

UCH-FC
DOC-Q
0451
C.L

**ESTUDIO DE RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD
PARA ANALOGOS DE HISTAMINA**

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

Facultad de Ciencias

Claudio Olea Azar

Marzo, 1995

25 OCT 2000



Directores de tesis: Dr. Bruce Cassels Niven

Dra. Julia Parra Mouchet

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Informe de Aprobación
Tesis de Doctorado

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Doctorado presentada por el Candidato:

Claudio Alberto Olea Azar

ha sido aprobada por la comisión informante como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias mención en Química.

Directores de Tesis:

Dr. Bruce K. Cassels Niven

Dra Julia Parra Mouchet

Bruce K. Cassels
Julia Parra

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Arie Aizman

Dr. Luis Nuñez

Dr. Octavio Monasterio

Dr. Alejandro Toro

Arie Aizman
Luis Nuñez
Octavio Monasterio
Alejandro Toro

25 OCT 2000



25 OCT 2000



A mis padres
A mis hermanos y cuñados
A Catalina, Valentina y los que vienen
por su apoyo, confianza y cariño sin limites

Agradezco a la Dra Julia Parra y al Dr. Bruce Cassels por su apoyo y entrega de conocimientos desinteresado, y por la gran calidad humana que me permitió crecer académicamente y humanamente.

Mis agradecimientos a todas aquellas personas que de una u otra manera permitieron la realización de esta tesis, en especial a mis buenos amigos de los Laboratorios de Química Teórica y Química Biodinámica de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Agradezco al Prof. George G. Lunt por darme la oportunidad de trabajar en su grupo en la Universidad de Bath, Inglaterra.

Agradezco a mis amigos de siempre por su apoyo y cariño.

Agradezco a CONICYT y al proyecto FONDECYT 920010 por su apoyo en esta tesis.

25 OCT 2000



INDICE DE MATERIAS

	Página
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE TABLAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
CAPITULO 1. INTRODUCCION	1
1.1.- Receptores de histamina	2
1.2.- Agonistas de histamina	4
1.3.- Antagonistas de histamina	7
1.4.- Antecedentes experimentales y teóricos de aspectos estructurales de la histamina y compuestos análogos incluyendo interacciones de estas drogas con receptores H2	10
1.4.1.- Histamina, agonistas y modelación de receptor H2	10
1.4.2.- Antagonistas H2 de histamina	19
1.5.- Antecedentes para la modelación del receptor H2 de histamina por mecánica molecular	23
1.6.- Objetivos del trabajo	28
1.7.- Organización del trabajo	30
CAPITULO 2. MECANICA CUANTICA	32
2.0.- Métodos y cálculos	32
2.1.- Justificación de las metodologías utilizadas	34

2.2.- Resultados y discusión	40
2.2.1.- Análisis conformacional de histamina	40
2.2.2.- Energía potencial de transferencia protónica para histamina protonada obtenida por las metodologías AM1 y PM3	51
2.2.3.- Energía potencial de transferencia protónica obtenida para histamina protonada en un campo de reacción.	55
2.3.- Estudio teórico para una familia de antagonistas H ₂ de histamina	62
2.3.1.- Famotidina	62
2.3.2.- Estudio conformacional para una familia de análogos de famotidina	70
2.4.- Conclusiones de la parte mecano-cuántica	75
¹ CAPITULO 3. MODELACION MOLECULAR	77
3.0.- Introducción a la mecánica molecular	77
3.1.- Método	79
3.2.- Resultados y discusión	85
3.2.1 Modelación de la interacción histamina-receptor	85
3.2.2.- Análisis de las mutaciones puntuales	93
3.2.3.- Predicción de otros aminoácidos potencialmente involucrados en la acción de la histamina	100

3.2.4.- Estudio conformacional de histamina en su receptor H2	101
3.2.5.- Estudio de la interacción de los antagonistas H2 de histamina en el modelo de receptor	103
3.3.- Conclusiones de modelación molecular	116
CAPITULO 4.	118
4.0.- Análisis del mecanismo de transferencia protónica intramolecular en el modelo de receptor H2 de histamina	118
4.1.- Estudio de la transferencia protónica intramolecular en el modelo de Weinstein	125
CAPITULO 5. CONCLUSIONES GENERALES	129
CAPTULO 6. PROYECCIONES	132
APENDICE 1	134
APENDICE 2	146
CAPITULO 6. BIBLIOGRAFIA	155

INDICE DE FIGURAS

	Página
1.- Molécula de histamina, numeración IUPAC y la utilizada en la tesis.	1
2.- Agonistas y antagonistas selectivos para los receptores H1, H2 y H3 de histamina	5
3.- Agonistas H1 y H2 de histamina e inhibidores de la histamina descarboxilasa	6
4.- Burimamida	9
5.- Metiamida	9
6.- Ranitidina, famotidina, Nizatidina y Roxatidina	9
7.- Histamina en sus formas N1H, N3H y protonadas +HN1H, +HN3H y HAH+	12
8.- β -(2-Piridiletilamina)	14
9.- Esquema del modelo teórico del receptor H2 descrito por Timmerman aplicado al 5-(2-aminoetil)-tiazol (lado izquierdo) y a la histamina (lado derecho)	20
10.- Tiotidina	22
11.- Esquemmatización de los receptores acoplados a proteína G	24
12.- Numeración de átomos en la molécula de histamina	41

13.- Estructuras más estables para la histamina protonada obtenidas por la metodología AM1	44
14.- Curvas de energía en función del ángulo α de las moléculas protonadas de histamina obtenidas por el método AM1	46
15.- Curvas de energía en función del ángulo α de las moléculas protonadas de histamina obtenidas por el método PM3	47
16.- Curvas de energía de transferencia protónica en función de la distancia "N1"-H para la histamina obtenidas por los métodos AM1 y PM3	53
17.- Curvas de energía de transferencia protónica en función de la distancia "N1"-H para la histamina obtenidas por el método CNDO/2-RF con $\epsilon=1.0$ y $\epsilon=80.0$	56
18.- Curvas de energía en función del ángulo α para la forma +HN3H de la histamina obtenida por el método CNDO/2-RF con $\epsilon=1.0$ y $\epsilon=80.0$	58
19.- Mecanismo de equilibrio entre especies para la histamina en fase gaseosa, solución y en presencia de sitios en fase gaseosa	61
20.- Famotidina y sustancias análogas	63
21.- Curvas de energía en función del ángulo α de famotidina en su forma neutra y protonadas en N6 (N6H) y N5 (N5H)	

obtenidas por el método AM1	65
22.- Curvas de energía en función del ángulo α de la famotidina neutra y de las moléculas 2, 4 y 5 obtenidas por el método AM1	71
23.- Curvas de energía en función del ángulo α de las moléculas 6, 7, 8 y 9 obtenidas por el método AM1	72
24.- Curvas de energía en función del ángulo α de las moléculas 10, 11 y 12 obtenidas por el método AM1	73
25.- Representación gráfica de los movimientos descritos en la ecuación 3.1	80
26.- Alineamiento de secuencias obtenido por Oliveira y otros	83
27.- Modelo tridimensional del receptor H2 de histamina. Se muestran los C α ,C(O),N de las 7 hélices. En color rojo se destacan los residuos Asp98, Asp186 y Thr190 y en celeste Glu270.	87
28.- Vista en el plano de la membrana celular del modelo del receptor H2 de histamina. Los Asp98 Asp186 y Thr190 se muestran en color rojo y el Thr190 en celeste. Se destacan con superficie de van der Waals y en amarillo las hélices 3 y 5	88
29.- Comparación de los sitios activos de los complejos de +HN3H y +HN1H con el receptor H2 de	

histamina. Se representan los $C\alpha, C(O), N$ de las hélices 3, 5 y 7. En color rojo se destacan las cadenas y superficies de van der Waals de los residuos Asp98, Asp186 y Thr190 y en celeste las de Glu270. En verde se destaca la histamina.

Lado izquierdo: +HN3H, lado derecho: +HN1H

90

30.- Vista en el plano de la membrana celular del modelo del receptor H2 de histamina. Los Asp98, Asp186 y Thr190 se representan con sus superficies de van der Waals en color rojo y el Glu270 en color celeste. La histamina es destacada en color verde. Lado derecho: +HN3H con las hélices 3 y 7 destacadas en azul. Lado izquierdo: +HN1H con las hélices 3 y 5 destacadas en amarillo.

91

31.- Representación gráfica de los desplazamientos RMS para cada una las hélices. a) Estudio con $C\alpha$

b) Estudio con $C\alpha, C(O), N,$

94

32.- Vista del sitio activo del receptor con Asp98 mutado por Asn98. Se muestran los $C\alpha, C(O), N$ de las hélices 3, 5 y 7. Con rojo se destacan las cadenas y superficies de van der Waals de los residuos Asp98, Asp186 y Thr190. Con verde se destaca la forma +HN3H

96

33.- Vista del sitio activo del receptor

con Asp 186 mutado por Ala186: lado izquierdo. Mutación de Asp 186 y Thr 190 por Ala186 y Ala190: lado

derecho. Se destacan en rojo las cadenas y superficies de van der Waals de los aminoácidos involucrados en el sitio y con verde la forma +HN3H	97
34.- Vista del sitio activo del receptor con Thr190 mutado por Ala190: lado izquierdo. Vista de las 7 hélices del receptor con Glu270 mutado por Ala270: lado derecho. Se destacan los residuos importantes en el sitio activo. Con verde se representa la forma +HN3H	99
35.- Representación gráfica de los desplazamientos RMS para la mutación Glu270. a) Estudio con C α b) Estudio con C α ,C(O),N	102
36.- Vista del sitio activo del receptor H2 de histamina. Se muestran los C α ,C(O),N de las hélices 3, 5 y 7. Se muestran los aminoácidos involucrados en el sitio activo en rojo. Lado izquierdo en verde +HN3H plegada. Lado derecho en verde +HN3H extendida	104
37.- Vista del sitio activo del complejo de cimetidina con el receptor H2 de histamina . Se muestran los C α ,C(O),N de las hélices 3, 5 y 7. En rojo se destacan los residuos involucrados en el sitio. Lado izquierdo: complejo minimizado. Lado derecho: complejo obtenido por dinámica de 20 ps	106
38.- Esquema de la interacción del modelo del receptor H2 de histamina con cimetidina	107

- 39.- Vista del sitio activo del complejo de ranitidina con el receptor H2 de histamina . Se muestran los $C\alpha, C(O), N$ de las hélices 3, 5 y 7. En rojo se destacan los residuos involucrados en el sitio. Lado izquierdo: complejo minimizado. Lado derecho: complejo obtenido por dinámica de 20 ps 109
- 40.- Esquema de la interacción del modelo del receptor H2 de histamina con ranitidina. 110
- 41.- Vista del sitio activo del complejo de famotidina con el receptor H2 de histamina . Se muestran los $C\alpha, C(O), N$ de las hélices 3, 5 y 7. En rojo se destacan los residuos involucrados en el sitio. Lado izquierdo: complejo minimizado. Lado derecho: complejo obtenido por dinámica de 20 ps 112
- 42.- Esquema de la interacción del modelo del receptor H2 de histamina con famotidina. 113
- 43.- Esquema de la transferencia protónica de la histamina en presencia de los sitios que representan los aminoácidos del sitio activo del modelo del receptor H2 de histamina 120
- 44.- Curva de energía de transferencia protónica para la histamina en presencia de sitios que representan los residuos importantes en el modelo de receptor H2 de histamina, obtenida por el método PM3 121

- 45.- Curvas de energía de transferencia protónica para la histamina en presencia de los sitios que representan los residuos en el modelo de receptor H₂ de histamina, obtenida por el método CNDO/2-RF con $\epsilon=80.0$ y $\epsilon=1.0$ 122
- 46.- Mecanismo de equilibrio de especies propuesto para la histamina en presencia de los sitios y el solvente 124
- 47.- Curva de energía transferencia protónica en función de la distancia "N1"-H para la histamina en presencia de los sitios descritos por Weinstein, obtenida por el método PM3 126
- 48.- Curvas de energía transferencia protónica para histamina en presencia de los sitios descritos por Weinstein, obtenida por el método CNDO/2-RF con $\epsilon=1.0$ y $\epsilon=80.0$ 128

INDICE DE TABLAS

TABLAS

	Página
I.- Abundancias relativas de especies de histamina en solución acuosa.	11
II.- Energías y geometrías moleculares para las formas neutras más estables de la histamina obtenidas a través de los métodos AM1 y PM3.	42
III.- Energías y geometrías moleculares para las formas protonadas más estables de la histamina obtenidas a través de los métodos AM1 y PM3.	45
IV.- Energías y geometrías moleculares para las formas protonadas más estables de la histamina obtenidas por el método PM3 y datos publicados en la referencia 26.	49
V.- Geometrías moleculares obtenidas por el método AM1 para las formas más estables de la famotidina neutra y sus formas protonada en el N6 o N5.	66
VI.- Energías relativas de los complejos ligando-receptor H2 y distancias mas relevantes.	89

ABSTRACT

The conformational hypersurface and electronic structure for both neutral and protonated forms of histamine and a family of histamine H₂ antagonist were studied using the AM1 and PM3 methodologies. This study led to rationalize the experimental results concerning the relative abundance of the protonated forms in gas phase. In addition the quantum chemical calculations showed that the preferred site of protonation was at the imidazole ring, regardless the neutral histamine tautomers.

The solvent effect on the electronic and conformational structure on the protonated histamines, was studied through the Reaction Field model implemented at the CNDO/2 level. The relative abundance of these ions observed in aqueous solution at physiological pH was reproduced. The results provided a molecular mechanism about the tautomeric equilibrium of protonated histamine forms in aqueous solution, which is presently lacking in the scientific literature. According to this mechanism, the proton transfer between +HN1H and +HN3H (those side-chain protonated forms bearing a hydrogen atom at N1 or N3 of the imidazole ring, respectively) proceeds through intramolecular H bonding, in aqueous solution.

A tridimensional model of the histamine H₂ receptor was built up, by the first time, using molecular mechanics methodologies and using Bacteriorhodopsin as a template. This model showed agreement with the experimental data obtained with cloned mutant receptors, Asp 98 in helix 3 being the most important residue for the interaction with histamine. Analysis of the alignment of homology sequences of the histamine H₂ receptors together with the proposed model allowed the Glu 270 in helix 7 to be postulated as a

posibles important residue for the activity of these receptors. Besides, the +HN3H extended form was shown to be the active conformation of histamine.

Analysis of the interactions of several histamine H2 antagonist with the receptor model allowed famotidine to be identified as the molecule with the highest affinity, showing important interactions with aminoacid residues belonging to helices 3 and 5.

Finally, on the basis of both the quantum chemical results and those obtained by molecular mechanics, a mechanism of the interaction between histamine and the H2 receptor is proposed through the semiempirical methodologies cited above. The molecular model used in the calculation consisted on the protonated histamine surrounded by external sites which represented the real residues found by molecular mechanic studies. The results showed that the intramolecular proton transfer occur in opposition to the intermolecular proton transfer relay proposed by Weinstein, which is presently the most popular mechanism in this field.

In addition the intramolecular proton transfer process was applied to the histamine monocation surrounded by the active site model proposed by Weinstein, with the finding that this mechanism is thermodynamically feasible in contrast with the intermolecular proton transfer proposed by Weinstein.

The protonation at the histamine imidazole ring showed to be an important key in the determination of its mechanism of tautomeric equilibrium in aqueous solution as well as in the description of the molecular interaction histamine-H2 receptor.

RESUMEN

Se estudió la hipersuperficie conformacional y la estructura electrónica de la histamina en sus formas neutras y protonadas y de una familia de antagonistas H₂ de histamina. Este estudio permitió la racionalización de los resultados experimentales concernientes a la abundancia relativa de las formas protonadas en fase gas. Además, los cálculos químico-cuánticos mostraron que el sitio de protonación preferido fue el anillo imidazol, independientemente de los tautómeros de la histamina neutra.

Se estudió el efecto solvente sobre las estructuras electrónicas y conformacionales de las histaminas protonadas, a través del modelo de campo de reacción implementado en la metodología CNDO/2. Se reprodujo, la abundancia relativa de especies en solución acuosa a pH fisiológico. Los resultados produjeron un mecanismo molecular referente al equilibrio tautomérico de las formas protonadas en solución acuosa, el cual no se ha descrito en la literatura científica. Acorde a este mecanismo, la transferencia entre los tautómeros +HN1H y +HN3H (formas protonadas en la cadena que presentan un átomo de hidrógeno en el N1 o N3 del imidazol respectivamente) procede a través de un enlace por hidrógeno intramolecular en solución acuosa.

Se construyó un modelo tridimensional para el receptor H₂ de histamina mediante las metodologías de mecánica molecular, utilizando como patrón inicial la estructura tridimensional de la bacteriorodopsina. Este modelo se mostró de acuerdo con los datos experimentales obtenidos con receptores con mutaciones puntuales, siendo el Asp 98 de la hélice 3 el residuo fundamental para la interacción con la histamina. El análisis del alineamiento de secuencias homólogas de los receptores H₂ de histamina en conjunto con el estudio del modelo propuesto, permitió postular que el Glu 270 de la hélice 7 podría ser importante en la actividad de estos receptores. Además se

determinó que la forma +HN3H extendida sería la conformación activa de la histamina.

El análisis de las interacciones de un grupo de antagonistas H2 de histamina con el modelo del receptor, permitió calcular que la famotidina es la molécula de mayor afinidad, mostrando éstas interacciones importantes con residuos aminoacídicos pertenecientes a las hélices 3 y 5.

Finalmente, se confrontó el mecanismo propuesto sobre la base de los resultados de cálculos químico-cuánticos con las interacciones esperables en la presencia de los sitios activos encontrados en la modelación del receptor. Dicho mecanismo resultó estar de acuerdo con el comportamiento observado en el modelo que describe la naturaleza de la interacción droga-receptor. Los resultados muestran que la transferencia protónica intramolecular ocurre en contraposición a la transferencia intermolecular propuesta por Weinstein, el cual es en la actualidad el mecanismo más popular en este campo.

Además, el proceso de transferencia intramolecular fue aplicado para la histamina monocationica inmersa en los sitios activos propuestos por Weinstein, encontrándose que este mecanismo es termodinamicamente factible en contraste con la transferencia protónica intermolecular propuesta por Weinstein.

La protonación del anillo imidazol de la histamina mostró ser una importante clave en la determinación de este mecanismo de equilibrio tautomérico en solución acuosa, tan bien como en la descripción de interacción molecular histamina-receptor H2.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

La histamina (Fig 1) es un metabolito producto de la descarboxilación de la histidina, cuya estructura química corresponde al 4-(2-aminoetil)-imidazol o β -(4-imidazolil)-etilamina. La histamina es biosintetizada principalmente en los mastocitos o células cebadas, cuya función primaria parece ser la de almacenar gránulos que contienen sustancias con intensa actividad farmacodinámica como heparina, histamina y serotonina entre otros. Estas células poseen receptores de superficie que se unen a anticuerpos denominados inmunoglobulinas E (IgE) y al entrar éstas en contacto con antígenos se desgranulan para liberar mediadores como la histamina (1).

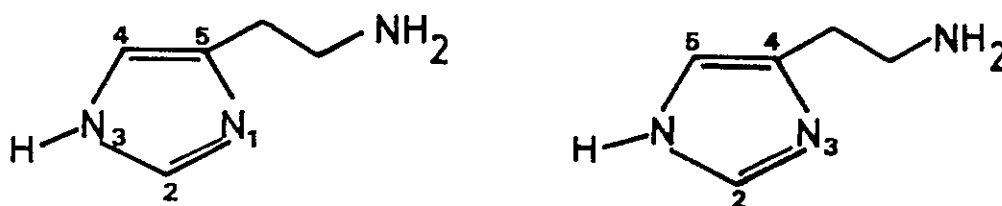


Figura 1

Numeración usada en
la tesis

Numeración
IUPAC

El rol fisiológico de la histamina en mamíferos, incluido el hombre, depende de la localización de ésta en los tejidos. Generalmente la piel, los tejidos conectivos, los pulmones y el tracto gastrointestinal son ricos en histamina; los músculos esqueléticos, el miocardio, los órganos endocrinos y los nervios periféricos contienen cantidades moderadas, mientras que en la sangre, los tejidos cerebrales y el riñón los niveles son bajos (2).

Las acciones biológicas de la histamina son múltiples, siendo ésta un mediador farmacológico en 1) reacciones de inmunidad e hipersensibilidad 2) contracción y relajación del músculo liso en sistemas vasculares y otros 3) secreción del ácido gástrico 4) cambios del ritmo cardíaco. Además, pruebas recientes establecen que la histamina también puede actuar como neurotransmisor en el cerebro (3).

1.1 Receptores de histamina

La clasificación original de los receptores de histamina se basa en el descubrimiento de los H₁, que data de 1966 (4). En aquel momento se caracterizó este tipo de receptor por comparación de las actividades relativas de una serie de análogos de histamina en tres preparaciones farmacológicas diferentes: a) acción secretora de ácido gástrico en estómago perfundido de rata, b) acción inhibitoria de la contracción del músculo liso en útero de rata estimulado por carbacol y c) acción estimuladora del músculo liso en fleo aislado de cobayo. Las potencias relativas de los análogos estudiados pusieron en evidencia la posibilidad de que existieran por lo menos dos tipos de receptores de histamina. La definición del receptor designado como "H₁" se basó en la existencia de antagonistas específicos y muy selectivos como es el caso de la

mepiramina. Las acciones mediadas por los receptores H1 incluyen la contracción del músculo liso del tracto gastrointestinal, del pulmón y del sistema génito-urinario entre otras. La mepiramina fue el primer "antihistamínico H1" de uso clínico, desarrollado a partir de la observación que protege los animales de experimentación contra los espasmos bronquiales inducidos por dosis letales de histamina. Sin embargo, este antihistamínico y muchos otros utilizados clínicamente no protegen contra todos los efectos producidos por la histamina, tales como la estimulación de la secreción de ácido gástrico o la relajación del útero de rata. La ineficacia de los antihistamínicos clásicos frente a este segundo grupo de acciones de la histamina llevó al descubrimiento en 1972 de otro tipo de receptores denominado H2 (5). En este trabajo se estudiaron tres tipos de sistemas que no involucran receptores H1 tales como a) la secreción gástrica, medida a través del pH del contenido gástrico en ratas anestesiadas, b) la frecuencia de contracción de la aurícula derecha de cobayo y c) la contracción del útero de rata provocada eléctricamente; y dos sistemas en los cuales intervienen receptores H1 como son: a) la contracción del fleo de cobayo y b) la contracción del estómago en ratas anestesiadas. Se determinaron las actividades relativas para una serie de compuestos análogos de la histamina, observándose diferencias significativas para los dos grupos de sistemas escogidos. Estos resultados, en conjunto con los estudios de la acción inhibitoria de la burimamida en la secreción gástrica, permitieron definir un nuevo receptor de histamina el cual fue designado como H2. Estos receptores están relacionados con los efectos cronotrópicos, la inhibición de la contracción del útero aislado de rata y la estimulación de la secreción de ácido gástrico y son bloqueados selectivamente por la cimetidina. Ambos tipos de receptores aparentemente se encuentran envueltos en la mediación de los efectos hipotensores de la histamina (5).

Arrang y colaboradores, en el año 1987 (3), proporcionaron fuertes indicios de la

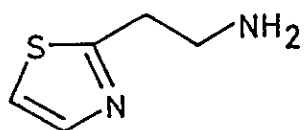
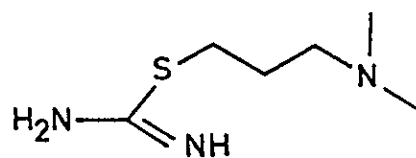
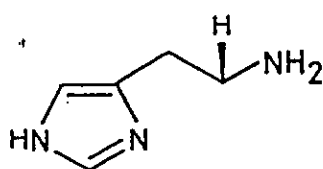
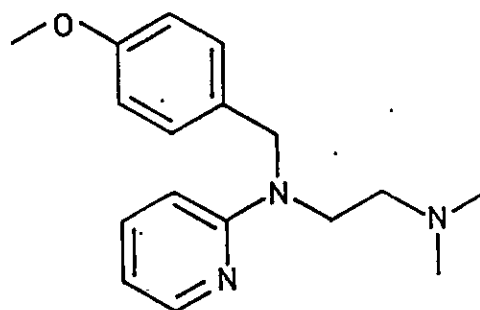
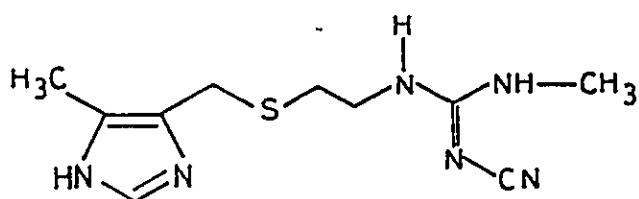
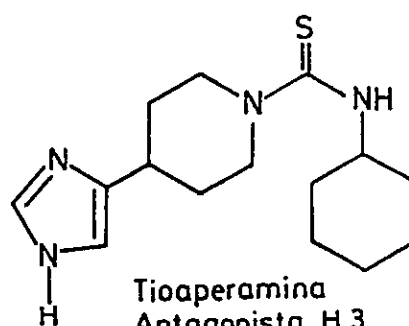
existencia de un nuevo tipo de receptor histaminérgico denominado H3. Este receptor está envuelto aparentemente en el control de la síntesis y liberación de histamina, en la inhibición de la neurotransmisión simpática en nervios perivasculares y en la relajación de venas cerebrales. Recientemente se ha demostrado que los supuestos receptores H3 modulan la neurotransmisión colinérgica en tráquea de cobayo y en bronquios humanos, actuando ya sea en ganglios parasimpáticos o en nervios postganglionares (6).

La existencia de subtipos de receptores para un mediador se revela desde un punto de vista farmacológico, como se ha visto, por medio de las respuestas diferenciales a diversos agonistas o antagonistas. En la Fig. 2 se presentan algunos fármacos selectivos que se utilizan en el estudio de las diferentes clases de receptores de histamina.

1.2 Agonistas de histamina

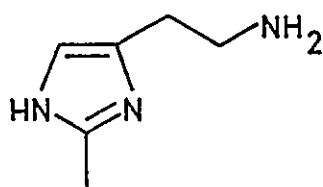
La histamina no tiene aplicaciones terapéuticas dada la rápida metabolización que sufre, ya sea por oxidación o por N-metilación. Por este motivo se ha desarrollado una serie de drogas con propiedades agonistas cuyas estructuras químicas se asemejan mucho a la de la histamina. Un agonista H1 moderadamente selectivo es la betahistina, que tiene un uso clínico muy limitado como vasodilatador. El betazol es un agonista H2 que estimula la secreción gástrica en forma preferencial, utilizándose como un secretagogo de ácido gástrico en el hombre (Fig. 3)

Figura 2

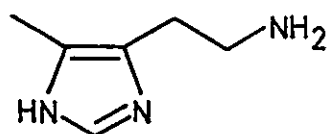
2-Tiazolietilamina
Agonista H1DIMAPRIT
Agonista H2(R)- α -Metilhistamina
Agonista H3Mepiramina
Antagonista H1Cimetidina
Antagonista H2Tioaperamina
Antagonista H3.

Agonistas y Antagonistas selectivos para los receptores

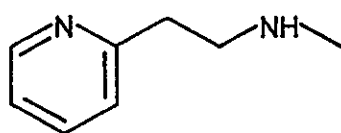
H1, H2 y H3 de histamina

Figura 3Agonistas H₁

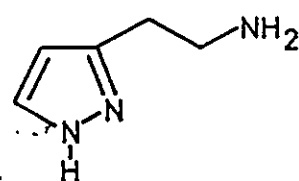
2-metilhistamina

Agonistas H₂

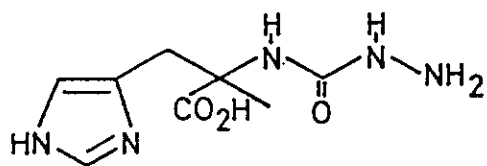
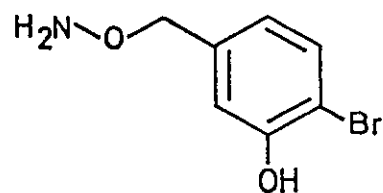
4-metilhistamina



Betahistina



Betazol

Inhibidores de la Histidina
Descarboxilasa α -metilhistidina semicarbazida

brocresina

Agonistas H₁ y H₂ de histamina
e inhibidores de la histamina descarboxilasa

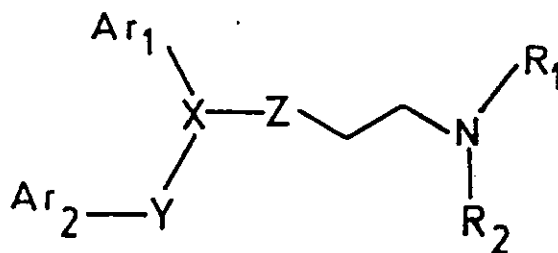
1.3 Antagonistas de histamina

Los efectos de la histamina pueden ser antagonizados por el uso ya sea de a) inhibidores de su biosíntesis, tales como la α -metilhistidinaseemicarbazida y la brocresina, que inhiben la histidina descarboxilasa o b) agentes antihistamínicos que antagonizan la acción de la histamina en sus receptores.

i) Antagonistas de receptores H1

El desarrollo de los antagonistas H1 data de las décadas de 1930 y 1940. Estos antagonistas producen efectos terapéuticos al suprimir síntomas asociados con la liberación de histamina y su interacción subsecuente con receptores H1. Los agentes clásicos de este tipo deben ser usados clínicamente teniendo presente que su baja selectividad hace que también actúen como anticolinérgicos muscarínicos, anestésicos locales y depresores o a veces estimulantes del sistema nervioso central. El uso de estas drogas se concentra fundamentalmente en el tratamiento de la urticaria, la dermatitis alérgica, el prurito y la rinitis alérgica.

Los antihistamínicos H1 más comunes presentan la estructura general



donde Ar₁ y Ar₂ son dos estructuras homo o heteroaromáticas, X es CH, N, C-O o C-N, NR₁R₂ es generalmente un grupo amino terciario y Z e Y pueden o no estar presentes siendo generalmente grupos metileno o heteroátomos.

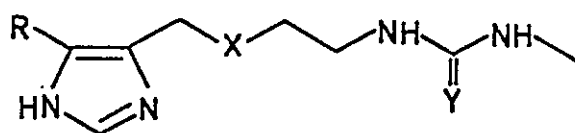
Los primeros neurolépticos, que corresponden a esta estructura general, fueron descubiertos buscando nuevos antihistamínicos y no están complemente libres de estas acciones. Por modificación ulterior de las estructuras de los neurolépticos tricíclicos fueron descubiertos los antidepresivos tricíclicos como la amitriptilina que también poseen actividad antihistamínica (7).

ii) Antagonistas de receptores H₂

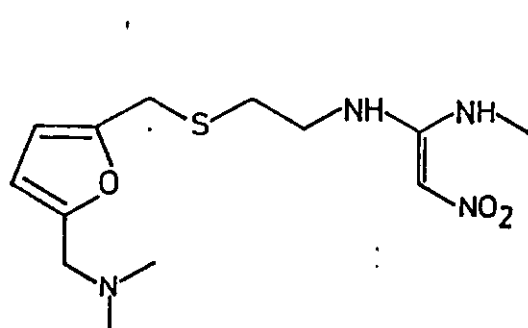
La incapacidad de los antihistamínicos H₁ de inhibir la secreción de ácido gástrico estimulada por histamina fue un hecho reconocido desde aproximadamente 1960. Por esta razón se desarrollaron variadas líneas de investigación con el fin de encontrar antihistamínicos capaces de contrarrestar los efectos producidos por la histamina en la mucosa gástrica.

Uno de los primeros antihistamínicos H₂ que fueron ensayados en el hombre fue la burimamida (Fig. 4). Con la inserción de un átomo de azufre en la cadena alquilica y un grupo metilo en el anillo imidazólico la burimamida fue transformada en metiamida (Fig. 5), que es más activa terapéuticamente pero que fue eliminada de los ensayos clínicos dados los efectos secundarios que produce. La cimetidina (Fig. 2), primer antagonista H₂ de uso clínico, fue desarrollada en el laboratorio Smith Klyne and French, e introducida en el mercado en el año 1972 (8).

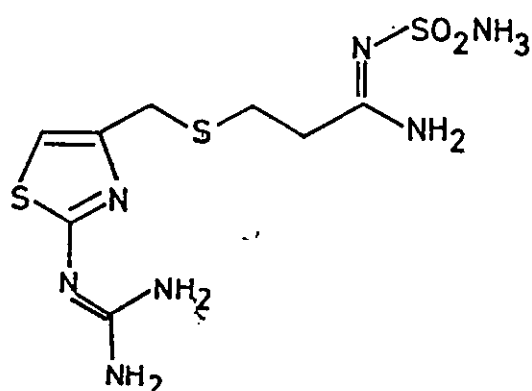
Los investigadores del laboratorio Glaxo, compitiendo con SKF, demostraron, a



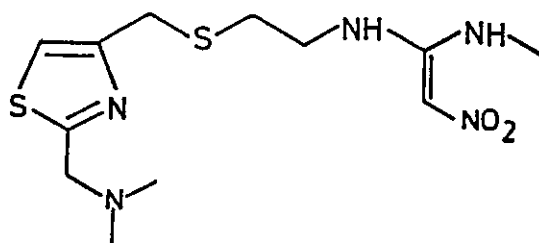
	R	X	Y
Fig. 4	H	CH ₂	S
Fig. 5	CH ₃	S	S



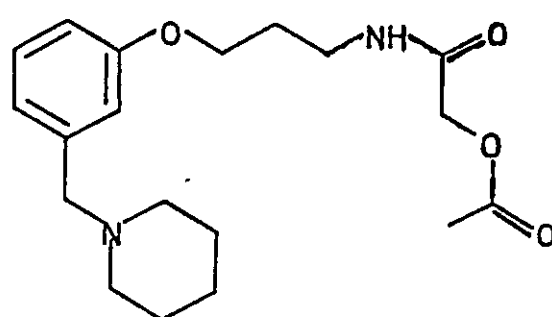
Ranitidina



Famotidina



Nizatidina



Roxatidina

Fig. 6

través de una serie de compuestos en los cuales se reemplazó el anillo imidazólico por uno furánico, que la actividad antagonista se puede expresar con uno u otro heterociclo. De esta serie se seleccionó la ranitidina (Fig. 6) para el desarrollo como fármaco de uso clínico, introduciéndola en el mercado en el año 1981 (9).

Investigaciones posteriores se desarrollaron en dichos laboratorios y en otros más, variando la cadena o el heterociclo, obteniéndose antihistamínicos H₂ más potentes como la famotidina, la roxatidina y la nizatidina (Fig. 6) (10-12).

1.4 Antecedentes experimentales y teóricos de aspectos estructurales de histamina y compuestos análogos incluyendo interacciones de estas drogas con el receptor H₂.

1.4.1 Histamina, agonistas y modelación de receptores H₂.

La estructura química de la histamina se asemeja a las de las monoaminas neurotransmisoras. Sin embargo, la histamina no existe en solución acuosa como una única especie, sino que hay un rápido equilibrio dinámico entre varias especies iónicas, tautoméricas y conformacionales.

Estudios de relaciones estructura-actividad indican que modificaciones que afecten las poblaciones relativas de las diferentes formas iónicas, tautoméricas o conformacionales pueden afectar la actividad biológica, habiéndose llegado a creer que quizás una sola de las especies involucradas sería la que presentara determinada acción farmacológica.

La histamina posee dos formas tautoméricas electricamente neutras denominadas N¹H y N³H. Esta nomenclatura, que es la utilizada en esta tesis para designar los

nitrógenos del heterociclo, se ha hecho tradicional en la literatura sobre el tema pero no corresponde a la que recomiendan las reglas de la IUPAC (ver Fig. 1). Así, el átomo llamado N1 según las reglas internacionales se designará de aquí en adelante "N3", y el N3 según la IUPAC aparecerá como "N1". La protonación del nitrógeno alifático de las formas neutras conduce a dos formas monocatónicas denominadas +HN1H y +HN3H, existiendo otra forma monocatónica que se obtiene por la protonación del segundo nitrógeno del anillo imidazólico, HAH+, y un dicatión en el cual están protonados tanto el nitrógeno alifático como los del anillo (Fig. 7).

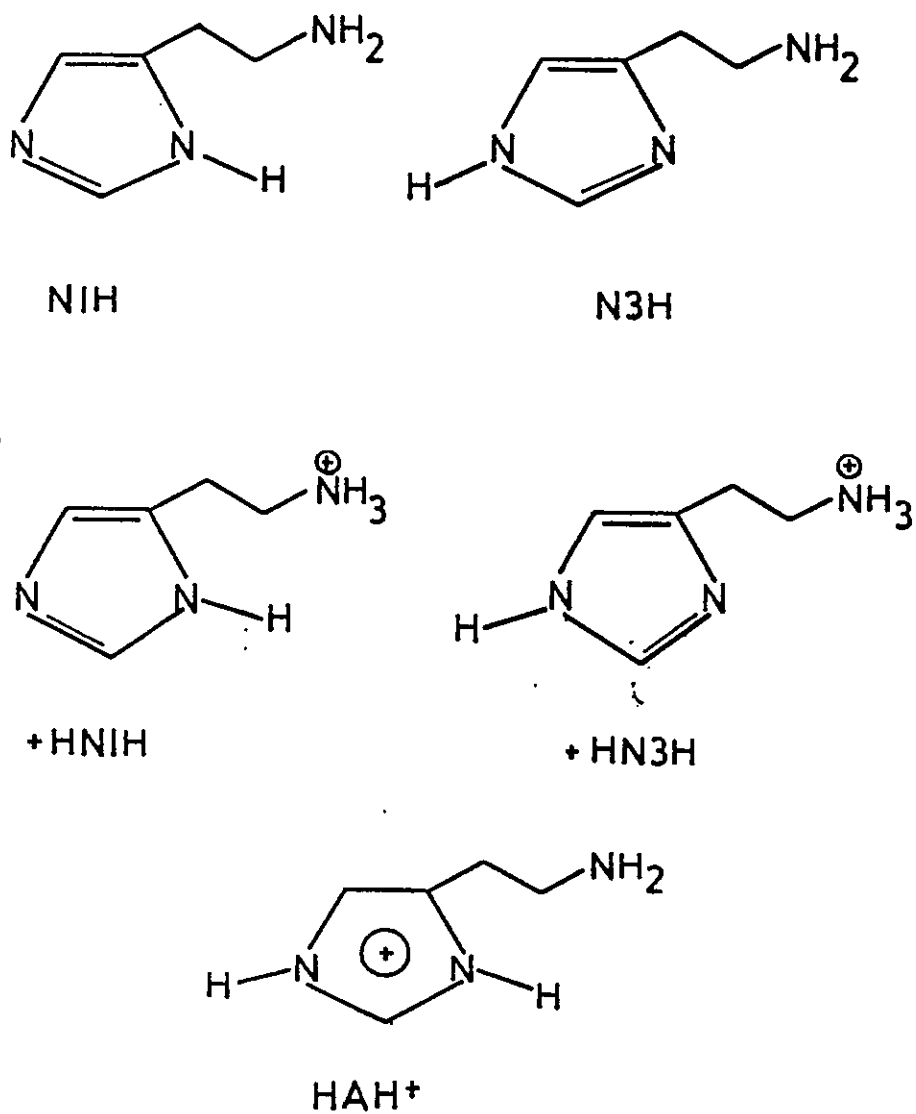
En solución acuosa, la histamina existe como una mezcla que contiene todas las formas anteriormente descritas, donde la concentración relativa de ellas depende fundamentalmente del pH de la solución. La tabla I presenta un resumen de las abundancias de las especies de histamina en solución acuosa.

TABLA I Abundancias relativas de especies de histamina en solución acuosa (13-14).

Especie	Porcentaje de especies		
	a pH 5,4	a pH 7,4	a pH 8,4
Dicatión	71,5	2,4	0,25
Monocaciones	28,5	96,6*	-
Neutra	$3,0 \times 10^{-3}$	1	9
Anión	$1,0 \times 10^{-11}$	$2,5 \times 10^{-7}$	-

* de este porcentaje el 80% se encuentra en la forma +HN3H.

Figura 7



Histamina en sus formas N1H, N3H y protonadas

+HN1H, +HN3H y HAH⁺

A pH fisiológico (pH=7,4), aproximadamente el 99% de todas las moléculas de HA se encuentran protonadas. Estudios de RMN de ^{13}C (15) confirmados por estudios mediante titulaciones potenciométricas (16), indican que en solución tamponada a pH=7,4, aproximadamente el 80% de las moléculas de HA están presentes en la forma +HN3H en equilibrio principalmente con la forma +HN1H.

La estructura cristalina del bromhidrato de histamina presenta la forma +HN3H, la cual exhibe un puente de hidrógeno entre el nitrógeno de la cadena de una molécula y el nitrógeno "N1" del anillo imidazólico de otra (17); en cristales de histamina neutra la molécula está presente como el tautómero N1H, encontrándose un enlace por hidrógeno intermolecular entre el nitrógeno alquílico de una molécula y el "N3" del anillo imidazólico de otra (18).

Worth y Richards calcularon la constante del equilibrio tautomérico +HN3H - +HN1H en solución acuosa, utilizando el método de la perturbación de la energía libre (19). El valor de la constante de equilibrio para las formas monocatiónicas de 6,7, se encuentra bastante cerca del valor experimental de poco más de 4 a pH=7,4.

La existencia de una forma que presenta un enlace por hidrógeno intramolecular ha sido postulada en varios trabajos. Newman y Hays (20), basados principalmente en datos farmacológicos correspondientes al compuesto similar a histamina β -(2-piridil)-etilamina (Fig. 8), han planteado que la actividad biológica de la histamina podría depender de la existencia de un enlace por hidrógeno entre el grupo amino protonado y el nitrógeno imidazólico "N1". Un enlace por hidrógeno análogo fue propuesto por Lee y Jones (21) a partir de sus análisis de los requisitos estructurales para la actividad de histamina y sustancias relacionadas en solución acuosa.

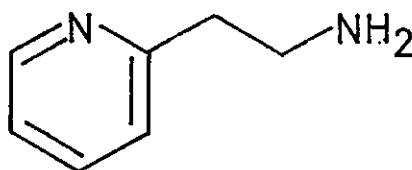


Figura 8

Un estudio teórico de Weinstein y colaboradores indicó que la forma más estable de la molécula de histamina correspondería a una conformación plegada con un enlace intramolecular por hidrógeno entre el "N1" del anillo imidazólico y la amina alifática (22). Similares resultados son obtenidos a través de la metodología PCILO que también indicó la forma plegada como la estructura más estable (23).

Smeyers y col. (24-25), basados en cálculos CNDO/2 para algunos agonistas H₂, encontraron dos conformeros estables por rotación alrededor del enlace C-C de la cadena aminoalifática: el anti y uno syn o "gauche" que exhibe un enlace por hidrógeno intramolecular entre el nitrógeno alifático y el "N1". Estos autores postulan que la presencia de un medio polarizable podría romper este enlace, estabilizando una conformación abierta, muy cercana a la anti, de manera que esta última sería la conformación esencial para la actividad de agonistas H₂. Este razonamiento conlleva el error muy difundido de suponer que una conformación estable sería la responsable de la actividad farmacofórica.

Recientemente, O. Tapia y colaboradores calcularon la hipersuperficie de energía potencial para uno de los monocationes de histamina (+HN₃H) a través de la metodología ab initio usando una base RHF-STO-4G. Los resultados indicaron la existencia de tres estados de transición y dos mínimos energéticos principales. Uno de

los mínimos corresponde a una conformación extendida, mientras que el otro, más estable, corresponde a una estructura plegada que los autores denominan "escorpión" y que presenta un enlace por hidrógeno intramolecular entre el nitrógeno alifático y el "N1" del imidazol (26).

Estudios experimentales recientes, utilizando la espectroscopía de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier para determinar la basicidad en fase gaseosa de la histamina protonada, revelaron que la quelación provee la principal contribución a la estabilidad de esta especie (27). Cálculos ab initio con una base 6-31G//6-31G están de acuerdo con estos resultados experimentales, que indicaron que en el vacío la protonación en el anillo está favorecida con respecto a la protonación en la cadena (27).

