



FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICAS  
Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

---

## Aproximación Cuántica de Cluster para modelar los mecanismos de la Monoamino Oxidasa A Humana

---

Tesis para optar al grado de Magíster en Química  
y Memoria para optar al Título Profesional de Químico  
por **Martín Andrés Pérez Comisso**

Director de Tesis: Dr. Gerald Zapata T.  
Co-Directora de Tesis: Dra. Angélica Fierro H.

Santiago de Chile  
Diciembre 2013

---

# Índice general

<b>1. SOBRE LA MONOAMINO OXIDASA</b>	<b>1</b>
1.1. Monoamino Oxidasa: Generalidades e Importancia . . . . .	2
1.2. Monoaminoxidasa: Sustratos e Inhibidores . . . . .	5
1.3. Monoaminoxidasa: Mecanismos . . . . .	6
1.3.1. Mecanismo de Silverman . . . . .	7
1.3.2. Mecanismo de Edmonson y cols . . . . .	9
1.3.3. Mecanismo de Hidruro: Fitzpatrick y Vianello . . . . .	11
1.4. Estado de Transición . . . . .	13
1.5. Aproximación de Clúster . . . . .	13
1.6. Propuesta de Tesis . . . . .	15
<b>2. METODOLOGÍA</b>	<b>18</b>
2.1. Construcción de Sustratos y Ajuste de Cargas . . . . .	18
2.2. Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) y Funciones de base . . . . .	19
2.3. Docking: Autodock 04 y Vina . . . . .	20
2.3.1. Selección de Poses de Docking . . . . .	20
2.3.2. Selección de Aguas Estructurales . . . . .	20
2.4. Estudio de Reactividad y Función de Fukui . . . . .	21
2.5. Aproximación de Clúster . . . . .	21

<b>3. DOCKING SOBRE hMAO-A</b>	<b>24</b>
3.1. Estudios de Docking	24
3.1.1. Criterios de Selección de Sustratos	25
3.1.2. Estudio de Orientaciones por Docking	25
3.1.3. Dopamina	27
3.1.4. Noradrenalina	30
3.1.5. Serotonina	31
3.1.6. Triptamina	34
3.1.7. Análisis de Conformaciones de Sustratos	36
3.2. Aguas estructurales	39
<b>4. MECANISMOS DE REACCIÓN</b>	<b>44</b>
4.1. Modelo mínimo: Bencilamina	45
4.2. Estados de Transición Clúster Serotonina	52
4.2.1. Mecanismo de Hidruro	53
4.2.2. Mecanismo radicalario	55
4.3. Análisis de Estados de Transición por MAC	57
<b>5. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD QUÍMICA</b>	<b>60</b>
5.1. Índices de Reactividad Química Global	61
5.1.1. Potencial Químico	61
5.1.2. Dureza	63
5.1.3. Blandura	64
5.1.4. Índice de electrofilia	66
5.1.5. Índice de Nucleofilia	67
5.2. Función de Fukui Local y Electrofilia	68
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>A. TEORIA FUNCIONAL DE LA DENSIDAD</b>	<b>75</b>
A.1. Teoría Funcional de la Densidad (DFT)	75

<b>B. CONSIDERACIONES SOBRE DOCKING</b>	<b>80</b>
B.1. Concepto de Docking . . . . .	80
<b>C. POTENCIAL QUIMICO Y FUNCIONES DE FUKUI</b>	<b>85</b>
<b>D. PROPIEDADES CINÉTICAS DE LAS ENZIMAS</b>	<b>89</b>

---

## Índice de figuras

1.	Estructura de la Monoamino Oxidasa A humana. Consistente en un dominio transmembrana (verde), un dominio sitio activo (rojo) y un dominio de unión al FAD (amarillo). En azul el cofactor FAD. . . . .	3
2.	Estructura de la Isoaloxacina, sitio de reacción. . . . .	4
3.	Estructuras moleculares de sustratos de hMAO-A Serotonina (5-HT), Triptamina (TA), Dopamina (DA) y Noradrenalina (NA). . . . .	6
4.	Mecanismo SET (single electron transfer) propuesto por Silverman y replanteado por Lu en 2003. . . . .	7
5.	Mecanismo polar nucleofílico o $S_N2$ . . . . .	10
6.	Mecanismo de transferencia directa de hidruro. . . . .	11
7.	Mecanismo de Vianello de hidruro en dos etapas. La primera es el traspaso del hidruro y la segunda un mecanismo de Grotthus. . . . .	12
8.	Representación de una Curva de Reacción y una superficie de reacción. . . . .	13
9.	Estructuras moleculares de sustratos de hMAO-A. . . . .	26
10.	Pose de dopamina neutra en sitio activo hMAO-A (color rosa). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X) . . . . .	27
11.	Pose de dopamina cargada en sitio activo hMAO-A (color amarillo). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X) . . . . .	29

