* 1981;52: 7182–7190. doi:10.1063/1.328693
241. Miao Y, Sinko W, Pierce L, Bucher D, Walker RC, McCammon JA. Improved Reweighting of Accelerated Molecular Dynamics Simulations for Free Energy Calculation. *J Chem Theory Comput.* 2014;10: 2677–2689. doi:10.1021/ct500090q
242. Miao Y, Feher VA, McCammon JA. Gaussian Accelerated Molecular Dynamics: Unconstrained Enhanced Sampling and Free Energy Calculation. *J Chem Theory Comput.* 2015;11: 3584–3595. doi:10.1021/acs.jctc.5b00436
243. Case D, Ben-Shalom I, Brozell SR, Cerutti DS, Cheatham T, Cruzeiro VWD, et al. *Amber.* 2018.
244. Miyamoto S, Kollman PA. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J Comput Chem.* 1992;13: 952–962. doi:<https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>
245. Åqvist J, Wennerström P, Nervall M, Bjelic S, Brandsdal BO. Molecular dynamics simulations of water and biomolecules with a Monte Carlo constant pressure algorithm. *Chem Phys Lett.* 2004;384: 288–294. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2003.12.039>
246. Daura X, Gademann K, Jaun B, Seebach D, Gunsteren WF van, Mark AE. Peptide folding: When simulation meets experiment. *Angew Chemie - Int Ed.* 1999;38: 236–240.
247. Gowers R, Linke M, Barnoud J, Reddy T, Melo M, Seyler S, et al. MDAnalysis: A Python Package for the Rapid Analysis of Molecular Dynamics Simulations. *Proc 15th Python Sci Conf.* 2016; 98–105. doi:10.25080/majora-629e541a-00e
248. Dahl ACE, Chavent M, Sansom MSP. Bendix: intuitive helix geometry analysis and abstraction. *Bioinformatics.* 2012/06/23. 2012;28: 2193–2194. doi:10.1093/bioinformatics/bts357
249. Girvan M, Newman MEJ. Community structure in social and biological networks. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99: 7821–7826. doi:10.1073/pnas.122653799
250. Grant BJ, Rodrigues AP, ElSawy KM, McCammon JA, Caves LS. Bio3D: An R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics.* 2006;22: 2695–6.
251. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. *Computing.* 2006;1. doi:10.1890/0012-9658(2002)083[3097:CFHIWS]2.0.CO;2
252. McClendon CL, Friedland G, Mobley DL, Amirkhani H, Jacobson MP. Quantifying Correlations between Allosteric Sites in Thermodynamic Ensembles. *J Chem Theory Comput.* 2009;5: 2486–2502.

253. Buchoux S. FATSLiM: a fast and robust software to analyze MD simulations of membranes. *Bioinformatics*. 2016;33: 133–134. doi:10.1093/bioinformatics/btw563
254. Smith P, Lorenz CD. LiPyphilic: A Python Toolkit for the Analysis of Lipid Membrane Simulations. *J Chem Theory Comput*. 2021;17: 5907–5919. doi:10.1021/acs.jctc.1c00447
255. Masood T Bin, Sandhya S, Chandra N, Natarajan V. CHEXVIS: a tool for molecular channel extraction and visualization. *BMC Bioinformatics*. 2015;16: 119. doi:10.1186/s12859-015-0545-9
256. Roe DR, Cheatham TEIII. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput*. 2013;9: 3084–3095. doi:10.1021/ct400341p
257. Schrödinger L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.2.1. 2015.
258. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD -- Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph*. 1996;14: 33–38.