En resumen, los resultados teóricos de Tapia y los teóricos y experimentales de Smeyers y col. concuerdan con que la forma más estable de la histamina protonada en fase gaseosa involucra un enlace por hidrógeno intramolecular entre los nitrógenos 1 y 12, donde la cadena alifática yace sobre el plano del anillo imidazólico.

Debido a la carencia de datos experimentales de la estructura del receptor H₂, se han postulado aspectos topológicos de él a partir de la descripción estructural de la histamina y a partir de propiedades de aminas y análogos mediante técnicas estadísticas, conocidas como QSAR que correlación propiedades afines con la actividad biológica y como resultado predicen estructuras de agonistas o antagonistas que posean mayor o menor actividad farmacológica. Las primeras hipótesis referentes a la topografía de receptores de histamina se basaron en los cálculos de orbitales moleculares de Kier (28), los cuales permitieron postular que las diferentes acciones de la histamina podrían basarse en la existencia de dos conformeros preferenciales que podrían dar origen a dos respuestas biológicas distintas. Según este autor, los

receptores H1 serían complementarios del conformero anti, en el cual la distancia entre el "N1" del anillo imidazólico y el nitrógeno del grupo amino es de aproximadamente 4,55 Å, mientras que los receptores H2 se complementarían con un conformero syn cuya distancia internitrógenos sería de aproximadamente 3,60 Å.

En 1976, Weinstein y otros, basados en cálculos de orbitales moleculares y de potenciales moleculares electrostáticos a través de la metodología ab initio STO-3G (29), propusieron la hipótesis que la interacción de la histamina con el receptor H2 envuelve tres componentes: a) una interacción electrostática entre el nitrógeno protonado de la cadena y un sitio I del receptor; b) un enlace de hidrógeno entre el "N3" del anillo imidazólico y un sitio II del receptor y c) un enlace de hidrógeno entre el "N1" del anillo imidazólico y un sitio III del receptor.

En 1986 el equipo de Weinstein (30) realizó un estudio ab initio STO-3G de la transferencia protónica para la histamina en el modelo molecular recientemente descrito (29) desarrollado por ellos. La modelación del receptor se realizó simulando un sitio aniónico (I) a través de un anión hidroxilo, el cual se hizo interactuar con el sitio catiónico de la cadena protonada. Dos sitios dador y aceptor de protones (II y III respectivamente) fueron modelados por un catión amonio y una molécula de amoníaco. En este modelo, una vez que se ha neutralizado la carga positiva de la cadena de etilamonio por la carga negativa del receptor, la distribución electrónica de la histamina cambia, pasando a favorecer la forma $+HN1H$. Extrapolando los resultados ellos propusieron que el mecanismo de activación de los receptores H2 estaría mediado por una transferencia de carga, proceso posibilitado por la tautomería de la histamina. Sin embargo los cálculos de las barreras de energía para la transferencia protónica indicaron valores muy altos, por lo que los autores postularon que el solvente y el medio biológico deberían bajar estas barreras y así hacer posible la

transferencia.

El modelo de Weinstein fue validado por Luque y col. (31), quienes estudiaron una serie de agonistas H₂; para cada uno de ellos, la función de energía potencial de transferencia protónica fue calculada por metodologías AM1 y MNDO, obteniendo resultados cualitativamente semejantes a los citados anteriormente. Además, estudios realizados por Smeyers y col. (32), en los cuales se compararon las conformaciones de la histamina y de algunos agonistas H₂ sustituidos en la posición 5 (numeración IUPAC) del anillo y se estudió la tautomería N1H-N3H utilizando la metodología ab initio STO-4G, concluyeron que el equilibrio tautomérico constituiría una etapa necesaria para la acción de estos fármacos sobre los receptores H₂ de histamina.

Para poner a prueba la conjetura de Weinstein relativa al efecto del medio, Gómez-Jeria y Parra-Mouchet (33) calcularon el efecto de la polaridad del solvente sobre la estructura de la histamina en el modelo descrito por ellos, utilizando el esquema de campo de reacción implementado en la metodología CNDO/2 (CNDO/2-RF). Los resultados obtenidos indicaron que tanto las barreras de energía para la transferencia protónica intermolecular, como los mínimos relativos de energía serían independientes de la constante dieléctrica del medio, lo que no sería coherente con la hipótesis de Weinstein.

Recientemente, Nagy y col. (34) realizaron un estudio teórico de la posición del equilibrio tautomérico a partir de análisis conformacionales de la histamina y de la (α R, β S)- α,β -dimetilhistamina en fase gaseosa y en solución acuosa, utilizando la metodología ab initio con bases extendida incluyendo interacción de configuraciones. Para la descripción del sistema en solución acuosa utiliza simulación Montecarlo en el marco del método de perturbación estática. Sus resultados indicaron que para la histamina neutra en el vacío los conformeros más estables fueron el N1H syn y el N3H

syn estabilizados por interacción de hidrógeno intramolecular. Las estructuras protonadas que prevalecerían a pH fisiológico son una forma +HN3H syn (64%) en equilibrio con dos formas extendidas +HN3H (34%) y +NH1H (2%). De acuerdo con el modelo molecular de Weinstein, los autores proponen que la forma +HN3H syn interactuaría con una zona del receptor cargada negativamente. Después de la desprotonación, la histamina sufriría un cambio conformacional, predominando entonces el tautómero N1H extendido, que sería el conformero neutro más estable en solución acuosa. La diferencia de energía interna libre entre la forma N3H trans y la forma N1H trans (la N1H sería 0,9-1,8 Kcal/mol más estable que la forma N3H) sería explicada a través del proceso de transferencia protónica necesario para la activación de los receptores H2 en el modelo de Weinstein.

Recientemente, el grupo de Timmerman (35), desarrolló un modelo para una serie de agonistas de receptores H2, a través de cálculos teóricos y medidas de constantes de acidez, para una serie de derivados de histamina y análogos heterocíclicos incluyendo algunos que no poseen un equilibrio tautomérico. Los resultados indicaron que la forma extendida monocatiónica era la predilecta para la interacción con el receptor H2, ya que la competencia entre un centro aniónico del receptor y el "N1" del heterociclo determinaría la preferencia por una conformación abierta. Este modelo postula cuatro posibles sitios de unión en el receptor. En el caso de los agonistas 5-aminoetiltiazólicos, después de la interacción del grupo amonio alifático de la cadena con un grupo cargado negativamente en el receptor (sitio I), se protonaría el nitrógeno del anillo tiazólico del agonista (correspondiente al "N3" de la histamina) a través del sitio III, dador de protones. La distribución de la carga positiva en el anillo heterocíclico permitiría una interacción electrostática con una carga negativa del sitio II (aceptor de protones). La carga negativa generada en el sitio III, producto de la

donación del protón, interactuaría con un sitio adicional IV, produciendo así la activación de los receptores H₂ de histamina (Fig. 9). Mientras que para el caso de los 5-aminoetiltiazoles la participación del sitio II estaría sólo limitada a una interacción electrostática, para los 4-aminoetilimidazoles existiría un puente por hidrógeno entre el nitrógeno "N1" del anillo y este sitio. Este modelo presenta una explicación cuantitativa para la diferente afinidad de los agonistas H₂, tanto los tautoméricos como los no tautoméricos, al relacionarla con las constantes de afinidad y las constantes de asociación protónica para el anillo heterocíclico, encontrándose que mientras más básico es este último más activo es el análogo de histamina. La basicidad del núcleo heterocíclico sería entonces un requisito fundamental para la activación de estos receptores. Dada la serie de compuestos estudiados por Eriks y otros, esta conclusión sería válida únicamente para moléculas capaces de aceptar un protón en una región "distal" con respecto al grupo amonio y de interactuar electrostáticamente o formar puente de hidrógeno con el receptor desde una región "proximal". Esto se debería corroborar a partir de análogos rígidos.

1.4.2 Antagonistas H₂ de histamina

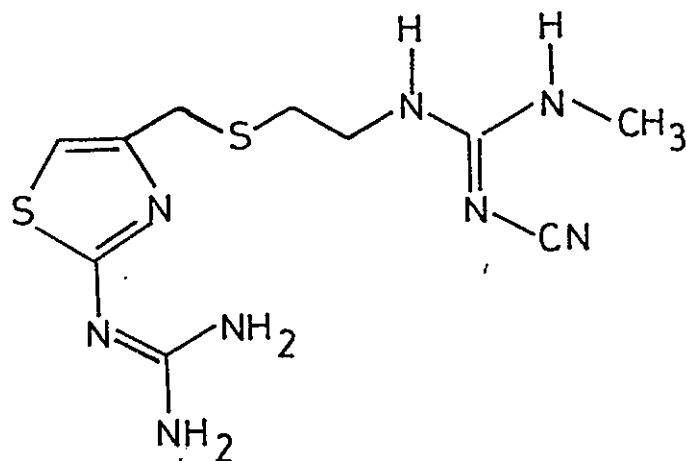
En el caso de los antagonistas H₂ de histamina la metodología de análisis cuantitativo de relaciones estructura-actividad (QSAR) es la más ampliamente usada. Sin embargo, aún no existe una idea precisa acerca de la contribución de diversos aspectos de la estructura a su función. Empíricamente se ha establecido una estructura general para la acción de dichos antagonistas que debieran presentar: 1) un sistema _ básico o que contenga algún grupo básico 2) una cadena flexible y 3) un grupo polar

neutro.

Un trabajo de QSAR (36) para derivados de cimetidina en el cual se superpusieron las estructuras en sus formas más estables, obtenidas a través del método PM3, y se correlacionaron diversos parámetros moleculares con sus actividades, indicó que los potenciales electrostáticos de la parte polar de la cadena (cianoguanidínica o análoga) y las lipofilias de las moléculas serían los factores determinantes de la actividad en esta serie. Además, la superposición de tres estructuras, una activa (cimetidina), otra poco activa y la tercera inactiva, estableció que tanto rasgos estéricos como las propiedades electrostáticas serían esenciales para que se pueda plantear bioisosterismo de diferentes moléculas en su acción sobre los receptores H₂.

Los estudios de las propiedades conformacionales para este tipo de antagonistas han proporcionado sólo información cualitativa, pero estudios racionales y sistemáticos que justifiquen la actividad de algunos antagonistas en función de su estructura e interacción con posibles sitios del receptor son aún muy escasos (37).

Un modelo de interacción fue desarrollado recientemente por el equipo de Timmerman (Haaksma y otros, 1992) (38) para la tiotidina y análogos (Fig. 10). En éste se plantean a lo menos tres posibles sitios de unión con el receptor H₂ de histamina. Dos interacciones involucrarían los grupos NH₂ de la cadena guanidínica, fuertemente básica. El tercer sitio de interacción aceptaría el protón del NH que une la larga y flexible cadena a la porción cianoguanidínica.



Tiotidina

Figura 10

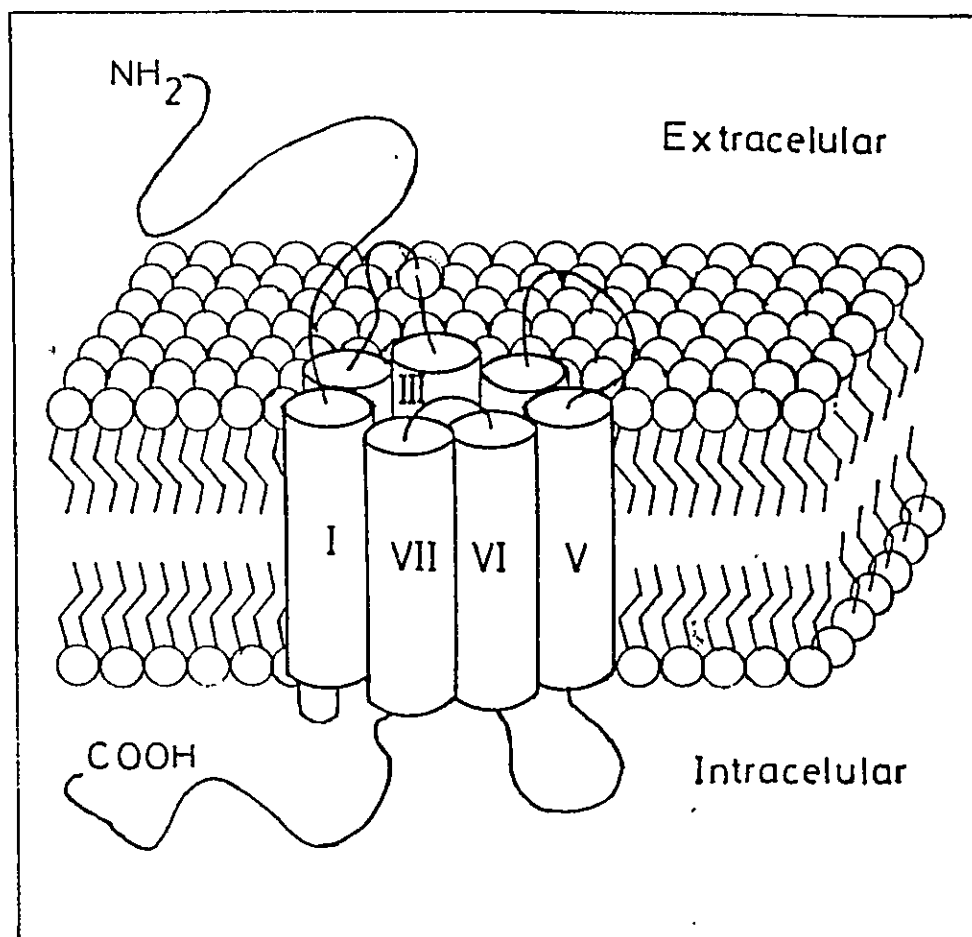
Finalmente, la tiotidina, la famotidina y análogos presentarían un puente por hidrógeno intramolecular entre el nitrógeno guanidínico terminal y el nitrógeno del anillo tiazólico, el cual proporcionaría una conformación estable y más compacta para estas moléculas, la que podría ser la estructura preferencial para que ellas ingresaran a los receptores H₂ de histamina (39).

1.5 Antecedentes para la modelación del receptor H2 de histamina por mecánica molecular

El desarrollo de las técnicas de clonación molecular ha permitido reevaluar la clasificación de los receptores biológicos y aumentar el número de receptores identificados. Es así como se ha podido determinar que una amplia gama de hormonas polipeptídicas, neurotransmisores, mediadores de la respuesta inflamatoria y otras moléculas bioactivas transducen su señal al medio intracelular interactuando con una clase de receptores estructuralmente homólogos. Estos receptores, insertos en la membrana plasmática, se encuentran acoplados a proteínas asociadas a la cara citoplasmática de la membrana denominadas proteínas G (40). La respuesta funcional provocada por la activación de los receptores acoplados a proteínas G (RAPG) no sólo depende de ellos, sino también de la disponibilidad de la proteína G y de sistemas amplificadores de la señal además de los sistemas efectores intracelulares.

Estos receptores muestran como rasgo estructural común la presencia de siete regiones hidrofóbicas (hélices putativas que atravesarían la membrana) unidas entre sí por lazos que se suponen extra- e intracelulares (Fig. 11). Estudios para algunos receptores adrenérgicos y muscarínicos, los cuales son activados por ligandos endógenos pequeños, indicaron que tales receptores carecen de un dominio aminoterminal (extracelular) importante (40). Por lo tanto, el enlazamiento del ligando debería producirse en el interior de la región hidrofóbica del receptor. Un gran número de aminoácidos están conservados en los receptores de neurotransmisores, que en consecuencia muestran importantes grados de homología. Estas homologías se concentran fundamentalmente en los dominios supuestamente transmembranales 3 y 5,

Figura 11



Esquemática de los receptores acoplados a proteína G

donde se encuentran determinados residuos de aspartato y serina que serían importantes para la unión con el ligando.

El primer receptor H₂ de histamina fue clonado recién en 1991 por Gantz y col. (41) usando el cDNA de las células parietales gástricas de perro. Estos autores encontraron que su receptor poseía 7 regiones hidrofóbicas muy bien definidas, razón por la cual lo incorporaron a la gran familia de RAPG. Estos mismos autores (42), basados en estudios de mutagénesis puntuales y analizando las homologías con los receptores β_2 adrenérgicos, identificaron algunos aminoácidos importantes para el enlazamiento de la histamina. Es así como se postuló que un aspartato en la hélice o dominio 3 (Asp 98) interactuaría a través de una interacción electrostática con el grupo amino alifático cargado de la histamina. La mutación de este aminoácido por asparagina provocó la disminución de la afinidad y actividad de la histamina.

Otro aspartato (Asp 186) y una treonina (Thr 190) en la hélice 5 también estarían involucrados en el sitio de reconocimiento del receptor. La mutación del Asp 186, sólo o en combinación con la mutación de la Thr 190, provocó una disminución de la afinidad por el antagonista tiotidina. Sin embargo, la estimulación de la síntesis del segundo mensajero AMP cíclico por histamina fue mantenida, lo que demuestra que este aminoácido estaría relacionado con la selectividad de los antagonistas. La mutación de Thr 190 por sí sola provocó sólo una disminución de la afinidad y actividad. Estos datos indicaron que sólo el Asp 98 era esencial para que se mantuviera la afinidad y actividad de estos receptores, siendo el Asp 186 importante para definir su selectividad mientras que la Thr 190 estaría involucrada en la cinética de enlazamiento de la histamina, pero no sería esencial para la selectividad de los receptores H₂. Se postuló entonces que este trío de residuos aminoacídicos corresponde a los posibles tres sitios hipotéticos descritos en el modelo de Weinstein y

col. (29-30), en el cual el equilibrio tautomérico del ligando se suponía vital para una interacción eficaz con estos receptores.

Basados ahora en un conocimiento más profundo del receptor H₂ de histamina, se realizaron algunos estudios teóricos modelando el sitio de unión con moléculas que representaran mejor los residuos implicados en la interacción.

En un trabajo de Giraldo y col. (43) se simularon los aspartatos por aniones formiato y el sitio dador de protón por un catión amonio, suponiendo todavía que el aminoácido correspondiente en el receptor H₂ fuera Lys, Arg o His en lugar de Thr. Este modelo fue utilizado para elucidar el mecanismo de acción farmacológica de antagonistas como cimetidina, ranitidina y tiotidina. Los resultados indicaron que la forma monocatiónica de estos antagonistas sería la especie preferida para el enlazamiento con el receptor. Además, el modo de reconocimiento sería análogo para los diversos tipos de compuestos que actúan como antagonistas: un sitio protonado de la molécula, el imidazolio en la cimetidina, el guanidinio en la tiotidina, o el dimetilamonio en la ranitidina, interactuaría electrostáticamente con un sitio aniónico en el receptor. Determinados grupos de la cadena más larga de estos antagonistas se interpondrían entre los otros dos sitios a través de interacciones por puente de hidrógeno, aumentando la afinidad del ligando por el receptor. Este modelo explica adecuadamente la afinidad de los antagonistas por el receptor H₂, apreciablemente mayor que la de la histamina por el mismo.

A partir de los antecedentes anteriormente presentados y el conjunto de una diversidad de estudios en el campo de los receptores H₂ de histamina, es claro que aún existe un gran número de interrogantes que deben ser resueltas. Específicamente las principales preocupaciones que siguen en discusión son:

- 1.- Racionalización de la distribución de los conformeros/tautómeros de la histamina monoprotonada en fase gaseosa y en solución acuosa.
- 2.- Obtención de un mecanismo molecular para el equilibrio tautomérico de la histamina en agua.
- 3.- La contribución del equilibrio tautomérico y/o las propiedades ácido-base del heterociclo a la activación de los receptores H₂.
- 4.- La contribución de características conformacionales y electrónicas de los antagonistas H₂ de histamina a su reconocimiento por los receptores H₂.
- 5.- La obtención de un primer modelo del receptor H₂ utilizando la metodología de la Mecánica Molecular.

Teniendo esto en mente, la hipótesis de esta tesis es:

- 1.- Sería necesaria la existencia de un centro cargado positivamente, tanto en agonistas como en antagonistas, el cual actuaría como "ancla" de estas estructuras en el receptor, existiendo en los agonistas la necesidad de otro tipo de interacciones para lograr la activación del receptor y, en los antagonistas, interacciones adicionales que tuvieran por resultado el aumento de su afinidad por el receptor.
- 2.- El equilibrio tautomérico sería importante para la activación de los receptores H₂ en aquellos compuestos que presentan un grupo funcional que permita este efecto, pero debería existir otro tipo de mecanismo más general que involucre cualquier otro compuesto que tenga una estructura no tautomérica pero sí un efecto agonista en este tipo de receptores.
- 3.- Este mecanismo de activación debería estar ausente o bloqueado en la interacción del receptor con los antagonistas.

1.6 OBJETIVOS DEL TRABAJO

De acuerdo con los antecedentes expuestos, se puede afirmar que las investigaciones precedentes han dejado aún problemas planteados y que los datos recogidos son todavía insuficientes para establecer de manera fehaciente y racional una relación general entre la estructura y la actividad de los ligandos que se unen a los receptores H₂ de histamina.

Los objetivos que se plantean en esta tesis son:

Objetivo General

Proponer un mecanismo de interacción ligando-receptor para la histamina y sus análogos que contribuya a aclarar algunas de las cuestiones pendientes.

Para cumplir con este objetivo se hace necesaria la elección de disciplinas científicas que puedan dar cuenta de procesos químicos que ocurren en fase condensada donde las interacciones con el solvente juegan un rol en el comportamiento de las moléculas y sus reacciones. Esta necesidad se hace indispensable en sistemas tales como la histamina y sus análogos en los cuales los equilibrios conformacionales y tautoméricos pueden ser afectados por la presencia de un medio polarizable.

Dado que la química cuántica es una disciplina que permite controlar muchas variables, constituye una herramienta poderosa en la elucidación de una reactividad molecular. Ella posee una formulación teórica que puede dar cuenta en forma confiable de las propiedades de sistemas tales como la histamina y análogos, tanto en

fase gaseosa como en fase condensada. Para lograr una completa descripción de los sistemas droga-receptor, sin embargo, se hace necesario el estudio de sistemas macromoleculares para los cuales la química cuántica presenta graves limitaciones.

La mecánica molecular, a través de sus herramientas particulares, proporciona una metodología útil para el estudio de sistemas macromoleculares tales como los receptores H₂ de histamina. Sin embargo, dado que esta metodología está basada en una formulación clásica, no permite dar cuenta de la formación o rompimiento de enlaces, y por lo tanto no puede ser aplicada a determinados procesos químicos debido a que su formulación analítica es inadecuada para tal efecto.

Esta limitación puede ser resuelta por el uso de la mecánica cuántica, la cual permite en principio describir procesos tales como formación o rompimiento de enlaces, transferencia electrónica, propiedades ácido-base, etc. Por lo tanto resulta claro que una solución global a la problemática de las interacciones de histamina y análogos con los receptores H₂ de histamina se puede obtener de manera mucho más satisfactoria combinando los enfoques clásicos y cuánticos. Ya que se posee un cúmulo de información experimental y teórica valiosa publicada en la literatura científica, ésta nos permitirá corroborar los resultados alcanzados en esta tesis y validar a su vez las metodologías seleccionadas.

En este contexto los objetivos específicos son:

Objetivos Específicos

- 1.- Estudio de la estructura electrónica y propiedades conformacionales de la histamina y análogos.
- 2.- Cálculo de las energías de las moléculas neutra y protonada en sus diversas formas

tautoméricas para determinar el equilibrio entre especies.

3.- Evaluación del efecto del solvente en la estructura molecular de la histamina y en sus equilibrios.

4.- Determinación de la importancia relativa del equilibrio tautomérico $+HN3H - +HN1H$ en la acción de la droga sobre el receptor.

5.- Diseño de un modelo para los receptores H2 de histamina.

6.- Evaluación y análisis del modelo obtenido para los receptores H2, a través del estudio de:

i) mutagénesis puntuales teóricas

ii) equilibrio tautomérico de la histamina unida al receptor

iii) equilibrio conformacional de la histamina unida al receptor

iv) afinidades y modos de unión al receptor de algunos antagonistas H2 de histamina.

La disciplina de la mecánica cuántica será utilizada para llevar a efecto los cuatro primeros objetivos, mientras que la mecánica molecular nos permitirá resolver los dos últimos.

1.7 Organización de la tesis

En la introducción del trabajo se presentó una revisión bibliográfica con los antecedentes más relevantes del problema a investigar; además se informó de los objetivos que se persiguen y se justificaron las metodologías seleccionadas para cumplir con los objetivos propuestos. En el capítulo 2 se presentan el formulismo teórico y justificación de las metodologías mecano-cuánticas utilizadas con los

correspondientes resultados, la discusión de éstos y las conclusiones obtenidas para la histamina y sus análogos. En el capítulo 3, se trata la modelación del receptor H2 de histamina a través de la mecánica molecular, presentando los antecedentes teóricos generales de la metodología utilizada, con los correspondientes resultados, discusión y conclusiones obtenidas para el modelo de receptores H2 de histamina y sus interacciones con la histamina y algunos antagonistas. El capítulo 4 presenta el mecanismo general propuesto para los receptores H2 de histamina basado en la confrontación de los resultados obtenidos en los capítulos 2 y 3. Este mecanismo se estudia en el marco de la química cuántica. Además en este capítulo se comparan los resultados obtenidos con el mecanismo propuesto por Weinstein. Se finaliza con las conclusiones generales de la investigación realizada.

CAPITULO 2

MECANICA CUANTICA

2.0 Métodos y cálculos

La teoría de orbitales moleculares se ha desarrollado a través de metodologías ab initio y semiempíricas. Debido a que la primera calcula todas las integrales, representa un método sistemático de abordar el problema de la solución de la ecuación de Schrödinger a nivel de Hartree-Fock, ya que de acuerdo al teorema variacional de Eckart, a medida que se aumente la dimensión de la base, los valores medios de la energía electrónica total deben en general disminuir (pero jamás aumentar). En la representación de la teoría de Hartree-Fock-Roothaan, la base está representada por orbitales atómicos, siendo los orbitales atómicos de Slater los más indicados. Debido a que las integrales involucradas en las ecuaciones de Fock no tienen solución analítica, éstas se han representado como combinaciones lineales de funciones gaussianas, dando origen a las bases STO-NG^a (Slater Type Orbital-descripción del número de gaussianas utilizadas y el número de estas combinaciones, donde *a* representa funciones adicionales), que sí tienen soluciones analíticas. Actualmente existen combinaciones lineales de gaussianas muy elaboradas, que toman en cuenta bases extendidas, funciones de polarización, de difusión, etc. La solución de la ecuación de Schrödinger se acerca asintóticamente al límite de Hartree-Fock, es decir, deja fuera la energía de correlación. Esta última puede tomarse en cuenta a través de la interacción de configuraciones, que consiste en agregar otras configuraciones,

representadas por determinantes de Slater a la función de onda molecular; el número de configuraciones necesarias para obtener valores significativos de correlación electrónica es muy alto. A pesar del gigantesco avance computacional en las últimas décadas, ambos factores: la dimensión de la base y el número de configuraciones, sólo hacen posible en la actualidad aplicar con éxito esta metodología a moléculas pequeñas (alrededor de 5 átomos).

Al mismo tiempo, los avances científicos y tecnológicos han producido métodos semiempíricos sofisticados que permiten calcular con éxito algunas propiedades moleculares, amén de la energía electrónica total del sistema molecular. Los métodos semiempíricos reemplazan el cálculo de algunas integrales involucradas en las ecuaciones de Fock por parámetros determinados experimentalmente; la calidad de los resultados dependerá de la representatividad de los parámetros para el sistema que se está describiendo. Debido al ahorro de memoria computacional que se logra de esta manera, estos métodos pueden aplicarse a sistemas moleculares de mediana magnitud, que alcanzan máximos de 30 a 100 átomos, dependiendo fundamentalmente de la capacidad de memoria.

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron métodos ab initio STO-3G (44) y semiempíricos: CNDO/2 (Complete Neglect of Differential Overlap), (45) AM1 (Austin Model 1) (46) y PM3 (Parametrization 3) (47); estos dos últimos utilizan un hamiltoniano del tipo MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap) (48). Además, para describir el efecto de la polaridad del solvente en la estructura electrónica de las especies protonadas y en la función de potencial de transferencia protónica en solución acuosa, se utilizó el modelo teórico de campo de reacción (RF), en la versión de solvente continuo implementado en la metodología CNDO/2, (49).

Siendo el MNDO un método más complejo que el CNDO (ya que toma en cuenta

las repulsiones entre pares electrónicos), se espera que el primero, parametrizado adecuadamente, proporcione datos más exactos que los producidos por el uso del método CNDO. Sin embargo, ambos métodos fueron desarrollados para aplicarlos a moléculas aisladas. Entonces, una molécula en estado gaseoso a bajas presiones, debería ser mejor descrita por métodos del tipo MNDO que por el CNDO. Para describir sistemas en solución acuosa diluida, ninguno de los métodos es adecuado. Sin embargo el CNDO debería dar resultados "menos malos" que el MNDO debido a que el fenómeno de solvatación es eminentemente electrostático y los fenómenos electrostáticos son mejor reproducidos y hasta sobreestimados por el CNDO.

Finalmente, es necesario resaltar que, dado que la parametrización de las metodologías semiempíricas se efectúa con datos experimentales, en la medida en que ellos sean representativos contienen ya el efecto de correlación electrónica, como ocurre con los métodos AM1 y PM3. El formulismo básico y la parametrización de los métodos serán descritos en el Apéndice 1.

2.1 Justificación de las metodologías utilizadas

Las estructuras electrónicas de los confórmeros de la histamina en sus formas neutras y protonadas, así como la familia de antagonistas H₂ de histamina, fueron estudiadas usando las metodologías: i) CNDO/2, ii) CNDO/2-RF iii) AM1 y iv) PM3.

En la metodología AM1 la función de repulsión de core del hamiltoniano MNDO es modificada para corregir la tendencia de este método a subestimar la repulsión entre átomos cuando están separados por distancias del orden del radio de van der Waals. En el método PM3 el proceso de reparametrización permite mejorar la evaluación de la energía asociada al enlace por hidrógeno, la cual es subestimada por el método AM1.

Las geometrías moleculares, calores de formación, potenciales de ionización y momentos dipolares de un gran número de nuevos compuestos que contienen estos conjuntos de átomos parametrizados, obtenidas a partir del método AM1 o PM3, están en perfecta concordancia con los resultados experimentales. Este hecho ha sido destacado por J.P. Stewart, quien correlacionó datos experimentales con resultados obtenidos a través de las metodologías MNDO, AM1 y PM3 para más de 600 compuestos (47). Los resultados indicaron que el método PM3 mejora la representación del enlace por hidrógeno, pero no cambia los valores promedio de las propiedades obtenidas a través del método AM1.

Sin embargo, estudios realizados por J.J. Dannenberg y E. M. Velet (50), han indicado que la sobreestimación de la energía por puente de hidrógeno obtenida en la metodología AM1 es mucho mayor en los casos de las moléculas neutras que en los complejos cargados. Por otra parte el método AM1 ha demostrado dar buenas magnitudes de las propiedades químicas asociadas a los parámetros moleculares, donde no se encuentran interacciones por puente de hidrógeno. Por ejemplo, J.J. Dannenberg y L. Tury (51) han presentado resultados de cálculos AM1, ab initio HF (HF/6-31G, HF/6-31G(d.p.)) y MP2 en el estudio de la energía relativa de los tautómeros y conformeros de 1,3-dionas; la comparación de estos resultados mostró que los cálculos AM1 están de acuerdo con los resultados ab initio utilizando la base más sofisticada, lo cual hace que estos métodos semiempíricos sean considerados de gran validez y ha llevado a su aplicación con extraordinaria frecuencia. Respecto de la validez de los resultados MNDO, AM1 y PM3 existen defensores y detractores. Habitualmente la confiabilidad de los resultados de estos métodos, es medido como la desviación de éstos respecto de los obtenidos por cálculos ab initio con bases sofisticadas. Sin embargo estas metodologías semiempíricas son parametrizadas a partir de datos

experimentales, que por cierto incluyen la energía de correlación. Por otra parte la validez los resultados obtenidos por estos métodos dependen tanto en la confiabilidad de la partición de la propiedad molecular en contribuciones atómicas como en la transferibilidad de estos parámetros atómicos de una molécula a otra. Estos considerandos invalidan la comparación entre los resultados ab initio y aquellos del tipo MNDO. Al respecto la única forma correcta de evaluar la confiabilidad de los resultados de estos métodos semiempíricos es por comparación directa con datos experimentales. Específicamente, en esta tesis los resultados experimentales acerca de la abundancia relativa de la histamina en fase gaseosa, en especial para las formas protonadas obtenida por ICR (27), fueron utilizadas para medir la confiabilidad de estos métodos.

Las ventajas que presentan estos métodos de cálculo y que permiten cumplir con los objetivos propuestos por esta tesis son: i) la histamina está constituida solamente por átomos de carbono, nitrógeno e hidrógeno, a los que cabe agregar átomos de oxígeno al considerar residuos de sitios activos en la descripción del receptor; los parámetros utilizados para estos átomos se han desarrollado empleando un mayor número de moléculas que para cualquier otro átomo, por lo cual los resultados AM1 y PM3 se espera que sean confiables ii) las energías de puente de hidrógeno deberían ser bien descritas por el método PM3, a pesar de que la metodología AM1 también proporciona un límite más bajo para las energías por puente de hidrógeno intramolecular en las formas neutras y protonadas de la histamina iii) los valores relativos de la energía de estabilización de los tautómeros/rótameros de histamina asociados con sus distribuciones de carga deberían ser confiables si se realiza optimizaciones completas de geometrías tanto en las metodologías AM1 como PM3.

Consecuentemente, en esta tesis se desarrollaron cálculos AM1 y/o PM3 de la

estructura electrónica y conformacional de las formas neutras y protonadas de la histamina y análogos. Para los conformeros/tautómeros enlazados intramolecularmente por hidrógeno se utilizaron ambas metodologías calculando las hipersuperficies de energía potencial para las especies relevantes. Además, los resultados numéricos de las energías de los conformeros o tautómeros obtenidos por estas metodologías permiten evaluar la confiabilidad del método CNDO para describir el proceso de transferencia protónica.

Para describir el efecto del medio hemos utilizado el modelo de campo de reacción implementado en la metodología CNDO/2 (CNDO/2-RF) (49). Este modelo ha sido empleado en tres diferentes niveles de aproximación: i) la versión que supone el solvente como un medio continuo, la cual considera un campo eléctrico uniforme generado por el solvente en su totalidad. La intensidad de este campo eléctrico es modulada por la magnitud de la constante dieléctrica, la que no corresponde al valor experimental, sino que representa la polaridad relativa del solvente. ii) un campo de reacción local, el cual supone la existencia de una primera capa de solvatación para representar el solvente y iii) la aproximación de supermoléculas, la cual considera explícitamente la estructura electrónica del solvente para su interacción con el soluto en la primera capa de solvatación.

Dado que los mecanismos asociados al proceso de solvatación parecieran ser gobernados principalmente por fuerzas electrostáticas, los cálculos que se presentan corresponden a la versión del solvente continuo. Debido a que no se pretende determinar propiedades termodinámicas, sino buscar un mecanismo de reacción de transferencia protónica en solución acuosa, se puede esperar que esta aproximación al problema resulte ser exitosa. En efecto, se ha demostrado desde un punto de vista termodinámico que el modelo discreto-continuo no proporciona una mejor descripción

de las energías de solvatación que el modelo de medio continuo.

La implementación del modelo de campo de reacción en el método CNDO/2 puede justificarse debido a que esta metodología proporciona, cualitativamente, propiedades electrostáticas confiables. También se ha demostrado que las funciones de la energía potencial de transferencia protónica obtenidas por este método son similares a las obtenidas por cálculos ab initio usando una base STO-3G (52). Por otra parte, los resultados CNDO/2 para la descripción de enlace por hidrógeno muestran la misma tendencia que aquellos obtenidos empleando bases más sofisticadas (51). Recientemente, la formulación analítica de la energía electrostática en el método CNDO fue desarrollado para producir resultados confiables para sistemas que poseen un gran número de átomos (53); específicamente, esta aproximación mostró ser eficiente para proporcionar conformeros confiables en sistemas moleculares muy grandes de una manera muy rápida. Sin embargo, es conocido que esta metodología ha fallado en la descripción de las geometrías moleculares.

En el modelo de campo de reacción el efecto del solvente es incorporado a través de la extensión de la versión generalizada de la fórmula de Born desarrollada por R. Contreras y colaboradores y utilizada en variados sistemas (49,54,55,56,57,58) (Apéndice 1).

Finalmente, debido a que la histamina y análogos son compuestos que contienen aminas como grupos funcionales y considerando que las interacciones de estos compuestos con los receptores se espera que sean del tipo electrostáticas o del tipo donador-aceptor, con especial énfasis en la interacción vía puente de hidrógeno, los métodos Hartree-Fock deberían dar una buena representación de tales interacciones. Es bien conocido que la teoría MO-SCF a un solo determinante (nivel Hartree-Fock), comete errores en la descripción de sistemas enlazados covalentemente debido a que

fuerza la función de onda a poseer un significativo carácter iónico, aún a separación infinita entre fragmentos. Sin embargo, la disociación de los complejos donador-aceptor es correctamente tratada por la teoría HF a un determinante, debido a que en este proceso los pares electrónicos son conservados en los fragmentos (59).

Los datos experimentales para la histamina y análogos constituyen una excelente herramienta para evaluar las metodologías AM1, PM3, CNDO/2 y CNDO/2-RF. Por ejemplo, las abundancias experimentales relativas de tautómeros/confórmers de histamina neutra y protonada en estado gaseoso y en solución acuosa a distintos pH se pueden comparar con los resultados obtenidos usando estas metodologías. Uno de los hechos más relevantes, respecto a los intereses de esta tesis, radican en que, a la fecha no se ha propuesto ningún mecanismo que describa el equilibrio tautomérico de la histamina en solución acuosa.

Debido a: 1) que el campo eléctrico creado por el solvente polar en la molécula de la histamina protonada, deber ser similar a aquél creado por los sitios activos del receptor en este sistema más el resto de la macromolécula y 2) que el fenómeno de solvatación es eminentemente electrostático, la primera etapa de este trabajo consistió en evaluar la confiabilidad de los métodos semiempíricos, confrontados con datos experimentales, respecto a la abundancia relativa de los distintos tautómeros/confórmers de la histamina en fase gaseosa y en solución acuosa. Como meta terminal de esta etapa, se planteó la formulación de un mecanismo molecular que explicara el equilibrio tautomérico en solución acuosa. Por consecuencia con lo anteriormente expuesto, se evaluó el mecanismo propuesto en presencia de los sitios descritos por Weinstein, para finalmente en la última etapa de la tesis aplicar el mecanismo en presencia de los grupos activos encontrados en el modelo del receptor H₂ de histamina (Capítulo 3), en ausencia y presencia de un medio polarizable, con el

fin de proponer un mecanismo de interacción droga-receptor.

2.2 RESULTADOS Y DISCUSION

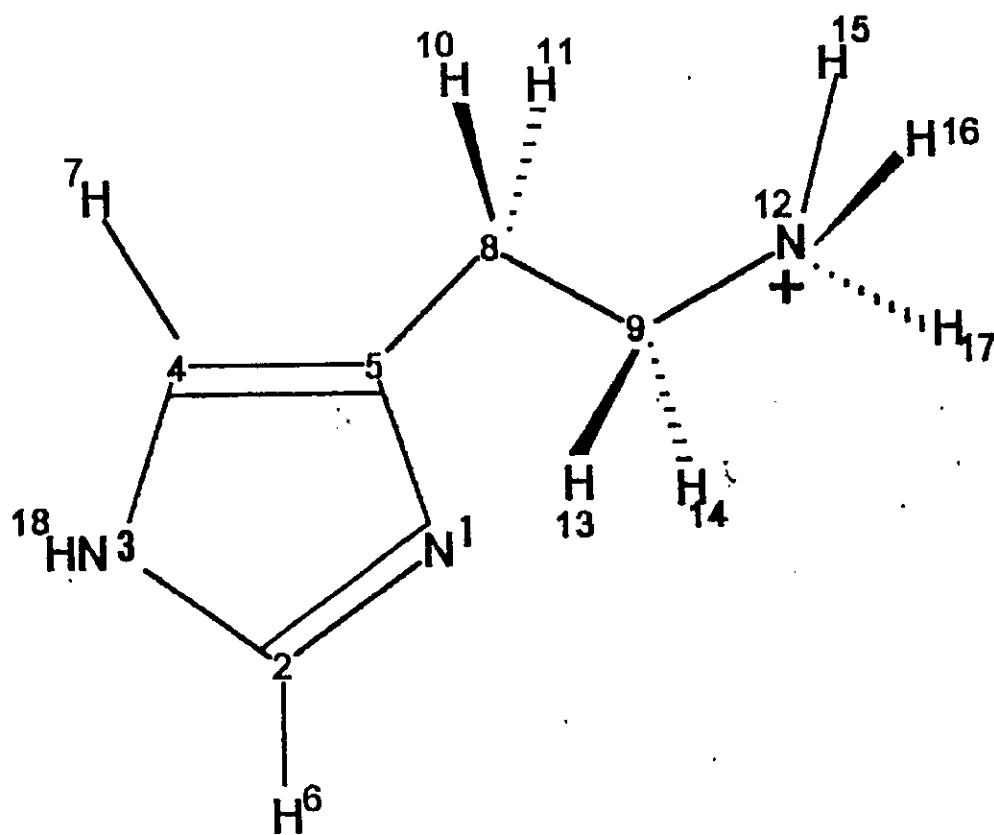
2.2.1 Análisis Conformacional de la Histamina

El análisis conformacional de la histamina fue desarrollado tanto para las moléculas neutras como también para las formas protonadas por las metodologías AM1 y PM3. La hipersuperficie de energía potencial fue estudiada en función primero de la rotación interna de la cadena a lo largo del enlace C5-C8 (Fig. 12). Los cálculos fueron desarrollados dejando fijo el ángulo α (ángulo diedro C5-C8-C9-N12) en distintos valores y buscando para cada valor de α la estructura más estables por optimización total de la geometría utilizando la técnica de gradiente. Debido a los problemas que presentan los métodos AM1 y PM3 en la reproducción de las geometrías, ésto se realizó partiendo de distintas conformaciones iniciales. Por esta razón, las curvas obtenidas representan un corte real de la hipersuperficie de energía potencial.

Este procedimiento se desarrolló para valores de α entre 0° y 180° con incrementos de 10° ; en las cercanías de las energías mínimas y máximas se utilizaron incrementos más pequeños de α , con el objeto de obtener una buena caracterización de dichas estructuras. Finalmente, para obtener la posición de los máximos y mínimos se realizó una optimización total a partir de las estructuras anteriores relajando toda la estructura incluyendo el ángulo α .