12.	Pose de noradrenalina neutra en sitio activo hMAO-A (color plateado). El grupo isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X) . . . . .	30
13.	Pose de noradrenalina cargada en sitio activo hMAO-A (color azul). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X) . . . . .	31
14.	Pose de serotonina neutra en sitio activo hMAO-A (color verde). El grupo isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X) . . . . .	32
15.	Pose de serotonina cargada en sitio activo hMAO-A (color azul). El grupo isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X) . . . . .	33
16.	Pose de triptamina neutra en sitio activo hMAO-A (color fucsia). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X) . . . . .	34
17.	Pose de triptamina cargada en sitio activo hMAO-A (color amarillo). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X) . . . . .	35
18.	Aguas conservadas predichas. De este experimento se tomaron las coordenadas de solo cuatro de éstas, las que también presentan documenta su importancia. .	41
19.	Aguas en sitio activo de hMAO-A con 5-HT. . . . .	42
20.	Aguas estructurales de hMAO-A (PDB: 2Z5X) en el clúster de dopamina neutra. En figura se observa en el centro el neurotransmisor y el grupo isoaloxacina. Las moléculas señaladas con un área circular son las aguas más relevantes. . . .	43
21.	Sistema mínimo, corresponde a una bencilamina con una isoaloxacina . . . . .	45
22.	Curva de tránsito líneal bencilamina con mecanismo de hidruro en isoaloxacina .	46
23.	Energía de Reacción, con su Estado de Transición obtenido para bencilamina en mecanismo de hidruro . . . . .	48
24.	Tránsito líneal del sistema bencilamina-isoaloxacina para mecanismo radicalario	49

25. Energía de Reacción, con su Estado de Transición obtenido para bencilamina en mecanismo radicalario . . . . .	51
26. Clúster de la Serotonina. Esta fue la estructura inicial para calcular los estados de transición de hMAO-A . . . . .	52
27. Tránsito líneal 5-HT para mecanismo de hidruro . . . . .	53
28. Estado de Transición para hMAO-A de 5-HT con mecanismo de hidruro . . . . .	54
29. Tránsito líneal 5-HT en Serotonina para mecanismo radicalario . . . . .	55
30. Estado de Transición para hMAO-A por MAC con mecanismo radicalario . . . . .	56
31. Gráfico de Efecto Solvente en Potencial Químico. . . . .	61
32. Gráfico de Efecto Solvente en Dureza . . . . .	64
33. Superficie de energía potencial de Feniletilamina . . . . .	64
34. Gráfico de Efecto Solvente en Blandura . . . . .	65
35. Efecto Solvente en índice de Electrofilia. . . . .	66
36. Gráfico de Efecto Solvente en Índice de Nucleofilia . . . . .	68
37. Estructura Isoaloxacina y numeración de sus átomos. . . . .	68
38. Dureza y Eletronegatividad en el contexto de Orbitales Moleculares . . . . .	87

---

## Índice de tablas

1.	Constrante de Michaelis-Menten para Sustratos hMAO-A . . . . .	25
2.	Energías de unión para neurotransmisores en estado neutro y protonado . . . . .	26
3.	Resumen de residuos que interactúan en los acoplamientos moleculares . . . . .	36
4.	Valores normalizados de parámetros termodinámicos del sistema . . . . .	47
5.	Valores termodinámicos normalizados del sistema para bencilamina en mecanismo radicalario.// *Iso=Isoaloxacina; Sus=Bencilamina . . . . .	50
6.	Valores de Energía libre relativa en kcal/mol para distintos dieléctricos. Mecanismo de Hidruro . . . . .	54
7.	Valores de Energía libre relativa en kcal/mol para distintos dieléctricos. Mecanismo Radicalario . . . . .	56
8.	Valores de Potencial Químico Electrónico con el efecto solvente. . . . .	62
9.	Efecto Solvente en Dureza . . . . .	63
10.	Efecto Solvente en Blandura en kcal/mol . . . . .	65
11.	Efecto Solvente en Índice de Electrofilia en kcal/mol . . . . .	66
12.	Efecto Solvente en Índice de Nucleofilia . . . . .	67
13.	Electrofilia local y relativa para átomos de Isoaloxacina. Destacan $C_{4a} - N_1(9)$ , $N_5(13)$ y $N_1(15)$ // *Electrofilia local en kcal/mol. Electrofilia relativa sin unidades . . . . .	71
14.	Contribuciones en energía en interacción en algoritmo de Autodock Vina . . . . .	84