259. Molecular Design Ltd M. ISIS/Draw. 1993. Available: <https://books.google.com.mx/books?id=kIXFvwEACAAJ>
260. Williams T, Kelley C. Gnuplot 4.6: an interactive plotting program. 2013.
261. Ekhtejari Salmas R, Yurtsever M, Durdagi S. Investigation of Inhibition Mechanism of Chemokine Receptor CCR5 by Micro-second Molecular Dynamics Simulations. *Sci Rep*. 2015. doi:10.1038/srep13180
262. Arimont M, Sun S-L, Leurs R, Smit M, de Esch IJP, de Graaf C. Structural Analysis of Chemokine Receptor-Ligand Interactions. *J Med Chem*. 2017;60: 4735–4779. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01309
263. Fu D, Ballesteros JA, Weinstein H, Chen J, Javitch JA. Residues in the seventh membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor accessible in the binding-site crevice. *Biochemistry*. 1996;35: 11278–11285. doi:10.1021/bi960928x
264. Bai Q, Zhang Y, Li X, Chen W, Liu H, Yao X. Computational study on the interaction between CCR5 and HIV-1 entry inhibitor maraviroc: insight from accelerated molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16: 24332–24338. doi:10.1039/C4CP03331K
265. Gadhe CG, Kothandan G, Cho SJ. Computational modeling of human coreceptor CCR5 antagonist as a HIV-1 entry inhibitor: using an integrated homology modeling, docking, and membrane molecular dynamics simulation analysis approach. *J Biomol Struct Dyn*. 2013;31: 1251–1276. doi:10.1080/07391102.2012.732342
266. Fano A, Ritchie DW, Carrieri A. Modeling the Structural Basis of Human CCR5 Chemokine

- Receptor Function: From Homology Model Building and Molecular Dynamics Validation to Agonist and Antagonist Docking. *J Chem Inf Model.* 2006;46: 1223–1235. doi:10.1021/ci050490k
267. Isaikina P, Tsai C-J, Dietz N, Pamula F, Grahl A, Goldie KN, et al. Structural basis of the activation of the CC chemokine receptor 5 by a chemokine agonist. *Sci Adv.* 2022;7: eabg8685. doi:10.1126/sciadv.abg8685
268. Kameyoshi Y, Dörschner A, Mallet AI, Christophers E, Schröder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med.* 1992;176: 587–592. doi:10.1084/jem.176.2.587
269. Zhang H, Chen K, Tan Q, Shao Q, Han S, Zhang C, et al. Structural basis for chemokine recognition and receptor activation of chemokine receptor CCR5. *Nat Commun.* 2021;12: 4151. doi:10.1038/s41467-021-24438-5
270. Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, Ghoshdastider U, Debinski A, Filipek S. Action of Molecular Switches in GPCRs - Theoretical and Experimental Studies. *Curr Med Chem.* 2010;19: 1090–1109.
271. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein coupled receptors. *Nature.* 2009;459: 356–363.
272. Yuan S, Filipek S, Palczewski K, Vogel H. Activation of G-protein coupled receptors correlates with the formation of a continuous internal water pathway. *Nat Commun.* 2014;5: 1–10.
273. Wang D, Sun X, Sadee W. Different Effects of Opioid Antagonists on μ -, δ -, and κ -Opioid Receptors with and without Agonist Pretreatment. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321: 544–552. doi:10.1124/jpet.106.118810
274. Costa T, Herz A. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86: 7321–7325. doi:10.1073/pnas.86.19.7321
275. De Marco R, Tolomelli A, Spampinato S, Bedini A, Gentilucci L. Opioid Activity Profiles of Oversimplified Peptides Lacking in the Protonable N-Terminus. *J Med Chem.* 2012;55: 10292–10296. doi:10.1021/jm301213s
276. Calderon SN, Rothman RB, Porreca F, Flippen-Anderson JL, McNutt RW, Xu H, et al. Probes for narcotic receptor mediated phenomena. 19. Synthesis of (+)-4-[(α R)- α -((2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethyl-1-piperaziny)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide (SNC 80): a highly selective, nonpeptide delta opioid receptor agonist. *J Med Chem.* 1994;37: 2125–2128. doi:10.1021/jm00040a002
277. Knapp RJ, Santoro G, De Leon IA, Lee KB, Edsall SA, Waite S, et al. Structure-activity relationships for SNC80 and related compounds at cloned human delta and mu opioid

- receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;277: 1284–1291.