La Tabla II muestra las coordenadas internas y energías de los conformeros neutros más estables obtenidos por AM1 y PM3. Ambos métodos muestran que el conformero

Figura 12



Numeración de átomos en la molécula de histamina

**TABLA II ENERGÍAS Y GEOMETRIAS MOLECULARES PARA LA
FORMAS
NEUTRAS MAS ESTABLES DE LA HISTAMINA OBTENIDAS A TRAVES
DE LOS
METODOS AM1 Y PM3**

Parámetros Geométricos	NH1	NH1	NH3	NH3
	AM1	PM3	AM1	PM3
D N1-C2	1,3985	1,917	1,3994	1,3473
D C2-N3	1,3515	1,419	1,3990	1,3918
D N3-N4	1,3913	1,3906	1,3936	1,4012
D C4-C5	1,4127	1,3892	1,4137	1,3839
D N1-H17	0,9842	0,9870	-	-
D N3-H17	-	-	0,9841	0,9865
D C5-C8	1,4733	1,4787	1,4762	1,4822
D C8-C9	1,5322	1,5302	1,5308	1,5268
D C9-N12	1,4376	1,4724	1,4374	1,4734
D N12-H15	1,0015	0,9992	1,0012	0,9987
D N12-H16	1,0013	0,9996	1,0013	0,9865
D N12-N1	3,4312	3,9210	3,1418	3,2450
D N1-H16	-	-	2,6110	2,6500
D N12-H17	3,3910	4,1620	-	-
A(N1-C2-N3)	111,4	107,8	116,4	107,8
A(C2-N3-C4)	105,8	108,9	106,8	109,6
A(N3-C4-C5)	110,2	108,7	106,3	105,7
A(C5-C8-C4)	113,4	112,8	114,9	115,8
A(C8-C9-N12)	117,1	115,3	117,5	115,8
ϕ_1	-136,6	-109,3	-177,8	179,1
ϕ_2	-56,8	-58,6	-78,2	-74,8
α	52,3	64,1	63,4	69,9
ENERGIAS TOTALES	-31922,2	-28081,8	-31921,5	-28080,2

a. Energías totales en Kcal/mol

b. Distancias en Å

c. $\phi_1 = \text{C9-C8-C5-C4}$

d. $\alpha = \text{N12-C9-C8-C5}$

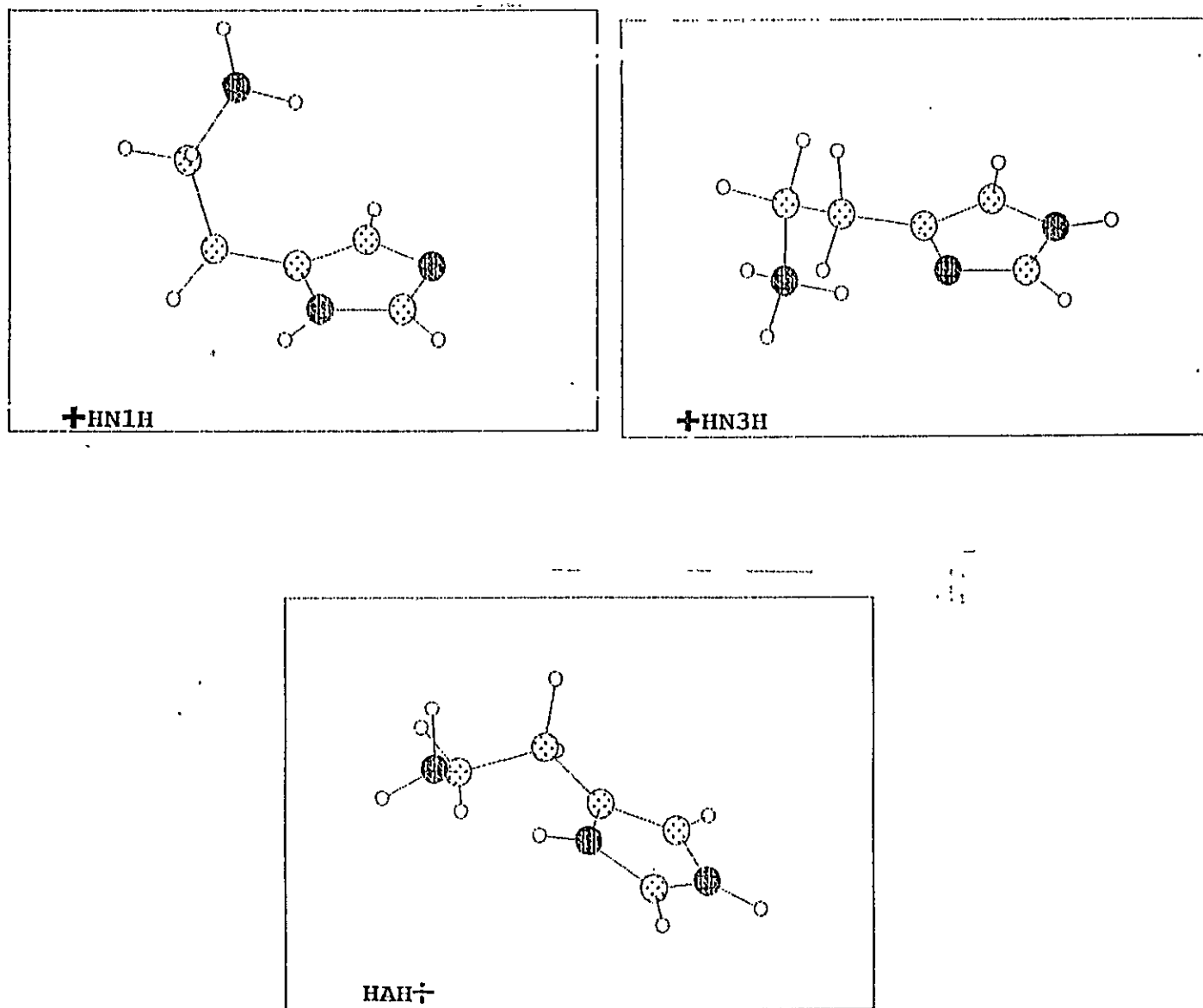
e. $\phi_2 = \text{H15-N12-C9-C8}$

N1H plegado es la estructura más estable en sistema aislado y que la forma N3H más estable también presenta una estructura plegada. La diferencia energética entre ambos conformeros resultó ser de 0,7 Kcal/mol y 1,8 Kcal/mol obtenidas de cálculos AM1 y PM3 respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Nagy (34) obtenidos de cálculos ab initio con bases extendidas incluyendo energías de correlación cuyas energías varían entre 2,02 y 3,51 Kcal/mol. Por otra parte, Nagy reporta un cambio de energía libre de 1,8 Kcal/mol proveniente de la corrección del punto cero de energía y la inclusión de la energía de correlación utilizando bases sofisticadas. Tomando en cuenta el nivel de aproximación de estos cálculos y aquellos obtenidos por Nagy, sólo se puede inferir que ambas estructuras se encontrarían en concentraciones similares en fase gaseosa.

Debido a que la histamina se encuentra mayoritariamente protonada en solución acuosa, para los efectos de esta tesis el interés se centró tanto en la distribución energética como en la estructura electrónica de los tautómeros/conformeros para el ácido conjugado de la histamina.

La Tabla III presenta las coordenadas internas y las energías para las formas protonadas más estables de los conformeros +HN1H, +HN3H y HAH+ (Fig. 13). Los resultados de la tabla muestran que el conformero protonado más estable corresponde a aquel protonado en el anillo imidazólico, en concordancia con los datos experimentales ICR (27). El trabajo de Nagy, a pesar de haber realizado cálculos ab initio de alto nivel no incluyó esta forma tautomérica. Sin embargo, respecto de las diferencias energéticas entre los tautómeros plegados +HN1H y +HN3H reportada por Nagy son de orden similar al obtenido por las metodologías AM1 y PM3. Las figuras 14 y 15 presentan las curvas de energía en función del ángulo α para las formas protonadas, obtenidas por los métodos AM1 y PM3. Los

Figura 13



Estructuras más estables para la histamina protonada obtenidas por la metodología

AM1

TABLA III ENERGÍAS Y GEOMETRIAS MOLECULARES PARA LA FORMAS PROTONADAS MAS ESTABLES DE LA HISTAMINA OBTENIDAS POR LOS METODOS AM1 Y PM3

Parámetros Geométricos	+HN1H AM1	+HN1H PM3	+HN3H AM1	+HN3H PM3	HAH+ AM1
D N1-C2	1,3960	1,3862	1,3848	1,3524	1,3689
D C2-N3	1,3547	1,3532	1,3977	1,3864	1,3738
D N3-N4	1,3865	1,3810	1,3906	1,4020	1,3999
D C4-C5	1,4176	1,3968	1,4101	1,3839	1,4082
D N1-H17	0,9879	0,9877	-	-	0,9963
D N3-H17	-	-	0,9893	0,9882	1,0060
D C5-C8	1,4715	1,4758	1,4751	1,4819	1,4778
D C8-C9	1,5310	1,5326	1,5255	1,5294	1,5315
D C9-N12	1,4918	1,5095	1,4910	1,5141	1,4454
D N12-H15	1,0024	1,0010	1,0213	1,0418	1,0015
D N12-H16	1,0023	1,0007	1,0230	1,0000	1,0015
D N12-N1	-	-	2,8300	2,6300	2,8880
D N1-H18	3,4000	3,5900	2,0530	1,7500	-
D N12-H18	1,0023	1,0010	1,0240	1,0100	2,2400
A(N1-C2-N3)	111,5	107,9	110,9	107,5	108,4
A(C2-N3-C4)	105,9	109,9	107,3	109,6	108,8
A(N3-C4-C5)	110,1	108,6	106,1	105,7	107,2
A(C5-C8-C4)	111,1	111,4	113,1	113,0	113,0
A(C8-C9-N12)	112,3	111,8	113,9	111,7	113,0
A PUENTE H			129,7	139,6	141,7
ϕ_1	-82,0	-84,5	146,8	-85,2	143,8
ϕ_2	-172,2	-174,8	-179,9	-169,0	-167,3
α	51,3	57,4	61,3	53,8	61,8
ENERGIAS TOTALES	-32083,4	-28276,2	-32095,0	-28296,9	-32097,2

a. Energías totales en Kcal/mol

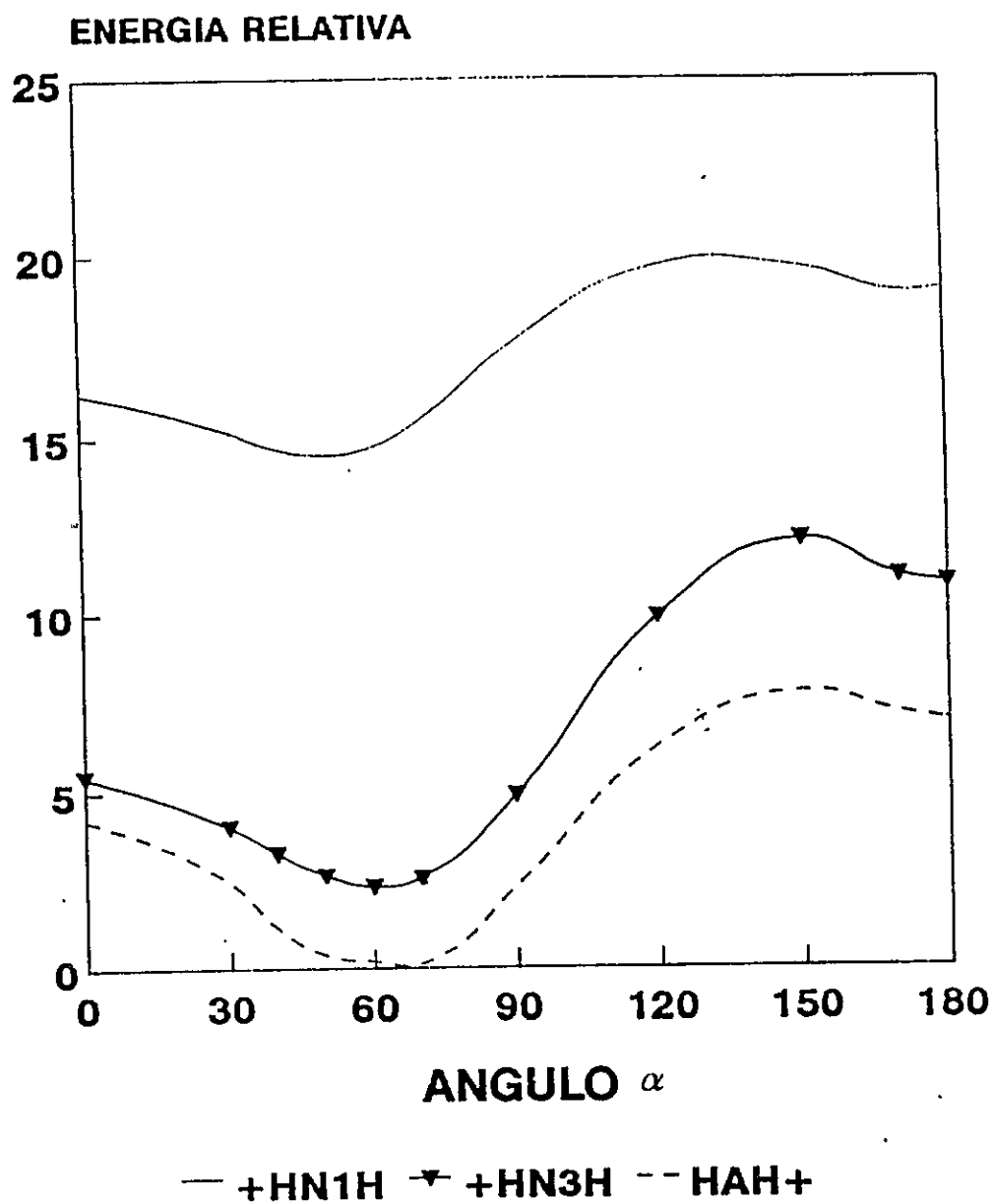
b. Distancias en Å

c. ϕ_1 = C9-C8-C5-C4

d. α = N12-C9-C8-C5

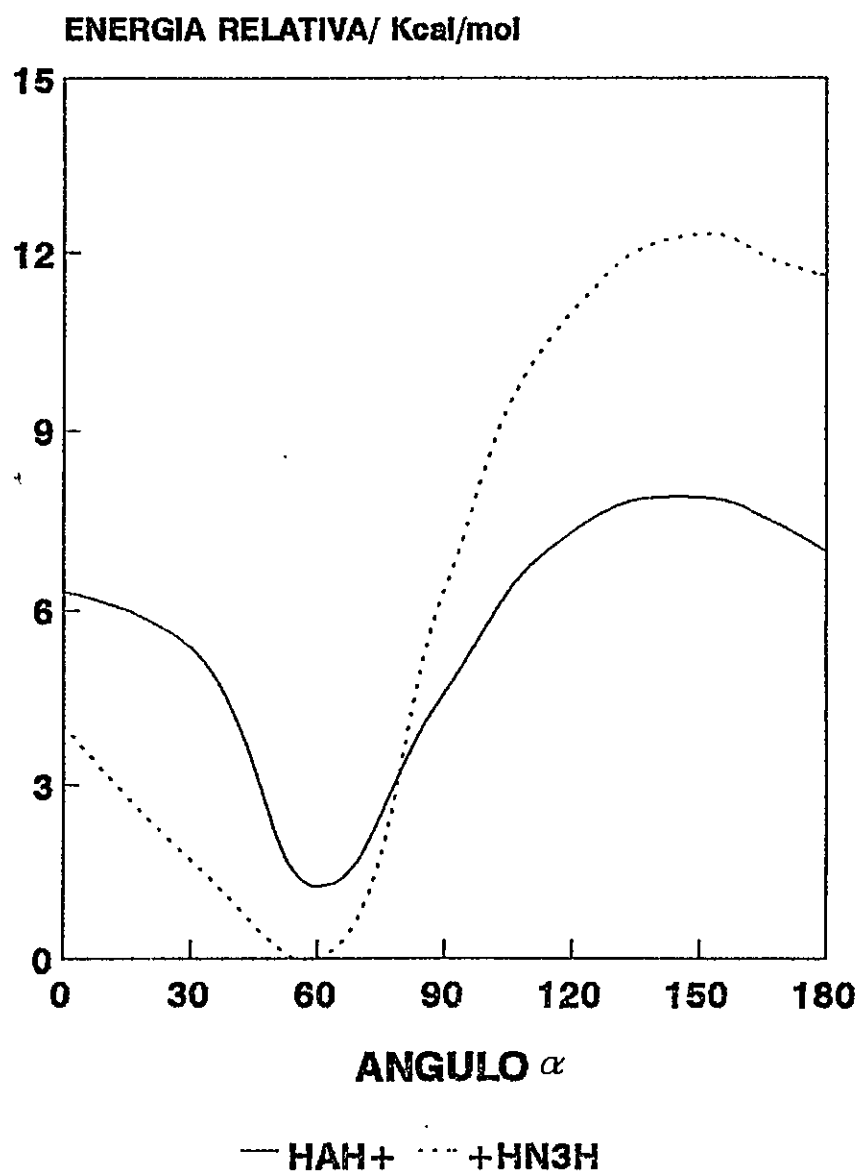
e. ϕ_2 = H15-N12-C9-C8

Figura 14



Curvas de energía en función del ángulo α de las moléculas protonadas de histamina obtenidas por el método AM1

Figura 15



Curvas de energía en función del ángulo α de las moléculas protonadas de histamina obtenidas por el método PM3

resultados obtenidos por ambas metodologías indican que las estructuras de menor energía están plegadas, con α alrededor de 60° , y concuerdan con los resultados obtenidos recientemente por A. Hernández-Laguna y otros (27) utilizando cálculos ab initio con la base 6-31G//6-31G y espectroscopia ICR.

Las barreras de rotación de las formas protonadas +HN1H, +HN3H y HAH+ obtenidas por el método AM1 fueron de 5,0 Kcal/mol, 9,2 Kcal/mol y 7,3 Kcal/mol, respectivamente a un ángulo α aproximadamente de 150° . Las Tablas 3 y 4 muestran las coordenadas internas para las formas protonadas más estables obtenidas por los métodos AM1 y PM3 respectivamente. Las distancias encontradas entre los átomos N1 y N12 y la de estos con el H18, apuntan a una posible interacción por hidrógeno intramolecular en las formas +HN3H y HAH+.

Estos resultados, además de indicar que la forma protonada más estable es el conformero protonado en el anillo (HAH+), muestran que éste exhibe una estructura plegada ($\alpha \approx 60^\circ$), siendo ésta 2,4 Kcal/mol y 15 Kcal/mol más estable con respecto a las formas +HN3H y +HN1H respectivamente.

Los cálculos PM3 indicaron que la forma +HN3H es 1,4 Kcal/mol más estable que la forma HAH+ a un valor de $\alpha \approx 60^\circ$, siendo la barrera de rotación en torno a este ángulo de 6,8 Kcal/mol y 10,0 Kcal/mol para HAH+ y +HN3H respectivamente.

Estos cálculos están de acuerdo con la propuesta de la estructura "escorpión" descrita por O. Tapia y colaboradores como la más estable, siendo una forma plegada enlazada intramolecularmente por hidrógeno, con una distancia de 1,27 Å entre "N1" y uno de los protones del nitrógeno 12. Las coordenadas internas de las formas HAH+ y +HN3H obtenidas por el método PM3 son bastante similares a la forma M2 denominada "escorpión" (Tabla IV) (26).

La estructura protonada en el anillo había sido también obtenida en trabajos

TABLA IV ENERGÍAS Y GEOMETRIAS MOLECULARES PARA LAS FORMAS PROTONADAS MAS ESTABLES DE LA HISTAMINA OBTENIDAS POR EL METODO PM3 Y DATOS PUBLICADOS EN LA REFERENCIA 26

Parámetros Geométricos	+HN3H	HAH+	M1	M2
	PM3	PM3	(26)	(26)
D N1-C2	1,3524	1,3744	1,326	1,318
D C2-N3	1,3864	1,3732	1,360	1,380
D N3-N4	1,4020	1,3912	1,399	1,386
D C4-C5	1,3839	1,3912	1,350	1,352
D N1-H17	-	0,9925	-	-
D N3-H17	0,9882	0,9890	1,025	1,021
D C5-C8	1,4819	1,4837	1,522	1,521
D C8-C9	1,5294	1,5264	1,522	1,541
D C9-N12	1,5141	1,4827	1,506	1,537
D N12-H15	1,0000	0,9994	1,030	1,039
D N12-H16	1,0000	0,9883	1,030	1,039
D N12-N1	2,63	2,99	-	-
D N1-H18	1,7500			
D N12-H18	-	2,6810	-	-
A(N1-C2-N3)	107,6	106,3	108,7	111,8
A(C2-N3-C4)	109,6	107,2		
A(N3-C4-C5)	105,7	107,2		
A(C5-C8-C4)	113,0	115,0	110,9	108,1
A(C8-C9-N12)	111,7	111,0	110,0	111,8
A PUENTE H	141,7	98,4		
ϕ_1	-85,2	157,8	149,1	142,5
ϕ_2	-169,1	66,6	-40,3	59,6
α	53,8	47,4	-40,3	59,6
ENERGIAS TOTALES	-28296,9	-28294,3		

- a. Energías totales en Kcal/mol
- b. Distancias en Å
- c. $\phi_1 = \text{C9-C8-C5-C4}$
- d. $\alpha = \text{N12-C9-C8-C5}$
- e. $\phi_2 = \text{H15-N12-C9-C8}$

anteriores (60). Esta forma era descartada a priori debido a que no se encontraba ningún apoyo experimental para su existencia, siendo preferida como estructura estable la forma NH_3^+ . Sin embargo, experimentos recientes (27) han podido determinar que en fase gaseosa la forma más estable es la forma protonada en el anillo, aunque no existen pruebas de la existencia de esta forma en solución. Por lo tanto, parece posible que la forma HAH^+ participe en algún equilibrio rápido que lleve finalmente a la formación de las estructuras encontradas frecuentemente en medio acuoso.

Basados en los datos experimentales de basicidad en fase gaseosa para el monocatión de la histamina ($+\text{HN}_3\text{H}$) (61) y de compuestos relacionados, O. Tapia y colaboradores (26) estimaron la contribución del enlace por hidrógeno al efecto quelatante de la histamina. Este valor fue obtenido como la diferencia de energías entre la forma plegada enlazada por hidrógeno ($\alpha \approx 60^\circ$) y la estructura extendida ($\alpha \approx 180^\circ$) de la histamina protonada. El valor obtenido por el equipo de O. Tapia con una base ab initio STO-4G fue de -31,9 Kcal/mol, muy lejano del experimental (-7.5 Kcal/mol).

Los resultados obtenidos en esta tesis para esta diferencia energética fueron de -7,3 Kcal/mol (HAH^+) y -11,2 Kcal/mol ($+\text{HN}_3\text{H}$) utilizando la metodología AM1 y -6,7 Kcal/mol (HAH^+) y -11,5 Kcal/mol ($+\text{HN}_3\text{H}$) a través del método PM3.

Como se puede notar, nuestros resultados se correlacionan bastante bien con el valor experimental estimado de la contribución del enlace por hidrógeno a la energía de estabilización producto de la quelación y constituyen una nueva prueba acerca de la confiabilidad de las metodologías AM1 y PM3 en la descripción de la histamina neutra (anteriormente discutida) y protonada. Por otra parte los resultados refuerzan la hipótesis que la estructura enlazada intramolecularmente por hidrógeno de la histamina podría estar involucrada en algún paso del mecanismo de activación de sus receptores

H2 de histamina.

La magnitud del ángulo del enlace por hidrógeno, en conjunto con la pequeña distancia entre los nitrógenos alifático e imidazólico en la estructuras plegadas protonadas ("gauche") de la histamina, indican fuertemente la posibilidad de una transferencia protónica a lo largo del puente por hidrógeno. Esta transferencia podría explicar las concentraciones encontradas experimentalmente para cada especie en solución.

2.2.2 Energía potencial de transferencia protónica para la histamina protonada obtenida por las metodologías AM1 y PM3.

De acuerdo a nuestros resultados, existen dos formas estables monoprotionadas, HAH+ y +HN3H, las cuales exhiben un enlace por hidrógeno intramolecular entre los átomos "N1" y N12. Los cálculos de las estabildades relativas de estas especies mostraron ser dependientes del hamiltoniano MNDO utilizado. En efecto, mientras el método AM1 proporcionó como forma más estable aquella en que el protón que interviene en la interacción por hidrógeno está más cerca del "N1", el método PM3 mostró un comportamiento opuesto, en el cual el protón se encuentra más cerca del nitrógeno alifático, de acuerdo con lo informado por O. Tapia y colaboradores (26).

En la figura 16 se presentan las curvas de energía potencial de transferencias protónica que envuelven las formas HAH+ y +HN3H obtenidas a partir de las metodologías AM1 y PM3. Cada una de estas curvas fue calculada con optimización completa de geometría del confórmero para cada punto de la posición del protón a lo largo de su trayectoria al traspasarlo desde el "N1" la forma HAH+ hacia el nitrógeno alifático (N12) de la cadena para generar la forma +HN3H. Al igual que en los

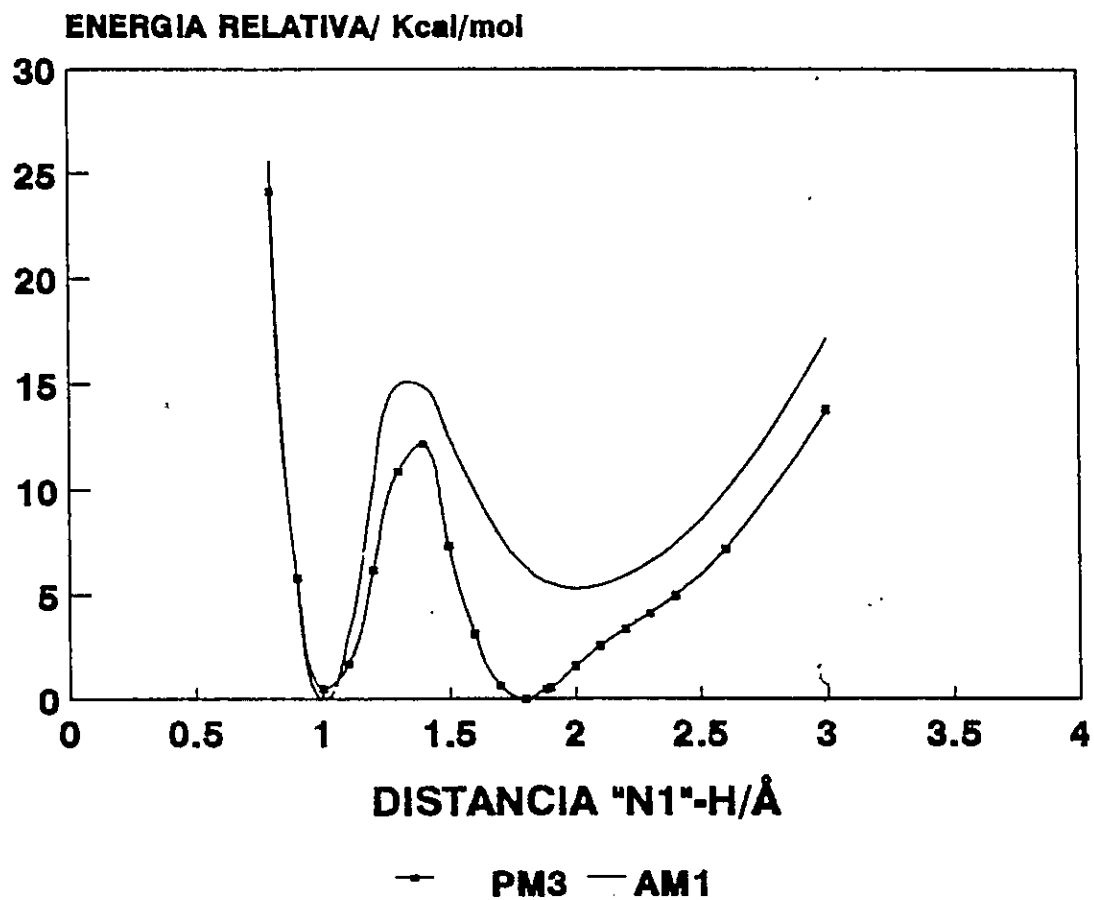
cálculos anteriores, las geometrías internas correspondientes a los máximos y mínimos de energía fueron caracterizadas en forma más precisa y, por lo tanto, esta curva de transferencia puede ser considerada como un corte de la hipersuperficie de energía potencial que describe el camino de energía mínima para el proceso de transferencia protónica en fase gaseosa o en solución diluida en un solvente no polar.

De la figura 16 se puede observar que ambas curvas muestran una función de potencial con un doble mínimo. La diferencia de energía entre los mínimos es de 6 Kcal/mol para el método AM1, mientras que para el método PM3 es extremadamente pequeña (0,3 Kcal/mol). Estas dos curvas muestran barreras a la transferencia protónica de 15,2 y 12,6 Kcal/mol, calculadas por las metodologías AM1 y PM3 respectivamente.

Otra característica que podemos observar en esta figura es que en las cercanías del "N1", la energía de potencial varía de manera mucho más abrupta que en las cercanías del N12. Estos resultados indican que la constante de fuerza para el enlace de hidrógeno "N1"-H es mayor que la correspondiente a la interacción N12-H. Además, el primer mínimo ("N1"-H) representa mejor un enlace covalente que el mínimo N12-H, el cual es descrito por una curva ancha que evidencia una interacción más electrostática. Este rasgo de la curva de energía potencial permite postular que la interacción por puente de hidrógeno podría ser polarizable en cierto grado; la curva de energía potencial debería ser sensible a un campo eléctrico, el cual podría ser producido por un solvente polar, iones, otras moléculas etc. La presencia de un solvente polar como el agua podría por lo tanto producir cambios en la forma de la curva de energía potencial de la transferencia protónica.

Los resultados teóricos reportados en la literatura ya mencionados, no dan cuenta de los resultados experimentales referentes a la histamina monoprotonada.

Figura 16



Curvas de energía de transferencia protónica en función de la distancia "N1"-H para la histamina obtenida por los métodos AM1 y PM3

Específicamente, en la existencia del tautómero más estable en estado gaseoso que como se mostrará más adelante, es la clave en la elucidación de un mecanismo de equilibrio tautomérico de la histamina en solución acuosa. Es importante resaltar que la existencia de del ión HAH^+ permitió sugerir, por primera vez, la ocurrencia de una transferencia protónica intramolecular entre los átomos N1 y N12.

A partir de los datos experimentales antes expuestos referentes a la abundancia de los conformeros de histamina en solución acuosa, se pone claramente en evidencia la necesidad de encontrar los efectos de un solvente polar sobre las estructuras protonadas de histamina involucradas en la curvas de energía potencial asociada a la transferencia protónica.

Para tal efecto utilizamos el modelo de campo de reacción implementado a nivel CNDO/2. Se eligió el modelo de solvente continuo para estudiar su efecto sobre las estructuras protonadas de histamina, debido a que el principal objetivo de esta parte de la tesis consiste en la proposición de un mecanismo para explicar el equilibrio tautomérico de la histamina en solución acuosa, el cual permita racionalizar las abundancias relativas de los tautómeros y/o conformeros de histamina determinadas experimentalmente.

Debido al éxito obtenido en la descripción de la histamina protonada por las metodologías AM1 y PM3, que mostraron ser las únicas capaces de reproducir los hechos experimentales ya discutidos, la evaluación de la confiabilidad de la metodología CNDO/2 fue medida respecto de los resultados AM1 y/o PM3.

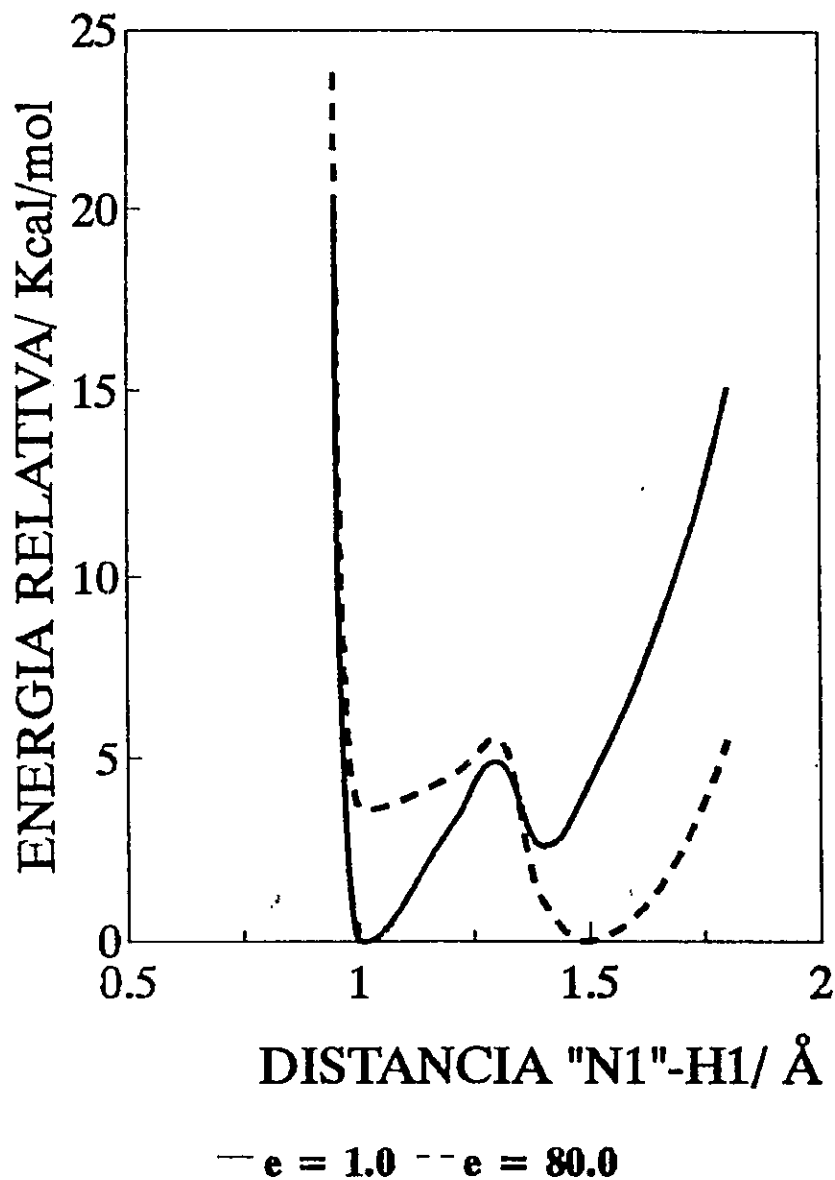
2.2.3 Energía potencial de transferencia protónica para la histamina protonada en un campo de reacción

Dado que el modelo de campo de reacción está parametrizado en el método CNDO/2, es necesario determinar la confiabilidad de esta metodología en la descripción de las curvas de energía potencial de transferencia protónica. Para ello, la curva fue calculada por este método semiempírico en ausencia de un campo eléctrico externo y comparada con aquellas obtenidas con las metodologías AM1 y PM3. Las geometrías utilizadas en el estudio de la transferencia protónica fueron obtenidas a partir de las coordenadas estándar de Pople (62) y los ángulos diedros fueron tomados de los cálculos de optimización por PM3. Todos los resultados obtenidos a través de los cálculos CNDO/2-RF serán interpretados en términos cualitativos.

La Fig. 17 muestra la curva de energía potencial de transferencia protónica entre el "N1" y el N12 a $\epsilon = 1$ (vacío) y $\epsilon = 80,0$ (medio polar). La comparación entre la curva de energía de transferencia protónica en el vacío obtenida usando el método CNDO/2, utilizando los ángulos diedros calculados por PM3, y las curvas de energía de transferencia obtenidas por los métodos AM1 y PM3 (Fig. 16), muestra que la metodología CNDO/2 reproduce cualitativamente las curvas calculadas por estos métodos semiempíricos más modernos. En rigor, las metodologías que utilizan un hamiltoniano del tipo MNDO dan resultados confiables sólo para los mínimos en el estado fundamental. En ese sentido, la curva de energía de transferencia protónica calculada mediante CNDO/2 exhibe mínimos en las mismas regiones que aquellos obtenidos por AM1 y PM3, con su mínimo absoluto en la posición más cercana al "N1".

Estos resultados muestran la confiabilidad de esta metodología en la descripción de

Figura 17



Curvas de energía de transferencia protónica en función de la distancia "N1"-H para la histamina

obtenida por el método CNDO/2-RF con $\epsilon = 1.0$ y $\epsilon = 80.0$

las tendencias energéticas para los conformeros de histamina. El paso siguiente consistió en evaluar el efecto de la polaridad del solvente sobre la curva de energía de transferencia protónica. Esta evaluación fue llevada a cabo comparando las energías específicas envueltas en la transferencia protónica del tautómero solvatado, definidas por una constante dieléctrica mayor que 1, con aquellas obtenidas para el mismo conformero en ausencia de un campo eléctrico, situación definida por una constante dieléctrica de 1,0

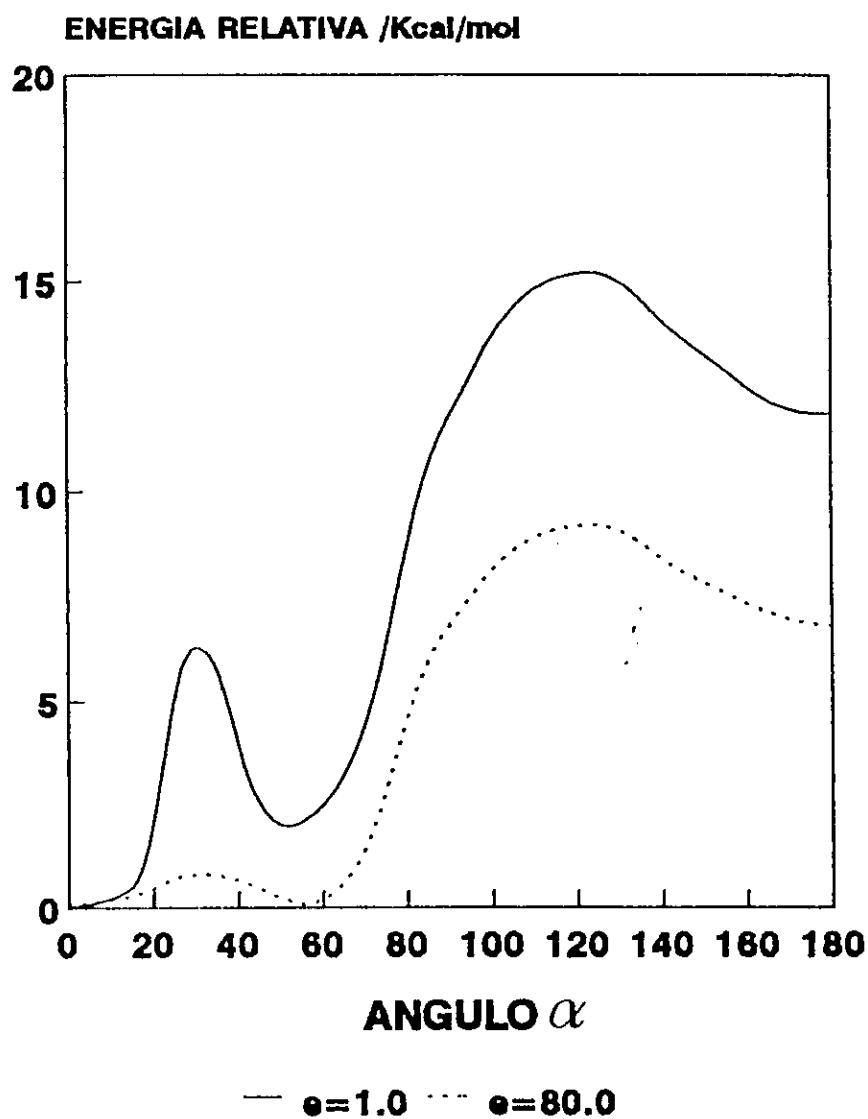
La curva de energía de transferencia calculada con $\epsilon = 1,0$ (Fig. 17) muestra dos mínimos ubicados a una distancia intermolecular N1-H de 1,0 Å y 1,4 Å, estando el primero favorecido energéticamente por 2,6 Kcal/mol, y presentando una barrera a la transferencia de 4,9 Kcal/mol a una distancia de 1,3 Å.

La curva de energía de transferencia protónica correspondiente a la descripción de un medio polar suponiendo un $\epsilon = 80,0$ (Fig. 17) muestra dos mínimos a las distancias interatómicas "N1"-H de 1,0 Å y 1,5 Å, siendo este último 3,7 Kcal/mol más estable, y presentado una barrera de 1,9 Kcal/mol respecto del mínimo cercano a "N1"-H a un distancia de 1,3 Å. Estos resultados revelan que la presencia del solvente provoca una mayor estabilización del mínimo correspondiente al protón enlazado al N de la cadena lateral respecto de la estabilización del mínimo correspondiente al protón en el N imidazólico y una ostensible disminución de la energía de la barrera de transferencia protónica, lo que justifica los resultados experimentales que muestran la forma +HN3H como las más abundante en solución.

A continuación se estudió el efecto del solvente en las energías asociadas a la rotación en torno al ángulo α para la forma +HN3H.

Los resultados indicaron que ambas curvas (Fig. 18), a constantes dieléctricas $\epsilon = 1,0$ e $\epsilon = 80,0$, exhiben 3 mínimos a valores de α de 0° , 60° y 120° y dos máximos

Figura 18



Curvas de energía en función del ángulo α para la forma +HN3H de la histamina obtenida por el método CNDO/2-RF con $\epsilon=1.0$ y $\epsilon=80.0$

a valores de α de 30° y 120° . El principal efecto del medio continuo polarizable sobre este tautómero fue la disminución de la energía de todas las conformaciones, manteniéndose el aspecto general de la curva de energía rotacional de la forma +HN3H. Sin embargo, existe claramente una fuerte disminución de la energía de activación para el cambio conformacional. Esta última característica está especialmente reflejada para el máximo alcanzado a $\alpha = 30^\circ$, donde el valor baja de 7 Kcal/mol a 1 Kcal/mol cuando se considera el efecto del medio. Similar consecuencia fue registrada para el segundo máximo, donde la barrera a la rotación disminuyó desde un valor de 15,2 Kcal/mol a uno de 7,8 Kcal/mol.

Con la finalidad de estudiar la respuesta molecular a la protonación, se realizó un estudio de la actividad relativa de los conformeros, a través de una comparación de los orbitales moleculares llenos de mayor energía (HOMO), obtenidos por cálculos AM1 y PM3. Ambas metodologías indicaron que el HOMO de las formas neutras N1H y N3H está localizado principalmente en el sistema π del anillo imidazólico. La protonación en la cadena alifática de ambas formas tautoméricas no provocó cambios fundamentales en el HOMO comparado con las formas neutras. Sin embargo, la protonación en el anillo condujo a que el HOMO se localizara en el nitrógeno alifático (N12). Esto indicaría que, en la forma HAH+, el carácter básico del N12 se incrementaría, debido a la desestabilización del par electrónico, lo que proporciona una explicación a nivel de mecanismo de reacción para la transferencia protónica intramolecular entre los "N1" y N12.

Debido a la incertidumbre en la descripción de los orbitales moleculares en la metodología CNDO/2, un análisis de este tipo carecería de validez. Sin embargo, considerando la confiabilidad de este método para dar cuenta de la distribución de carga se realizó un estudio de este parámetro molecular por CNDO/2.

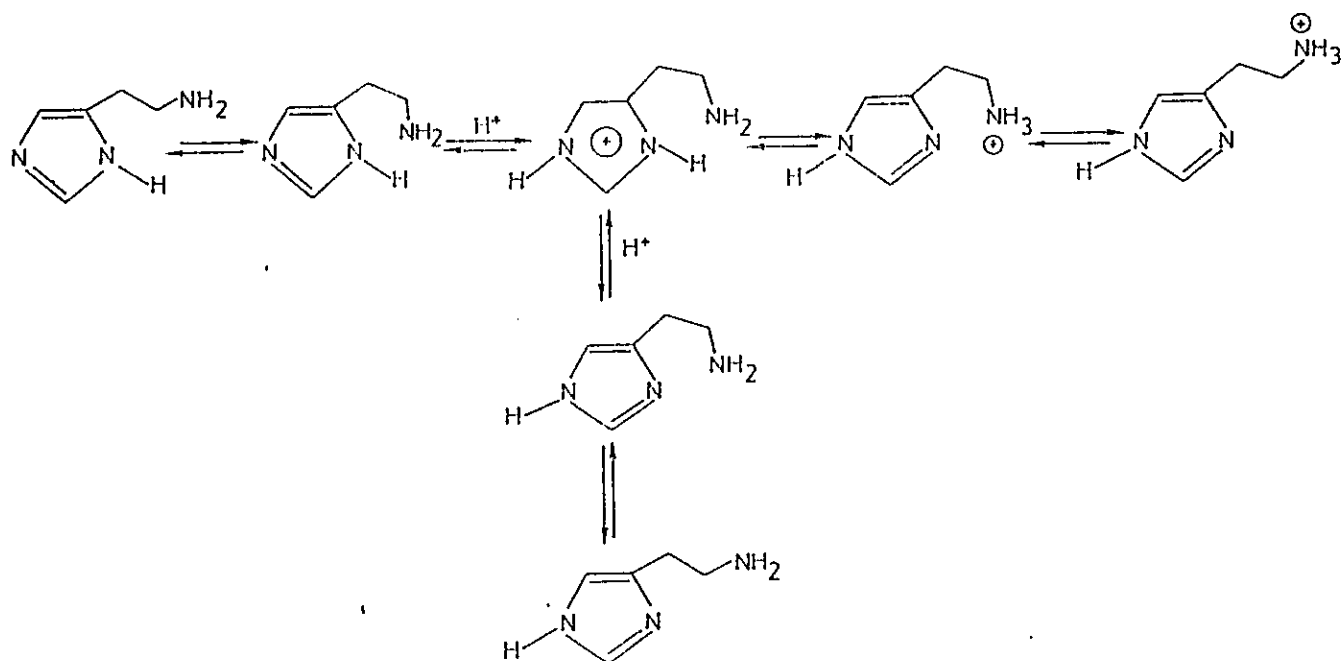
Las cargas sobre el N12 son aproximadamente las mismas a $\epsilon = 1,0$ (-0.070), para ambas especies (+HAH y +HN3H), pero con una constante dieléctrica de 80,0 el N12 de la forma protonada en el anillo tiene mayor carga negativa (-0,3081) que el de la forma +HN3H (-0,1161) señalando también el aumento del carácter básico del NH_2 en la forma +HAH que favorecería la transferencia protónica del "N1" al N12.