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
que la tesis de Magíster presentada por el candidato:

MARTÍN ANDRÉS PÉREZ COMISSO

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de  
Magister en Química, mención Química Médica de y al título de Química, en el examen de  
defensa rendido el 27 de Diciembre del año 2013.

Directores de Tesis

Dr. Gerald Zapata T. ....

Dra. Angelica Fierro H. ....

Comisión Informante de Tesis

Dr. Claudio Olea A. ....

Dra. Carolina Mascayano C. ....

Dr. Diego Venegas Y. ....

LUGAR DE DESARROLLO DE TESIS:

Unidad de Gráfica Molecular

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile.

FINANCIAMIENTO:

Proyecto Fondecyt N° 1120280.

COLABORADORES:

Lic. Cristian Celis

Lic. Montserrat Peñaloza

Dr. Germán Barriga

A quienes han tomado roles de padre en mi vida:

*Oney, Oscar, Jonás*

A quienes han tomado roles de madre en mi vida:

*Rosa, Cecilia, Edith*

A quien más quiero, mi hermano

*Francisco*

A quién si ella, jamás hubiese existido;

aunque ella no pueda físicamente leer esto:

*Patricia*

## AGRADECIMIENTOS

Ni todas las páginas de la tesis me alcanzarían para agradecer a quienes permitieron, de diversas formas, que llegase a completar mi formación universitaria. Creo he tomado un camino poco habitual para alguien que se forma como científico. Probablemente es porque oscilo. Habría que analizar la evidencia. . . Por eso, el primer agradecimiento es para quienes no aparecen explícitamente nombrados en estas páginas y que hicieron de mi experiencia universitaria una sorprendente, intensa e indescriptible aventura (física y digital) en casi siete años recorriendo no solo los campos de Olivos, si no que, la Universidad de Chile en toda su extensión.

Debo mis más profundos agradecimientos a mi director de tesis, Dr. Gerald Zapata, quien me entrego conocimientos, experiencias, un gran trato, muy buena voluntad y por sobre todo su paciencia. Sin ella difícilmente esto habría acabado bien. Mis agradecimientos por todos los buenos momentos, y mis más sinceros respetos. A mi co-directora, la Dra. Angélica Fierro que apoyo este proyecto y me oriento con mucha perspicacia y claridad para lograr obtener un trabajo de alta calidad científica.

A los miembros de la Unidad de Gráfica Molecular: Leslie, Cristian, Silvana, (Sebastián) y la adorable Montserrat. La experiencia de pertenecer a un grupo de vanguardia y excelencia no habría sido la misma sin la convivencia diaria con ustedes, y esta tesis tampoco sin sus colaboraciones.

A aquellos compañeros de armas en el descubrimiento de las teorías y experimentos que descifran la estructura profunda de la Materia que fueron y serán de gran confianza en todo lo que enfrentamos juntos estos tiempos y que fueron incondicionales amigos luego de tantas aventuras en la facu: Luis, Johanna, Alicia, Anakenna, Karina y Raúl.

También, a quienes confiaron en mi durante estos años para poder desarrollar mis habilidades científicas, no solo en la esfera de aprendiz, si no de ayudante o docente: Gianni, Jaqueline, Julio, Isabel, Jorge, Daniel, Oscar y Margarita. Gracias por permitirme conjugar mis aprendizajes y formación científica con la principal vocación con la que cargo: la de enseñar.

A mis amigos más queridos: Sebastián, Claudio, Daniel, Eduardo, Gustavo, Amaru y José Manuel. Y a mis amigas dulces y siempre presentes Angelina, Catalina, Natalia, Javiera, Nicole, Sara, Macarena y Tamara. Han sido como hermanos por este camino que es el vivir y me reciben en sus casas como uno más de sus familias. En mi dispersión y locuras, sin ustedes, difícilmente habría tenido las fuerzas para sacar grandes proyectos adelante; especialmente este último, el que he sentido como el más difícil de todo mi proceso de formación.