278. Zhuang Y, Wang Y, He B, He X, Zhou XE, Guo S, et al. Molecular recognition of morphine and fentanyl by the human μ -opioid receptor. *Cell.* 2022;185: 4361-4375.e19. doi:10.1016/j.cell.2022.09.041
279. Wentland MP, Lu Q, Lou R, Bu Y, Knapp BI, Bidlack JM. Synthesis and opioid receptor binding properties of a highly potent 4-hydroxy analogue of naltrexone. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15: 2107–2110. doi:10.1016/j.bmcl.2005.02.032
280. Wentland MP, Lou R, Lu Q, Bu Y, Denhardt C, Jin J, et al. Syntheses of novel high affinity ligands for opioid receptors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009;19: 2289–2294. doi:https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.02.078
281. Bidlack JM, Knapp BI, Deaver DR, Plotnikava M, Arnelle D, Wonsey AM, et al. In Vitro Pharmacological Characterization of Buprenorphine, Samidorphan, and Combinations Being Developed as an Adjunctive Treatment of Major Depressive Disorder. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018;367: 267 LP – 281. doi:10.1124/jpet.118.249839
282. Kaufman JJ, Semo NM, Koski WS. Microelectrometric titration measurement of the pKa's and partition and drug distribution coefficients of narcotics and narcotic antagonists and their pH and temperature dependence. *J Med Chem.* 1975;18: 647–655. doi:10.1021/jm00241a001
283. Dutta S, Selvam B, Das A, Shukla D. Mechanistic origin of partial agonism of tetrahydrocannabinol for cannabinoid receptors. *J Biol Chem.* 2022;298: 101764. doi:10.1016/j.jbc.2022.101764
284. Stewart PE, Holper EM, Hammond DL. δ antagonist and κ agonist activity of naltriben: Evidence for differential κ interaction with the $\delta 1$ and $\delta 2$ opioid receptor subtypes. *Life Sci.* 1994;55: PL79–PL84. doi:https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00738-1
285. Schiller PW, Berezowska I, Nguyen TM-D, Schmidt R, Lemieux C, Chung NN, et al. Novel Ligands Lacking a Positive Charge for the δ - and μ -Opioid Receptors. *J Med Chem.* 2000;43: 551–559. doi:10.1021/jm990461z
286. Marton J, Fekete A, Cumming P, Hosztafi S, Mikecz P, Henriksen G. Diels-Alder Adducts of Morphinan-6,8-Dienes and Their Transformations. *Molecules.* 2022;27. doi:10.3390/molecules27092863
287. Higashi E, Hirayama S, Nikaido J, Shibasaki M, Kono T, Honjo A, et al. Development of Novel δ Opioid Receptor Inverse Agonists without a Basic Nitrogen Atom and Their Antitussive Effects in Mice. *ACS Chem Neurosci.* 2019;10: 3939–3945. doi:10.1021/acchemneuro.9b00368
288. Tanguturi P, Pathak V, Zhang S, Moukha-Chafiq O, Augelli-Szafran CE, Streicher JM. Discovery of Novel Delta Opioid Receptor (DOR) Inverse Agonist and Irreversible (Non-

-
- Competitive) Antagonists. *Molecules*. 2021. doi:10.3390/molecules26216693
289. Shainyan BA, Chipanina NN, Oznobikhina LP. The basicity of sulfonamides and carboxamides. Theoretical and experimental analysis and effect of fluorinated substituent. *J Phys Org Chem*. 2012;25: 738–747. doi:https://doi.org/10.1002/poc.2910
290. Thompson CM, Wojno H, Greiner E, May EL, Rice KC, Selley DE. Activation of G-proteins by morphine and codeine congeners: insights to the relevance of O- and N-demethylated metabolites at mu- and delta-opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308: 547–554. doi:10.1124/jpet.103.058602
291. Carliss RDS, Keefer JF, Perschke S, Welch S, Rich TC, Weissman AD. Receptor reserve reflects differential intrinsic efficacy associated with opioid diastereomers. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;92: 495–502. doi:10.1016/j.pbb.2009.01.019
292. Li J-X, Becker GL, Traynor JR, Gong Z-H, France CP. Thienorphine: receptor binding and behavioral effects in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;321: 227–236. doi:10.1124/jpet.106.113290
293. Lewis JW, Husbands SM. The orvinols and related opioids--high affinity ligands with diverse efficacy profiles. *Curr Pharm Des*. 2004;10: 717–732. doi:10.2174/1381612043453027
294. Codd EE, Carson JR, Colburn RW, Dax SL, Desai-Krieger D, Martinez RP, et al. The novel, orally active, delta opioid RWJ-394674 is biotransformed to the potent mu opioid RWJ-413216. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318: 1273–1279. doi:10.1124/jpet.106.104208
295. Ananthan S. Opioid ligands with mixed mu/delta opioid receptor interactions: an emerging approach to novel analgesics. *AAPS J*. 2006;8: E118-25. doi:10.1208/aapsj080114
296. Bishop MJ, Garrido DM, Boswell GE, Collins MA, Harris PA, McNutt RW, et al. 3-(α R)- α -((2S,5R)-4-Allyl-2,5-dimethyl-1-piperazinyl)-3-hydroxybenzyl)- N-alkyl-N-arylbenzamides: Potent, Non-Peptidic Agonists of Both the μ and δ Opioid Receptors. *J Med Chem*. 2003;46: 623–633. doi:10.1021/jm020395s
297. Vickery ON, Machtens J-P, Zachariae U. Membrane potentials regulating GPCRs: insights from experiments and molecular dynamics simulations. *Curr Opin Pharmacol*. 2016/07/27. 2016;30: 44–50. doi:10.1016/j.coph.2016.06.011