En base a todos los resultados obtenidos se propone un mecanismo para describir el equilibrio tautomérico de la histamina en agua, incluyendo las formas neutras. Esre se ilustra en la Fig. 19. El mecanismo muestra la importancia relevante de la forma HAH+, que es por primera vez considerada en solución acuosa, ya que en estado gaseoso su existencia fue encontrada experimentalmente por ICR (27) y teóricamente a través de cálculos 6-31G//6-31G (27).

Es importante destacar que los resultados relativos al estudio de los HOMO y de la distribución de la carga, conforman una base mecano-cuántica importante para apoyar el mecanismo propuesto en la descripción del equilibrio tautomérico de la histamina en solución acuosa. Este trabajo teórico adquiere mayor relevancia si se toma en cuenta que, además de explicar la abundancia relativa de los conformeros/tautómeros de la histamina en agua, es el primer mecanismo molecular presentado para explicar dicha tautomería.

Por otra parte, los cálculos realizados permitieron explicar la abundancia relativa de los conformeros/tautómeros de la histamina protonada en fase gaseosa, observada experimentalmente (27).

El logro de un mecanismo acorde con los datos experimentales para explicar el equilibrio tautomérico de la histamina en solución acuosa constituye una respuesta a uno de los objetivos básicos de esta tesis.

Figura 19

Mecanismo de equilibrio entre especies propuesto para la histamina en fase gaseosa, solución y en presencia de sitios en fase gaseosa.

2.3 Estudio AM1 de una familia de antagonistas H2 de histamina.

En esta sección presentamos los resultados de un análisis conformacional y estructura estructura de la famotidina y una familia análoga. Este estudio se realizó con el doble propósito de estudiar distribución de confórmeros/tautómeros de estos compuestos protonados en fase gaseosa y la obtención de la posible estructura activa para la interacción con el receptor H2, que se utilizará en el la modelación de este receptor, descrito en el capítulo 3.

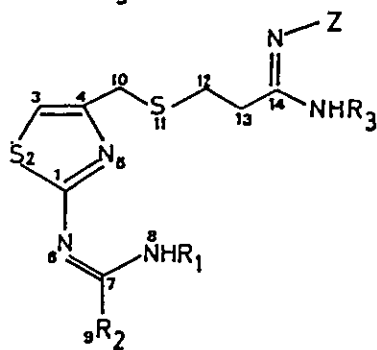
2.3.1 Famotidina

Uno de los resultados de la investigación en el campo de los antagonistas H2 de histamina ha llevado a la introducción reciente en el mercado de fármaco denominado famotidina (Fig. 20), que ha demostrado ser mucho más potente que la cimetidina.

En esta primera parte se desarrolla un estudio preliminar de las estructuras electrónicas y conformacional de la famotidina y de una familia de análogos con el objeto de comparar sus estructuras moleculares con la de la histamina.

Los estudios experimentales sobre la famotidina en su forma de base libre indican que existen muchas formas cristalinas que son dependientes de las condiciones de cristalización. La famotidina protonada, por el contrario, existiría únicamente en una conformación extendida. El estudio conformacional de esta molécula debería ser útil para racionalizar los resultados obtenidos por cristalografía de rayos X y por RMN de protones, (63) los cuales permiten suponer una correlación entre la actividad

Fig. 20



MOLECULA	R	R ₂	X	Z	R ₃
Molec 9	H	NH ₂	S	NCN	H
Molec 10	H	NH ₂	CH	NCN	H
Molec 11	H	NH ₂	S	NCN	CH ₃
Molec 12	H	CH ₃	S	NCN	H

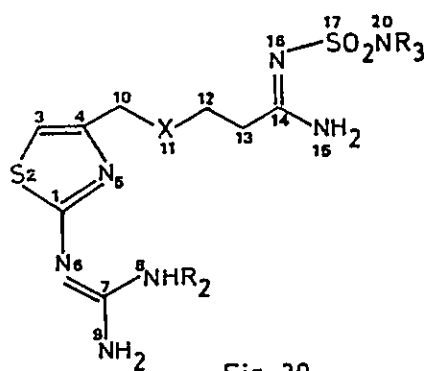


Fig. 20

MOLECULA	R ₁	X	R ₂
Molec 1 (FAMO)	H	S	NH ₂
Molec 2	H	CH ₂	NHCH ₂ CH ₂ CH ₃
Molec 3	CH ₃	S	NH ₂
Molec 4	H	CH ₂	NH ₂
Molec 5	H	S	N(CH ₃) ₂
Molec 6	H	S	C ₆ H ₅
Molec 7	H	S	CH ₃
Molec 8	H	CH ₂	CH ₂ CH ₃

antagonista H2 y la configuración espacial de estos compuestos.

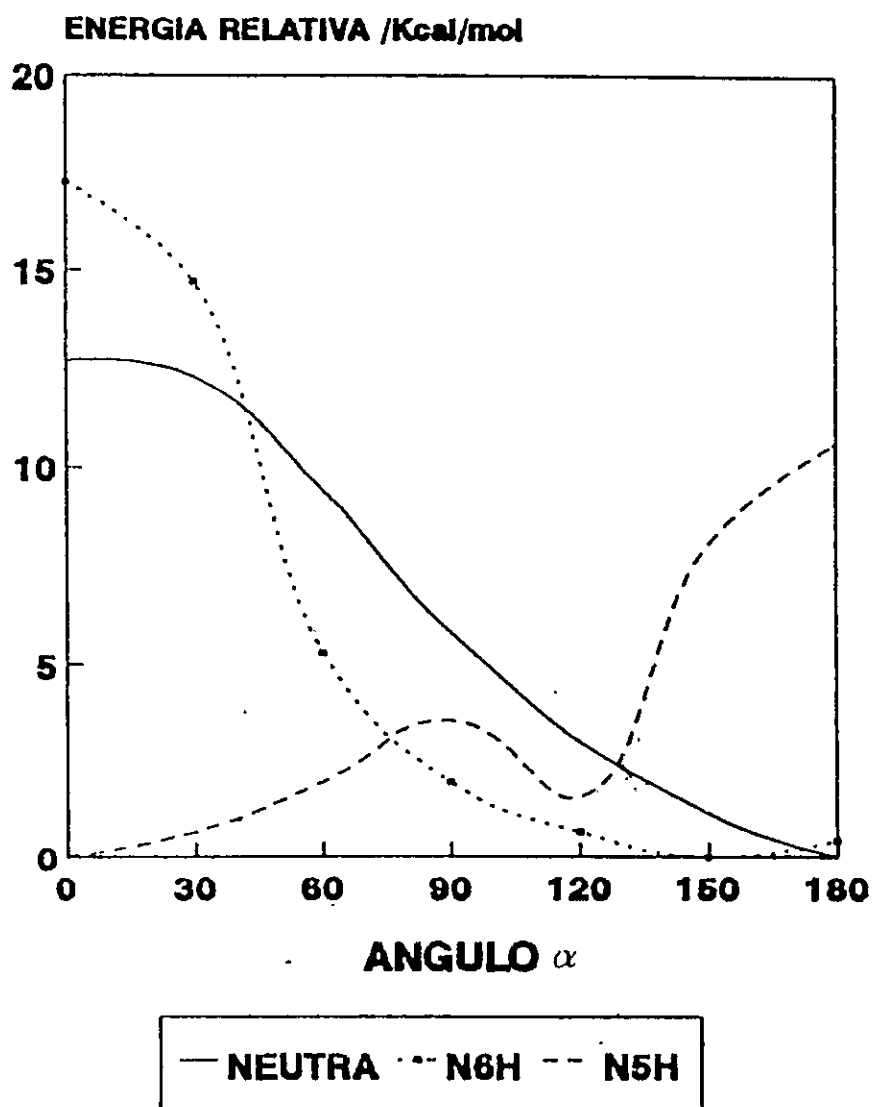
Para el estudio de la famotidina, tanto en su forma neutra como en las protonadas, los cálculos AM1 fueron desarrollados con optimización completa de la geometría (partiendo de distintos puntos) en función del ángulo diedro α (S2-C1-N6-C7) para la cadena guanidínica, que constituye la coordenada de reacción en estos cálculos.

Los resultados indicaron que tanto para la forma neutra como para las protonadas, la conformación extendida es la más estable ($\beta=180^\circ$ con β definido por los átomos, C14-C13-C12-S11). Sin embargo, ciertas estructuras cristalinas exhiben una interacción por puente de hidrógeno intramolecular entre el N8 de la cadena guanidínica y el N15 de la cadena sulfamoflica. Estudios desarrollados para un compuesto análogo a la famotidina, tiotidina (Fig. 10), indican que cuando el efecto del solvente es considerado en la estructura, la forma extendida ($\beta=180^\circ$) es 13 Kcal/mol más estable que la forma plegada (64).

El estudio de la energía conformacional asociada con la variación del ángulo α indicó que, para la forma neutra, la estructura a $\alpha = 180^\circ$ es la más estable. La barrera a la rotación se encontró a $\alpha = 0^\circ$ con una altura de 12,7 Kcal/mol (Fig. 21). Estos resultados concuerdan con los datos experimentales que muestran una fuerte interacción por hidrógeno entre el nitrógeno guanidínico (N8) y el nitrógeno tiazólico ("N5"). En la Tabla V se presentan las distancias, los ángulos de enlace y los ángulos diedros de las formas más estables neutra y protonadas.

Para las formas protonadas se estimaron las afinidades prótonicas, encontrando que los sitios preferenciales de protonación son los nitrógenos 6 (cadena guanidínica) y el "N5" (anillo). La diferencias energéticas entre estas especies protonadas fue de unas pocas Kcal/mol y ambas fueron más estables que las formas N8H, N9H, N20H y N15H, con diferencias energéticas de 20,5, 26,5, 33 y 44 Kcal/mol respectivamente a

Figura 21



Curvas de energía en función del ángulo α de famotidina en su formas neutras y protonadas en N6 (N6H) y N5 (N5H) obtenidas por el método AM1

TABLA V GEOMETRIAS MOLECULARES OBTENIDAS POR EL METODO AM1 PARA LAS FORMAS MAS ESTABLES DE LA FAMOTIDINA NEUTRA Y SUS FORMAS PROTONADAS EN EL N6 Y N5

Parámetros Geométricos	FAMOTIDINA	FAMOTIDINA	FAMOTIDINA
	NEUTRA	N5H	N6H
D C1-S2	1,7563	1,7262	1,7055
D S2-C3	1,6596	1,6621	1,6542
D C3-C4	1,3930	1,3829	1,4019
D C4-N5	1,3907	1,3934	1,3712
D N6-C1	1,3846	1,3678	1,4077
D N6-C7	1,3306	1,3499	1,4017
D C7-N8	1,4256	1,4234	1,3707
D C7-N9	1,4275	1,4072	1,3728
D S11-C10	1,7821	1,7864	1,7811
D N15-C14	1,3557	1,3712	1,3688
D N16-C14	1,278	1,2748	1,2676
D S27-N16	1,5442	1,5519	1,5850
D N5-N8	2,9530	4,2815	2,9505
D H22-N5	2,6010	4,3464	2,2804
A(C1-S2-C3)	90,7	92,2	90,4
A(C2-C3-C4)	111,5	112,8	111,5
A(C3-C4-N5)	114,7	112,3	114,5
A(N8-C7-N6)	125,0	122,8	121,2
A(C9-C7-N6)	119,1	117,7	118,7
α	-169,3	-6,3	116,7
β	179,1	178,6	179,2

a . Distancias en Å

c. α = C7-N6-C1-S2

d. β = C14-C13-C12-S11

favor de la estructura N6H.

La variación del ángulo α en la forma N6H indicó que la conformación más estable se encuentra a $\alpha = 150^\circ$ con una barrera a la rotación de 17,3 Kcal/mol a $\alpha = 0^\circ$ (Fig. 21). Este resultado, en conjunto con las distancias entre los N8 y "N5" y entre el protón del N8 y el "N5", hacen pensar en la existencia de una fuerte interacción por hidrógeno entre estos nitrógenos.

Para la forma N5H, la forma más estable fue encontrada a $\alpha = 0^\circ$, con una barrera a la rotación de 10,6 Kcal/mol a 180° y una barrera menor de 3,5 Kcal/mol, a 90° (Fig. 21). La protonación del nitrógeno heterocíclico rompe el puente de hidrógeno intramolecular, siendo en este caso la estructura preferencial aquella en la cual el N8 se encuentra en posición cis con respecto al azufre heterocíclico.

Para el resto de las especies protonadas, la forma más estable fue encontrada a $\alpha = 180^\circ$ con barreras a la rotación que varían entre 12 y 18 Kcal/mol.

El estudio de las cargas de Mulliken indica que la protonación del N6 provoca una gran disminución de la carga negativa del "N5" y una leve disminución de la carga negativa en el N8, lo que también hace evidente la interacción por puente de hidrógeno entre ambos nitrógenos. La protonación del "N5" no provoca grandes cambios en el resto de las cargas de la molécula. La posibilidad de protonación del azufre heterocíclico queda descartada debida a la gran carga positiva que posee este átomo, que haría altamente desfavorable el que soportara adicionalmente una carga positiva, lo cual dificultaría también la posible interacción por puente de hidrógeno entre el azufre y el N8. Además un análisis de la carga sobre el N8 durante la rotación no mostró alteración con respecto a su valor $\alpha = 0^\circ$.

Los estudios teóricos del mecanismo de acción en los receptores H2 de histamina de los antagonistas de este tipo estructural entre los cuales está incluida la tiotidina, (43),

indican que el catión guanidinio (N6H) interactúa con el sitio I (modelado por un anión formiato) y la cadena cianoguanidínica interactúa con sitio dador y aceptor de protones (modelado por un ión amonio y ión formiato respectivamente) aceptando y donando un protón. En este caso la conformación más estable utilizada para la tiotidina fue análoga a la que se obtuvo en este trabajo para la famotidina en su forma protonada N6H. Estos resultados estarían en desacuerdo con los estudios efectuados para la 4-metiltiazol-2-ilguanidina, en la cual la base libre es considerada como la candidata preferencial para interactuar con el receptor. Sin embargo, estudios recientes de pKa para la famotidina a pH fisiológico indican que la forma protonada N6H es la más abundante en estas condiciones (65).

Otra posibilidad para el reconocimiento y activación de los receptores H2 de histamina, consiste en suponer que los nitrógenos "N5" y N6 actúa como sitios donador y aceptor de protón respectivamente frente al receptor . Sin embargo, la interacción entre el nitrógeno guanidínico N8 y el "N5" tiazólico, además de la pequeña carga negativa en el "N5", harían poco probable la aceptación de un protón por este nitrógeno. Esto concuerda con los estudios realizados con tiotidina en los cuales la interacción donador-aceptor está localizada en la cadena cianoguanidínica (43).

Para determinar el efecto de la cadena de metiltioetil-N-sulfamoilamidina en la estabilidad de la famotidina, se realizó un estudio conformacional de la molécula 2-guanidil-tiazol a través de la rotación del ángulo α con optimización completa de la geometría, utilizando la metodología AM1, y un estudio detallado de los conformeros más estables utilizando la metodología ab initio.

Las geometrías iniciales para esta moléculas fueron tomadas de trabajos cristalográficos (63). En primer lugar se determinó la estabilidad de las diferentes formas de hibridización para la cadena guanidínica, tanto en sus formas neutra como

protonadas. Para las moléculas neutras la forma más estable, obtenida por ambos métodos (AM1 y *ab initio*), fue aquella en la cual toda la cadena de guanidina presenta hibridación sp^2 . Para las moléculas protonadas estos cálculos indicaron que tanto la forma protonada en el anillo como la protonada en el nitrógeno 6 (N6H) de la cadena guanidínica poseen una hibridación sp^2 de todos los nitrógenos y el carbono de este sustituyente.

El análisis conformacional de la molécula de 2-guanidinothiazol se realizó a través de la metodología AM1, barriendo el ángulo diedro α (S2-C1-N6-C7) desde 0° a 180° , con pasos de 10° , minimizando la energía para el resto de la geometría en cada punto. Los mínimos y máximos fueron más finamente caracterizados. En el caso de la molécula neutra la forma más estable fue aquella que exhibe un interacción por hidrógeno entre los nitrógenos guanidínico N8 y tiazólico "N5" ($\alpha=180^\circ$). La barrera a la rotación a $\alpha=120^\circ$ alcanzó un valor de 12 Kcal/mol.

La forma protonada en el anillo presenta su conformación más estable con $\alpha=0^\circ$, mostrando una pequeña diferencia energética de 1,93 Kcal/mol con respecto a la estructura con $\alpha=180^\circ$. La altura de la barrera a la rotación interna, de 2,0 Kcal/mol, indica que ambas estructuras estarían en equilibrio rápido en fase gaseosa. La forma protonada en la cadena guanidínica (N6H) fue 6,7 Kcal/mol más estable que la protonada en el anillo. También en este caso el conformero con $\alpha=180^\circ$ fue el más estable, y su barrera a la rotación interna presenta una altura de 10,0 Kcal/mol. Este resultado, en conjunto con las distancias entre los nitrógenos tiazólico y guanidínico (2,4 Å), indican una interacción por puente de hidrógeno entre los nitrógenos "N5" del anillo y N8 guanidínico.

Estos resultados inducen a pensar que la presencia de la cadena metiltioetil-N-sulfamoilamidínica modifica la estructura del anillo tiazólico,

aumentando el carácter básico del nitrógeno "5" y haciendo que la interacción por puente de hidrógeno entre los nitrógenos "5" y 8 sea energéticamente más favorable. Esta conclusión racionaliza las pruebas experimentales de la importancia de una cadena polar para la actividad de los antagonistas H₂ (66).

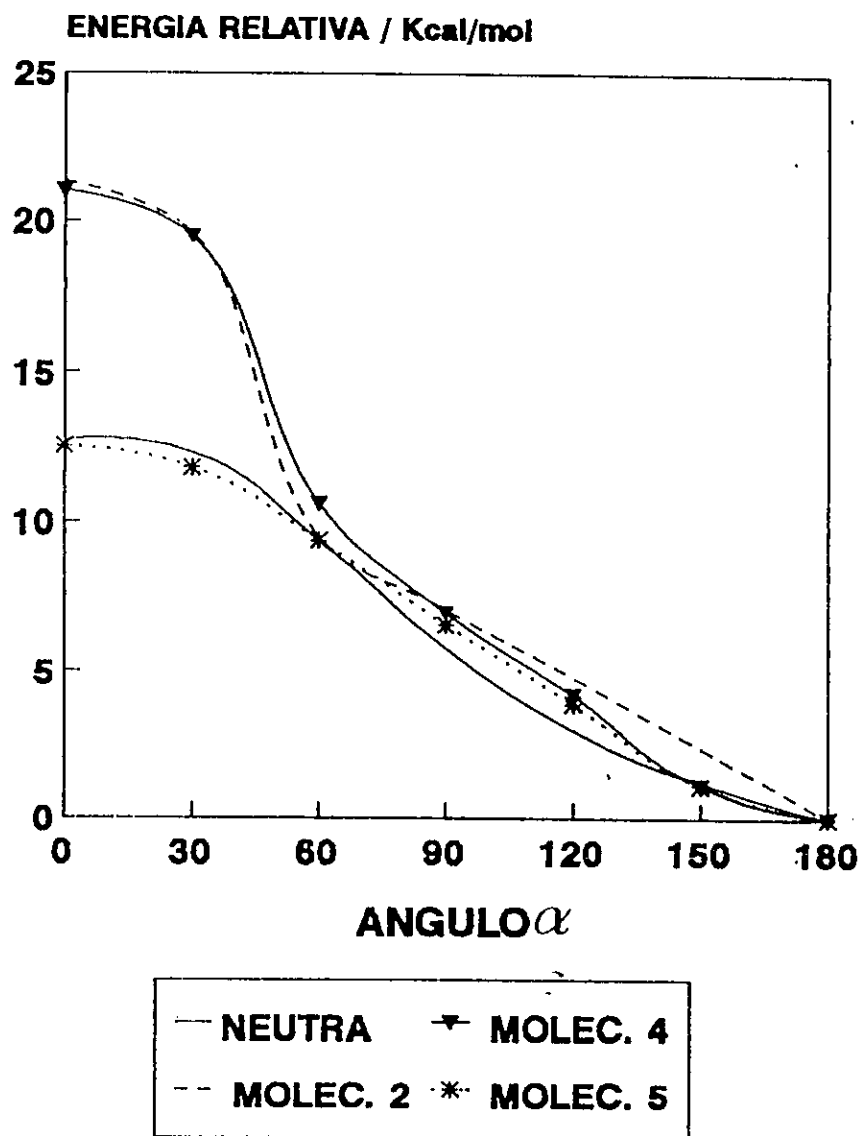
2.3.2 Estudio conformacional de una familia de análogos de famotidina

Con el propósito de generalizar algunos de los resultados obtenidos para la famotidina, se procedió al estudio conformacional de once derivados de N-sulfamoil, N-sulfonil amidinas y N-cianoamidinas (Fig. 20) tanto para las moléculas neutras como para sus formas protonadas, a través de la metodología AM1.

Los resultados para todos los análogos de famotidina, en sus formas neutras, indicaron que la conformación más estable es en todos los casos aquella en la cual la cadena que lleva en su extremo un grupo N-sulfamoil, N-sulfonilamidina o N-cianoamidina se encuentra en su forma extendida. El estudio conformacional se realizó variando el ángulo α (S2-C1-N6-C7) con optimización total del resto de la geometría. Los resultados están representados en las figuras 22, 23 y 24, en los cuales se puede observar que las formas más estables son aquellas en las cuales el ángulo α permanece en 180° con una diferencia con las formas con $\alpha = 0^\circ$ de 13 a 23 Kcal/mol. En todas las estructuras con $\alpha = 180^\circ$ se observó un puente de hidrógeno entre el N8 y el N5, cuya distancia entre nitrógenos estaría entre 2,3 Å a 2,6 Å.

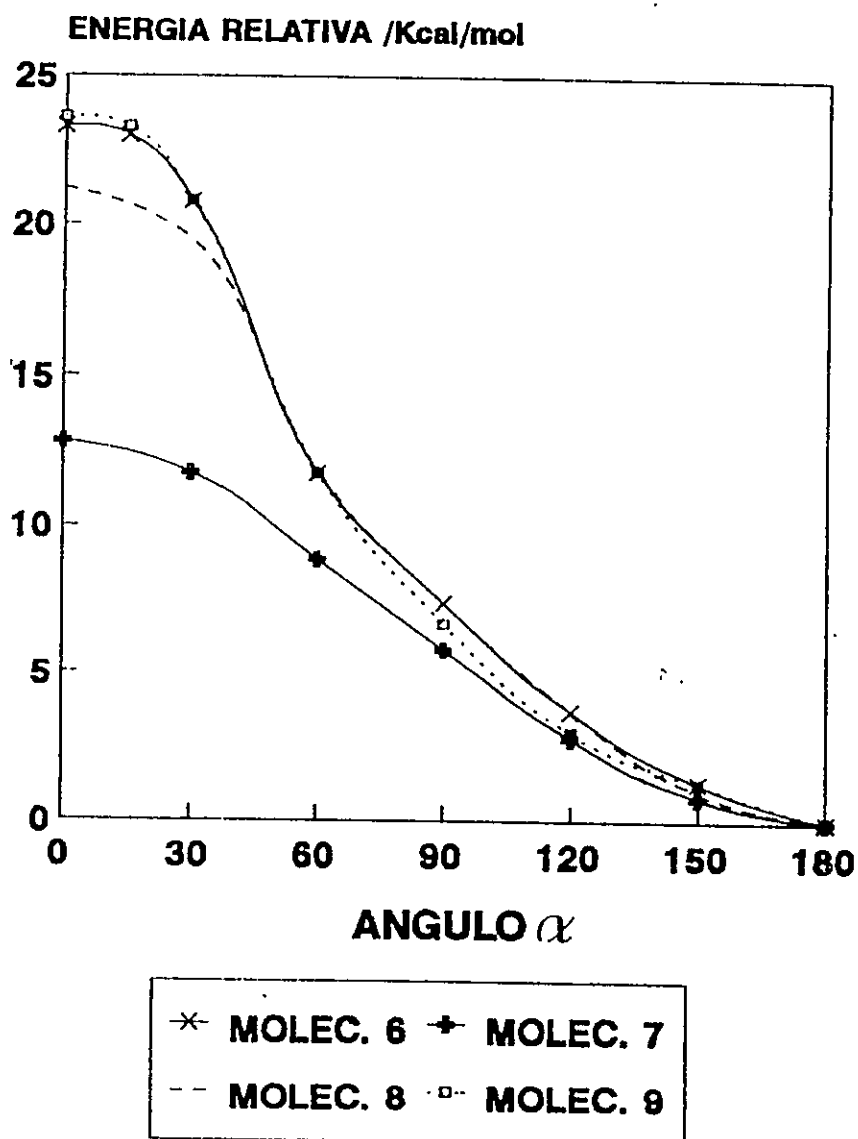
Sin embargo, la presencia de un grupo metilo en el N8 de la cadena guanidínica introduce un comportamiento diferente al del resto de las moléculas. La forma más

Figura 22



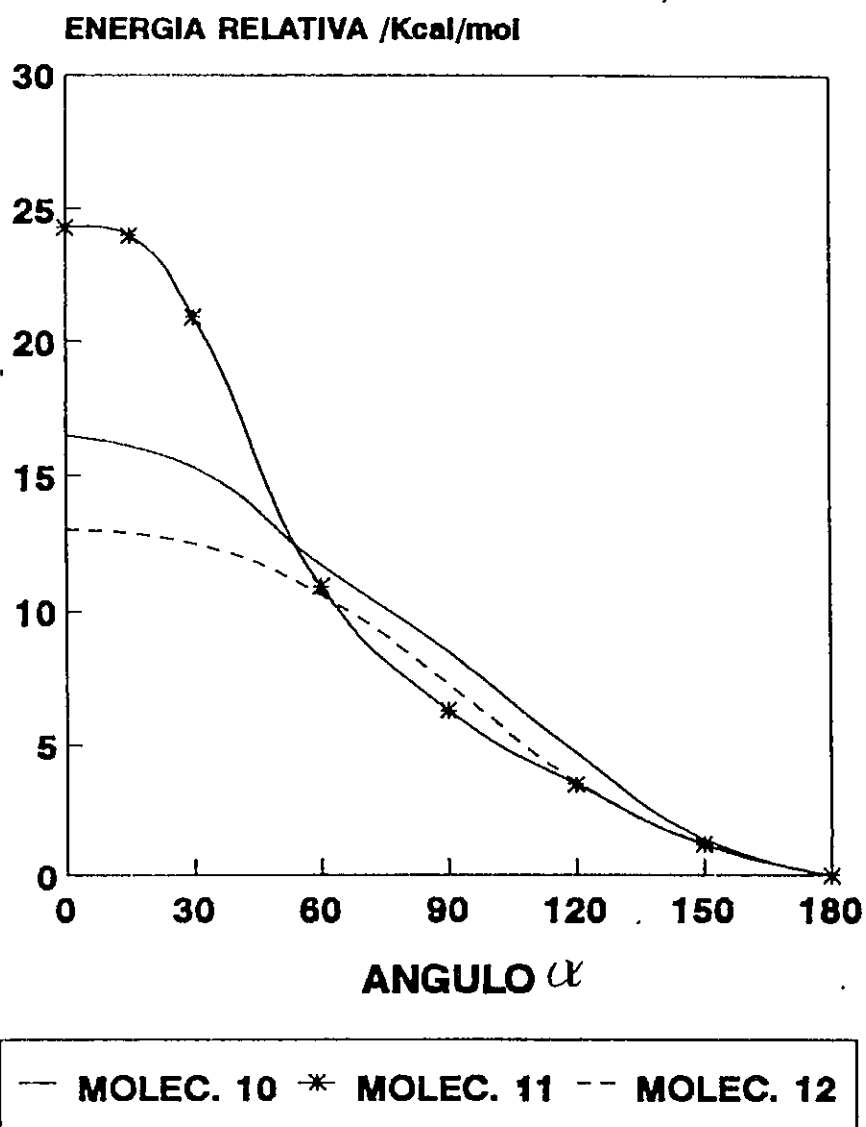
Curvas de energía en función del ángulo α de la famotidina neutra y de las moléculas 2, 4 y 5 obtenidas por el método AM1

Figura 23



Curvas de energía en función del ángulo α de las moléculas
6, 7, 8 y 9 obtenidas por el método AM1

Figura 24



Curvas de energía en función del ángulo α de las moléculas

10, 11 y 12 obtenidas por el método AM1

estable se encontró a $\alpha = 90^\circ$, apareciendo dos máximos energéticos de 213 Kcal/mol y 36,5 Kcal/mol a $\alpha = 0^\circ$ y $\alpha = 180^\circ$ respectivamente. Esta estructura con $\alpha = 90^\circ$ no permite la existencia de un puente de hidrógeno entre los nitrógenos guanidínico y tiazólico, lo cual podría estar relacionado con la baja actividad bloqueadora H2 de este compuesto comparada con la actividad de la famotidina (66). Este hecho respalda la hipótesis que el puente de hidrógeno intramolecular entre el N8 y el "N5" sería importante para el reconocimiento del receptor H2.

En el caso de las formas protonadas extendidas, las formas más estables son aquellas en las cuales la protonación involucra los nitrógenos 6 (cadena guanidínica) y "5" (anillo tiazólico). Sin embargo la estabilidad de ambas formas depende del tipo de cadena que las constituye. Por ejemplo, en las moléculas que poseen la cadena N-cianoamidina (moléculas 9,10,11 y 12), la forma más estable es aquella que presenta la protonación en el "N5" a $\alpha = 0^\circ$, siendo aproximadamente 8,0 Kcal/mol más estable que la forma protonada en el N6. Para las moléculas que presentan cadenas N-sulfamoil o N-sulfonilamidina, la forma más estable fue la protonada en el N6 a $\alpha = 180^\circ$ con una leve diferencia energética con la forma protonada en el "N5".

Finalmente, los resultados obtenidos para la famotidina y análogos indicarían que las estructuras protonadas en el N6, en las cuales existe una fuerte interacción por hidrógeno entre los nitrógenos guanidínico y tiazólico, sería la conformación preferencial en el vacío, lo que no predice, sin embargo, la forma que podría bloquear con los receptores H2 de histamina.

2.4 Conclusiones.

- Las metodologías AM1 y PM3 mostraron ser confiables para la descripción de la distribución de los tautómeros de la histamina protonada, puesto que reprodujeron los datos experimentales de ICR (27). Sin embargo, esta aseveración es válida para la posición de los mínimos, pero no así para las barreras, debido que la parametrización en estos métodos es basada en datos experimentales. Este hecho es especialmente válido para las barreras de la transferencia protónica intramolecular en fase gaseosa, que se ilustra comparando estos resultados con los obtenidos por el método CNDO/2.

Un aspecto relevante mostrado por los cálculos AM1 y PM3 lo constituye la predicción que el conformero más estable de la histamina protonada en fase gaseosa corresponde a la forma HAH⁺, en acuerdo con los datos experimentales ICR y los ab initio 6-31G//6-31G (27). Esta estructura ha sido desechada como estado estacionario por la mayoría de los trabajos reportados en la literatura.

- La metodología CNDO/2-RF mostró ser adecuada en la descripción de la distribución de los conformeros/tautómeros de la histamina monoprtonada en solución acuosa, ya que reproduce los datos experimentales (13-16), además de la distribución de los mínimos que mostraron las mismas tendencias que los resultados AM1 y PM3.

- Se formuló un mecanismo para explicar la tautomería de la histamina protonada en solución acuosa. Este proporcionó una explicación racional de la distribución estadística de especies de histamina en solución acuosa encontrada experimentalmente.

- Los resultados obtenidos indicaron que la transferencia protónica intramolecular es termodinámicamente posible en solución acuosa, hecho que es presentado por primera vez como un proceso importante en la elucidación del mecanismo que rige el equilibrio tautomérico de la histamina protonada en agua. Este proceso constituye una piedra angular en la proposición de un mecanismo que describe las interacciones histamina-receptorH₂ que se mostrará en el capítulo 4.

- Los cálculos AM1 para la familia de análogos de famotidina indicaron que una estructura intramolecularmente enlazada por hidrógeno sería la conformación preferencial.

CAPITULO 3

MODELACION MOLECULAR

3.0 Introducción a la Modelación Molecular

El objetivo de cualquier estudio de modelación molecular es obtener información acerca de la estructura y función de un determinado sistema cuyo estudio directo ofrece grandes dificultades. En general, cualquier procedimiento de modelación contiene en sí mismo mecanismos adecuados para evaluar los modelos producidos y son las funciones de energía potencial las que se utilizan para este propósito.

El uso de modelos físicos simples para la simulación de sistemas moleculares proporciona métodos que permiten obtener un conocimiento más profundo de su estructura y de sus movimientos internos (dinámica) que puedan ser relacionados con los procesos reales.

Uno de estos métodos es la denominada Mecánica Molecular (MM), que exige como prerequisite que la función de energía potencial que define el sistema molecular sea función de la posición de los átomos. En principio, una solución más precisa a este problema puede ser obtenida mediante la solución de las ecuaciones mecano-cuánticas que describen la energía de los electrones y núcleos para cada posible posición nuclear. Desafortunadamente la descripción mecano-cuántica de sistemas tan complejos como las proteínas no es aún posible. Se hace entonces necesario derivar en forma más simple la función de la energía. Podemos expresar la energía asociada a

un simple átomo o una fuerza molecular a través de una suma de varios términos. Para el modelo VFF (campo de fuerzas de valencia generalizado) (70) la ecuación de la energía potencial queda expresada como:

$$\begin{aligned}
 E_{pot} = & \sum_b D_b [1 - \exp(-\alpha(b - b_0))]^2 + \frac{1}{2} \sum_\theta H_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \\
 & \frac{1}{2} \sum_\phi H_\phi [1 + s \cos(n\phi)] + \frac{1}{2} \sum_x H_x x^2 + \\
 & \sum_b \sum_{b'} F_{bb'} (b - b_0)(b' - b_0') + \sum_\theta \sum_{\theta'} F_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta_0') + \quad (3.1) \\
 & \sum_b \sum_\theta F_{b\theta} (b - b_0)(\theta - \theta_0) + \sum_\phi F_{\phi\phi} \cos \phi (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta_0') + \\
 & \sum_x \sum_{x'} F_{xx'} x x' + \sum_i \sum_{j \neq i} [A_{ij}/r_{ij}^{12} - B_{ij}/r_{ij}^6 + q_i q_j / r_{ij}]
 \end{aligned}$$

Esta ecuación constituye el denominado campo de fuerzas. Un campo de fuerzas es un conjunto de ecuaciones y parámetros los cuales, cuando son evaluados en un sistema molecular dado para un determinado conjunto de coordenadas, proporcionan una energía. Los componentes de un campo de fuerzas pueden incluir los estiramientos de enlaces, las flexiones de ángulos, las torsiones de diedros, las interacciones de van der Waals, las interacciones electrostáticas y otras. Para cada componente, el campo de fuerza usa una particular ecuación o una forma funcional determinada. Por ejemplo, la molécula de metano tiene un sólo tipo de estiramiento de enlace y un tipo de flexión de enlace característicos (todos los enlaces C-H y ángulos H-C-H son

equivalentes). Luego, la función de energía potencial para cada átomo será idéntica en el caso de los hidrógenos.

En la ecuación 3.1 los cuatro primeros términos describen la energía requerida para perturbar los enlaces internos, ángulos de valencia, ángulos de torsión y distancias desde un átomo al plano vecino definido por tres átomos unidos a él. Los cinco términos que siguen describen las relaciones entre los términos anteriores, y son llamados términos de acoplamiento. El último término de la ecuación describe la relación entre los átomos no enlazados. La visualización gráfica de estos términos queda expresada en la figura 25.

Las constantes de la ecuación son derivadas del ajuste de los datos utilizando valores experimentales o a partir de cálculos mecano-cuánticos para pequeñas moléculas. Los campos de fuerzas son frecuentemente refinados por la adición de términos capaces de describir mejor un fenómeno específico observable en la estructura molecular, como son por ejemplo los enlaces por hidrógeno.

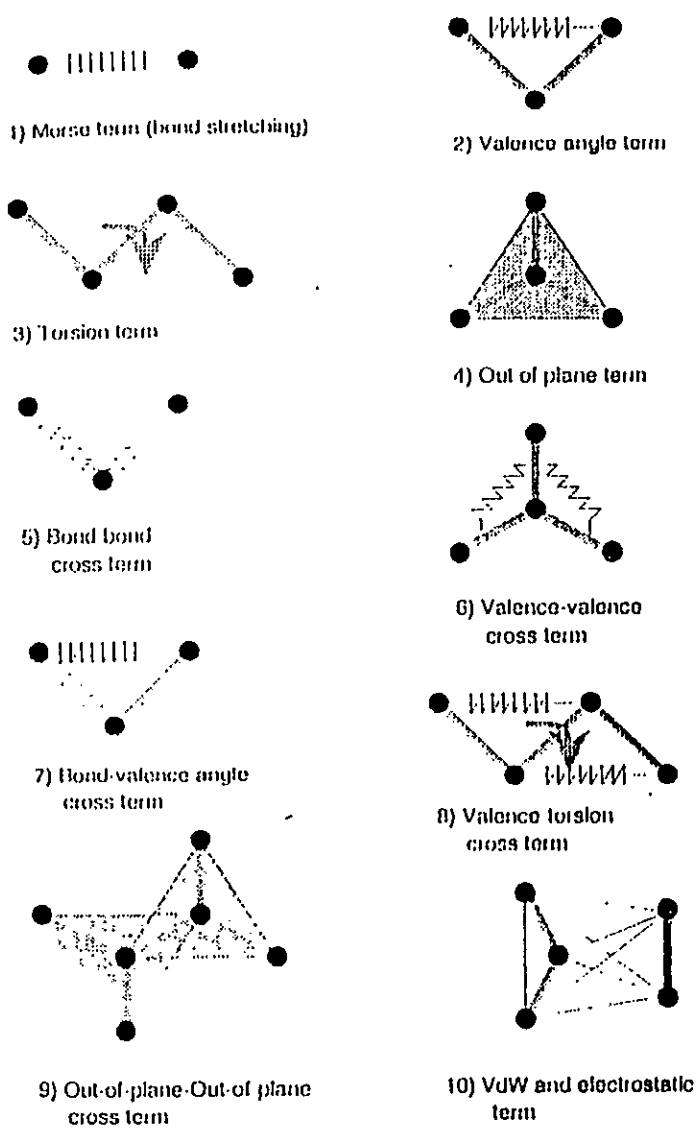
Dos metodologías importantes de la MM han sido usadas en esta tesis: la **minimización** y la **dinámica molecular**, que serán descritos brevemente en el apéndice 2.

3.1 METODOS

a) Modelación del receptor

En la actualidad no existen datos cristalográficos para los receptores H2 de histamina, aunque este receptor es claramente un miembro de la superfamilia de

Figura 2.5



Representación gráfica de los movimientos descritos

en la ecuación 3.1

receptores acoplados a proteínas G (RAPG) (68). La bacteriorrodopsina (BR), cuya estructura terciaria se conoce con una resolución de 3,5 Å, ha sido considerada durante mucho tiempo como una estructura homóloga de la superfamilia de RAPG (69) y es frecuentemente usada como estructura modelo para los miembros de esta familia. Sin embargo, se ha encontrado en la literatura críticas al uso de la BR como modelo, ya que la estructura de los receptores puede que no sea estrictamente homóloga a la BR, a pesar de que su ordenamiento general puede ser muy similar. Es claro que la BR no es un RAPG, pero al igual que éstos es una proteína constituida por siete segmentos de α -hélices que atraviesan la membrana plasmática y es posible relacionarla estrechamente con la evolución de la superfamilia de RAPG.

En este trabajo las coordenadas de la BR obtenidas a partir de cristalografía de difracción de electrones fueron utilizadas para construir la estructura de partida para la producción del modelo (70). Sin embargo, esta estructura sólo tiene bien definida la parte transmembranal de la proteína, ya que los lazos extra e intracelulares aún no han podido ser bien caracterizados cristalograficamente.

Los estudios experimentales desarrollados por Kahn y Engelman (71) en los cuales dos segmentos transmembranales de la BR fueron eliminados de la proteína nativa y posteriormente reemplazados por los mismos segmentos pero ahora sintetizados sin los lazos conectivos, indicaron que la proteína adoptó nuevamente la forma original sin la necesidad de dichos lazos. Este trabajo permite afirmar que la conectividad de los lazos no es fundamental para el plegamiento y asociación de las hélices y proporciona otro elemento de juicio para seguir usando la estructura de la BR como prototipo.

El modelo de la región transmembranal fue construido reemplazando los aminoácidos de estos segmentos de la BR por las secuencias aminoacídicas correspondientes al receptor H2 canino (41) usando el programa Insight II. Se utilizó

el alineamiento de secuencias de RAPG y BR obtenido por Oliveira y otros (72) (Fig 26), en el cual se destacan los aminoácidos importantes en el sitio activo de este receptor, Asp 98 en la hélice 3, Asp 186 y Thr 190 en la hélice 5 y Glu 270 en la hélice 7). El análisis de este alineamiento permitió determinar los residuos conservados en todas las RAPG. Algunos de estos residuos son ácido aspártico, alanina, leucina en la hélice 2; prolina en las hélices 5, 6 y 7; aminoácidos aromáticos como triptofano y fenilalanina en las hélices 4, 6, 7.

Algunos residuos son solamente conservados en una subclase de receptores. Por ejemplo, dos residuos de serina en la hélice 5 son encontrados únicamente en los receptores de catecolaminas; en el caso de los receptores H2 de histamina estas serinas están reemplazadas por un residuo de aspartato y uno de treonina.

El alineamiento de Oliveira y otros (72) fue corroborado por el nuestro en el que fueron alineadas 50 secuencias aminoacídicas, homólogas de los receptores H2 de histamina.

Estos alineamientos permitieron que los residuos postulados como pertenecientes al sitio activo del receptor, Asp 98 en la hélice 3, Asp 186 y Thr 190 en la hélice 5, quedaran orientados hacia el centro del espacio entre las hélices. Además, los residuos hidrofóbicos fueron correctamente colocados en la superficie externa del haz de segmentos transmembranales del receptor.

Los refinamientos estructurales realizados utilizando MM y DM fueron hechos usando el programa Discover, versión 2.6, en un computador PS 390 Evans & Sutherland acoplado a una estación de trabajo gráfico Vax.