A quienes me han alegrado compartiendo sus logros y vidas conmigo de diversas maneras: Oney y Merly; Jonás y Rebeca; Daniel y Nadia; Loreto y Max; Cecilia y Aldo; Cynthia y Víctor; Gonzalo, Adrian, Raúl, Pancho y Daniel, Rosa, Rocío, Zaki y Carlitos, Barbará y Richard; Aldito y Gabriela; Rosy y Manolo; Javier y Oscar. Todas las veces que me salvaron han contribuido a mantenerme, en múltiples sentidos, vivo. Me entregaron no solo cosas materiales y económicas, si no que también su confianza, y lo más importante, un espacio en sus corazones. Mi cariño hacia ustedes queda permanentemente explícito en estas líneas.

También debo hacer mención a los grupos humanos que me entregaron la oportunidad de desarrollar todas mis (multivocacionales) talentos en estos años: La Sociedad de Debate, Cultura Libre, la Coc(h)ina, SECMA, el Pleno de la Federación de Estudiantes, La Piscina Universitaria, La Orden del Mechero Calado, La Ciudad Atómica, y el Senado Universitario. Las experiencias vividas ahí han forjado profundamente mi visión de mundo y mi concepción de la Universidad. Los grandes logros logrados junto con ellos permitieron aprender mucho más que en cualquier aula y me permitieron explorar de una manera plena lo que significa ser parte de la Universidad de Chile. A quienes he conocido en todas estas aventuras reflejan la genialidad y diversidad de la institución donde todas las verdades se tocan.

Es menester agradecer también a la institución que apostó por mí y con la que financié (o mejor dicho, no debí financiar) mis estudios: Beca Universidad de Chile. Me siento infinitamente afortunado de no haber tenido que endeudarme para recibir la mejor educación en un país donde la educación segrega por su elevado costo y el lucro es el motor de la desigualdad. Me siento orgulloso de mis compañeros con los que marchamos para que la Educación Pública, Gratuita

y de Calidad sea una realidad para todos los chilenos y chilenas. Espero que con la mayoría de mis acciones en la Universidad haber devuelto aunque sea la milésima parte de todo lo que ella me ha entregado y apoyado estos años.

Es justo hacer mención aquí también a los funcionarios y funcionarias que me compartieron su experiencia y cariño en estos años: Julito, Chendo, la Sra. Chelita, La tía Patty y el tío Richard, Cecilia, la Sra. Ximena, Sandritas (Jimenez y Morales), Javier 'El Gato' y Óscar, Sra. Leonor, Don Germán, Fernando y Rocío; y otros tantos más. Su compromiso con la Universidad es el más profundo de todos y la hacen vivir silenciosamente para quienes estudiamos y quienes nos enseñan. Gracias por siempre estar ahí para salvar nuestro día.

Un especial agradecimiento a Oney por mostrarme este camino que decidí tomar y darme bríos para creer que podía ser un científico; y a Edith, mi profesora que irrestrictamente creyó en mí hace siete años y me financio para poder vivir ni la presión del techo. La mayoría de las cosas que ocurrieron en la Universidad fue gracias a que no estaba obligado a trabajar (aunque a veces lo hacía) para tener un techo, a pesar de mi disfuncional familia.

Un último y final agradecimiento a todos quienes aportaron en la corrección y mejoras (y el aguante en la redacción) de este documento, especialmente Mauricio 'Pacha' Vargas quien sin él este documento no tendría la calidad que hoy presenta.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

5-HT	Serotonina
AD4	AutoDock 4
ADT	AutoDock Tools
ADVina	AutoDock Vina
BBS	Set de base mayor (Big Basis Set)
C (Cys)	Cisteína
DA	Dopamina
DFT	Teoría de Funcionales de la densidad
F (Phe)	Feniletilamina
GP	Fase Gas (Gas Phase)
hMAO-A	Monoamino Oxidasa A humana
I (Ile)	Isoleucina
IMAOs	Inhibidores de Monoamino Oxidasa
L (Leu)	Leucina
LT	Transito Lineal (Linear transit)
MAC	Método de Aproximación de Cluster
MAO	Monoamino Oxidasa
MC/MM	Mécanica cuántica/Mecánica Moléculas
MPC	Modelo polarizable continuo
N (Asp)	Asparagina
NA	Noradrenalina
NT's	Neurotransmisores
ONIOM	our own n-layer integrated molecular orbital and molecular mechanics
Q (Gln)	Glutamina