298. Shobab LA, Hsiung G-YR, Feldman EH. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2005;4: 841–852.
299. Röder C, Kupreichyk T, Gremer L, Schäfer LU, Pothula KR, Ravelli R, et al. Cryo-EM structure of islet amyloid polypeptide fibrils reveals similarities with amyloid- β fibrils. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27: 660–667.
300. Zhang F, Gannon M, Chen Y, Yan S, Zhang S, Feng W, et al. β -amyloid redirects

-
- norepinephrine signaling to activate the pathogenic GSK3 β /tau cascade. *Sci Transl Med.* 2020;12: eaay6931. doi:10.1126/scitranslmed.aay6931
301. Piller C. Blots on a Field? *Science* (80-). 2022;377: 358–363. doi:https://doi.org/10.1126/science.add9993
302. Sturchio A, Dwivedi AK, Malm T, Wood MJA, Cilia R, Sharma JS, et al. High Soluble Amyloid- β 42 Predicts Normal Cognition in Amyloid-Positive Individuals with Alzheimer's Disease-Causing Mutations. *J Alzheimer's Dis.* 2022;90: 333–348. doi:10.3233/JAD-220808
303. McEvoy JP, McCue M, Spring B, Mohs RC, Lavori PW, Farr RM. Effects of amantadine and trihexyphenidyl on memory in elderly normal volunteers. *Am J Psychiatry.* 1987;144: 573–577. doi:10.1176/ajp.144.5.573
304. Gould TJ, Leach PT. Cellular, molecular, and genetic substrates underlying the impact of nicotine on learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2014;107: 108–132.
305. Placzek A, Zhang T, Dani J. Nicotinic mechanisms influencing synaptic plasticity in the hippocampus. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30: 752–760.
306. Alkadhi KA. Neuroprotective Effects of Nicotine on Hippocampal Long-Term Potentiation in Brain Disorders. *J Pharmacol Exp Ther.* 2018;366: 498–508.
307. Gould TJ. Nicotine and hippocampus-dependent learning: implications for addiction. *Mol Neurobiol.* 2006;34: 93–107.
308. Eagger SA, Levy R, Sahakian BJ. Tacrine in Alzheimer's Disease. *Lancet.* 1991;337.
309. Ng YP, Or TCT, Ip NY. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2015;89: 260–270. doi:10.1016/j.neuint.2015.07.018
310. Pohanka M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int J Mol Sci.* 2014;15: 9809–9825. doi:10.3390/ijms15069809
311. Reitz C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15: 307.
312. Edwards G, Moreno-Gonzalez I, Soto C. Amyloid-beta and tau pathology following repetitive mild traumatic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;483: 1137–1142. doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.123
313. Pappolla M, Omar R, Kim K, Robakis N. Immunohistochemical evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 1992;140: 621–628.
314. Sierksma A, Lu A, Mancuso R, Fattorelli N, Thrupp N, Salta E, et al. Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid- β but not to TAU pathology. *EMBO Mol Med.* 2020;12: e10606.

-
315. Iqbal K, Del C. Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2005;1739: 198–210. doi:10.1016/j.bbadis.2004.09.008
 316. Dominy S, Lynch C-, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* 2019;5.
 317. Balin BJ, Hudson AP. Herpes viruses and Alzheimer's disease: new evidence in the debate. *Lancet.* 2018;17: 839–841.
 318. Bolós M, Llorens-Martín M, Perea JR, Jurado-Arjona J, Rábano A, Ávila J. Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Mol Neurodegener.* 2017;12.