El protocolo usado en la MM fue de hasta 1500 ciclos con "steepest descent" hasta alcanzar un valor de la derivada de 2,0 Kcal/mol Å, seguido de hasta 2000 ciclos de una minimización con "conjugate gradient" hasta un valor de la derivada de 0,05

Figura 2.6

	Externa		CITOSOLICA
hélice 1120.....130.....	
bacteriorodop.	F E W I W L A L G T A L M G L G T L Y F L V K G H		
rodop. bovina	L A A Y M F L L I M L G F P I N F L T L Y V T V D		
muscarínico M1	I G I I I G I L S I A T V I G N L I V L I S F K V		
β -2 adrenérgico	H G I V M S L I V I A I V F Q N V L V I T A I A F		
bradicina β -2	D A P F I W V I I L L A A L E N I F V L S V F C L		
histamina H2	V S V V L I V L I L I T I A G N V V V C I A V G L		
hélice 2240.....250.....220.....
bacteriorodop.	L L M S L Y M I F A I A P V L I I I A Y F I I A D		
rodop. bovina	Y L I T I F G G F V M F L D A V A I N L I I Y N L		
muscarínico M1	I I Y L N M S I I G I I L D A C A I S L L F Y N N		
β -2 adrenérgico	A A G I F V V A L G M A L D A C A L S T I I G Y N I		
bradicina β -2	I I A W F P I G C A L I L D A G A I N G L Y I F A		
histamina H2	F A S F P L V I I G L I L D T I A L S V I F C N I		
hélice 3320.....330.....340.....
bacteriorodop.	E Q N P I Y W A P Y A D W L F I T F L L L L D L A L L		
rodop. bovina	G C H L F G F F A I L G G E I A L W S L V V L A I E P		
muscarínico M1	A C D L W L A L D Y V A S N A S V M N I L L I S I D P		
β -2 adrenérgico	W C E L W I S I D V L G V I A S I E I I F V I A V D P		
bradicina β -2	I F P V V N I M I Y M N L Y S S I C F I M L V S I D P		
histamina H2	I I H I Y I S I D V N L C I A S I I N I I M I S I D P		
hélice 4430.....420.....	
bacteriorodop.	L A G V L G I S I M I G D A G V L A L I T G		
rodop. bovina	V L P P A A C A L A M V W I F A V G M I A H		
muscarínico M1	I I A P A W L V F S V L W A L G I H L A A P		
β -2 adrenérgico	Q I P L F S T L G S V I W V M L I I V P A P		
bradicina β -2	V L M P S S L L L T C S W I V L S Y L I A W		
histamina H2	H I S I F S L T I S I V W I L V L S V A V P		
hélice 5510.....520.....	
bacteriorodop.	W W A I S T A A M L Y I L Y V L F F G F I		
rodop. bovina	F V I Y M F V V H F I I P L I V I F F C Y		
muscarínico M1	I I F G I A M A A F Y I P V I V M F I L Y		
β -2 adrenérgico	Y A I A S S I V S I Y V P L V I M V I V Y		
bradicina β -2	I N H I L N I V G F L I P L S I I I F F I		
histamina H2	Y G I V D G I V I F Y I F L L V M F I I Y		
hélice 6620.....630.....	
bacteriorodop.	I L W V V P Y A S W L V V T V N R L V K F I S A V E		
rodop. bovina	Y F A V G A Y P L W C I L F A I V M I I V M R I V E		
muscarínico M1	V I V M I N Y P I W T L I F A L L I A S I I P A A F		
β -2 adrenérgico	V I N V I F F F L W C L I F F I G M I I G L I K L A K		
bradicina β -2	V L F I S I D F P F W C L V F L G L V A L V L V I A F		
histamina H2	Y V G V T I Y P F W C I I F A G M V A A I I V I A F		
hélice 7710.....720.....730.....
bacteriorodop.	N I E I L I F M V L D V S A E V G I Q L I L L P		
rodop. bovina	D F G P I F M I I P A F F A E I S A V Y N P V I		
muscarínico M1	C V P E I L W E L G Y W L C Y V N S T I N P M C		
β -2 adrenérgico	L I P K E V Y I L L N W I G Y V N S G F N P L I		
bradicina β -2	R V A D I V I D I S S Y V A Y S N S A I N P I L		
histamina H2	A I N E A F E A V V L W L G Y A N S A L N P V I		

Alineación de secuencias obtenidas por Oliveira y otros.

Kcal/mol Å. El modelo fue minimizado forzando los átomos de la cadena principal a permanecer en sus posiciones originales usando una constante de fuerza de 270 Kcal/mol Å².

La estructura resultante de la minimización constituye la conformación inicial para la simulación con DM. En este trabajo la simulación tuvo el objetivo de encontrar otros posibles mínimos de la hipersuperficie conformacional.

El protocolo utilizado en DM fue un calentamiento de 0,1 K a 310 K en un lapso de 5 ps (los pasos de cada tiempo fueron en todos los casos de 1 fs). Cuando la temperatura alcanzó los 310 K, un lapso de 20 ps fue dividido en cuatro segmentos y las estructuras extraídas a estos tiempos fueron minimizadas y estudiadas para determinar las más estables. Además del modelo del receptor "silvestre", se construyeron usando la misma metodología modelos de receptor H2 de histamina incorporando las mutaciones puntuales que se habían realizado experimentalmente (42).

Para explorar las interacciones que se producen en el sitio activo en el proceso de reconocimiento del ligando, la molécula de histamina en sus distintas formas tautoméricas y protonadas, tanto como algunos ligandos exógenos, fueron atracados al modelo del receptor H2 de histamina y a los correspondientes modelos de receptores mutados en las mismas formas y en posiciones equivalentes. La minimización de los complejos siguió el mismo protocolo que el descrito anteriormente, al igual que las simulaciones por DM.

b) Modelación de agonistas y antagonistas

La estructura inicial para la histamina en su forma +HN3H fue la estructura cristalina (16) obtenida de la base de datos estructurales de Cambridge. Esta estructura fue minimizada usando el método semiempírico PM3 (29). Las coordenadas atómicas de la forma +HN1H fueron generadas a partir de la estructura +HN3H minimizada utilizando nuevamente el método PM3.

Las estructuras cristalinas de los antagonistas H2 de histamina cimetidina, ranitidina y famotidina fueron obtenidas de la misma base de datos y sus estructuras también fueron minimizadas utilizando el método PM3.

Las cargas atómicas de las formas +HN3H y +HN1H así como las de los antagonistas fueron utilizadas en los cálculos de MM y DM como una forma de modificación del campo de fuerza que utiliza el programa.

3.2 RESULTADOS Y DISCUSION

3.2.1 Modelación de las interacciones histamina-receptor

Con el fin de obtener la mejor representación posible del receptor H2 de histamina, la estructura obtenida a partir de la minimización fue utilizada para los cálculos de DM. El protocolo para la simulación condujo a la obtención de cuatro estructuras, a 5 ps, 10 ps, 15 ps y 20 ps respectivamente, las que fueron minimizadas como se describió en la sección de métodos. Las cuatro estructuras resultaron ser

energéticamente muy similares, existiendo solo 2 a 4 Kcal/mol de diferencia entre ellas.

Al comparar la estructura obtenida por minimización con la más estable obtenida en la simulación dinámica, no se observaron diferencias fundamentales (energéticas y estructurales) entre ellas. Dada la similitud de las estructuras obtenidas por ambos métodos y el tiempo computacional necesario para cada cálculo, la estructura obtenida por MM fue usada para explorar la interacción con histamina (Fig 27-28).

Los complejos +HN3H-receptor H2 y +HN1H-receptor H2, obtenidos después de la minimización, fueron más estables que el receptor aislado en 150 Kcal/mol y 160 Kcal/mol respectivamente (Tabla VI).

Durante la minimización de los complejos se observó un reordenamiento del ligando en el interior del sitio activo para mejorar su interacción con el receptor. Uno de los protones del grupo amonio de la forma +HN3H fue encontrado a 2,0 Å de uno de los oxígenos del grupo carboxilato del Asp 98 (Fig. 29 y 30 lado izquierdo). El protón del "N1" del anillo imidazólico (IM) fue localizado a 2,04 Å de uno de los oxígenos del grupo carboxilato del Asp 186. El "N3" del IM, a su vez, se encontró a 5,6 Å del protón del hidroxilo de la Thr 190 (Tabla VI).

Aunque las energías de los complejos +HN3H-receptor H2 y +HN1H-receptor H2 fueron similares, la posición del ligando en el sitio activo fue totalmente diferente. En el complejo con la forma +HN1H uno de los protones de la amina alifática cargada fue localizado a 2,62 Å de uno de los oxígenos carboxílicos del Asp 98, mientras que el protón del "N1" y el nitrógeno "N3" del IM fueron localizados a 4,62 Å y 5,67 Å de uno de los oxígenos carboxílicos del Asp 186 y del hidrógeno hidroxílico de la Thr 190 respectivamente (Fig. 29 y 30 lado derecho).

La estabilización de estos complejos fue principalmente debida a una disminución

Figura 29

Modelo tridimensional del receptor H2 de histamina. Se muestran los C α ,C(O),N de las 7 hélices. En color rojo se destacan los residuos Asp98, Asp186 y Thr190 y en celeste Glu270.

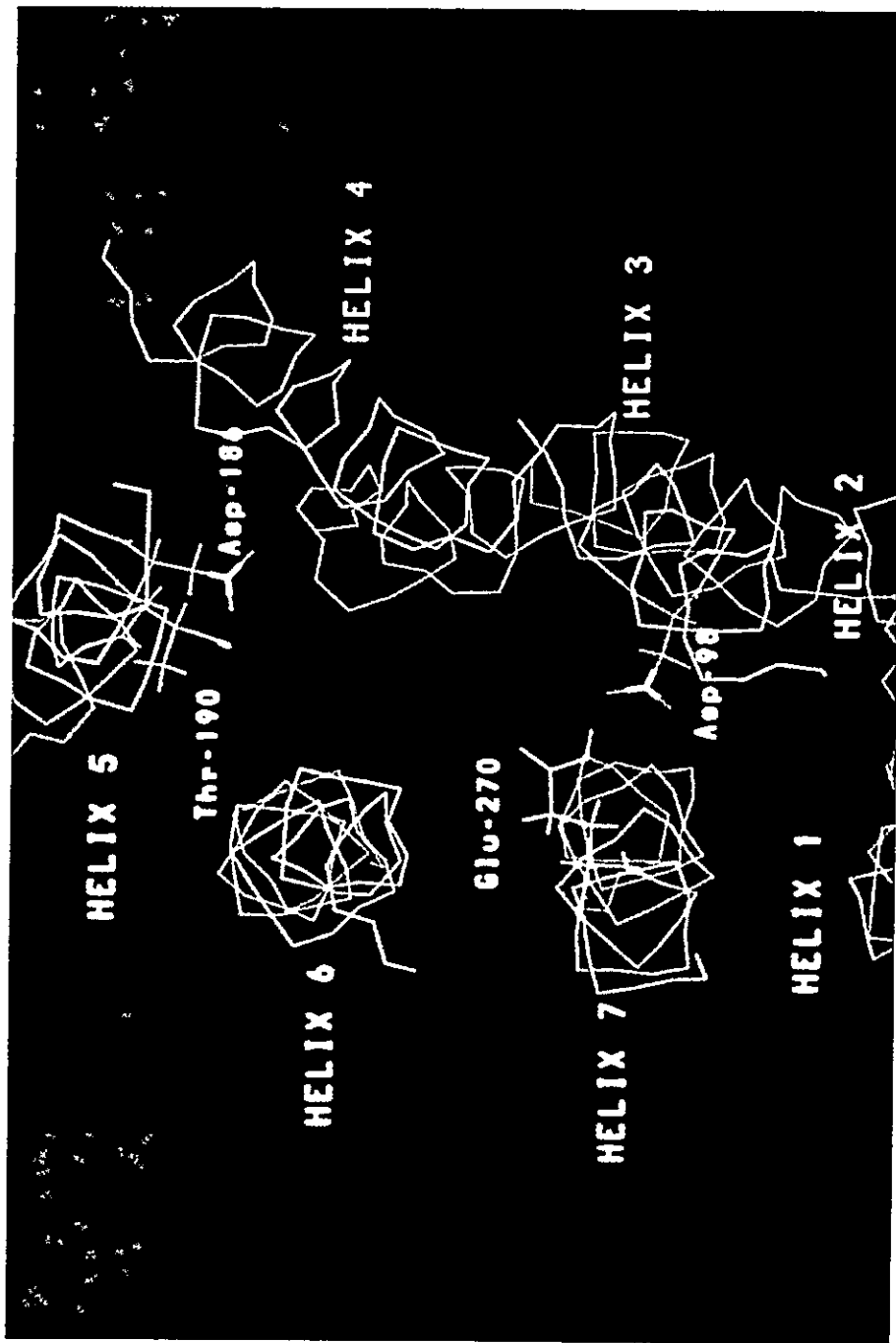


Figura 28

Vista en el plano de la membrana celular del modelo del receptor H2 de histamina. Los Asp98 Asp186 y Thr190 se muestran en color rojo y el Thr190 en celeste. Se destacan con superficie de van der Waals y en amarillo las hélices 3 y 5

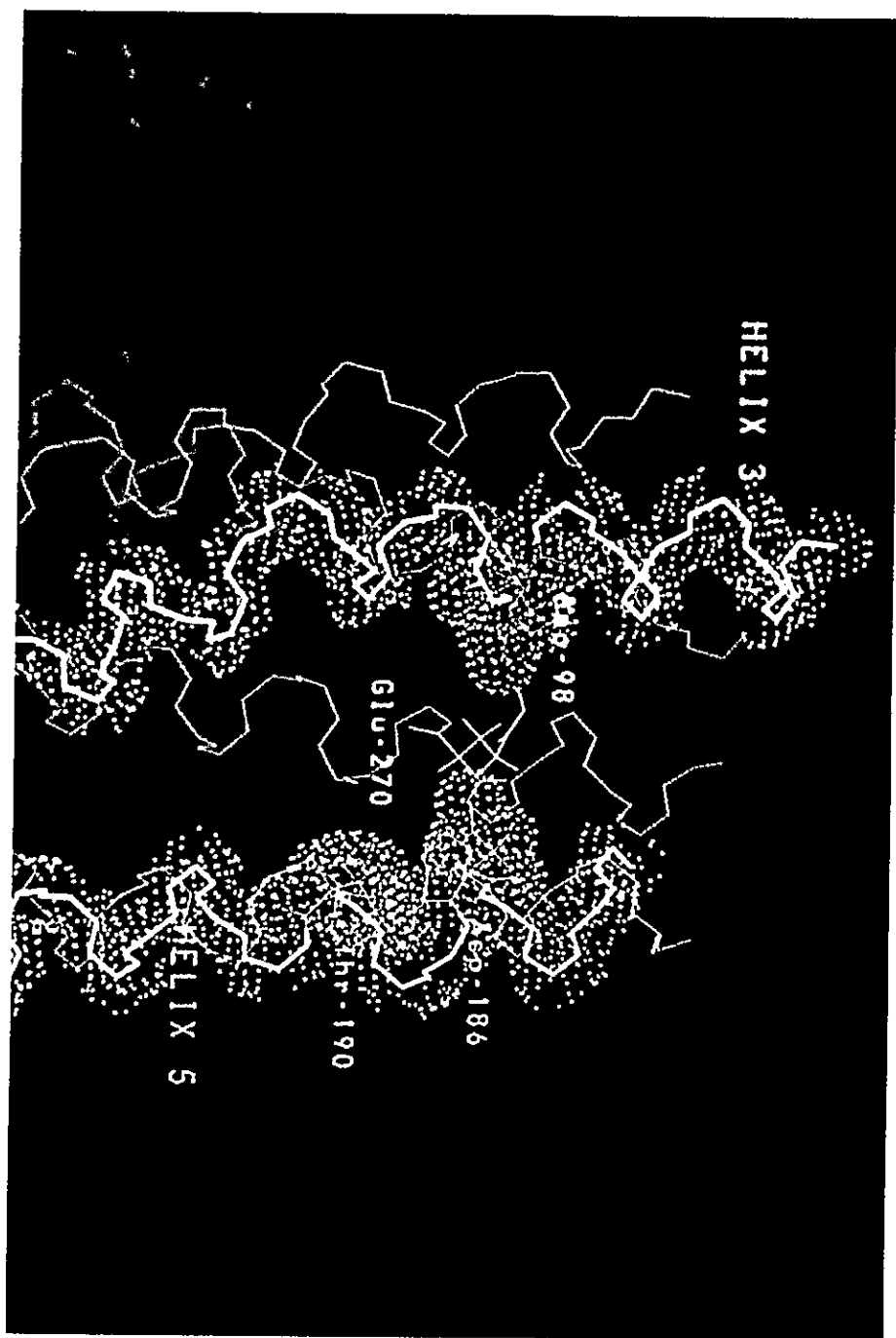


TABLA VI ENERGÍAS RELATIVAS DE LOS COMPLEJOS LIGANDO-RECEPTOR H2 Y DISTANCIAS MAS RELEVANTES.

Complejo receptor con	Distancia Asp98-NH3+	Distancia Asp186 - N(3)H	Distancia Thr 190 - "N1"	$\Delta E /$ Kcal/mol
+HN3H	2,0	2,04	5,60	145,8
+HN3H 20ps	2,01	2,0	5,5	145,0
Asn98/+HN3H	7,06	1,85	6,73	70,0
Ala 186/ +HN3H	1,77	5,68	9,58	150,0
Ala 190/ +HN3H	2,14	1,97	7,09	144,0
Ala186 Ala 190 / +HN3H	2,44	5,20	8,06	143,0
Ala270 / +HN3H	1,63	4,89	7,68	142,0
+HN1H	2,62	4,62	5,67	143,0
Complejo	Asp 98	Asp 86	Thr 190	$\Delta E/$ Kcal/mol
Cimetidina min.	2,19 con H IM+	2,98 con CN	2,65 con NH ₂	165,0
Cimetidina DM	2,23	3,93	3,92	170,0
Ranitidina min.	1,88 con guanid.	4,31 con NH ₂	6,54 con NO ₂	180,0
Ranitidina DM	1,81	5,47	7,87	189,0
Famotidina min.	2,05 con guanid.	2,41 con NH ₂	1,45 con SO ₂	230,0
Famotidina DM	1,89	1,96	2,08	260,0

a. Distancias en Å

Figura 29

Comparación de los sitios activos de los complejos de +HN3H y +HN1H con el receptor H2 de histamina. Se representan los C α ,C(O),N de las hélices 3, 5 y 7. En color rojo se destacan las cadenas y superficies de van der Waals de los residuos Asp98, Asp186 y Thr190 y en celeste las de Glu270. En verde se destaca la histamina. Lado izquierdo: +HN3H, lado derecho: +HN1H

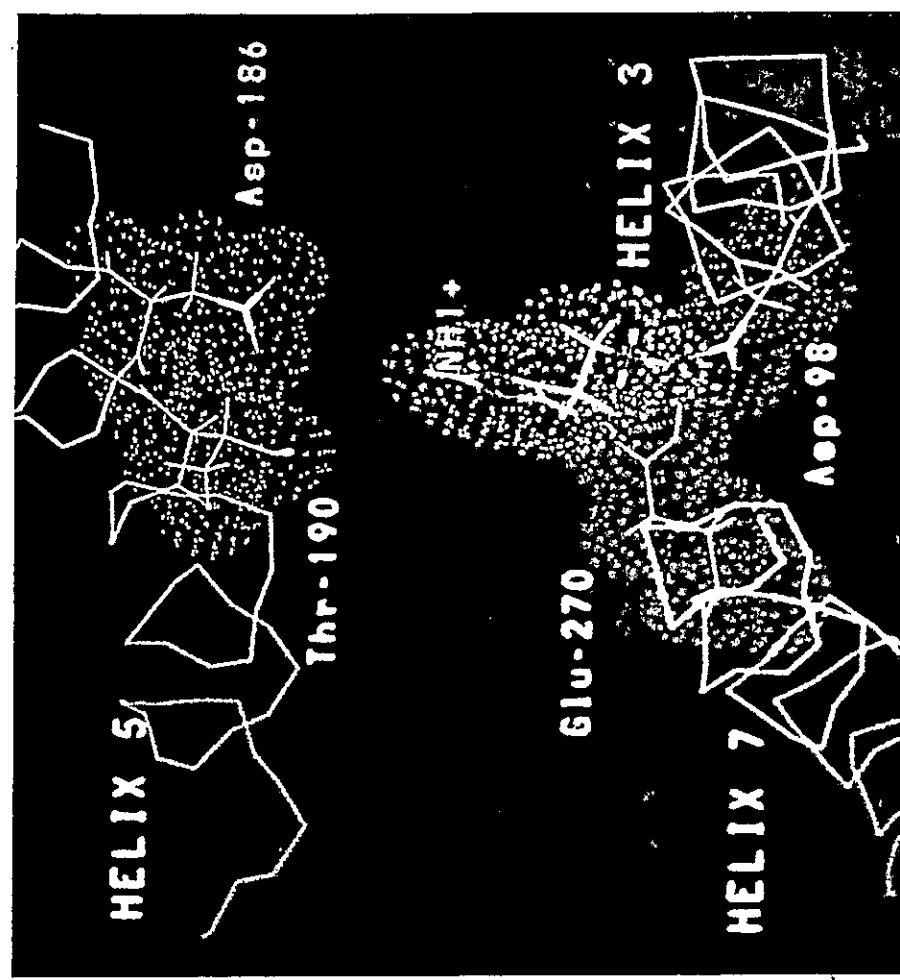
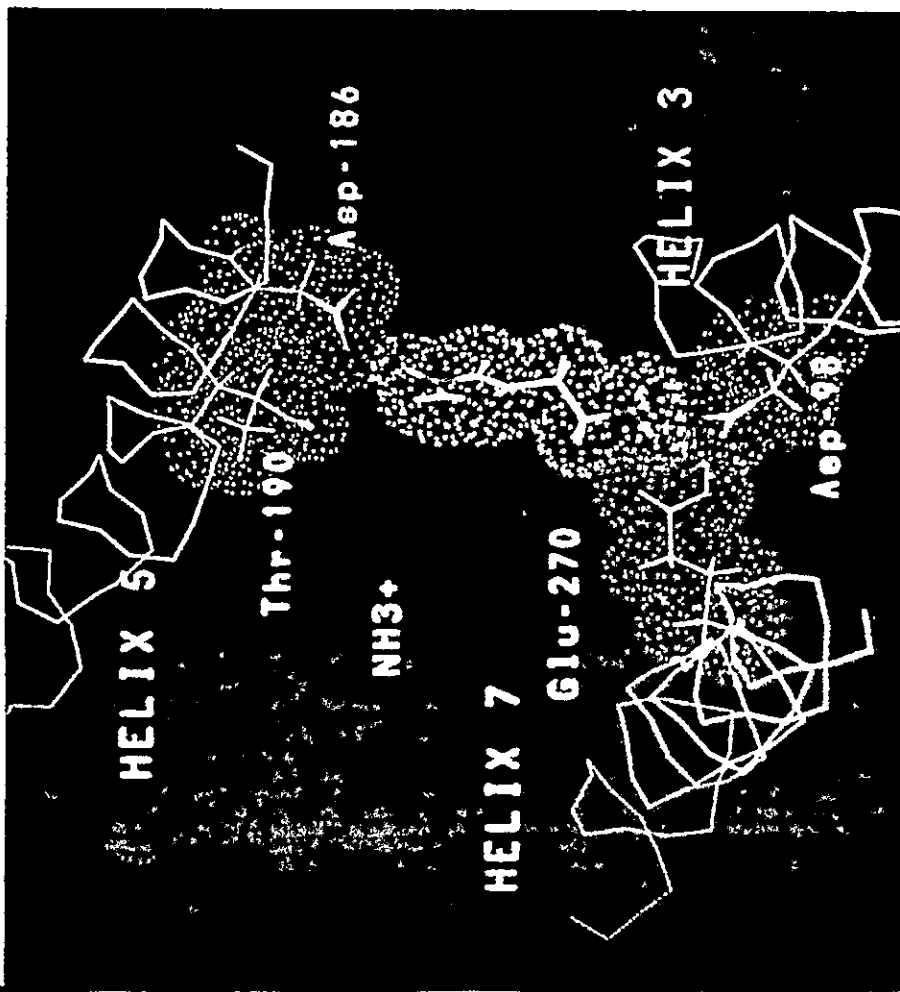
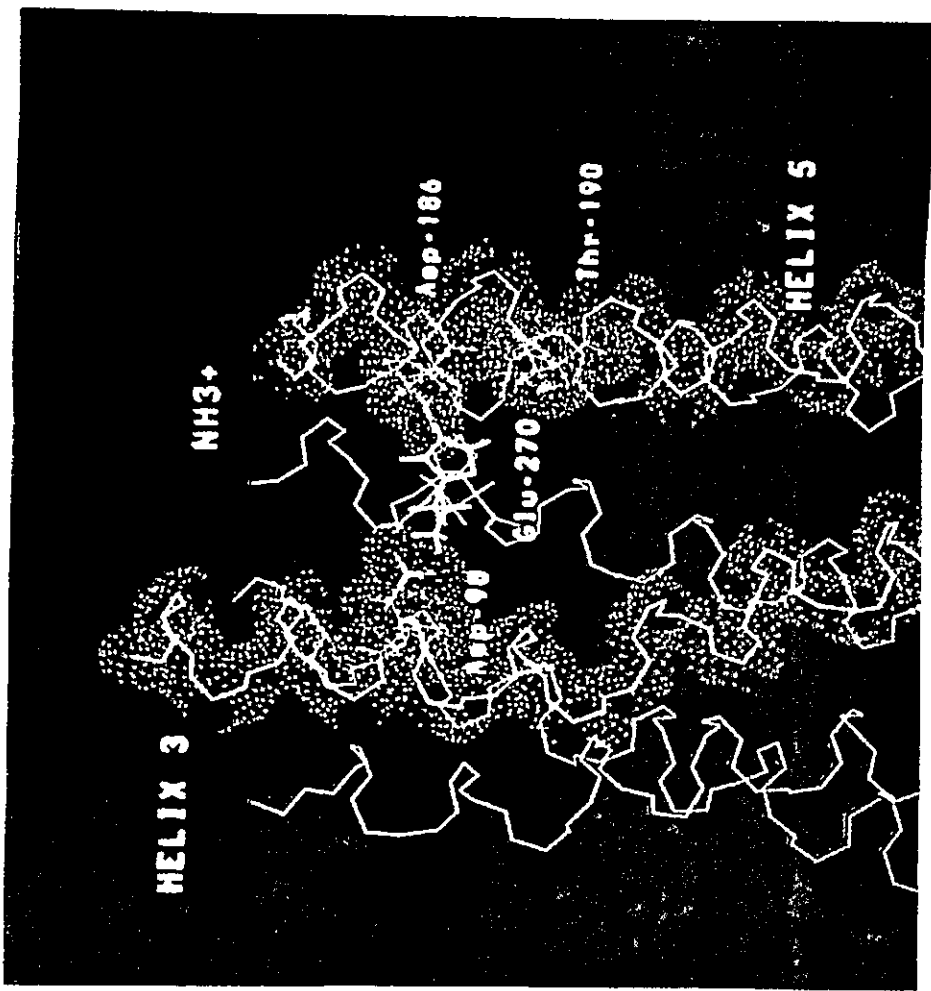
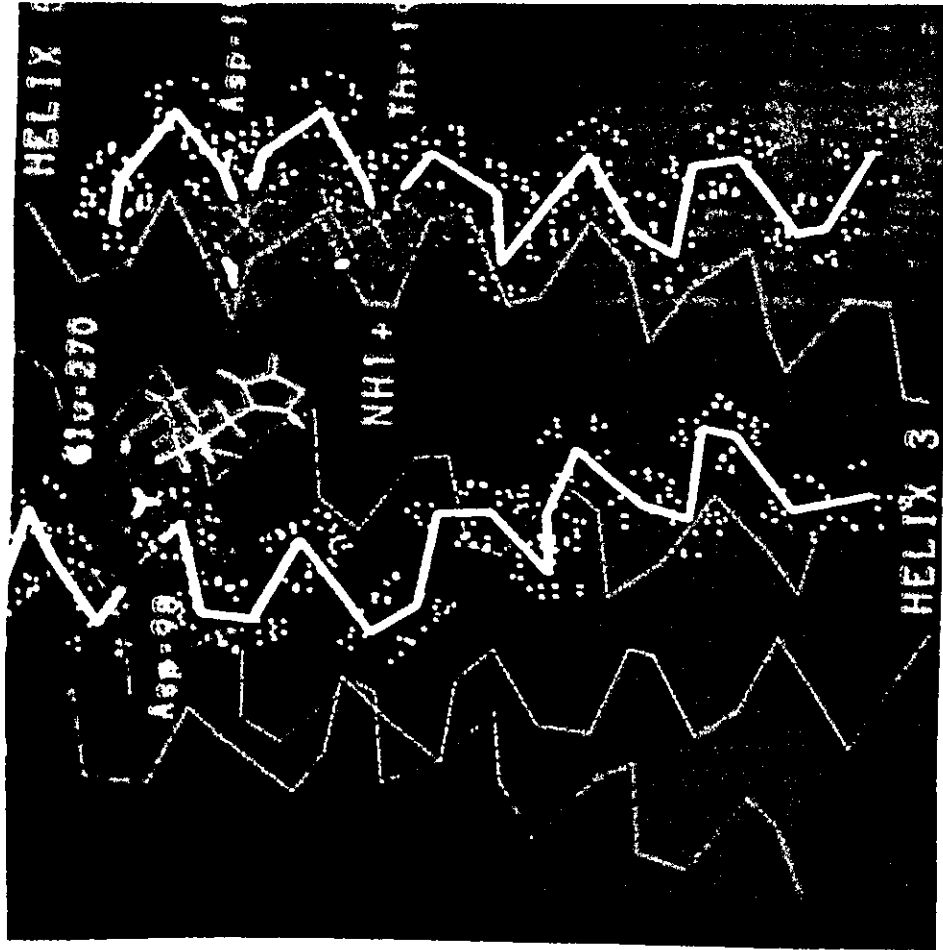


Figura 30

Vista en el plano de la membrana celular del modelo del receptor H2 de histamina. Los Asp98 Asp186 y Thr190 se representan con sus superficies de van der Waals en color rojo y el Glu270 en color celeste. La histamina es destacada en color verde. Lado derecho: +HN3H con las hélices 3 y 7 destacadas en azul. Lado izquierdo: +HN1H con las hélices 3 y 5 destacadas en amarillo.



de la energía coulombica. Sin embargo, el complejo con la forma +HN3H fue 40 Kcal/mol más estable, en términos de energía coulombica, que el complejo con la forma +HN1H.

También se observó que las distancias entre el hidrógeno de la amina alifática y el hidrógeno del "N3" del IM en la forma +HN3H unida al receptor, fue más larga que en la conformación más estable en el vacío, hecho provocado por la interacción del ligando con los residuos Asp 98 y Asp 186.

Si establecemos una relación entre las energías potenciales obtenidas de los complejos de histamina con el receptor "silvestre" y con los mutantes, por una parte, y las constantes de afinidad para los ligandos, por otra, se puede observar que los datos de MM están en completa concordancia con los observados experimentalmente por Gantz y otros (42). Estos autores postulan que la forma +HN1H de histamina tiene las mismas posibilidades que la forma +HN3H de unirse a los receptores H2. La similar afinidad de ambas formas por el receptor H2 calculadas en esta tesis no permite decidir cuál de ellas es la funcionalmente activa, por lo que se hace necesario recurrir a otros criterios.

Los datos de simulación dinámica para los complejos con las formas tautoméricas de histamina no presentaron diferencias energéticas o estructurales apreciables con respecto a los datos obtenidos por minimización, razón por la cual este último método fue seleccionado para los estudios que se describen a continuación

Para medir los efectos estructurales de los ligandos sobre el receptor, se estudiaron las desviaciones de las raíces cuadradas de las coordenadas (root mean square, RMS) tanto en los C α como en la cadena principal de las estructuras de los complejos minimizados, con respecto a las coordenadas de la estructura del receptor H2 sin ligando. Los RMS miden la perturbación en la posición de los átomos como producto

de la influencia que puede ejercer sobre ellos la proximidad de otra estructura, una fuerza externa etc.

La variación de este parámetro posicional fue relacionada con la actividad medida a través de los ensayos biológicos, tanto para los ligandos endógenos como exógenos. Los valores de RMS indicaron que la forma +HN3H de la HA perturbó principalmente las hélices 1,3 y 7 (Fig. 31). Estos cambios estructurales inducidos por la forma +HN3H no son un artificio, dada la posición de este ligando. Los datos indican que dos de las regiones más afectadas por la presencia del ligando son hélices que están alejadas del sitio activo. Además, la hélice 5, involucrada directamente en el sitio activo, no presenta una perturbación apreciable, mientras que las hélices 1 y 7, que se encuentran más bien equidistantes de éste, fueron las más alteradas.

Los valores de RMS para la forma +HN1H indicaron que esta forma no perturba el receptor H2, ya que este parámetro se mantiene cerca de cero para todas las hélices.

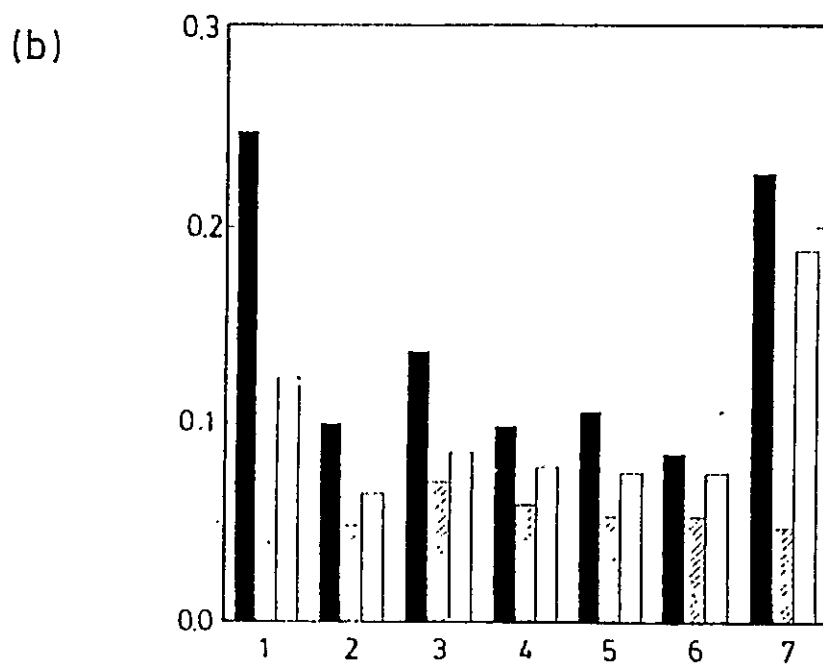
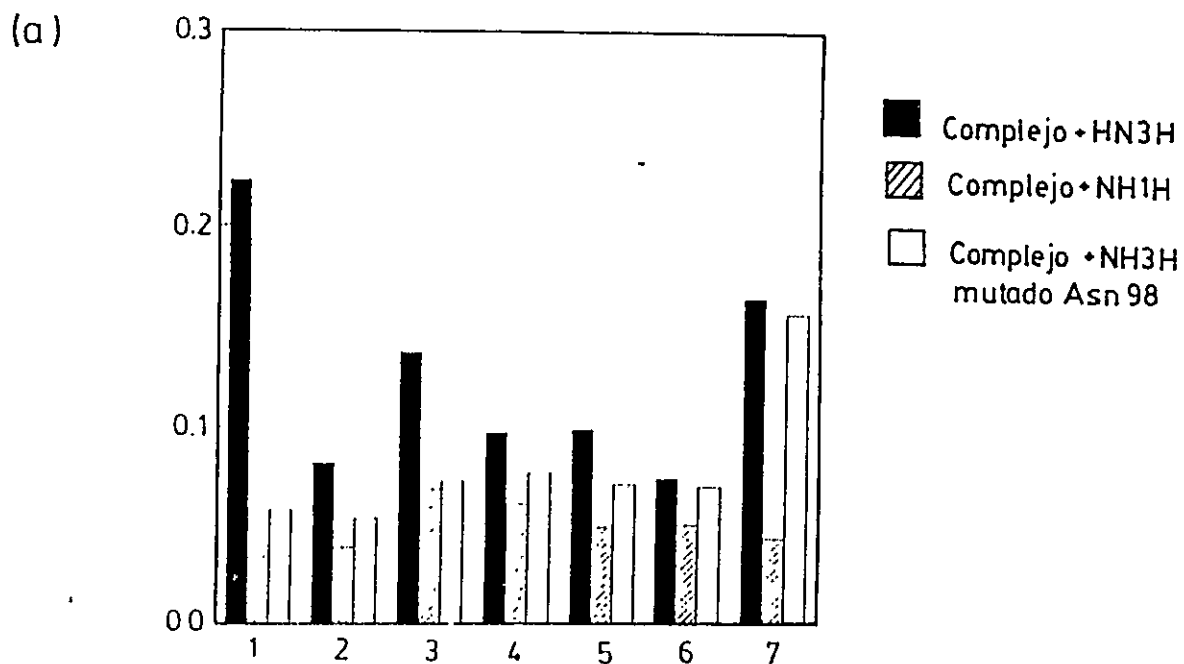
Estos resultados permiten establecer fehacientemente que, de las especies tautoméricas, la +HN3H es la forma que activa el receptor. Por esta razón, la forma +HN3H fue la utilizada en los estudios de ligando con receptor con mutaciones puntuales que es objeto de la sección siguiente.

3.2.2 Análisis de las mutaciones

Con el objeto de validar aun más el modelo propuesto para los receptores H2 de histamina se procedió a reemplazar computacionalmente los aminoácidos mutados experimentalmente (42).

El primer aminoácido sustituido fue Asp 98, el cual fue mutado por Asn, con el

Figura 34



Representación gráfica de los desplazamientos RMS para cada una de las hélices. a) Estudio con C α b) Estudio con C α ,C(O),N

objeto de eliminar esta carga negativa del interior del receptor. Cuando la forma +HN3H fue atracada al sitio de reconocimiento del receptor mutado, la energía de este complejo disminuyó sólo en 70 Kcal/mol con respecto al receptor mutado sin el ligando (recordemos que la disminución de energía del complejo con el modelo del receptor "silvestre" fue de 150 Kcal/mol).

La disposición del ligando (forma +HN3H) fue totalmente distinta a la descrita anteriormente. Uno de los protones de la amina alifática cargada se encontró a 7,1 Å del oxígeno carboxamídico más próximo de la Asn 98, mientras que el protón del "N3" del IM fue localizado a 1,85 Å de uno de los oxígenos del Asp 186 y el "N1" del IM fue encontrado a 6,73 Å del protón hidroxílico de la Thr 190. La pérdida de la carga provoca que la interacción con el Asp 186 en la hélice 5 sea ahora más importante. Sin embargo, al igual que en el receptor no mutado, no existe una interacción muy clara con la Thr 190 (Fig. 32) (Tabla VI).

Los datos experimentales para esta mutación indican que ella provoca una baja de la afinidad, lo cual estaría en perfecta concordancia con la disminución de la energía del complejo mutado con respecto al receptor mutado.

Los estudios de los efectos conformacionales indicaron que la mutación de Asp 98 por Asn provocó una disminución de los valores RMS en todas las hélices (Fig. 31), lo cual estaría indicando que la eficacia del ligando en este caso estaría disminuída. Esto también estaría de acuerdo con los datos experimentales, ya que la mutación provoca una baja en la actividad de la histamina pero no su pérdida total (42).

La mutación del Asp 186 por Ala no provocó ningún efecto en la energía del complejo +HN3H-receptor H2 con respecto a la energía del complejo no mutado. Sin embargo, la posición del ligando fue alterada (Fig. 33 lado izquierdo). La distancia entre el protón más próximo de la amina alifática cargada y de uno de los oxígenos

Figura 32

Vista del sitio activo del receptor con Asp98 mutado por Asn98. Se muestran los $C\alpha$, C (O), N de las hélices 3, 5 y 7. Con rojo se destaca las cadenas y superficies de van der Waals de los residuos Asp98, Asp186 y Thr190. Con verde se destaca la forma +HN3H

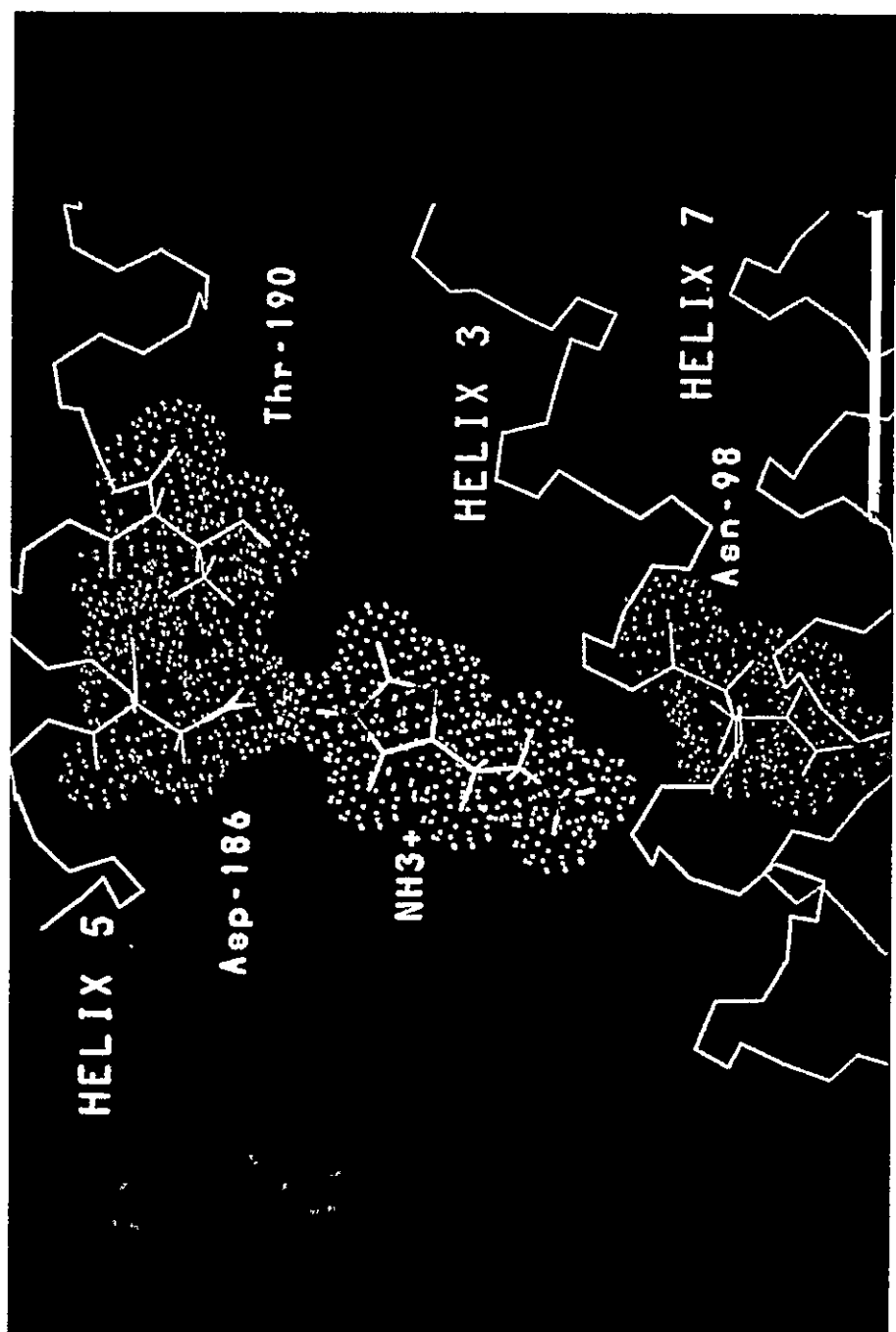
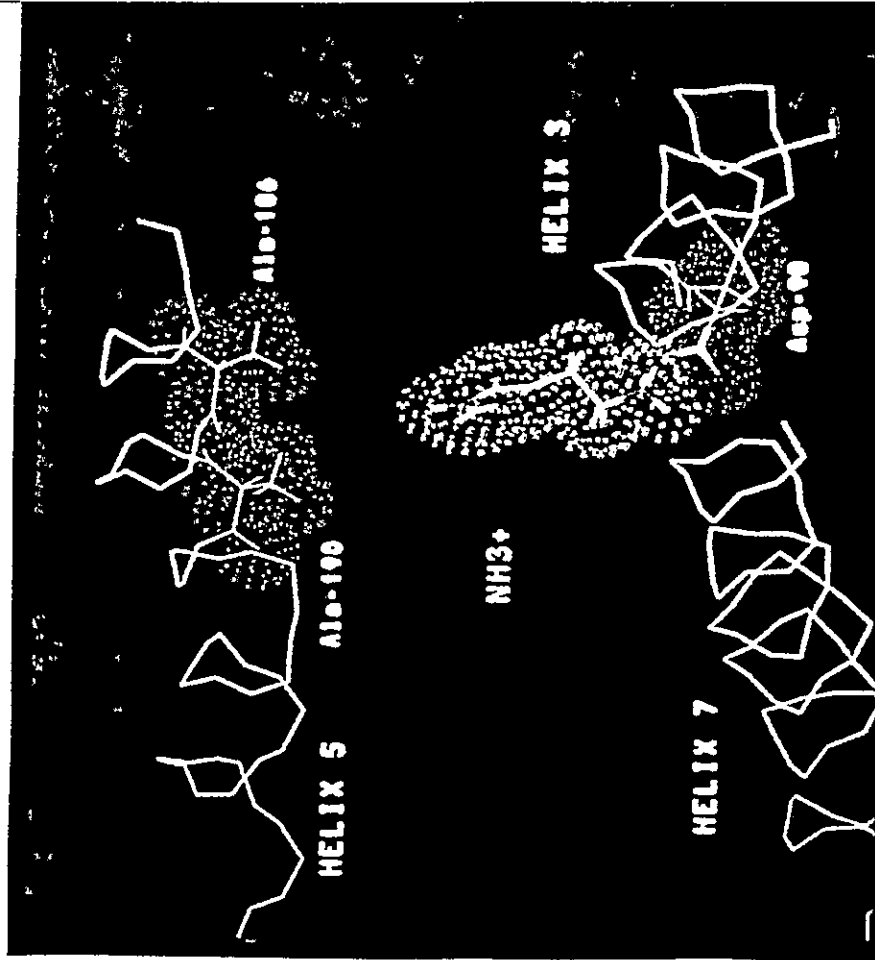
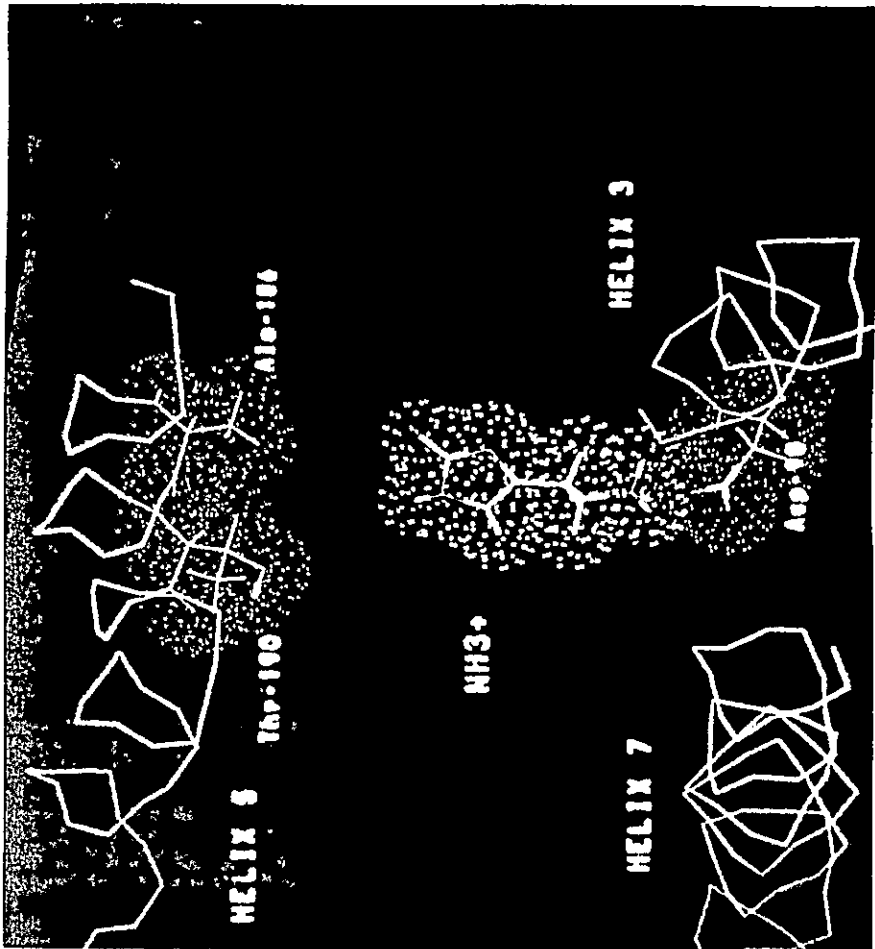


Figura 33

Vista del sitio activo del receptor con Asp 186 mutado por Ala186: lado izquierdo.
Mutación de Asp 186 y Thr 190 por Ala186 y Ala190: lado derecho. Se destacan en rojo las cadenas y superficies de van der Waals de los aminoácidos involucrados en el sitio y con verde la forma +HN3H



carboxílicos del Asp 98 fue de 1,77 Å, mientras que el IM fue encontrado muy lejos de los aminoácidos Ala 186 y Thr 190. En este caso la mutación en la hélice 5 provocó que la interacción con el Asp 98 fuera más fuerte. Los mismos resultados fueron encontrados para la mutación simultánea de Asp 186 por Ala y Thr 190 por Ala (Fig. 33 lado derecho) (Tabla VI).