RESP	Carga de potencial electrostático restringido (Restricted Electrostatic Potencial)
SMCF	Sistema mínimo de coordenadas fijas
$S_N2$	Sustitución nucleofílica II
TA	Triptamina
THF	Tetrahidrofurano
V (Val)	Valina
Y (Tyr)	Tirosina
ZPE	Energía de Punto Cero (Zero Point Energy)



## RESUMEN

La monoamino Oxidasa A humana es una enzima que metaboliza sustratos biogénicos como los neurotransmisores 5-HT, DA, NA, TA, entre otros. Existen diversas propuestas mecanísticas para la reacción de deaminación oxidativa de la hMAO-A: Polar nucleofílica, radicalaria, transferencia de hidruros. Todos estos mecanismos transfieren un hidruro ( $H^-$ ) del Carbono alfa de la monoamina al  $N_5$  del anillo isoaloxacina.

En este trabajo, se buscó por medio del Método de aproximación de clúster discriminar cuál es el mecanismo que domina la reacción. Los estudios de docking de neurotransmisores caracterizan el sitio activo. Los principales residuos indentificados en el sitio son Y444, Y407, Q215, I180, N181, e Y69. El papel de las moléculas de agua es también analizado. Se estudia el impacto del efecto solvente sobre sustratos y sitio activo de hMAO-A por cálculos de Fukui local y global para caracterizar índices químicos de este sistema ante diferentes valores de dieléctrico y su relación con los mecanismos. Finalmente, se implementó la metodología de aproximación de clúster para hMAO-A encontrando que el máximo de energía del tránsito líneal a 1.1 Å(hidruro) y 1.6 Å(radical). Las energías libres de reacción calculadas indican que está favorecido el mecanismo de transferencia directa de hidruro con 40 kcal/mol.

## ABSTRACT

The human monoamine oxidase is an enzyme that metabolizes biogenic substrates as neurotransmitters serotonin, dopamine, noradrenalin and tryptamine, among others. There are several mechanistic proposals for reacting oxidative deamination for hMAO-A: Polar nucleophilic, radical and hydride transfer. All these mechanisms transfer a hydride (H-) of the alpha Carbon of the monoamine to N5 of isoalloxacin group.

The aim of this research was to find and discriminate, using Cluster Approximation method, which is the mechanism that dominates the reaction. Docking studies of neurotransmitters characterize the active site. The major identified residues within the site are Y444, Y407, Q215, I180, N181 and Y69. The role of water molecules is also included in the analysis. It is studied the impact of the solvent effect on substrates and the active site of hMAO-A by calculations of local and global Fukui to characterize chemical indexes of this system at different dielectrically values and their relationship with the mechanisms. Finally, the Cluster Approximation methodology was employed for hMAO-A, finding that the maximum of energy of the linear transit to 1.1 Å (in the hydride mechanism) and 1.6 Å (in the radical mechanism). The calculated energies that were free of reaction, indicate that the hydride direct transfer mechanism is enhanced with almost 40 kcal/mol.

---

---

## CAPÍTULO 1

---

# SOBRE LA MONOAMINO OXIDASA

*Quién teme llegar a la meta traza fácilmente un laberinto*

Walter Benjamin  
Filosofo Alemán

*La Química Computacional ha desarrollado herramientas que tienen amplia utilidad en la resolución de problemas bioquímicos, médicos y farmacológicos a través de la elucidación de mecanismos enzimáticos, comprobación de vías metabólicas y propuestas en biología de sistemas.<sup>30</sup> Entre estos sistemas de estudio destacan las enzimas, siendo éstas eficientes y diversos catalizadores biológicos, de alta especificidad, gran economía atómica y con prometedoras aplicaciones médicas y biotecnológicas.*

## 1.1. Monoamino Oxidasa: Generalidades e Importancia

La monoamino oxidasa (MAO)<sup>1</sup> es una flavoproteína asociada a la membrana mitocondrial externa que cataliza la deaminación oxidativa de diversas aminas biogénicas, endógenas y exógenas, tales como dopamina (DA), serotonina (5-HT) norepinefrina (NA), triptamina (TA) y xenobióticos, entre otras moléculas de interés biológico.