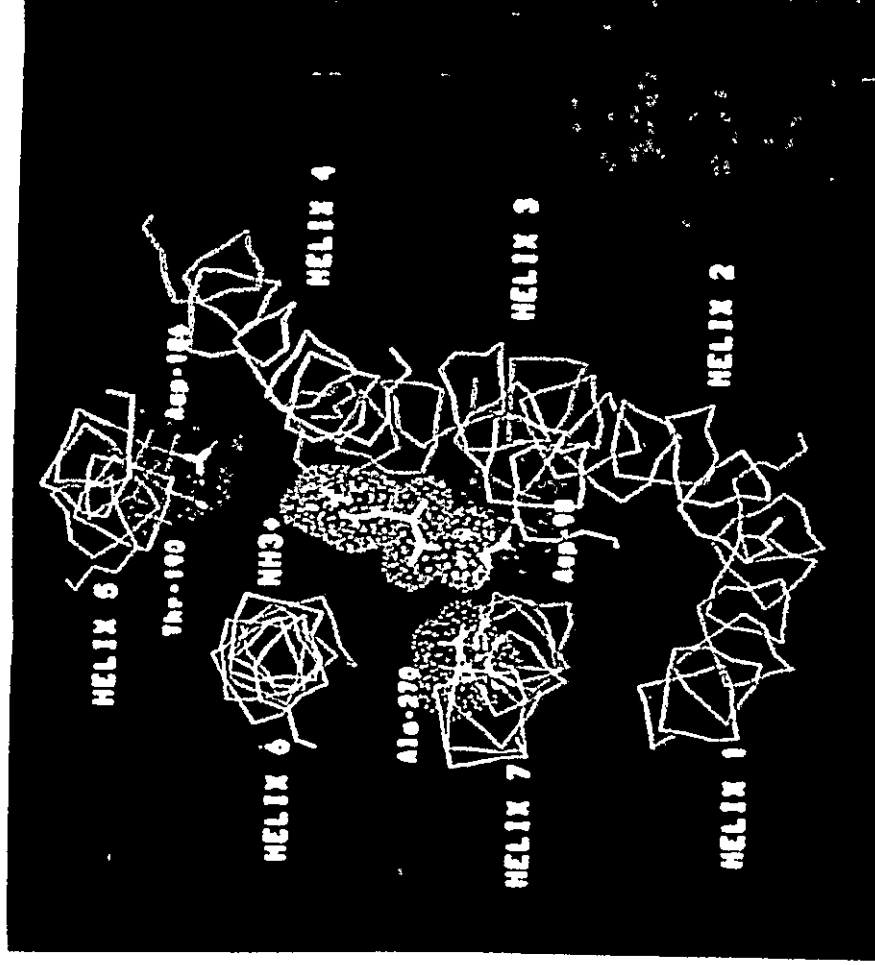
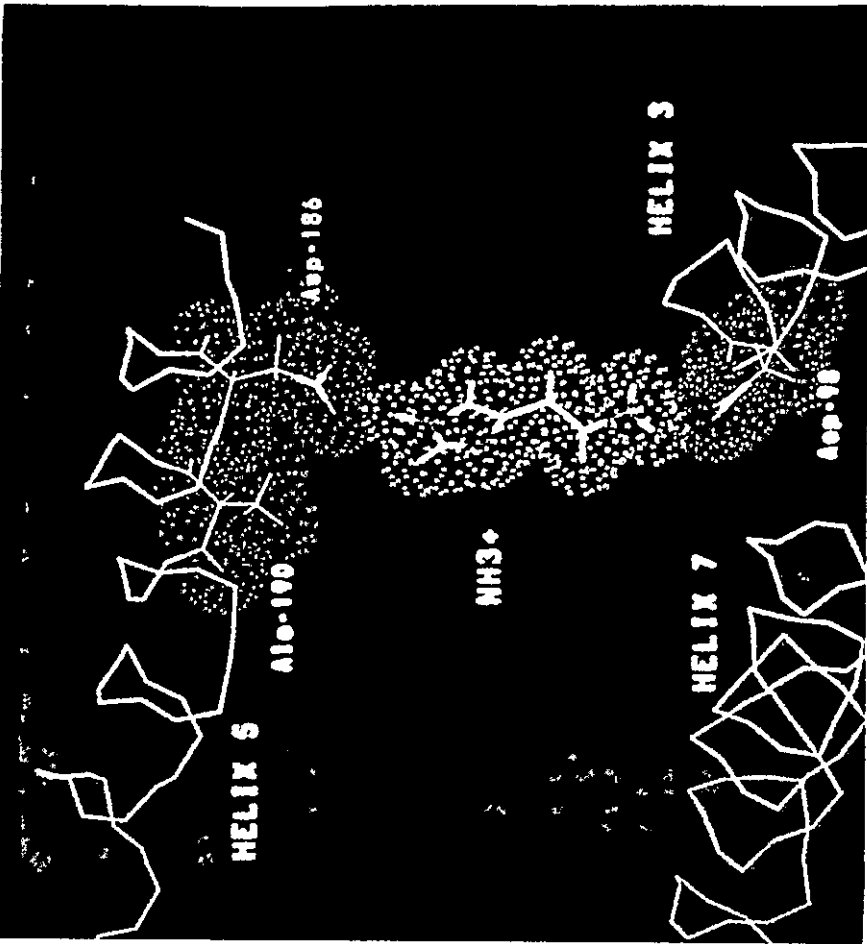
La sola mutación de Thr 190 por Ala tampoco provocó un efecto sobre la energía del complejo mutado con respecto a la del complejo no mutado. Además, la posición del ligando fue muy similar a la que ocupa en el complejo no mutado (Fig. 34 lado izquierdo) (Tabla VI).

Estos resultados están de acuerdo con los datos experimentales, dado que la mutación del Asp 186 solo o con la mutación simultánea de Thr 190, aunque provoca una disminución de la selectividad por los antagonistas H₂, no afecta la capacidad de generar AMPc como respuesta a la unión de histamina. También los resultados obtenidos con la mutación de Thr 190 sola están de perfecto acuerdo con las pruebas experimentales (constante de afinidad) dado que la similitud energética entre los complejos mutado y no mutado indica que este residuo no es importante para el enlazamiento de histamina. Además, los datos de RMS para estas mutaciones fueron similares a los que dio el complejo sin mutar.

Todos estos resultados nos permiten en un primer término corroborar nuestro modelo y determinar certeramente que el Asp 98, de la hélice 3 es, tal como lo indican los resultados experimentales (42), el principal residuo para el reconocimiento de las dos formas tautoméricas +HN3H y +HN1H. Sin embargo, en esta tesis se entregan por primera vez pruebas de que sólo la primera de ellas es la funcionalmente activa. Los estudios de modelación indican también, de acuerdo con los datos experimentales, que los aminoácidos de la hélice 5, Asp 186 y Thr 190, parecieran estar involucrados

Figura 34.

Vista del sitio activo del receptor con Thr190 mutado por Ala190: lado izquierdo. Vista de las 7 hélices del receptor con Glu270 mutado por Ala270: lado derecho. Se destacan los residuos importantes en el sitio activo. Con verde se representa la forma +HN3H



más en el reconocimiento de los antagonistas que en el de la histamina, aunque el Asp 186 podría tener un efecto orientador de la forma activa +HN3H en el sitio de unión.

3.2.3 Predicción de otros aminoácidos involucrados en la acción de la histamina

Los estudios de mutaciones sitio-dirigidas desarrollados por Gantz y otros se basaron en la homología de los receptores H2 con los receptores β -adrenérgicos, lo cual permitió determinar la existencia de tres aminoácidos involucrados en el sitio de reconocimiento.

El estudio detallado del alineamiento de cincuenta secuencias homólogas de los receptores H2 de histamina indicó que sólo los receptores H2 poseen un Glu (270) en la hélice 7. Esta observación no parece haber sido hecha anteriormente en la literatura, y resulta interesante considerar la posición de este residuo en relación con el sitio activo. En el modelo construido por nosotros, el protón del grupo carboxílico del Glu 270 se encuentra a 1,57 Å de uno de los oxígenos del Asp 98 y se ubica hacia el interior del haz de α -hélices del receptor, lo que permite suponerle un papel en la unión de los diversos ligandos.

Para evaluar el posible papel del Glu 270 en la activación del receptor H2, este residuo fue mutado por Ala en el modelo. La forma activa (+HN3H) fue atracada en el receptor mutado y el complejo fue posteriormente minimizado. Un protón de la amina alifática cargada fue localizado a 1,63 Å de uno de los oxígenos del Asp 98 y el protón del "N1" y el "N3" fueron encontrados a 4,89 Å y 7,68 Å de los átomos interactuantes del Asp 186 y la Thr 190 respectivamente (Fig. 34 lado derecho). La diferencia energética entre el receptor y el complejo fue similar a la que se había

encontrado para el complejo no mutado, lo cual indicó que la afinidad fue mantenida. Los datos de RMS, sin embargo, indicaron que el efecto estructural del ligando fue menor (Fig. 35), lo que apoya la hipótesis que este aminoácido es importante en la funcionalidad del receptor (Tabla VI).

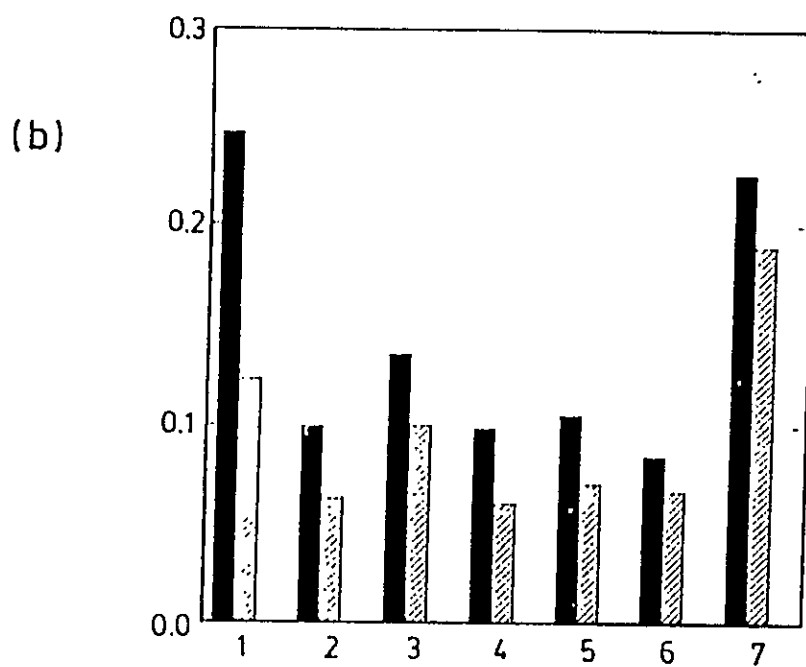
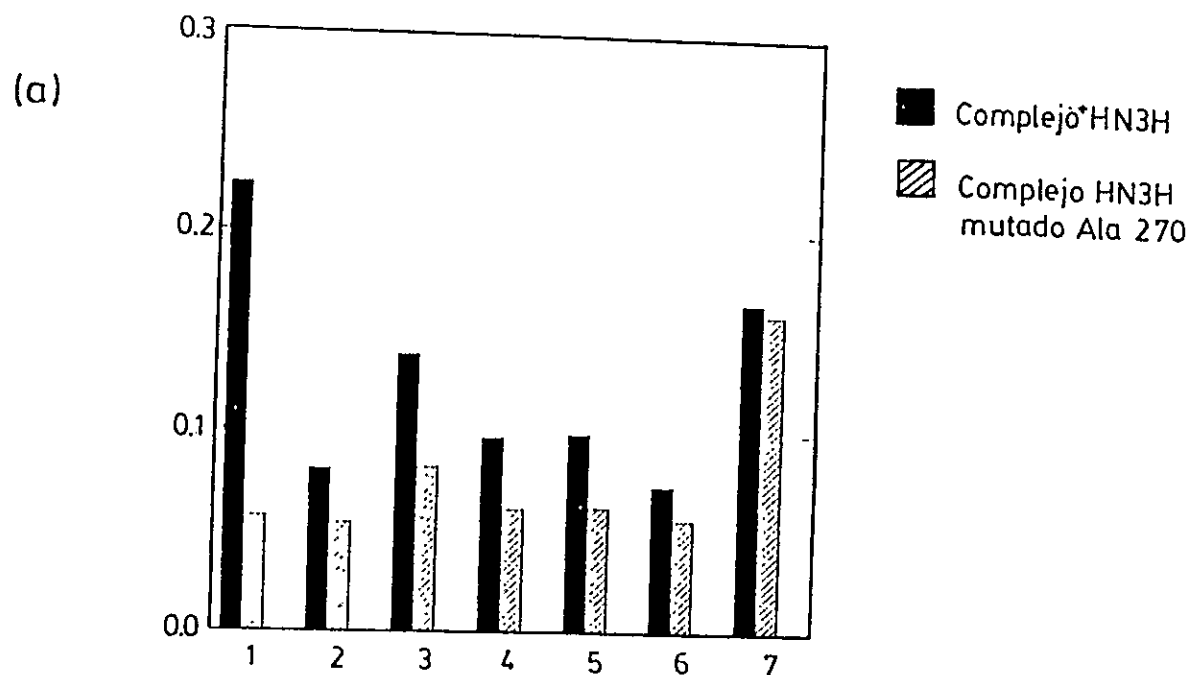
3.2.4 Estudio conformacional en el receptor H2 de histamina

Para obtener todos los resultados anteriores se trabajó con la forma +HN3H extendida, protonada en la cadena, con su energía interna minimizada a través del método PM3. Sin embargo, la hipersuperficie conformacional para esta forma tautomérica presenta otras estructuras con energías no muy diferentes a la de la extendida. Este es el caso de una forma plegada en la cual existe una interacción por puente de hidrógeno entre la amina protonada y el "N1" del IM.

En el capítulo anterior establecimos un mecanismo que permite, sin la intervención de moléculas del entorno, el equilibrio entre las especies conformacionales y tautoméricas de la histamina que podrían interactuar con el receptor. A pesar de que este equilibrio nos da una base racional para postular la forma extendida +HN3H como la candidata más apropiada para la interacción con el receptor, la posibilidad de una interacción fuerte, eventualmente eficaz desde el punto de vista funcional, con la estructura cerrada, no puede ser totalmente descartada.

Con el objeto de estudiar las preferencias conformacionales de la histamina interactuando con el modelo del receptor, la forma plegada +HN3H, en la cual existe un puente de hidrógeno intramolecular entre la función amina alifática protonada y el "N1" del IM, fue atracada en el sitio de reconocimiento del receptor H2 de histamina

Figura 35:



Representación gráfica de los desplazamientos

RMS para la mutación

Glu270. a) Estudio con $C\alpha$ b) Estudio con $C\alpha, C(O), N$

(Fig. 36 lado izquierdo) y posteriormente la energía del complejo fue minimizada. Durante la minimización energética de la estructura del complejo se observó que la estructura de la histamina comenzó a abrirse perdiéndose el enlace de hidrógeno intramolecular hasta adoptar una conformación similar a la de la +HN3H extendida descrita anteriormente (Fig. 36 lado derecho). Dado que en esta tesis se ha propuesto un mecanismo termodinámicamente factible para este cambio conformacional, este hecho induce a pensar que la estructura extendida tendría la conformación óptima para interactuar con el receptor H2 de histamina.

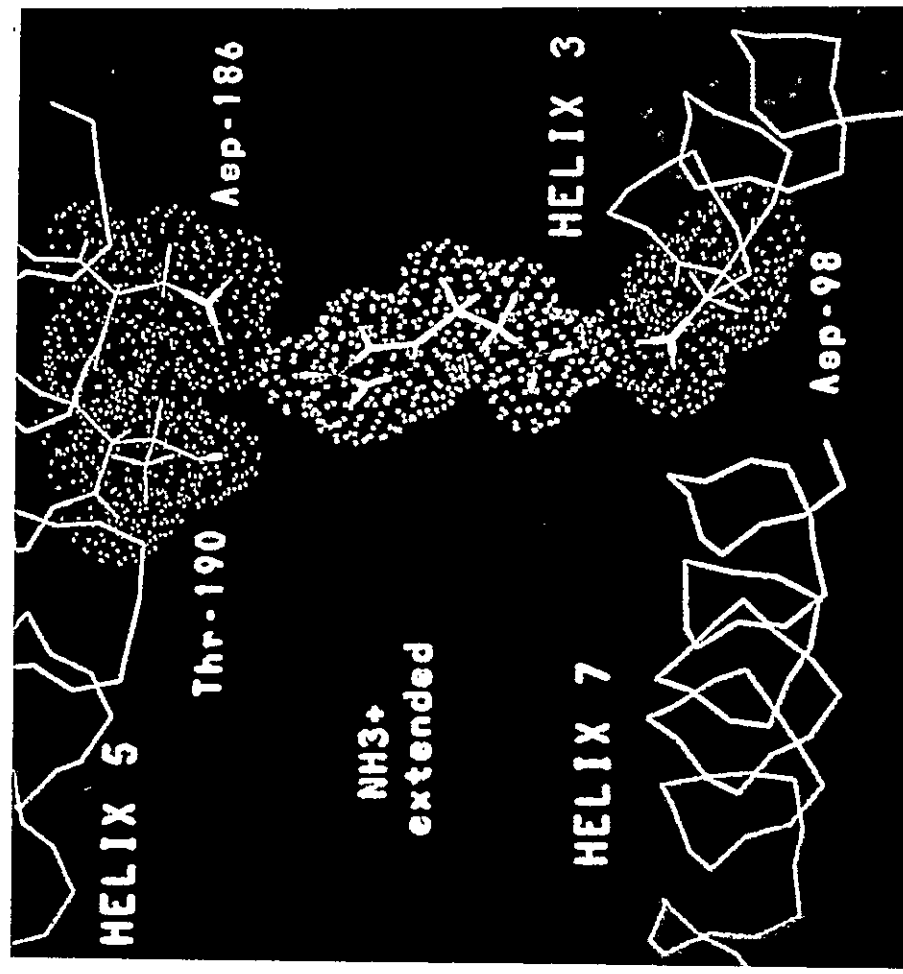
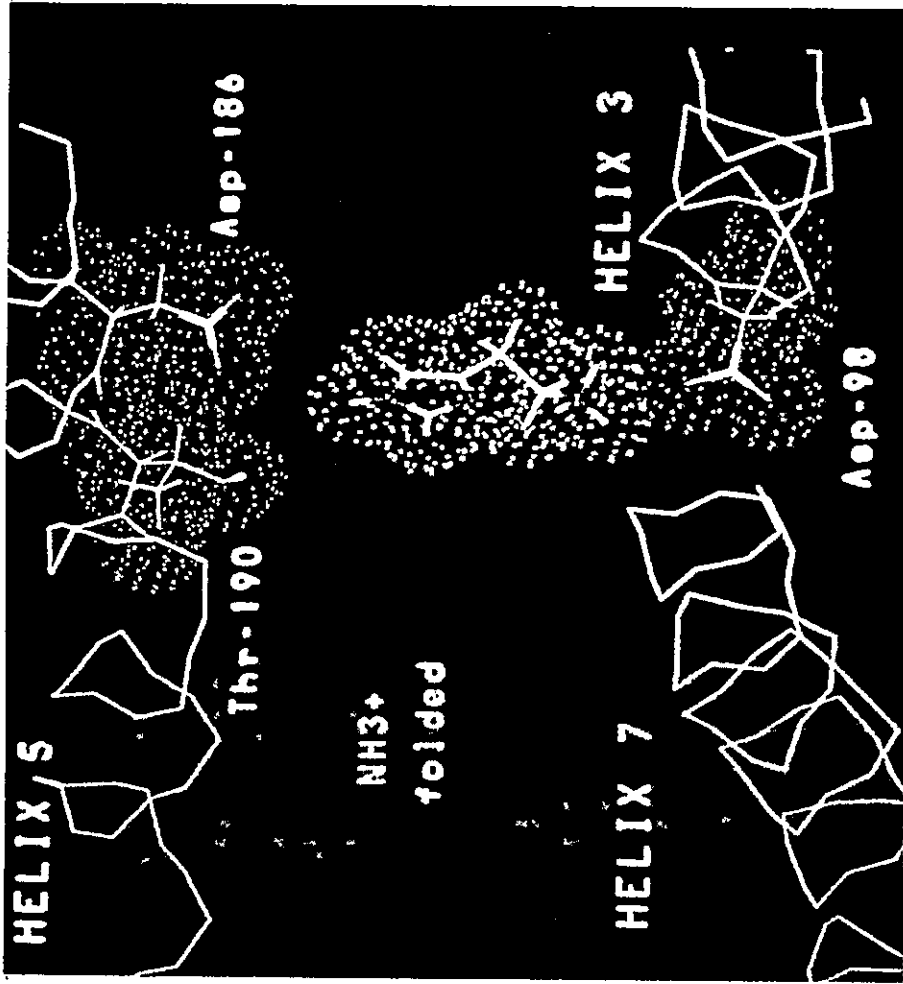
3.2.5 Estudio de las interacciones de algunos antagonistas H2 de histamina con modelos de receptores H2

i) Cimetidina

Estudios conformacionales previos para cimetidina y derivados usando datos cristalográficos (73) y técnicas de RMN han llevado a suponer que la conformación E,Z de la cadena de este fármaco estaría asociada con su actividad como antagonista H2 de histamina. Tomando en cuenta estos resultados, sólo la forma E,Z fue considerada para el estudio de la interacción de esta molécula con el receptor H2 de histamina. La estructura cristalina E,Z, protonada en el anillo, fue minimizada energeticamente con el método PM3 y posteriormente atracada en el interior del sitio activo. Con este objeto, la molécula de cimetidina fue colocada en el modelo del receptor evitando interacciones estéricas con los residuos del interior del sitio. La

Figura 36

Vista del sitio activo del receptor H2 de histamina. Se muestran los $C\alpha, C(O), N$ de las hélices 3, 5 y 7. Se muestran los aminoácidos involucrados en el sitio activo en rojo. Lado izquierdo en verde +HN3H plegada. Lado derecho en verde +HN3H extendida



energía del complejo fue posteriormente minimizada utilizando el mismo protocolo desarrollado para la histamina.

El resultado de la minimización se observa al lado izquierdo de la figura 37. La energía de este complejo fue aproximadamente 20 Kcal/mol menor que la del complejo con la histamina en forma +HN3H extendida. La estabilidad energética de este complejo, al igual que la del complejo con el ligando natural, también es debida a la disminución de la energía coulombica. La distancia entre el protón del "N3" del IM y uno de los oxígenos carboxílicos del Asp 98 fue de 2,19 Å, el nitrógeno del grupo ciano terminal fue localizado a 2,98 Å del protón hidroxílico de la Thr 190, y el hidrógeno del grupo amino de la cadena de la cimetidina fue encontrado a 2,65 Å de uno de los oxígenos del grupo carboxilo del Asp 186. Estos resultados son esquematizados en la figura 38.

La estructura del complejo minimizado fue utilizada como conformación base para la simulación por DM. La estructura obtenida a 20 ps (Fig. 37 lado derecho), resultó ser unas 25 Kcal/mol más estable que el complejo inicial con la forma +HN3H, adoptando la cimetidina una conformación apreciablemente distinta en este caso. El protón del "N3" del IM fue localizado a 2,23 Å de uno de los oxígenos del Asp 98, mientras que el nitrógeno del grupo ciano y el grupo amino se encontraron a 3,92 Å y 3,93 Å de la Thr 190 y el Asp 186 respectivamente (Tabla VI).

Estos resultados indican que las interacciones con los residuos de la hélice 5 serían débiles y éstos posiblemente estarían involucrados sólo en una primera etapa como orientadores de la cimetidina en el interior del sitio de reconocimiento.

Para determinar la importancia de la forma protonada de la cimetidina en su reconocimiento por el receptor H2 de histamina, la estructura cristalina neutra E,Z fue también atracada al modelo del receptor. Los resultados energéticos indicaron que este

Figura 3'7

Vista del sitio activo del complejo de cimetidina con el receptor H2 de histamina . Se muestran los C α ,C(O),N de las hélices 3, 5 y 7. En rojo se destacan los residuos involucrados en el sitio. Lado izquierdo: complejo minimizado. Lado derecho: complejo obtenido por dinámica de 20 ps

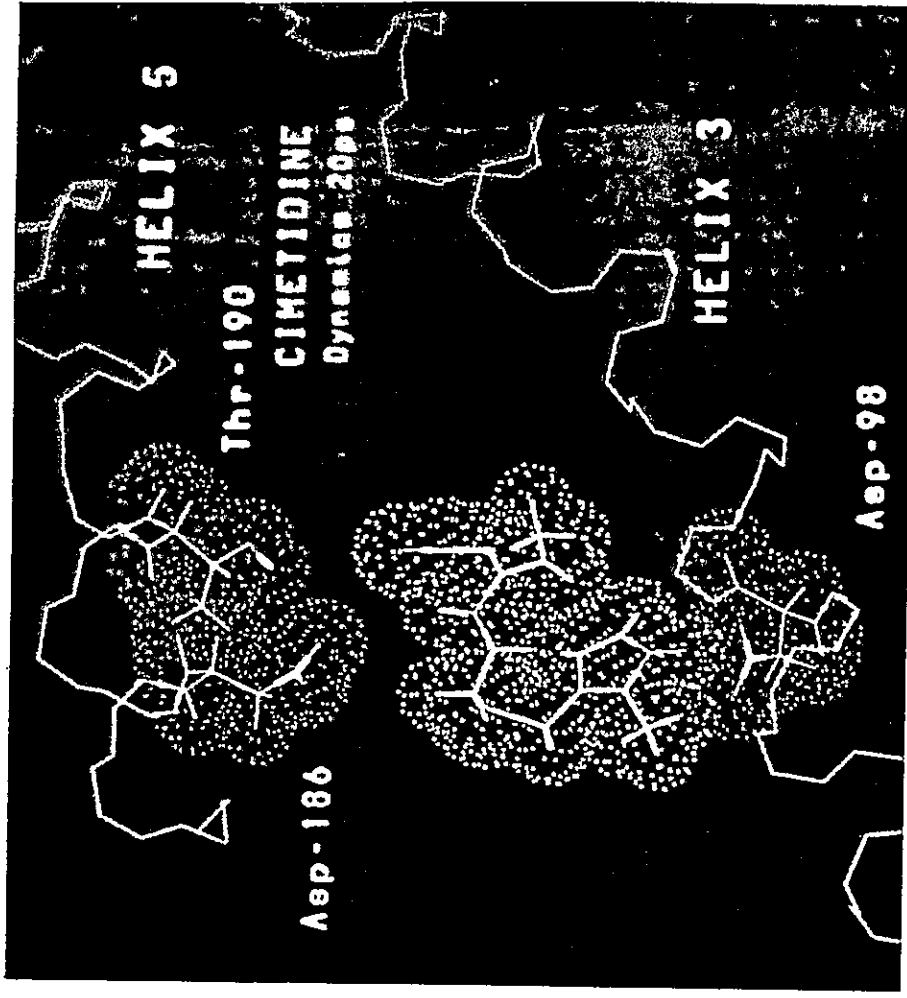
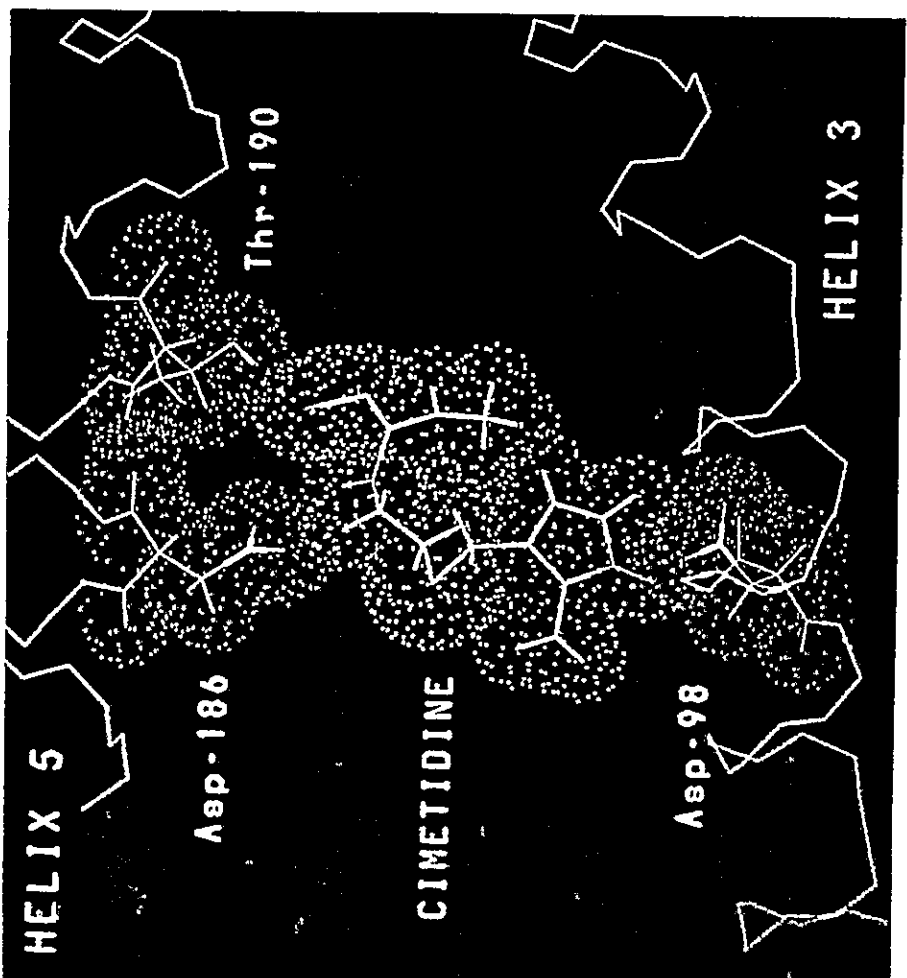
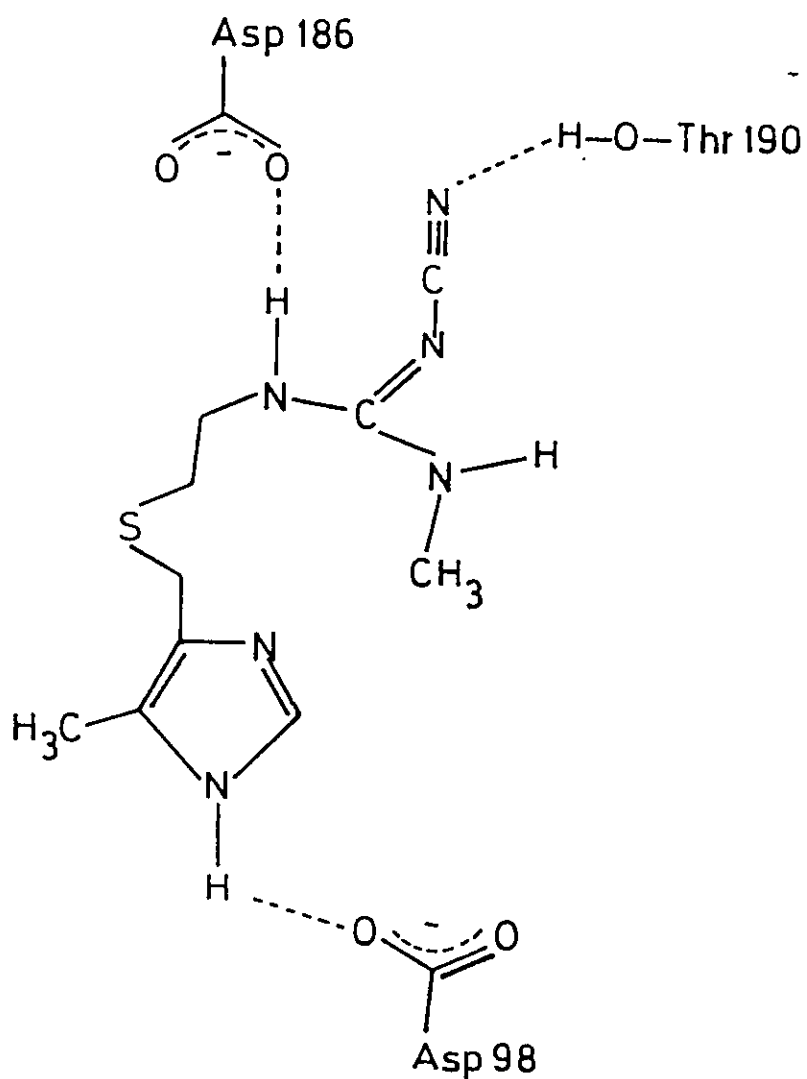


Figura 38



Esquema de interacción del modelo receptor H2 de
histamina con cimetidina

complejo fue 80 Kcal/mol más inestable que el complejo con la forma N_3H^+ de la histamina. Además, la distancia entre el "N3" del IM y uno de los oxígenos del Asp 98 fue de 3,2 Å, ratificando la importancia de una forma cargada de la molécula de fármaco para su óptima interacción con el receptor H2.

ii) Ranitidina

La estructura cristalina de la ranitidina protonada en la porción dimetilamínica (74) fue minimizada energéticamente por el método PM3. Esta estructura fue atracada al modelo del receptor y posteriormente sometida a una minimización.

El complejo minimizado (Fig. 39, lado izquierdo) fue 35 Kcal/mol más estable que el complejo con la forma $+HN_3H$ de la histamina. El hidrógeno del grupo dimetilamino protonado se encontró a 1,88 Å de uno de los oxígenos del Asp 98. Sin embargo, el grupo NH_2 así como el grupo NO_2 de la cadena fueron encontrados a 4,31 Å y 6,54 Å de los átomos interactuantes del Asp 186 y la Thr 190 respectivamente. Estos resultados son esquematizados en la figura 40. Esta estructura fue la utilizada como punto de partida para realizar la dinámica, obteniéndose un complejo estable a los 20 ps (Fig. 39, lado derecho) el cual fue 44 Kcal/mol más estable que el complejo con el agonista endógeno. Sin embargo, en esta estructura, al igual que en la minimizada, sólo se observó una interacción entre el grupo dimetilamino cargado y el Asp 98. La cadena más larga no presentó ninguna interacción aparente con los residuos de la hélice 5 (Tabla VI).

Resulta extraño no encontrar alguna interacción aunque fuera débil entre la cadena polar (que contiene el grupo nitro) y los residuos de la hélice 5. Esto es debido a que

Figura 39

Vista del sitio activo del complejo de ranitidina con el receptor H2 de histamina . Se muestran los C α ,C(O),N de las hélices 3, 5 y 7. En rojo se destacan los residuos involucrados en el sitio. Lado izquierdo: complejo minimizado. Lado derecho: complejo obtenido por dinámica de 20 ps

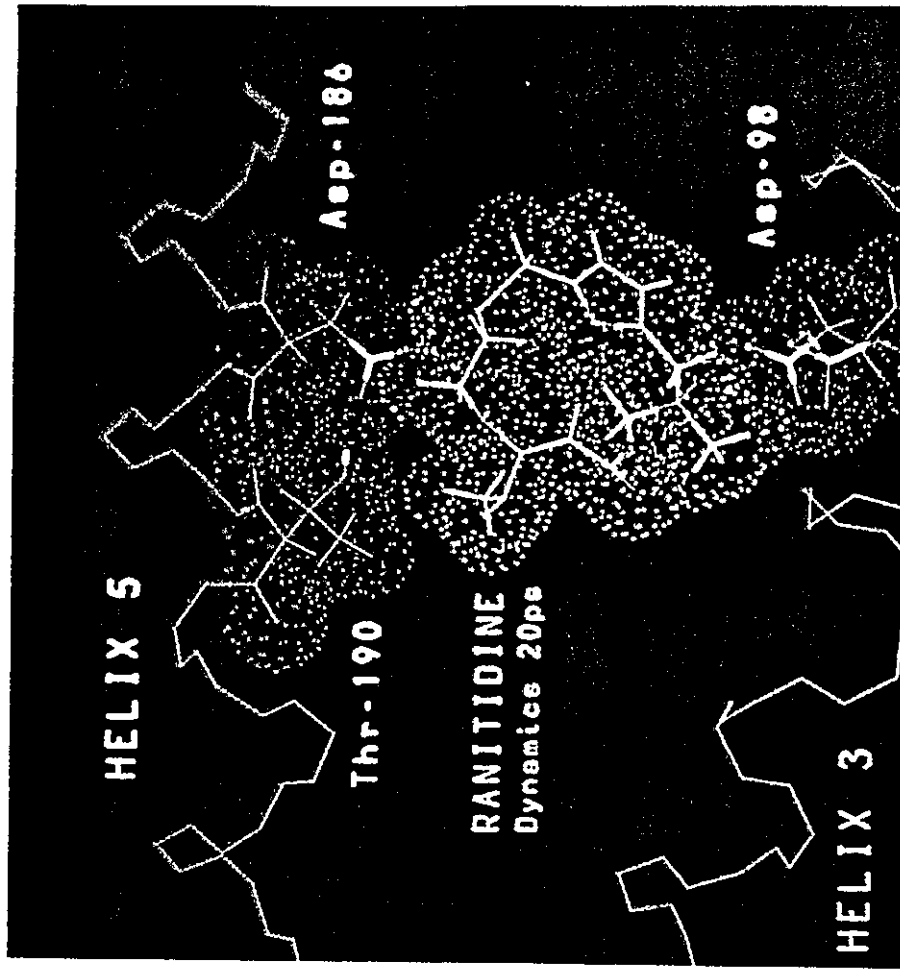
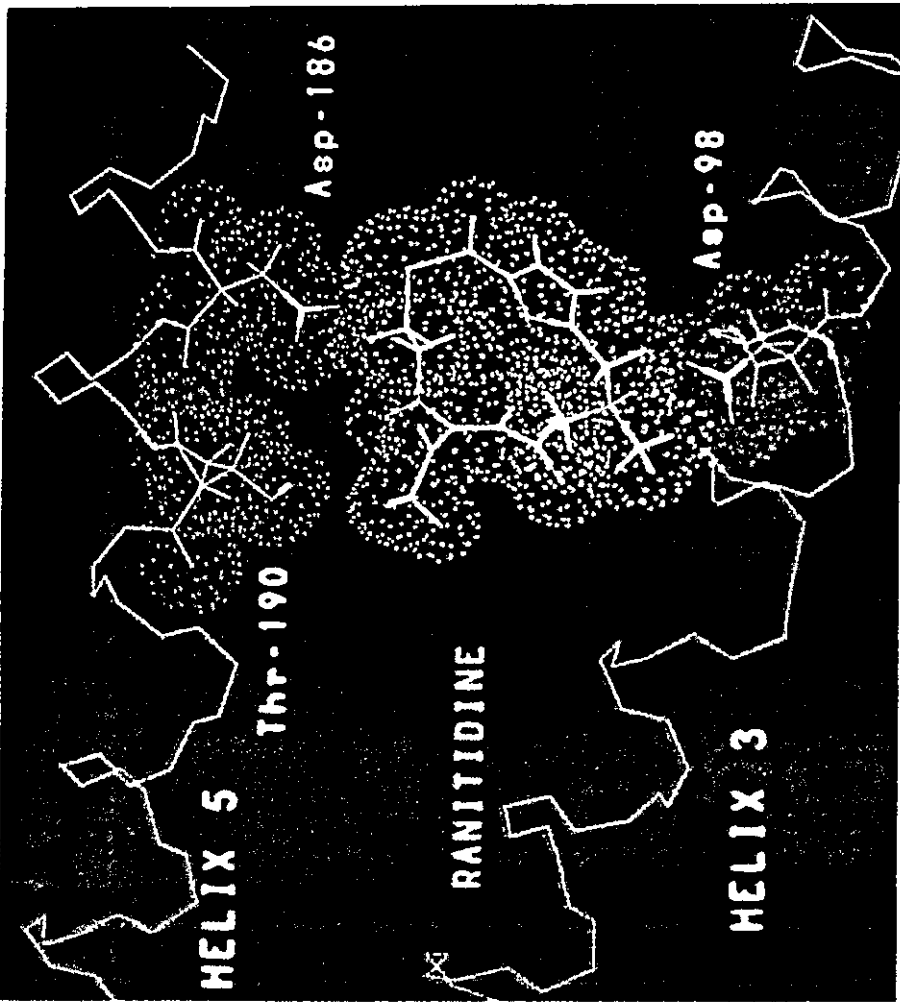
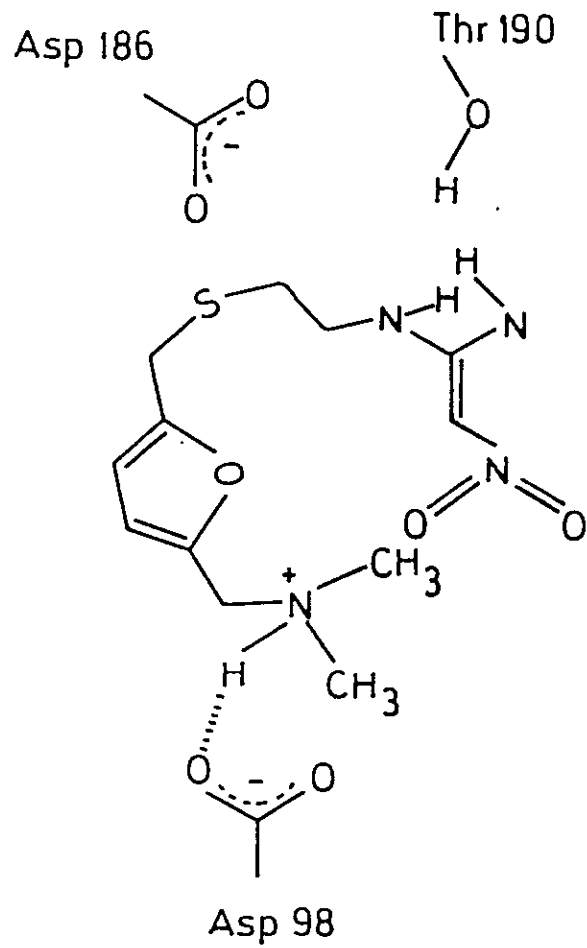


Figura 40

Esquema de interacción del modelo de receptor H2
de histamina con ranitidina

el programa INSIGHT II no posee un campo de fuerzas que pueda representar el grupo NO_2 de la cadena.

iii) Famotidina

La estructura cristalina de la famotidina, protonada en el grupo guanidínico (63), fue minimizada energéticamente por el método PM3. Al igual que los resultados obtenidos por cálculos en la sección anterior, la estructura minimizada a partir de datos cristalográficos muestra una fuerte interacción por puente de hidrógeno entre el nitrógeno tiazólico y uno de los nitrógenos guanidínicos. Esta estructura fue atracada al sitio activo en una orientación que parecía ser la óptima para la interacción con los residuos importantes de la hélices 3 y 5.

La energía del complejo minimizado (Fig. 41, lado izquierdo) fue 90 Kcal/mol menor que la del complejo con la forma $+\text{HN}_3\text{H}$ de la histamina, debiendo su estabilidad a una fuerte disminución de la energía coulombica al igual que en los casos anteriores. La posición de la molécula de famotidina varió durante la minimización, obteniéndose una interacción entre la cadena guanidínica y el grupo carboxilo del Asp 98 con una distancia mínima N-HO de 2,05 Å. Además se observó una interacción entre el grupo NH_2 sulfonamídico con el Asp 186 a una distancia N-HO de 2,41 Å y una interacción entre un oxígeno del grupo SO_2 y el hidrógeno hidroxílico de la Thr 190, separados por una distancia de 1,45 Å. Estos resultados son esquematizados en la figura 42 (Tabla VI).

Para alcanzar una óptima interacción de la famotidina con el sitio de reconocimiento, fue necesario que el puente por hidrógeno intramolecular entre los

Figura 41

Vista del sitio activo del complejo famotidina con el receptor H2 de histamina. Se muestran los C α ,C(O),N de las hélices 3, 5 y 7. En rojo se destacan los residuos involucrados en el sitio. Lado izquierdo: complejo minimizado. Lado: derecho complejo obtenido por dinámica de 20 ps.

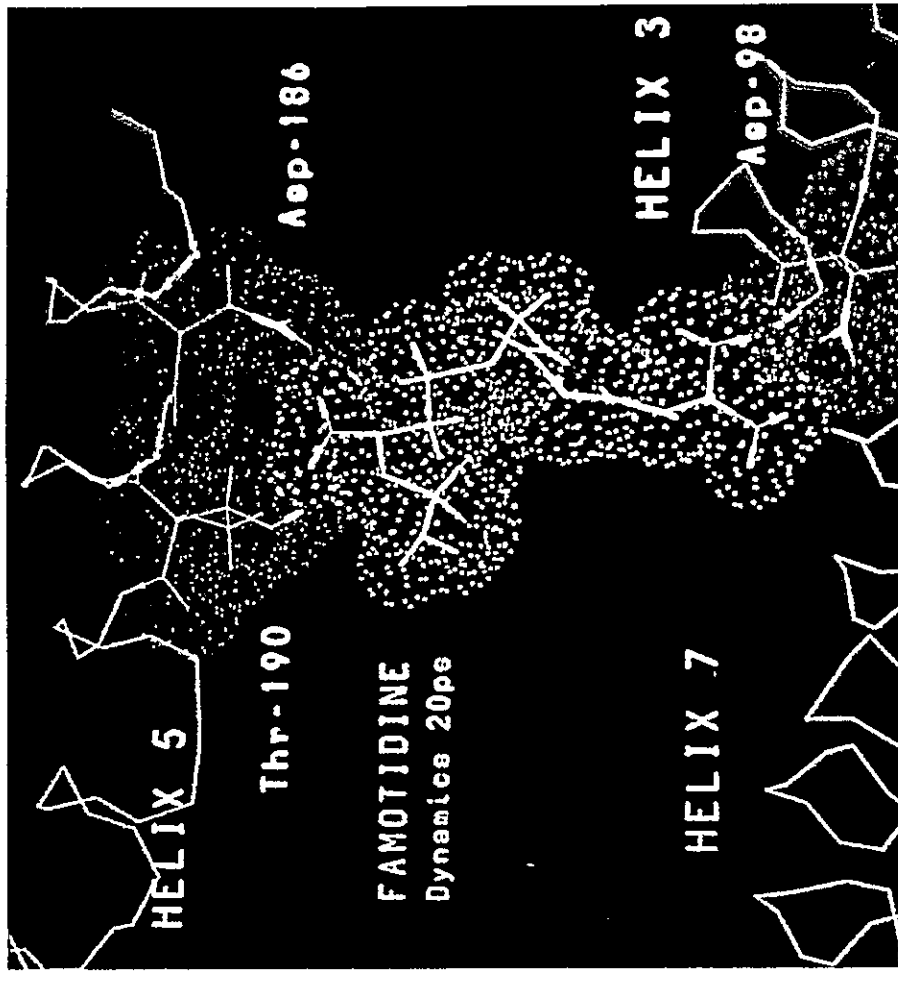
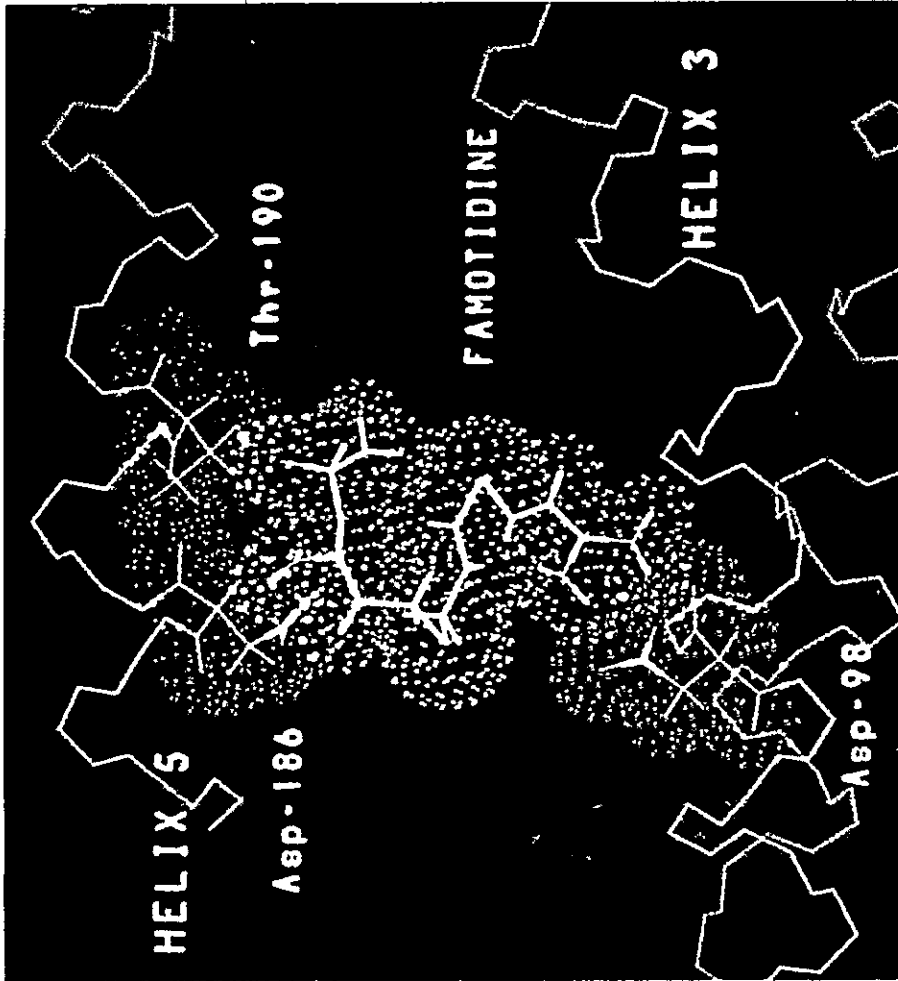
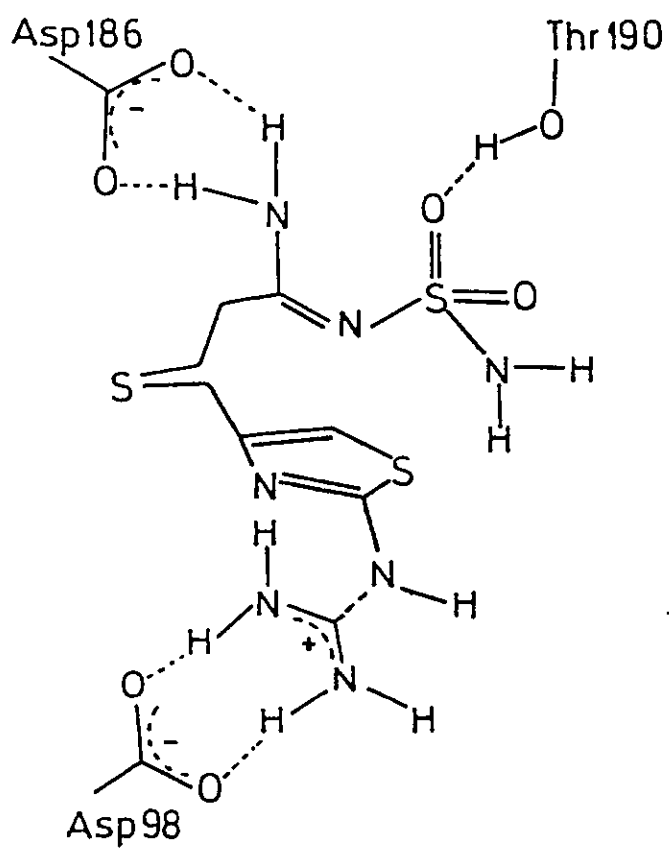


Figura 42



Esquema de interacción del modelo de receptor H2
de histamina con famotidina

nitrógenos tiazólico y guanidínico se rompiera, rotando la cadena guanídínica de tal forma que este grupo pudiera aproximarse mucho más al grupo carboxilo del Asp 98, maximizando así la interacción electrostática entre estos grupos.

El complejo minimizado fue la estructura de partida para el estudio de la simulación dinámica. De todas las estructuras promedio obtenidas en el intervalo de 20 ps, la última resultó ser 30 Kcal/mol (Fig. 41 lado derecho) más estable que la estructura minimizada. En este caso, la estructura de la famotidina no presentó el puente por hidrógeno intramolecular, pero ahora la distancia entre el grupo guanidínico y el grupo carboxilo del Asp 98 fue de 1,89 Å. También se observó la pérdida de la interacción entre el oxígeno del grupo SO₂ y el protón de la Thr 190, observándose un plegamiento de esta parte de la cadena, con lo cual la distancia correspondiente en este caso fue de 4,59 Å (Tabla VI). De acuerdo a nuestros datos teóricos obtenidos para los posibles grados de libertad de las rotaciones en esta cadena, todos ellos indicaron que las especies plegadas y las extendidas pueden coexistir. La diferencia energética de solo 30 Kcal/mol entre el complejo obtenido por DM y el de minimización nos indicaría que la interacción a través del grupo SO₂ es débil.

Sin embargo, en esta estructura el NH₂ sulfonamídico estaría interactuando simultáneamente con el grupo carboxílico del Asp 186 y el protón hidroxílico de la Thr 190 a distancias mínimas de 1,96 Å y 2,08 Å respectivamente. Esta doble interacción no es sorprendente, considerando los datos de afinidades protónicas obtenidos para la famotidina, los cuales indican que este grupo amino es el menos básico de todos los nitrógenos de esta molécula.

Los estudios de RMS tanto para los C α como para la cadena principal, para los complejos minimizados con todos los antagonistas así como para los modelos obtenidos a partir de la simulación dinámica, indicaron que en todos los casos se da un

patrón similar de perturbación al que produce la histamina, con la excepción de la perturbación de la hélice 6, la cual no es afectada por el agonista endógeno. Esta perturbación no sería debida a un efecto de la posición del antagonista, debido a que a pesar del mayor tamaño que presentan estas moléculas, afectaron en igual magnitud las mismas hélices que perturba el agonista, de mucho menor tamaño.

Finalmente, los datos de RMS para los antagonistas nos permiten establecer: 1) que ellos ocupan el mismo espacio de enlazamiento que el agonista y 2) los antagonistas perturban además el segmento transmembranal 6, el cual aparece invariante en la interacción con el agonista.

Los datos energéticos para todos los antagonistas H₂ de histamina estudiados están de acuerdo con la característica que debe poseer en general un buen antagonista que es la de ser más afín por el sitio del receptor que el agonista endógeno. Además el orden de las constantes de afinidad experimentales se relaciona perfectamente con el orden de estabilidades relativas calculadas para los complejos antagonista-receptor H₂ a través del trabajo de modelación. Es así como para el caso de la famotidina, que posee un constante de afinidad muy pequeña (y por lo tanto, una afinidad muy grande) el complejo fue 115 Kcal/mol más estable que el de la histamina en su forma activa (+HN₃H).

La principal interacción entre los antagonistas y el sitio de reconocimiento fue, al igual que para la histamina, la atracción electrostática entre el Asp 98 y un grupo cargado positivamente. Este resultado indicaría que el grupo guanidínico protonado de la famotidina, el grupo dimetilamino protonado de la ranitidina y el catión del anillo imidazólico de la cimetidina serían bioisómeros de la amina alifática cargada de la histamina. Esta aseveración ha sido utilizada para establecer modelos de interacción teóricos para los receptores H₂ y algunos antagonistas H₂ de histamina (43).

La interacción entre la cadena polar de los antagonistas estudiados y la hélice 5 indicaría que los residuos de Asp 186 y Thr 190 estarían involucrados principalmente en la acción de los antagonistas y no en la del agonista endógeno. Para la cimetidina esta interacción fue débil, aunque permitió la orientación del antagonista en el interior del sitio de reconocimiento. Sin embargo, para la famotidina la interacción entre el NH_2 sulfonamídico y los residuos Asp 186 y Thr 190 es fuerte a pesar de que la interacción entre un oxígeno del SO_2 y el protón de la Thr 190 ya no aparezca en el complejo obtenido por simulación dinámica.

3.3 Conclusiones de la parte de Modelación Molecular.

- Los resultados para las energías potenciales de los complejos entre las diversas formas de la histamina y el receptor H2 indicaron que tanto la forma +HN3H como la forma +HN1H poseen igual afinidad por éstos. Sin embargo, sólo la forma +HN3H provoca cambios estructurales en el mismo.

- Los estudios de mutación de residuos aminoacídicos indicaron que, de acuerdo con los resultados de trabajos experimentales, el Asp 98 en la hélice 3 es el principal residuo para el reconocimiento y acción de la histamina.

- En esta tesis se postula por primera vez que el Glu 270 en la hélice 7 podría ser importante para la actividad de los receptores H2.

- El puente por hidrógeno intramolecular en la histamina, en la conformación plegada de la forma +HN3H, se rompería para alcanzar la mejor interacción con el receptor H2, adoptando una conformación extendida semejante a la que predicen los cálculos teóricos descritos en esta tesis.

- La parte guanídínica de la famotidina, el catión imidazolio de la cimetidina, así como también el catión dimetilamonio de la ranitidina resultaron ser bioisómeros del grupo amino alifático de la histamina.

- Los cálculos de perturbación de las hélices del receptor H2 (RMS, especialmente en el dominio transmembranar 6) indicaron que estos antagonistas provocan cambios estructurales distintos a los que produce la histamina (principalmente en las hélices 1, 3 y 7).

- El orden de las energías potenciales calculadas para los complejos del receptor con los antagonistas estudiados está de acuerdo con el orden de las constantes de afinidad determinadas de manera experimental, encontrándose las potencias en la secuencia famotidina > ranitidina > cimetidina.

- Para la famotidina, el puente de hidrógeno entre el anillo tiazólico y la cadena guanidínica se pierde para generar un conformero que permite la mejor interacción con la cadena guanidínica y el Asp 98 en la hélice 3. Además existe una interacción entre el grupo amino de la cadena de sulfamoiamidina con el Asp 186 y una interacción débil entre el oxígeno sulfónico y la Thr 190.

CAPITULO 4

4.0 Análisis del mecanismo de transferencia protónica intramolecular en el modelo del receptor H2 de histamina.

Los resultados expuestos en el capítulo 2 permitieron formular un mecanismo para describir el equilibrio tautomérico de la histamina en agua. Este mecanismo propone una transferencia protónica intramolecular entre el "N1" de la histamina protonada en el anillo y el N12 de la amina alifática.

En el capítulo 3 se obtuvo un modelo tridimensional para representar el receptor H2 de histamina, que permitió explicar la actividad y selectividad de estos receptores frente a los agonistas y antagonistas de histamina.

Dado que la metodología de la mecánica molecular no puede dar cuenta de la formación de enlaces, el estudio *in situ* de la transferencia protónica intramolecular en el modelo obtenido resulta imposible.

Para poder aunar los alcances obtenidos por esta metodología y por métodos mecano-cuánticos y con estos antecedentes estudiar el mecanismo de transferencia protónica, se construyó un modelo teórico del receptor H2 en cual los Asp 98 de la hélice 3 y Asp 186 de la hélice 5 fueron modelados por aniones formiato y la Thr 190 por isopropanol.

Las distancias y posiciones iniciales de los aniones formiato y el isopropanol fueron aproximadamente las mismas que se obtuvieron en el modelo del receptor H2 para los correspondientes aminoácidos. Estos sitios fueron optimizados a través de la metodología PM3, conservando las distancias entre la histamina y los residuos del sitio

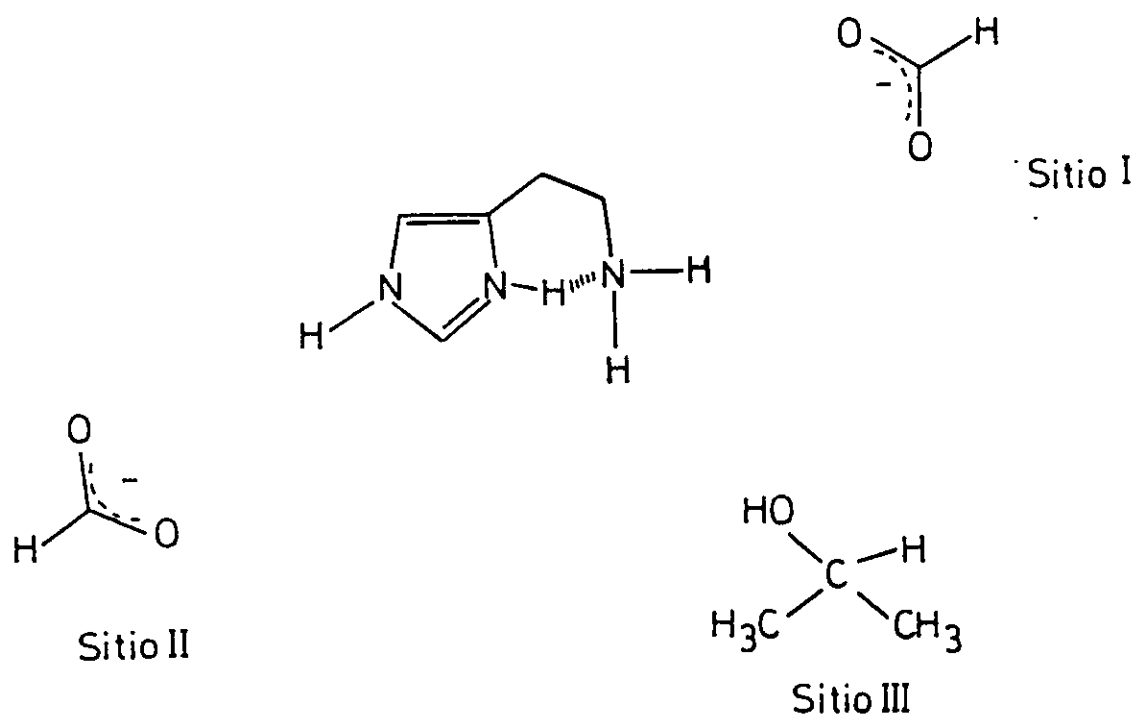
activo obtenidos por mecánica molecular, lo que se puede observar en el esquema de la Fig. 43.

Siguiendo la estrategia utilizada en el capítulo 2, la transferencia protónica intramolecular en histamina monoprotónada se estudió mediante el método PM3, para evaluar la confiabilidad del método CNDO/2. Este proceso se realizó acercando el protón desde el "N1" del anillo hacia el N12 de la cadena, optimizando las distancias y ángulos de enlace, así como los diedros de la histamina para cada punto.

Los resultados de la transferencia protónica se muestran en la figura 44. Se observan dos mínimos de energía ubicados a distancias "N1"-H de 1.1 y 1.9 Å correspondientes a las formas HAH⁺ plegada y +HN3H plegada respectivamente, siendo esta última 10.6 Kcal/mol más estable. La altura de la barrera para el traspaso del protón desde el "N1" al N12 fue de solamente 5.5 Kcal/mol; este valor indica que la presencia de los sitios baja la barrera en 7 Kcal/mol aproximadamente respecto del sistema aislado. Concomitantemente, la posición de los mínimos se invierte. Se puede notar que la presencia de los sitios produce un campo eléctrico sobre la histamina, similar a aquél producido por un medio polarizable (solución acuosa). Por otra parte, en el capítulo anterior se mostró que el sitio activo del modelo del receptor H2, contenía residuos aminoacídicos cargados, lo que indica que esa zona se encuentra inmersa en un campo eléctrico semejante al producido por la polaridad del solvente mostrada en el capítulo 2.

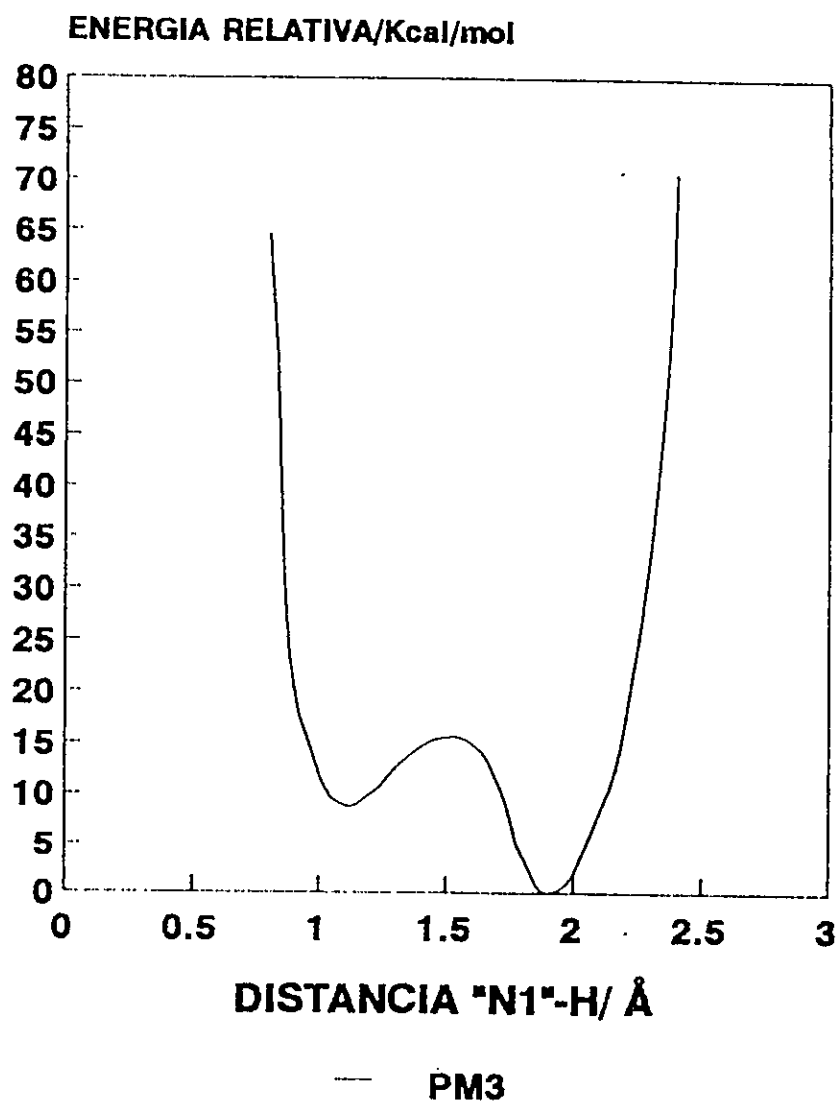
Tomando en cuenta los considerandos anteriores, se construyó el modelo molecular histamina-receptor H2, agrendando la existencia de los sitios, la presencia de un medio polarizable, a través del esquema de cálculo CNDO/2-RF.

La transferencia protónica intramolecular de histamina portónada en este modelo se muestra en la figura 45. Como es habitual y como referencia la figura muestra también

Figura 4.3

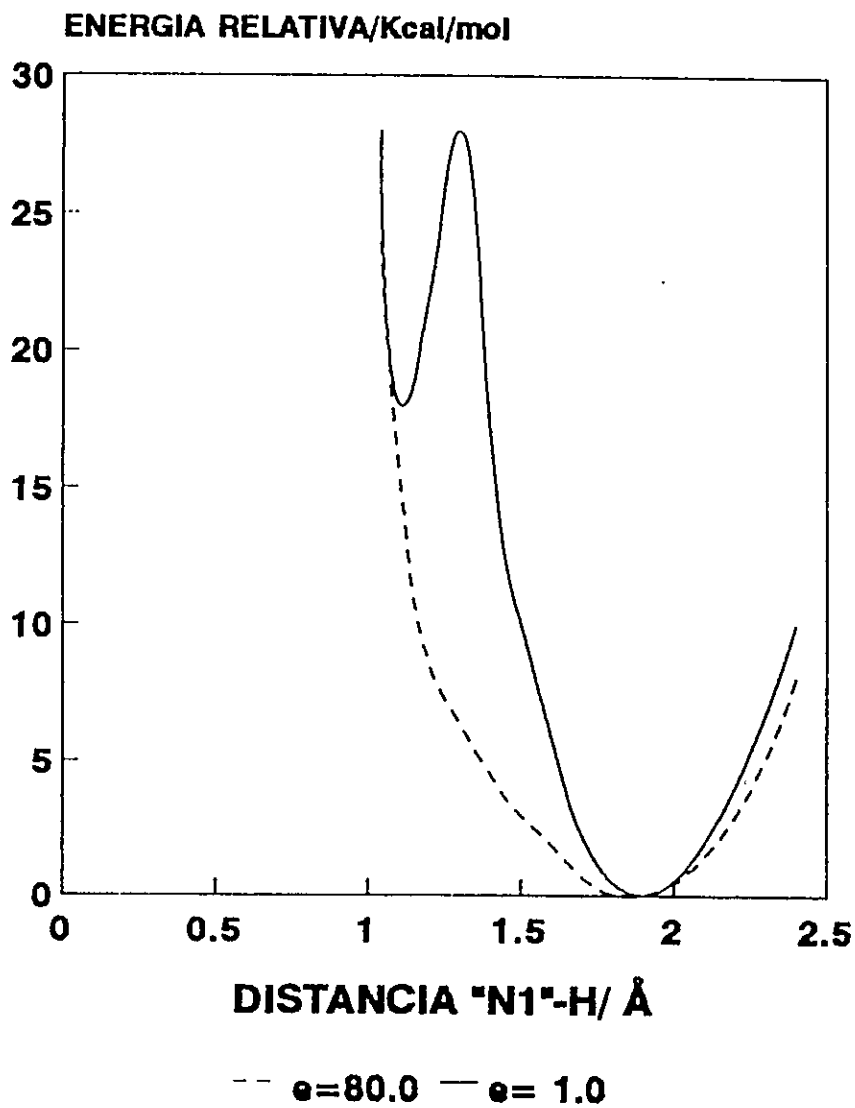
Esquema de la transferencia protónica de la histamina
en presencia de los sitios que representan los aminoácidos del
modelo de receptor H₂ de histamina

Figura 44



Curva de energía transferencia protónica para la histamina en presencia de los sitios que representan los residuos importantes en el modelo de receptor H2 de histamina, obtenida por el método PM3

Figura 45



Curvas de energía de transferencia protónica para la histamina en presencia de los sitios que representan los residuos importantes en el modelo de receptor H2 de histamina, obtenidas por el método CNDO/2-RF con $\epsilon=1.0$ y $\epsilon=80.0$

el proceso en presencia sólo de los sitios externos.

El análisis de la figura 45 muestra a) que la curva obtenida por la metodología CNDO/2 para $\epsilon = 1.0$ presenta la misma tendencia de la curva de transferencia protónica PM3 b) en presencia del campo eléctrico a $\epsilon = 80.0$ desaparece la forma HAH+. Además, se estudió la variación del ángulo α para la especie +HN3H en este modelo, concluyendo que el conformero extendido es 30 Kcal/mol más estable que la forma plegada ($\alpha \approx 60^\circ$).

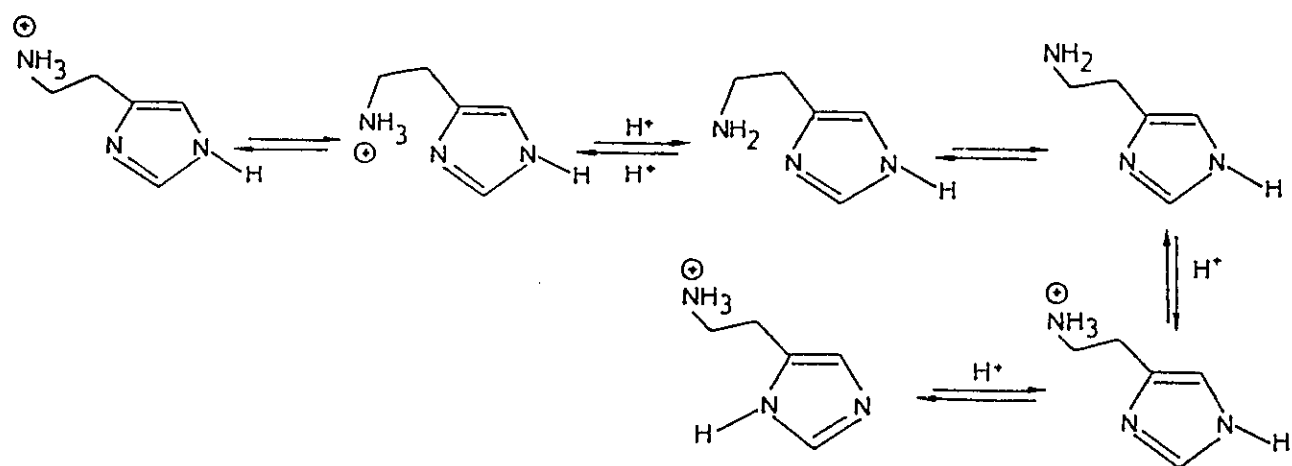
Finalmente, en el esquema de la figura 46 se presenta un mecanismo que describe el equilibrio tautomérico de la histamina protonada en este modelo. Parece necesario destacar que la forma HAH+ está necesariamente ausente en este esquema, debido a que no existe en estado estacionario.

Este modelo teórico del receptor H2 sería más confiable que el elaborado por el grupo de Giraldo (43), dado que:

- a) el modelo de estos autores simula la Thr 190 mediante un ión amonio, de propiedades cuantitativamente alejadas de los de un alcohol.
- b) la construcción del modelo teórico establecido en esta tesis fue complementada con los resultados obtenidos a partir del modelo tridimensional del receptor H2 de histamina, optimizados por mecánica molecular.

El conjunto de todos los resultados obtenidos, utilizando metodologías mecano-cuántica y de mecánica molecular, permite postular de manera más concluyente que la transferencia protónica intramolecular sería uno de los factores importantes para la activación de los receptores H2 de histamina.

Con el objeto de evaluar la importancia relativa de la transferencia protónica intramolecular, se estudió este proceso en la presencia de los sitios propuestos por Weinstein (29,30).

Figura 46

Mecanismo de equilibrio de especies propuesto para la histamina en presencia de los sitios y de solvente

4.1 Estudio de la transferencia protónica intramolecular en el modelo de Weinstein.

El modelo molecular de Weinstein es similar al esquema presentado en la figura 47, donde la estructura de la histamina protonada +HN3H extendida está enlazada al sitio I que corresponde a un ión hidróxilo, el sitio II es amoníaco y el sitio III es el ión amonio. El mecanismo propuesto por Weinstein consiste en la entrega de un protón del ión amonio del sitio III al nitrógeno imidazólico "N1" seguido de la entrega de un protón desde el "N3" del anillo imidazol al amoníaco del sitio II.

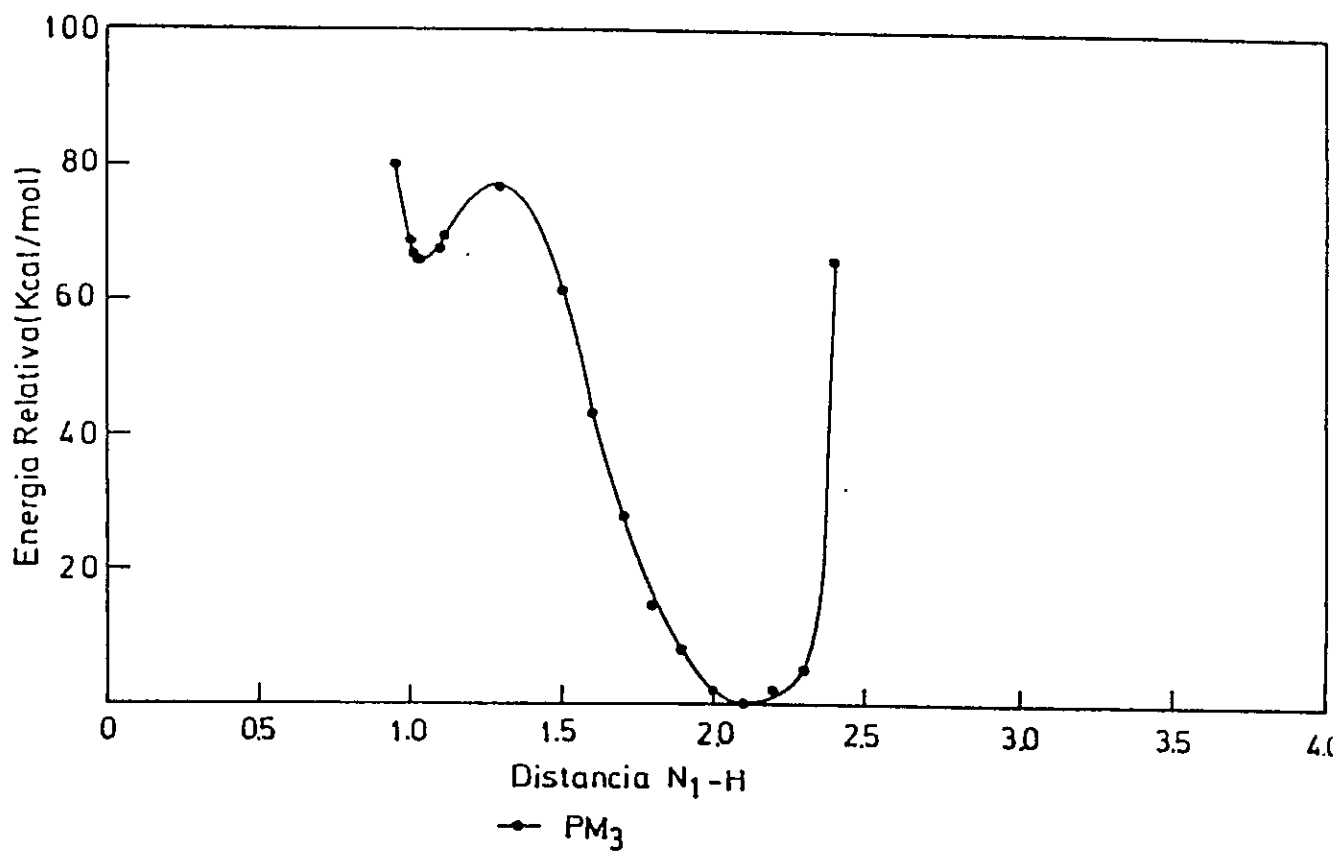
El mecanismo propuesto en esta tesis para la transferencia protónica intramolecular en solución acuosa ha sido aplicado al modelo de residuos propuesto por Weinstein.

La topografía y geometría de los sitios I, II y III, modelados con un anión hidroxilo, una molécula de amoníaco y un catión amonio, respectivamente, fueron las mismas utilizadas en el modelo descrito por estos autores. Posteriormente la histamina en su forma HAH+ plegada fue insertada entre estos sitios de manera que las distancias entre los átomos de la histamina y los átomos de los sitios de Weinstein fueran conservados.

La transferencia protónica intramolecular se estudió mediante el método PM3, acercando el protón desde el "N1" hacia el nitrógeno 12 (grupo amino terminal), con optimización total de la molécula de histamina.

Los resultados de la transferencia protónica intramolecular se muestran en la figura 47. Se puede observar dos mínimos a una distancia "N1"-H de 1,0 Å (forma HAH+ plegada) y a 2,2 Å, que corresponde a una distancia N12-H de 0,98 Å (forma +HN3H plegada), siendo esta última 66.4 Kcal/mol más estable.

La altura de la barrera para el traspaso del protón desde el "N1" al N12 fue de 10,8

Figura 47

Curva de energía de transferencia protónica en función de la distancia "N₁"-H para histamina en presencia de los sitios descritos por Weinstein obtenida por el método PM₃

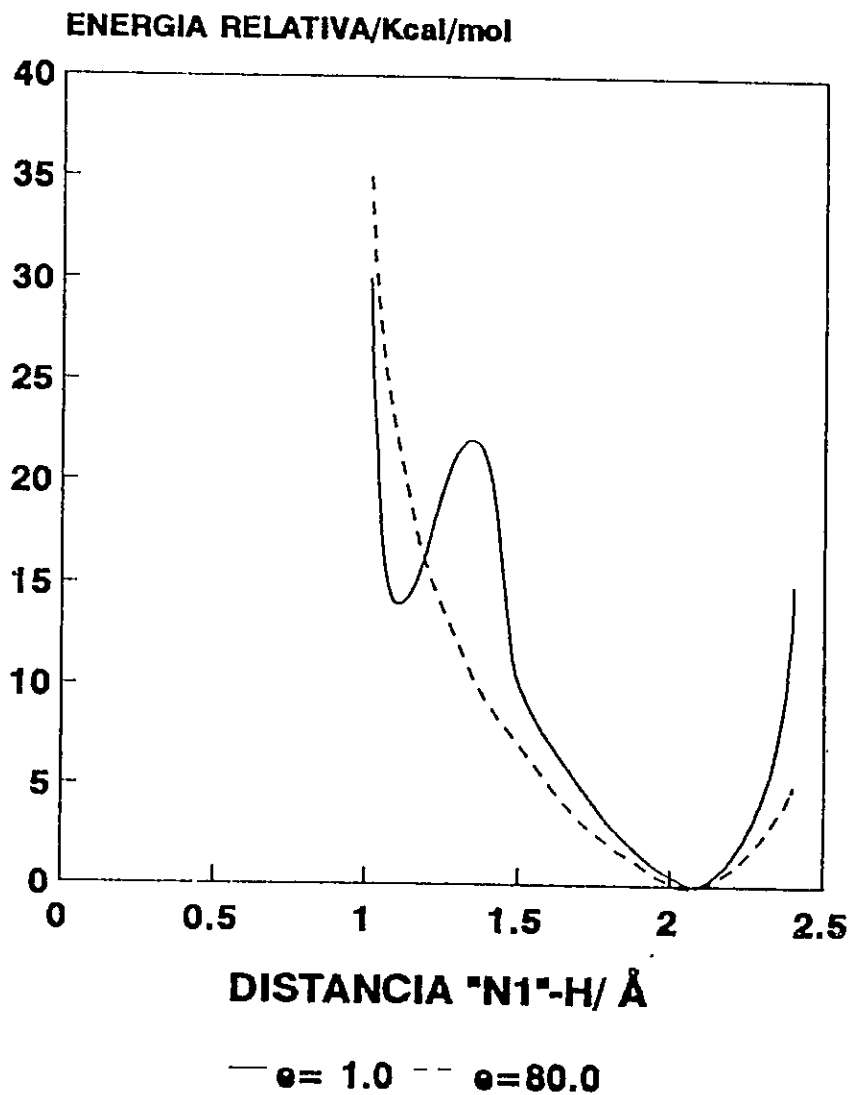
Kcal/mol, que corresponden a una baja en 2 Kcal/mol relativo al sistema aislado. Además, la barrera para el traspaso desde el N12 al "N1" fue de 77,2 Kcal/mol (ver capítulo 2).

La transferencia protónica intramolecular calculada por la metodología CNDO/2-RF considerando los sitios externos a $\epsilon = 1.0$ y a $\epsilon = 80.0$ se muestran en la figura 48. En la figura se puede apreciar la desaparición de la barrera a $\epsilon = 80.0$ respecto del caso en el vacío. Se puede apreciar que utilizando el modelo de Weinstein la transferencia protónica intramolecular es energéticamente favorecida.

La curva de energía potencial en función del ángulo α para la especie $+HN_3H$, en presencia de los sitios, indicó que la forma más estable fue la forma extendida, siendo ésta 20,0 Kcal/mol más estable que la forma plegada ($\alpha = 60^\circ$), sin barrera a la rotación.

Los resultados indican que en el modelo de activación del receptor H2, la transferencia protónica intramolecular jugaría un rol fundamental en el proceso.

Figura 48



Curvas de energía de transferencia protónica para histamina en presencia de los sitios descritos por Weinstein, obtenidas por el método CNDO/2-RF con $\epsilon = 1.0$ y $\epsilon = 80.0$

CAPITULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

- Se postula un mecanismo de activación de los receptores H₂ de histamina que involucra una transferencia protónica intramolecular, energeticamente favorable en contraposición con el mecanismo que involucra una transferencia protónica intermolecular no concertada y energeticamente no factible.
- Se presenta, por primera vez, un mecanismo para el equilibrio tautomérico de la histamina en solución acuosa.
- Se reporta la estructura HAH⁺ como estado estacionario en fase gaseosa (encontrada experimentalmente), que resulta ser la estructura determinante en la proposición de los mecanismos antes mencionados.
- Se encuentra que la transferencia protónica intramolecular juega un rol fundamental en el modelo de activación de los receptores H₂ de histamina.

- Los cálculos realizados en esta tesis están de acuerdo y racionalizan los valores experimentales de abundancia relativa de los confórmeros/tautómeros de la histamina protonada en fase gaseosa y solución acuosa.