Esta enzima presenta dos isoformas: MAO-A y MAO-B, las que comparten aproximadamente el 70 % de la secuencia aminoacídica para una misma especie.<sup>2</sup> Las isoformas difieren en la concentración tisular y en la preferencia por sustratos e inhibidores. La reacción de biodegradación de las monoaminas catalizada por MAO tiene como producto principal la imina correspondiente. Esta reacción es reversible, espontánea y específica para ciertos sustratos, como por ejemplo 5-HT la cual es altamente específica para MAO-A. Esta última isoforma es el foco de este trabajo.

La estructura cristalina de la MAO-A humana fue resuelta en 2005 por De Colibus y cols.<sup>3</sup> y en 2008 su resolución fue mejorada por Son y cols.<sup>4</sup> La proteína humana (hMAO-A) contiene 513 residuos. Aunque es químicamente funcional como monómero, se encuentra biológicamente dimerizada sobre la superficie de la pared mitocondrial externa.

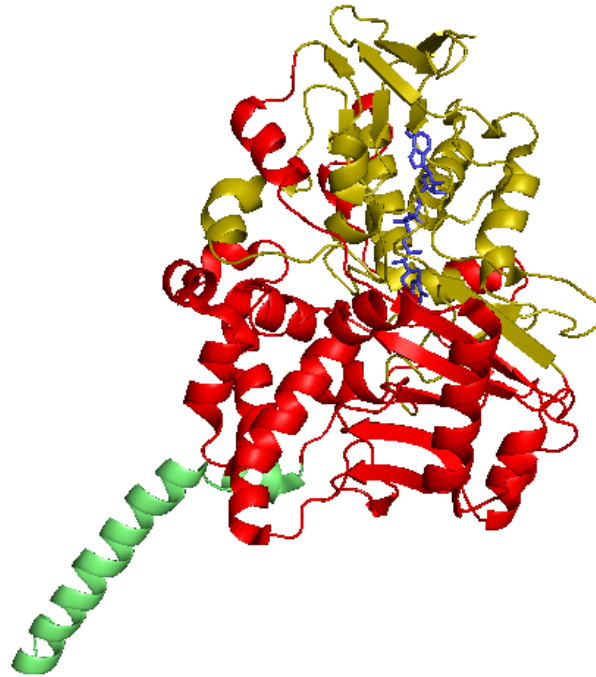


Figura 1.: Estructura de la Monoamino Oxidasa A humana. Consistente en un dominio transmembrana (verde), un dominio sitio activo (rojo) y un dominio de unión al FAD (amarillo). En azul el cofactor FAD.

La hMAO-A presenta tres zonas importantes, (Figura 1) una región de anclaje a la membrana mitocondrial que corresponde al segmento unido a la membrana (residuos 461-513), una zona hidrofóbica donde reside el sitio activo y una zona de enlace al FAD (Flavina Adenina Dinucleótido), grupo prostético que es unido por medio de un enlace  $\delta\alpha$ -S-cisteínil-FAD. El anillo de Isoaloxacina del FAD, representado en la Figura 2, corresponde al centro de reacción donde se reduce la flavina y se oxida el sustrato.

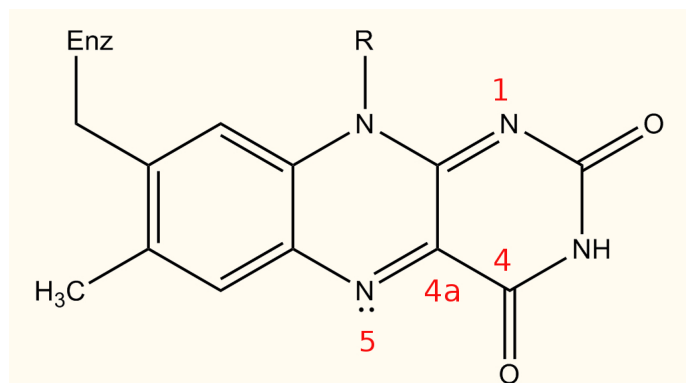


Figura 2.: Estructura de la Isoaloxacina, sitio de reacción.

El acercamiento de los sustratos, que a pH fisiológico se encuentran protonados y puede ser atraído electrostáticamente a la superficie de la enzima a razón de su carácter negativo, lo que puede ser observado en la superficie de energía potencial. Existe alto interés en comprobar que el grupo amonio debe desprotonarse para que la amina sea degradada en la cavidad a la cual reside el sitio activo, ya que todos los mecanismos que se han propuesto consideran la amina neutra.<sup>5</sup>

El carácter hidrofóbico y la ausencia de aminoácidos básicos o ácidos en el sitio activo que permitan la desprotonación del sustrato dentro de la cavidad hidrofóbica, ha llevado a plantear nuevos estudios para encontrar que la zona de desprotonación de MAO está fuera de ella, previa a la reacción de deaminación. El estudio de Zapata-Torres y cols<sup>6</sup> sostiene a partir de estudios de Steered Molecular Dynamics (SMD) que a pesar que a pH fisiológico las bioaminas deben estar protonadas, estas moléculas llegan al sitio activo en forma neutra. Las estructuras protonadas requieren mayores energías de entrada que las formas neutras, por lo que estas últimas ingresan con menor dificultad. Adicionalmente, el sustrato neutro muestra mayores energías de interacción con el sitio activo, lo que muestra una preferencia por el ingreso de éste por sobre la molécula protonada al sitio de reacción, como indica Zapata-Torres y cols.

## 1.2. Monoaminoxidasa: Sustratos e Inhibidores

El interés por el estudio de MAO se centra en su capacidad para controlar cuadros depresivos crónicos (Isoforma A), como de las enfermedades de Parkinson y Alzheimer (Isoforma B). Desde los años sesenta<sup>7</sup> las moléculas inhibitoras de Monoamino oxidasa (iMAO's) han sido desarrolladas para el uso clínico como antidepresivos, antiparkinsonianos y drogas neuroprotectoras.<sup>8</sup>

Sin embargo, la variabilidad estructural de los iMAO ha llevado a estudiar en detalle las interacciones que se presentan en el complejo proteína-ligando dentro del sitio activo y los mecanismos por los cuales MAO degrada los sustratos. La preparación de mejores síntesis de drogas para patologías cuyo mecanismo está asociado a la MAO se pueden optimizar comprendiendo de manera profunda la estructura y el mecanismo de la reacción enzimática de MAO, lo que orienta la importancia de esta investigación.

### Neurotransmisores

Las principales familias de neurotransmisores, ilustrados en la Figura 3, son sustratos de MAO. Entre éstos están las catecolaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina), las Indolaminas (serotonina, melatonina) y la histamina. Otras aminas exógenas trazas que metaboliza son la tiramina, la triptamina y la octopamina.

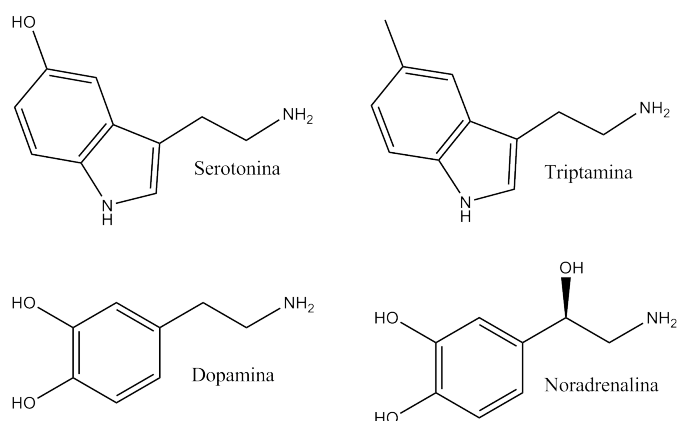


Figura 3.: Estructuras moleculares de sustratos de hMAO-A Serotonina (5-HT), Triptamina (TA), Dopamina (DA) y Noradrenalina (NA).

### 1.3. Monoaminooxidasa: Mecanismos

Desde 1993, con la publicación de la primera propuesta por Silverman, el mecanismo de reacción de hMAO-A no ha generado consenso en la comunidad científica, debido a los experimentos posteriores que entregan resultados que no son explicables por el primer mecanismo propuesto. Los trabajos de Scrutton,<sup>9</sup> Silverman,<sup>10</sup> Edmonson y cols.<sup>11</sup> y Fitzpatrick<sup>12</sup> y Vianello<sup>13</sup> resumen las líneas propuestas que se postulan para la reacción en el sitio activo de la MAO-A. Un punto interesante es que en cada una de las propuestas tienen en común el eliminar en la reacción neta un hidruro mediante alguna de las siguientes alternativas:

- Un mecanismo de transferencia de electrón propuesto por Silverman
- Un mecanismo polar nucleofílico propuesto por Edmonson y cols.
- Un mecanismo de transferencia de hidruro propuesto por Fitzpatrick



### 1.3.1. Mecanismo de Silverman

El mecanismo de Silverman o mecanismo de transferencia de 'un electrón'<sup>9</sup> (o single electron transfer, SET por sus siglas en inglés) propone la transferencia de un electrón desde el grupo amino a la flavina generando un catión amino-radical. Debido a que el pKa del radical amino es cercano a 10, la enzima podría remover el protón pro-*R* fácilmente. El radical producido de la desprotonación puede ser oxidado por una segunda transferencia de electrón o una combinación de radicales con un sitio activo radicalario, seguida de la  $\beta$ -eliminación de un ión imonio.