- La transferencia protónica no involucra directamente sitios del receptor que interactúen con los nitrógenos del anillo imidazólico, lo cual estaría de acuerdo con los estudios realizados en el modelo introduciendo mutaciones puntuales, que mostraron que sólo el Asp 98 en la hélice 3 sería importante para la afinidad y actividad de los receptores H₂.

- La metodología de trabajo utilizada en tesis ofrece una alternativa más completa que aquellas que modelan el receptor mediante correlaciones de propiedades de la droga y familias de análogos.

- El modelo construido para el receptor H2 de histamina está de acuerdo con toda las pruebas experimentales existentes hasta el momento y, por lo tanto, proporciona una fuente de información con la cual se podrían racionalizar otros resultados experimentales.

- La actividad de los antagonistas H2 de histamina se debe principalmente a una interacción de tipo electrostático entre un sistema π básico y el Asp 98 del receptor. Además, en las sustancias que actualmente se emplean en medicina, la cadena polar no cargada interactuaría con los residuos Asp 186 y Thr 190 de la hélice 5.

- El Glu 270 de la hélice 7 sería un residuo importantes para futuros estudios mutagénicos, ya que podría estar involucrado en la actividad de los receptores H2 de histamina.

CAPITULO 6

PROYECCIONES

La metodología de trabajo utilizada en esta tesis proporcionó una serie de resultados que permitieron responder algunas de las cuestiones concernientes al estudio de la histamina y análogos y sus correspondientes interacciones con el receptor H₂ de histamina. Sin embargo, dada la envergadura del problema, existe aún una amplia gama de posibilidades de estudio para tratar de explicar en forma más sistemática (a nivel molecular) las interacciones droga-receptor.

A continuación se presenta en forma breve algunas proyecciones que se generan partir de esta tesis:

- A partir de los resultados obtenidos a través de la mecánica molecular , se pueden diseñar antagonistas H₂ de histamina, que no presentarían la estructura tradicional, aceptada para éstos en la literatura. Por ejemplo, no sería de vital importancia un heterociclo (imidazol, furano, tiazol etc.) sino más bien un centro fuertemente básico, a su vez la cadena corta que presenta un azufre podría ser perfectamente reemplazada por un conector diferente.

A partir de un refinamiento tanto de los métodos cuánticos como de la mecánica molecular sería factible la obtención de mecanismos de activación y bloqueo del receptor H₂ de histamina para los agonistas y antagonistas respectivamente, que den cuenta de los hechos experimentales y permitan determinar las propiedades moleculares de la droga responsables en la interacción droga receptor. Utilizando

entonces, la misma metodología ilustrada en esta tesis, diseñar fármacos de mayor o menor potencia.

- Refinar el modelo tridimensional del receptor H2 de histamina, uniendo las regiones transmembranales a través de sus lazos conectivos, realizando dinámicas más completas. Además, considerar el efecto del medio en el modelo ya sea a través de un campo eléctrico continuo o la presencia de moléculas de agua en el interior del receptor y la de un entorno fosfolipídico en el exterior.

- Los estudios de modelación molecular permitieron postular que el Glu 270 estaría involucrado en la actividad del receptor H2, hecho que debería ser corroborado a través de la clonación de un receptor que posea otro residuo aminoacídico, (como la alanina planteada en esta tesis) en esta posición.

- Estudio de agonistas y antagonistas H1 de histamina, que permitan diseñar un mecanismo de activación y bloqueo del receptor.

- Obtención de un modelo tridimensional del receptor H1 de histamina.

APENDICE 1

Aproximaciones básicas

Las metodologías semiempíricas utilizadas contemplan la separación de Born-Oppenheimer y están aplicadas a moléculas de capa completa. Los electrones de valencia se mueven en el campo de un core fijo compuesto por los núcleos y los electrones de las capas internas .

Metodologías del tipo MNDO.

Los orbitales moleculares de la capa de valencia (Ψ_i) son representados por una combinación lineal de un conjunto de orbitales atómicos de la capa de valencia (ϕ_ν)

$$\Psi_i = \sum C_{\nu i} \phi_\nu \quad (2.1)$$

Los coeficientes $C_{\nu i}$ son obtenidos a través de las ecuaciones de Roothaan (75)-Hall (76) en la cual la aproximación NDDO (Neglect of differential diatomic orbital) (77) asume la forma:

$$\sum (F_{\mu\nu} - E_i \delta_{\mu\nu}) C_{\mu i} = 0 \quad (2.2)$$

donde E_i es el valor propio del orbital molecular Ψ_i y $\delta_{\mu\nu}$ la función delta de Kronecker. Cada uno de los elementos $F_{\mu\nu}$ de la matriz de Fock es la suma del hamiltoniano monoeléctrico $H_{\mu\nu}$ (hamiltoniano core) constituido por una parte

bielectrónica, $G_{\mu\nu}$ y la energía electrónica E_{el} representada por la siguiente ecuación:

$$E_{el} = 1/2 \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu} (H_{\mu\nu} + F_{\mu\nu}) \quad (2.3)$$

donde $P_{\mu\nu}$ es un elemento de la matriz de orden de enlace.

Se supone que los orbitales atómicos ϕ_{μ} y ϕ_{ν} están centrados en el átomo A y los orbitales atómicos ϕ_{λ} y ϕ_{σ} en el átomo B (siendo $A \neq B$). Los elementos de la matriz de Fock en la aproximación NDDO son:

$$F_{\mu\mu} = U_{\mu\mu} + \sum_B V_{\mu\mu,B} + \sum_{\mu}^A P_{\nu\nu} [(\mu\mu, \nu\nu) - 1/2(\mu\nu, \mu\nu)] + \sum_B \sum_{\lambda, \sigma} P_{\lambda\sigma} (\mu\mu + \lambda\sigma) \quad (2.4)$$

$$F_{\mu\nu} = \sum_B V_{\mu\nu,B} + 1/2 P_{\mu\nu} [3(\mu\nu, \mu\nu) - (\mu\mu, \nu\nu)] + \sum_B \sum_{\lambda, \sigma} P_{\lambda\sigma} (\mu\nu, \lambda\sigma) \quad (2.5)$$

$$F_{\mu\lambda} = \beta_{\mu\lambda} - 1/2 \sum_{\nu}^A \sum_{\sigma}^B P_{\nu\sigma} (\mu\nu, \lambda\sigma) \quad (2.6)$$

Los términos obtenidos en la matriz de Fock son clasificados como:

- a) Energías monoeléctronica-monoeléctronica $U_{\mu\mu}$, cada una de las cuales representa la suma de la energía cinética de un electrón en un orbital atómico A y su energía potencial debida a la atracción por el core del átomo A.
- b) Integrales de repulsión monocéntricas - bielectrónicas, es decir integral Coulómbica

$(\mu\mu, \nu\nu) = g_{\mu\nu}$ e integral de intercambio $(\mu\nu, \mu\nu) = h_{\mu\nu}$

c) Integrales de resonancia core bicéntricas - monoeléctricas $\beta_{\mu\lambda}$

d) Potenciales de atracción bicéntricas monoeléctricas $V_{\mu\nu}$, entre un electrón en la distribución $\Psi_\mu \Psi_\nu$ de un átomo A y el core del átomo B.

e) Integrales de repulsión $(\mu\nu, \lambda\sigma)$

La energía total de la molécula, $E_{\text{tot}}^{\text{mol}}$ es la suma de la energía electrónica E_{el} y la repulsión $E_{\text{AB}}^{\text{core}}$ entre los core de los átomos A y B.

$$E_{\text{tot}}^{\text{mol}} = E_{\text{elect}} + E_{\text{Nuc}} \quad (2.7)$$

El calor de formación ΔH_f^{mol} de la molécula es obtenido a través de la energía total por la substracción de la energía electrónica E_{el}^{A} y la adición de los calores de formación experimentales ΔH_f^{A} de los átomos en la molécula,

$$\Delta H_f^{\text{mol}} = E_{\text{elect}} + E_{\text{Nuc}} - \sum E_{\text{el}}^{\text{A}} + \sum \Delta H_f^{\text{A}} \quad (2.8)$$

La expresión para E_{el}^{A} está dada por la ecuación siguiente:

$$E_{\text{el}}^{\text{A}} = f(P_{ii}, U_{ii}, \langle ii | jj \rangle, \langle ij | ij \rangle) \quad (2.9)$$

donde P_{ii} es la población del orbital atómico en el estado fundamental del orbital atómico i . U_{ii} son las energías monoeléctricas de los orbitales atómicos de los iones resultantes de la remoción de los electrones de valencia. Estos últimos son representados por los parámetros U_{ss} y U_{pp} . $\langle ii | jj \rangle$ son las integrales bielectrónicas monocéntricas. En general, existen cinco expresiones de éstas por átomo, las cuales

son representadas por: $\langle ss | ss \rangle = G_{SS}$, $\langle ss | pp \rangle = G_{Sp}$, $\langle pp | pp \rangle = G_{pp}$,
 $\langle pp | p'p' \rangle = G_{p2}$ y $\langle sp | sp \rangle = H_{Sp}$. En estos casos p y p' son orbitales de tipo
 atómico p en un simple centro, pero difieren en las formas de sus funciones angulares.

E_{Nuc} es la energía de repulsión entre pares de núcleos y está dada por:

$$E_{Nuc} = \sum_{i < j} E_N(i,j) \quad (2.10)$$

con

$$E_N(i,j) = Z_A Z_B \langle AA | BB \rangle \left[1 + e^{(-\alpha_A R_{ij})} + e^{(-\alpha_B R_{ij})} \right] + (Z_i Z_j / R_{ij}) \\
 \left(\sum_k a_{kA} e^{-b_k A (R_{ij} - c_k A)^2} + \sum_k a_{kB} e^{-b_k B (R_{ij} - c_k B)^2} \right) \quad (2.11)$$

donde el átomo i es del tipo A, el átomo j es del tipo B, $\langle AA | BB \rangle$ es una integral
 bicéntricas, Z_i es el número de electrones de valencia en el átomo i y R_{ij} es la
 distancia internuclear. En la metodología MNDO sólo está presente el primer término
 para la expresión de $E_N(i,j)$. El segundo término fue introducido en el método AM1
 con el fin de corregir la subestimación de la repulsión core-core. Las cantidades α_A ,
 b_k y c_k son parámetros optimizables.

En la aproximación MNDO se pueden encontrar alrededor de 12 variables las cuales
 podrían ser consideradas como parámetros. Sólo algunos de éstos han sido
 completamente optimizados tales como aquellos representados por los símbolos U_{SS} ,
 U_{pp} etc. Los otros son obtenidos a partir de datos de espectros atómicos. El método
 AM1 introduce un segundo conjunto de parámetros en la forma de la gaussiana de

interacción core-core que se utiliza para corregir la subestimación de la repulsión de largo alcance en el término de repulsión core-core del método MNDO. Cada elemento en el método AM1 es descrito por 10 a 19 parámetros.

Las bases teóricas del AM1 son similares a las del método MNDO y sólo difieren en la incorporación de las gaussianas radiales en la metodología AM1, las cuales modifican el término de repulsión core-core. La combinación de las formulaciones teóricas y la necesidad de la optimización de la mayor parte de los parámetros ha permitido la mejor descripción del desprecio modificado del recubrimiento diatómico (MNDO) a través del método paramétrico PM3 (47).

En esta metodología existen 18 parámetros para cada elemento, con la excepción del átomo de hidrógeno, el cual tiene sólo 11 parámetros.

En resumen, en todas las metodologías que utilizan un hamiltoniano del tipo MNDO, la matriz de Fock es obtenida a partir de funciones parametrizadas construidas con parámetros definidos sólo para átomos. Estos parámetros son optimizados a través de un método no trivial de mínimos cuadrados, donde se determinan valores numéricos de estos parámetros para así obtener un conjunto de elementos característico de cada átomo. Estos parámetros optimizados reproducen propiedades en estado gaseoso de moléculas que contengan los átomos respectivos : i) calor de formación ii) momento dipolar iii) potencial de ionización y iv) geometrías moleculares.

La primera versión de MNDO incluye un conjunto de parámetros exclusivamente para los átomos H-C-N-O ; los refinamientos de este modelo de cálculo, AM1 y PM3, incluyen parámetros para otros átomos, pero por razones históricas, los parámetros para los átomos H, C, N y O han sido construidos empleando el mayor número de moléculas.

La validez de los resultados MNDO, AM1 y PM3, dependen de la capacidad de transferencia de los parámetros atómicos a otra molécula que contenga los átomos en cuestión. Por esta razón la confiabilidad de los resultados AM1 y PM3 deben ser asegurados por comparación con los resultados experimentales y no por comparación con metodologías ab initio.

Metodología del tipo CNDO/2

El método CNDO/2 es un esquema SCF (Self Consistent Field) semiempírico de cálculo para describir moléculas incluyendo explícitamente sólo los electrones de valencia, con omisión total del recubrimiento diferencial (45). El hamiltoniano tiene la forma general:

$$H^{val} = \sum_{i=1}^n \left[-1/2 \nabla^2_i + V_i \right] + \sum_i \sum_{j>i}^n 1/r_{ij} \quad (2.12)$$

donde n es el número de electrones de valencia. El primer término es el operador que representa la energía cinética del electrón de valencia i, V_i es la energía potencial del electrón de valencia i en el campo de los núcleos y electrones de capa interna. El último término nos da cuenta del potencial de repulsión interelectrónico. Las cantidades entre paréntesis se denominan Hamiltoniano de Core (H^{core}).

Cada orbital molecular (Ψ) se expresa como una combinación lineal de orbitales atómicos (ϕ) de tipo Slater (LCAO-STO) con exponentes orbitales fijos para cada átomo.

$$\Psi = \sum C_{i\mu} \phi_{\mu} \quad (2.13)$$

Este método resuelve en forma iterativa las ecuaciones de Hartree-Fock-Roothaan, usando el hamiltoniano (2.13). En forma matricial estas ecuaciones son expresadas como:

$$I F C = S C \epsilon \quad (2.14)$$

$$\det (I F - \epsilon S) = 0 \quad (2.15)$$

donde la matriz IF esta constituida por los valores esperados del operador de Fock molecular de los orbitales atómicos ϕ_μ , y S es la matriz de las integrales de recubrimiento entre orbitales atómicos.

El método CNDO/2 emplea la aproximación diferencial nula (ZDO) para las integrales de recubrimiento entre orbitales atómicos:

$$\langle \phi_\mu / \phi_\nu \rangle = 0 \quad \text{cuando } \mu \neq \nu \quad (2.16)$$

Esta aproximación introduce considerables simplificaciones para la solución de la ecuación (2.14), que nos conduce a:

$$\det (F - \epsilon \delta) = 0 \quad (2.17)$$

donde $\delta = \delta_{\mu\nu} = \langle \phi_\mu / \phi_\nu \rangle = S_{\mu\nu}$

$$\delta = 0 \quad \text{si } \mu \neq \nu$$

$$\delta = 1 \quad \text{si } \mu = \nu$$

Además, sólo las integrales bielectrónicas que aparecen en el elemento de matriz de Fock son consideradas:

$$\langle \mu \nu / \lambda \sigma \rangle = \int \phi_\mu \phi_\nu [1/r_{12}] \phi_\lambda \phi_\sigma dv \quad (2.18)$$

todas las de tres y cuatro centros son despreciadas.

Las integrales del hamiltoniano de core:

$$H_{\mu\mu}^{\text{core}} = \langle \phi_\mu / H^{\text{core}} / \phi_\mu \rangle \quad (2.19)$$

$$H_{\mu\nu}^{\text{core}} = \langle \phi_\mu / H^{\text{core}} / \phi_\nu \rangle \quad (2.20)$$

son evaluadas usando datos experimentales tales como potencial de ionización y afinidades electrónicas del estado de valencia del orbital atómico μ correspondiente, y tomando algunos de ellos como parámetros semiempíricos de ajuste, de tal modo que los cálculos CNDO/2 pueden dar las mismas tendencias en sus resultados en comparación con el cálculo SCF ab initio con base mínima.

La construcción de los elementos de la matriz de Fock es resumida a continuación.

1) Término monoeléctrico diagonal:

$$H_{\mu\mu} = -1/2 (I_\mu + A_\mu) - 1/2 (P_{\mu\mu} - 1)v_{AA} + (P_A - Z_A) - Z_B v_{AB} \quad (2.21)$$

I_μ : es el potencial de ionización del estado de valencia del orbital atómico μ .

A_μ : es la electroafinidad del estado de valencia del orbital atómico μ .

$P_{\mu\mu}$: es un elemento de la matriz la densidad.

Z_A : es la carga de core del átomo A (igual a la carga nuclear menos el número de electrones de capa interna no considerados explícitamente)

v_{AB} : es un término bielectrónico equivalente para todos los electrones de un mismo

átomo A o B. Se evalúa con las expresiones teóricas para las integrales.

$$v_{AB} = \langle S_A S_A / 1/r_{12} / S_B S_B \rangle \quad (2.22)$$

P_A : es la densidad electrónica integral de los elementos orbitales moleculares ocupados sobre el átomo A.

La energía cinética del electrón, la atracción por el core de su propio átomo y la repulsión entre mismo y los demás electrones de valencia están expresadas conjuntamente en los tres primeros términos de la ecuación (2.21). La sumatoria de $Z_B v_{AB}$ se estabiliza por la atracción del electrón μ y los core de los demás átomos en el sistema poliatómico.

De esta forma se obtiene un conjunto de coeficientes CNDO/2 $C_{i\mu}$ y una correspondiente matriz de densidad P_{μ} y la energía total puede ser encontrada desde la siguiente expresión:

$$E \text{ Total} = 1/2 \sum_{\mu} \sum_{\nu} P_{\mu\nu} \left(|H_{\mu\nu}| + |F_{\mu\nu}| \right) + \sum_{A < B} Z_A Z_B / R_{AB} \quad (2.23)$$

usando las expresiones adecuadas para $|H_{\mu}|$ y $|F_{\mu}|$.

En resumen se puede afirmar que las aproximaciones hechas en el método CNDO/2 son las siguientes:

- i) Reemplazar la matriz de recubrimiento por la matriz unidad en las ecuaciones de Roothaan y despreciar las integrales de recubrimiento S_{μ} en la normalización de los orbitales moleculares.
- ii) Despreciar el recubrimiento diferencial en todas las integrales bielectrónicas, es decir:

$$\langle \mu \nu / \lambda \sigma \rangle = \delta_{\mu \nu} \delta_{\lambda \sigma} \langle \mu \mu / \lambda \lambda \rangle \quad (2.24)$$

iii) Reducir el conjunto de integrales del tipo de Coulomb a un valor por par de átomos:

$$\langle \mu \mu / \lambda \lambda \rangle = v_{AB} \quad (2.25)$$

iv) No considerar el recubrimiento diferencial monoatómico (de una manera invariante) en las integrales de interacción involucrando los cores de los átomos.

$$\langle \mu / V_B / \nu \rangle = \delta_{\nu \mu} V_{AB} \quad (2.26)$$

En esta expresión V_B es el potencial asignado a los núcleos y capa electrónica interna del átomo B y V_{AB} es de esta forma la interacción entre cualquier electrón de valencia sobre el átomo A con el core del átomo B.

v) Tomar los elementos de la matriz asignados a los términos monoeléctricos diatómicos no diagonales como proporcionales a las correspondientes integrales de recubrimiento.

$$\begin{aligned} | H_{\mu \nu} &= \beta_{AB}^{\circ} S_{\mu} \\ &\mu \text{ sobre A y} \\ &\nu \text{ sobre B} \end{aligned} \quad (2.27)$$

siendo

$$\beta_{AB}^{\circ} = 1/2 K(\beta_A^{\circ} + \beta_B^{\circ}) \quad (2.28)$$

Por lo tanto, el objetivo del método CNDO/2 es lograr tendencias similares, cualitativamente hablando, con respecto a los resultados de cálculo de orbitales moleculares SCF ab initio, implicando un esfuerzo computacional menor.

Metodología CNDO/2-RF

Este modelo permite la incorporación del efecto estérico bajo la solvatación de cada centro atómico del sistema molecular. En esta aproximación, la energía de interacción entre soluto y solvente está dada por la expresión:

$$E_{\Sigma-S}(\epsilon, P) = \sum_A Q_A(P) [V_R(\epsilon, P)]_A \quad (2.29)$$

donde ϵ es la constante dieléctrica macroscópica del solvente, la cual está determinada por la fuerza del campo de reacción y donde P es la matriz densidad para una partícula

La energía libre de solvatación, $A(\epsilon, P)$ esta dada por:

$$A(\epsilon, P) = \frac{1}{2} E_{\Sigma-S}(\epsilon, P) = \frac{1}{2} \sum_A Q_A(P) [V_R(\epsilon, P)]_A \quad (2.30)$$

donde $Q_A(P)$ es la carga atómica neta en el centro A del soluto, y:

$$[V_R(\epsilon, P)]_A = (1-1/\epsilon) \sum_B Q_B(P) (1 - F_{AB}) \tau_{AB} \quad (2.31)$$

es el campo de reacción creado sobre cada centro atómico por un conjunto de cargas de polarización:

$$Q_A^{pol}(\epsilon, P) = - (1-1/\epsilon) Q_A(P) \quad (2.32)$$

y τ_{AB} es la integral de Coulomb que representa la interacción entre soluto y solvente.

F_{AB} es un término que toma en cuenta el efecto estérico de la solvatación para cada

centro atómico, producido por los átomos vecinos en la molécula. Este término depende solamente de la matriz de recubrimiento S_{AB} .

En esta aproximación, la energía libre de solvatación puede ser reescrita como:

$$A(\epsilon, P) = -1/2 (1-1/\epsilon) \sum_A \sum_B Q_A(P) Q_B(P) [1-F_{AB}] \tau_{AB} \quad (2.33)$$

A partir de la ecuación 2.33, el operador efectivo de Fock, $F(\epsilon, P)$, representa la energía libre de solvatación. Este procedimiento proporciona la expresión para los elementos de la diagonal de $F(\epsilon, P)$ (49,57):

$$\begin{aligned} [F(\epsilon, P)]_{\mu\mu} &= [F(1, P)]_{\mu\mu} + 1/2 [E_{\Sigma} - S/P]_{\mu\mu} = \\ & [F(1, P)]_{\mu\mu} - [V_R(\epsilon, P)]_{\mu\mu} \end{aligned} \quad (2.34)$$

donde $F(1, P)$ es el operador de Fock para el soluto aislado.

APENDICE 2

Minimización.

La minimización de la energía potencial de un sistema provee información que es complementaria a la obtenida a través de la dinámica molecular (DM). La estructura minimizada en algunos casos representa la configuración fundamental sobre la cual ocurren las fluctuaciones dinámicas, lo que permite tener un conveniente y útil sistema para el análisis estructural (67).

La minimización de una estructura molecular se efectúa básicamente en dos pasos. En el primero de ellos, la ecuación que describe la energía del sistema como función de las coordenadas debe ser definida y evaluada para dar la energía correspondiente a una conformación dada. Luego, esta conformación es ajustada para obtener el valor más bajo de la energía. Este mínimo puede ser obtenido después de un simple ajuste o puede requerir muchas iteraciones, dependiendo de la naturaleza del algoritmo, de la forma de la función y del tamaño molecular.

Los minimizadores habitualmente utilizan una llamada "línea de búsqueda", la cual usualmente cambia las coordenadas con el objeto de obtener una estructura de más baja energía. La línea de búsqueda puede ser crítica para ciertos algoritmos, pero ésta no depende del algoritmo que genera la dirección.

Tres son los métodos de minimización (algoritmos) más usados, que son clasificados de acuerdo al grado de la derivada que utilizan. Estos son: "Steepest descent" (primer orden), "Conjugate gradient" (primer orden) y "Newton-Raphson" (segundo orden)

(67).

A continuación describiremos brevemente en qué consiste cada uno de estos métodos.

Steepest descent

En "steepest descent", la línea de búsqueda es simplemente la derivada o gradiente de la función de energía potencial. Después de recorrer cada línea de búsqueda, se evalúa el gradiente en la dirección escogida lo que puede generar una nueva línea de búsqueda. Sin embargo, el uso de gradientes como "buscadores" de dirección provoca oscilaciones en el camino hacia la conformación mínima. Este ineficiente comportamiento es característico del método de "steepest descent". Por esta razón, el método es frecuentemente utilizado como primera aproximación cuando las configuraciones están lejos del mínimo, es decir cuando el gradiente es muy grande, recurriendo a otro algoritmo para la aproximación final. Ejemplos de tales casos son la relajación de una estructura cristalina pobremente definida o de estructuras construídas gráficamente.

Conjugate gradient

Una de las razones por las cuales el método de "steepest descent" es ineficiente es que cada segmento del camino hacia el mínimo tiende a retrasar el progreso logrado en la anterior iteración. En "conjugate gradient" el algoritmo produce un conjunto

direcciones mutuamente ortogonales, de modo que cada vez que se realiza un paso se refina la dirección hacia el mínimo evitando todo retroceso. Este método es escogido para sistemas de muchos átomos en las cuales la manipulación de la matriz de segunda derivada (Newton-Raphson) se hace imposible.

Newton-Raphson

En "steepest descent", el gradiente es usado como línea de búsqueda en una dimensión, mientras que en "conjugate gradient" mejoramos el algoritmo minimizando sólo a lo largo de las direcciones que son mutuamente conjugadas, con lo cual el movimiento a lo largo de una dirección no revierte el avance logrado por la iteración anterior. En estos casos se usa la primera derivada como función. El uso de la segunda derivada podría en principio lograr la convergencia en un paso. Conjuntamente con el uso del gradiente, que nos permite seleccionar una dirección, la curvatura de la función (segunda derivada) también especifica el punto en que el gradiente de la función cambia de dirección (pasa a través de un mínimo). Esta es la base del método Newton-Raphson, el cual es utilizado generalmente cuando el sistema no es muy grande.

Finalmente, una estructura minimizada puede ser analizada en una variedad de formas para obtener una diversidad de información molecular. Por ejemplo, un complejo minimizado enzima-sustrato nos proporciona una detallada información estructural y su energía interna, particionada en diferentes contribuciones, permite identificar las interacciones específicas de mayor relevancia.

La minimización también proporciona una manera directa de determinar las

consecuencias estructurales debidas a la modificación de la secuencia primaria de una proteína. A partir del desarrollo reciente de las tecnologías que permiten efectuar, amplificar y expresar mutaciones puntuales de ADN, se ha hecho posible incorporar cualquier aminoácido deseado por substitución en la secuencia conocida de una proteína. Dichos experimentos pueden ser perfectamente complementados con cálculos de modelación molecular, los cuales nos proporcionan información acerca de las alteraciones en las interacciones moleculares que podrían emerger con el nuevo aminoácido mutado.

Dinámica molecular

Las moléculas son sistemas dinámicos. En una macromolécula los movimientos abarcan una amplia gama de amplitudes (desde cientos de Å a 10 Å) y ocurren a tiempos sumamente disímiles (desde los picosegundos hasta los segundos o frecuentemente tiempos más largos). Algunos de estos movimientos suelen tener un importante rol funcional. Por ejemplo, el oxígeno no puede alcanzar el sitio de enlazamiento en la mioglobina o hemoglobina a menos que las fluctuaciones de la estructura proteica abran un camino transiente para lograr el enlace. Las simulaciones de dinámica molecular son importantes para obtener información con respecto a estos movimientos, particularmente porque los estudios experimentales a este nivel son muchas veces muy difíciles.

Dinámica molecular (DM) es el nombre que se da a la metodología que simula los movimientos de un sistema de partículas y que puede ser aplicada tanto a sistemas tales

como átomos y moléculas diatómicas como también a sistemas macromoleculares como lo son las proteínas.

La DM simula los movimientos de las moléculas usando la ecuación básica del movimiento de Newton,

$$F_i = m_i a_i \quad (3.2)$$

donde F_i es la fuerza, m_i es la masa y a_i es la aceleración del átomo i . La fuerza sobre un átomo i puede ser representada directamente como la derivada de la energía potencial, V , con respecto a las coordenadas r_i :

$$-\delta V / \delta r_i = m_i \delta^2 r_i / \delta t^2 \quad (3.3)$$

En principio, si tenemos una adecuada expresión para la energía potencial y conocemos la masa, debería ser posible resolver la ecuación diferencial para futuras posiciones en el tiempo (trayectoria). Desafortunadamente, en física clásica la solución analítica de la ecuación 3.3 sólo es posible para sistemas de una o dos partículas independientes. La solución de esta ecuación para sistemas mayores se realiza necesariamente a través de métodos numéricos.

Si conocemos la posición de la partícula a tiempo t_0 , $r(t_0)$, entonces la posición después de un corto intervalo de tiempo $t_0 + \Delta t$ puede expresarse en términos de una expansión de Taylor con respecto a t :

$$r(t_0 + \Delta t) = r(t_0) + (\delta r / \delta t)_{t_0} \Delta t + (\delta^2 r / \delta t^2)_{t_0} \Delta t^2 / 2 + \dots \quad (3.4)$$

En DM las posiciones iniciales de los átomos son obtenidos a partir de una minimización previa, o provienen de una estructura cristalina. Las velocidades iniciales son generadas al azar, usualmente a partir de una distribución de Maxwell-Boltzmann a una temperatura dada (energía). La aceleración se puede obtener facilmente a partir de la ecuación 3.3. Una vez obtenida la solución para $\mathbf{r}(t_0 + \Delta t)$ a partir de la ecuación 3.4, las coordenadas originales son reemplazadas por las nuevas coordenadas, las velocidades son recalculadas con este nuevo valor y la aceleración es corregida por el cálculo de los gradientes de las nuevas coordenadas. Este ciclo puede ser repetido muchas veces y en ciertos casos millones de veces.

En resumen. el esquema general del "stepwise" de la simulación por DM, es basada en un algoritmo predicción-corrección, que puede ser resumido en los siguientes pasos:

- a) predicción de la posición, velocidades y aceleraciones, a un tiempo $t + \Delta t$, usando los valores iniciales de estos parámetros
- b) evaluación de las fuerzas y con esto obtener las aceleraciones a partir de $\mathbf{a}_i = \mathbf{F}_i/m_i$, para las nuevas posiciones
- c) corregir las posiciones predichas, velocidades y aceleraciones, etc. usando las nuevas aceleraciones
- d) calcular cualquier variable de interes, tal como la energía etc., para tiempos promedios acumulados, antes de retornar al punto a para iniciar un nuevo paso

Algoritmo de Verlet

El método más usado para integrar las ecuaciones de movimiento es utilizar el algoritmo de Verlet. Este método proporciona una solución directa a la ecuación de segundo orden (3.2). El método está basado en el conocimiento de las posiciones $\mathbf{r}(t)$, aceleraciones $\mathbf{a}(t)$ y la posición del paso previo $\mathbf{r}(t - \Delta t)$. La ecuación para la posición en el paso siguiente está dada por:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(t - \Delta t) + \Delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (3.5)$$

En esta ecuación no toma en cuenta directamente las velocidades. Ellas han sido eliminadas por la adición de las ecuaciones obtenidas por la expansión de Taylor sobre $\mathbf{r}(t)$:

$$\mathbf{r}(t + \Delta t) = \mathbf{r}(t) + \Delta t \mathbf{v}(t) + 1/2 \Delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (3.6)$$

$$\mathbf{r}(t - \Delta t) = \mathbf{r}(t) - \Delta t \mathbf{v}(t) + 1/2 \Delta t^2 \mathbf{a}(t) \quad (3.7)$$

Luego las velocidades no son necesarias para registrar la trayectoria, pero ellas son útiles para estimar la energía cinética y a partir de ésta la energía total. Las velocidades pueden ser obtenidas de la fórmula:

$$\mathbf{v}(t) = [\mathbf{r}(t + \Delta t) - \mathbf{r}(t - \Delta t)] / 2\Delta t \quad (3.7)$$

Mientras que la ecuación (3.5) es correcta excepto para el término de orden 4 Δt^4 , las velocidades de la ecuación (3.7) están sujetos a errores de orden 2 Δt^2 .

Intervalo de tiempo

Un término importante en los algoritmos de simulación lo constituye el intervalo de tiempo, Δt . Obviamente, desde la perspectiva de los tiempos computacionales, serían deseables pasos largos. Sin embargo, ya que deben ser simulados los movimientos a altas frecuencias, esto no es posible. Además pueden ocurrir problemas numéricos en la integración de las ecuaciones de movimiento.

En general, el tiempo de cada paso depende básicamente del tipo de simulación y del sistema que se está estudiando. Sin embargo, se suele recomendar un tiempo de un femtosegundo (10^{-12} s), aunque esta elección debe ser probada para cada sistema en particular.

Temperatura

El concepto de temperatura en una simulación por DM es fundamental. Básicamente, la temperatura es proporcional a la energía cinética del sistema, la cual se expresa en términos de las velocidades atómicas. Esta relación surge de la racionalización del comportamiento del estado gaseoso según la teoría cinética de los gases. La relación microscópica entre la temperatura y las velocidades queda expresada

a través de la ecuación de Maxwell-Boltzmann:

$$f(v)dv = (m/2\pi kT)^{3/2} e^{-mv^2/2kT} 4\pi v^2 dv \quad (3.8)$$

La temperatura es una medida de un promedio de una distribución y sólo tiene un significado definido cuando el sistema se encuentra en equilibrio. La ecuación de Maxwell-Boltzmann puede ser usada para resolver variados promedios de velocidades.

Otra relación útil que se obtiene de la teoría cinética de los gases es la proporcionalidad entre la energía cinética, E , de un gas ideal y la temperatura termodinámica:

$$E = 3/2 kT \quad (3.9)$$

donde k es la constante de Boltzmann. Por otra parte, la energía cinética de un átomo viene dada por:

$$E = 3/2 mv^2 \quad (3.10)$$

Así podemos derivar una expresión para la temperatura en términos de la velocidad:

$$T = mv^2/k \quad (3.11)$$

Esta ecuación permite calcular la temperatura para un conjunto de átomos en movimiento, directamente a partir de sus velocidades.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

- 1.- D.P. Stites, J.D. Stobo y J.V. Wells, "Inmunología Básica y Clínica", Capítulo 15, página 205, Ed. Manual Moderno S.A. de C.V., México, 1988.
- 2.- "Current concepts in Histamine Receptors", Smith Kline and French International, 1983.
- 3.- J.M. Arrang, M. Garbarg, J.C. Lancelot, J.M. Lacomte, H. Pollard, M. Robba, W. Schunack y J.C. Schwartz, *Nature (London)*, **327**, 117, (1987).
- 4.- A.S.F. Ash y H.O. Schild, *Br. J. Pharmacol.*, **27**, 427, (1966).
- 5.- J.W. Black, W.A.M. Duncan, G.J. Durant, C.R. Ganellin y M.E. Parsons, *Nature (London)*, **236**, 385, (1972).
- 6.- S. Ishikawa y N. Sperlakis, *Nature (London)*, **327**, 158 (1987).
- 7.- B.N. Halpern, *J. Am. Med. Assoc.*, **129**, 1219, (1945).
- 8.- R.W. Brimblecombe, W.A.M. Duncan, G.J. Durant, J.C. Emmett, C.R. Ganellin y M.E. Parsons, *J. Int. Med. Res.*, **3**, 86, (1975).
- 9.- J. Bradshaw, R.T. Brittain, J.W. Clitherow, M.J. Daly, D. Jack, B.J. Price y R. Stables, *Br. J. Pharmacol.*, **66**, 464, (1979).
- 10.- Y. In, T. Ishida, M. Doi, M. Inoue y T. Shibata, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2295, (1988).

- 11.- (a) R.N. Brodgen, A.A. Carmine, R. C. Heel, T. M. Speight, y G.S. Avery, *Drugs*, **24**, 267, (1982); (b) S.M. Grant, H. D. Langtry y R.N. Brodgen, *Drugs*, **37**, 801, (1987)
- 12.- *Lancet*, **1**, 28, (1988), (Editorial)
- 13.- T.B. Paiva, M. Tominaga y A.C.M. Paiva, *J. Med. Chem.*, **13**, 689, (1970).
- 14.- G.J. Durant, C.R. Ganellin y M.E. Parsons, *J. Med. Chem.*, **18**, 905, (1975).
- 15.- W.F. Reynolds y W. Tzeng, *Can. J. Biochem.*, **55**, 576, (1977).
- 16.- C.R. Ganellin, *J. Pharm. Pharmacol.*, **25**, 787, (1973).
- 17.- J.J. Bonet y J.A. Ibers, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4829, (1973).
- 18.- K. Praut, S. Critchley y C.R. Ganellin, *Acta Cryst. Sect. B*, **30**, 2884, (1974).
- 19.- G.A. Worth y W.G. Richards, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 239, (1994).
- 20.- C.C. Newman y J.T. Hays, *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2288, (1942).
- 21.- H.M. Lee y R.G. Jones, *J. Pharmacol. Expl. Therap.*, **95**, 71, (1949).
- 22.- P. Reggio, S. Topiol y H. Weinstein, *J. Med. Chem.*, **29**, 2412, (1986).
- 23.- *Essentials of Medicinal Chemistry*, A. Korolkovas y J.H. Burckhalter, John Wiley, Nueva York, (1976).
- 24.- A. Hernández-Laguna, F.J. Romero-Sánchez e Y.G. Smeyers, en "QSAR and Strategies in the Design of Bioactive Compounds", J.K. Seidel, Ed., Verlag Chemie, Weinheim, RFA, (1986).
- 25.- Y.G. Smeyers, A. Hernández-Laguna, C. Muñoz_Caro y F.J. Romero-Sánchez, *J. Chim. Phys.*, **84**, 633, (1985).
- 26.- O. Tapia, R. Cárdenas, Y.G. Smeyers, A. Hernández-Laguna, J.J. Rández y F.J. Rández, *Int. J. Quant. Chem.*, **38**, 727, (1990).
- 27.- A. Hernández-Laguna, J.L.M. Abboud, R. Notario, H. Homan, y Y.G. Smeyers, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1450, (1993).

- 28.- L. Kier, *J. Med. Chem.*, **11**, 441, (1968).
- 29.- H. Weinstein, D. Chou, C.L. Johnson, S. Kang y J.P. Green, *Mol. Pharmacol.*, **12**, 738, (1976).
- 30.- H. Weinstein, A. Mazunk, R. Osman y S. Topiel, *Mol. Pharmacol.*, **29**, 28, (1985).
- 31.- F.J. Luque, F. Yllas y R. Pouplana, *Mol. Pharmacol.*, **32**, 557, (1986).
- 32.- Y.G. Smeyers, A. Hernández-Laguna, J.J. Rández y F.J. Rández, *J. Mol. Struc. (Theochem)*, **123**, 431, (1990).
- 33.- J.S. Gómez-Jeria, J. Parra-Mouchet y D. Morales-Lagos, *J. Mol. Struc. (Theochem)*, **236**, 201, (1991).
- 34.- P. Nagy, G.J. Durant, W.P. Hoss y D.A. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4898, (1994).
- 35.- J. Eriks, H. Van der Goot y H. Timmerman, *Mol. Pharmacol.*, **44**, 886, (1993).
- 36.- A. Nakayama, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **11**, 478, (1992).
- 37.- M. Tintelnot y H.D. Hölje, *J. Mol. Graph.*, **4**, 7, (1986).
- 38.- E. Haaksama, H.P. Voss, G.M. Donné-Op den Kelder y H. Timmerman, *Quant. Struct. Act. Relat.*, **11**, 142, (1992).
- 39.- T. Ishida, Y. In, M. Shibata, M. Doi, M. Inoue e I. Yanagisawa, *Mol. Pharmacol.*, **31**, 410, (1987).
- 40.- T.P. Lismaa y J. Shine, *Current Opinion in Cell Biology*, **4**, 195, (1992).
- 41.- I. Gantz, M. Schäffer, J. Del Valle, C. Logsdon, V. Campbell, M. Uhler y T. Yamada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 429, (1991).
- 42.- I. Gantz, J. Del Valle, L. Wang, T. Tashiro, G. Munzert, Y. Guo, Y. Konda y T. Yamada, *J. Biol. Chem.*, **267**, 20840, (1992).
- 43.- J. Giraldo, M. Martín, M. Campillo, y L. Pardo, *Mol. Pharmacol.*, **42**, 372,

- (1992).
- 44.- W.J. Hehre, R.F. Stewart y J. Pople, *J. Chem. Phys.*, **51**, 2657, (1969)
- 45.- J.A. Pople, D.L. Beveridge y P.A. Dobosh, *J. Chem. Phys.*, **47**, 2026, (1967).
- 46.- M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healey y J.J. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 3902, (1985).
- 47.- J.J. Stewart, *J. Comp. Chem.*, **10** (2), 221, (1989).
- 48.- M.J.S. Dewar y W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 4988, (1977).
- 49.- R. Constanciel y R. Contreras, *Theor. Chim. Acta*, **65**, 1 (1984).
- 50.- J.J. Dannenberg y E.M. Evlet, *Int. J. Quantum Chem.*, **44**, 869, (1992).
- 51.- L. Tury y J.J. Dannenberg, *J. Phys. Chem.*, **96**, 5819, (1992).
- 52.- R. Contreras y G. Klopman, *Can. J. Chem.* **63**, 7, (1987).
- 53.- D. Dehareng, G. Dive y J.M. Ghuysen, *Int. J. Quantum Chem.*, **46**, 711, (1993).
- 54.- R. Contreras y A. Aizman, *Int. J. Quantum Chem.: Quantum Chemistry Symposium*, **20**, 573, (1986).
- 55.- R. Contreras y A. Aizman, *Int. J. Quantum Chem*, **27**, 293, (1984).
- 56.- J.E. Parra-Mouchet, R. Contreras y A. Aizman, *Int. J. Quantum Chem.*, **33**, 41, (1988).
- 57.- J.L. Pascual-Auhir, J. Andrés y E. Silla, *Chem. Phys. Lett.*, **169**, 4, (1990).
- 58.- P. Pérez-López, M. Aliste, J.S. Gómez-Jeria y J.E. Parra-Mouchet, *Acta Sud Americana de Química*, **113**, en prensa, aceptado 1993.
- 59.- R. Janochek, E.G. Weideman y G. Zundel, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, **69**, 505, (1973)
- 60.- P. Reggio, S. Topiol y H. Weinstein, *J. Med. Chem.*, **29**, 2412, (1986).
- 61.- J. Catalan, J.L.G de Paz, M. Yañez, R. Claramunt, C. López J. Elguero, F.

- Anvia, J.H. Quian, M. Taagepera y R.W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1678, (1990).
- 62.- J.A. Pople, D.P. Sundry y G.A. Segal, *J. Chem. Phys.*, **43**, S129, (1965).
- 63.- T. Ishida, Y. In, M. Shibata, M Doi, M. Inoue e I Yanagisawa, *Mol. Pharm.*, **31**, 410, (1987).
- 64.- D.J. Gilman, J. K. Oldham, J.M. Wardleworth y T.O. Yellin, " The Royal Society of Chemistry" London, U.K., Ed. A.M. Creighton y S. Turner, 56-72, (1985).
- 65.- M. Islam y M.M. Nakurkar, *J. Pharm. Pharmacol*, **45**, 682, (1993).
- 66.- I. Yanagisawa, H. Yasufumi y Y. Ishii, *J. Med. Chem.*, **30**, 1787, (1987).
- 67.- Manual Discover 2.6
- 68.- N.J.M Birdsall, *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 9, (1991).
- 69.- S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoflack y M. Hilbert, *J. Med. Chem.*, **35**, 3448, (1992).
- 70.- R. Henderson, J. Baldwin, T.H. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann y K. Dowing, *J. Mol. Biol.*, **213**, 899, (1990).
- 71.- T.W. Kahn y D.M. Engelman, *Biochemistry*, **31**, 6144, (1992).
- 72.- L. Oliveira, A.E.M. Paiva y G. Vriend, *J. Computer Aided Molecular Design*, **7**, 649, (1993).
- 73.- E. Hadicke, F. Frickel y A. Franke, *Chem. Ber.*, **111**, 3222, (1978).
- 74.- P. Bradshaw, R.T. Brittain, J.W. Clitherow y R. Stable, *Acta Cryst. Sect. B*, **38**, 1837, (1982).
- 75.- C.C.J. Roothaan, *Rev. Mod. Phys.*, **23**, 69, (1951).
- 76.- G.G. Hall, *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, **205**, 541, (1951).
- 77.- J.A. Pople y D. Segal, *J. Chem Phys.*, **43**, S129, (1965).