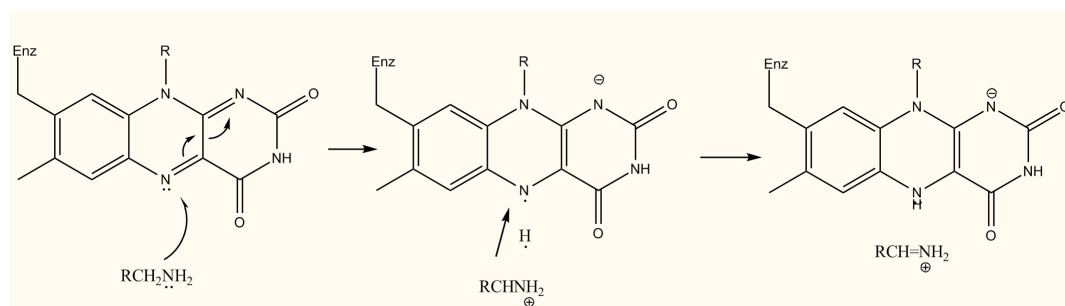


Figura 4.: Mecanismo SET (single electron transfer) propuesto por Silverman y replanteado por Lu en 2003.

El mecanismo de Silverman fue actualizado por Lu y col en 2003<sup>14</sup> indicando que el  $N_5$  de la flavina sería responsable de la desprotonación del carbono  $\alpha$  en su posición pro-*R*, en lugar de que un aminoácido del sitio activo desprotona a la monoamina para activarla. Esta alternativa se ilustra en la Figura 4. La reacción se inicia por la transferencia de un electrón de la amina entre la interacción  $C_{4a} - N_1$  del sitio activo, formando el radical que abstrae el protón  $\alpha$  por el átomo  $N_5$ . Posteriormente, un segundo electrón es transferido desde el sustrato a la flavina. El intermediario resultante es el catión-radical amonio. La reacción es concertada pero no sincroniza la transferencia de electrón con la desprotonación, representando un estado de transición singlete biradicálico.

La principal evidencia del mecanismo radicalario es que las isoformas de MAO son desactivadas por análogos químicos de la ciclopropilamina mediante un mecanismo radicalario característico, con la subsiguiente apertura del anillo de ciclopropilamina. Por otra parte, estudios de Rigby y cols<sup>15</sup> presentan evidencia espectroscópica de la presencia de un radical tirosil estable en MAO-A parcialmente reducida, que da cuenta de la presencia de dicho radical en el mecanismo de la reacción.

Sin embargo, frente a este mecanismo, Edmonson y sus colaboradores,<sup>1116</sup> llevaron a cabo estudios de EPR en flujo detenido (stop-flow) sin encontrar evidencia de intermediarios radicalarios ni efecto del campo magnético sobre la reacción enzimática. Adicionalmente Kay y colaboradores,<sup>17</sup> utilizando EPR y ENDOR no encontraron pruebas de la presencia de radicales al estudiar la reacción de MAO-A. De acuerdo a Vianello y cols<sup>13</sup> el mecanismo radicalario no es espontáneo termodinámicamente. Datos experimentales de potencial redox del cofactor FAD (-0,2 V) indican que dicho valor es insuficiente para ser un oxidante efectivo de una amina neutra (alrededor de +0.9 V),<sup>18</sup> a pesar de ser una reacción enzimática.

Desde la perspectiva teórica, en 2011 Erdem y Buyukmenekse<sup>19</sup> publicaron un estudio de este mecanismo en MAO-A utilizando ONIOM en cálculos de capa abierta para bencilamina, encontrando energías cercanas a los 44 kcal/mol y constantes cinéticas que no correlacionan con los resultados experimentales para la reacción radicalaria, considerando que el mecanismo no es viable, aunque sostienen la falta de pruebas experimentales que descarten totalmente dicho mecanismo.

### 1.3.2. Mecanismo de Edmonson y cols

El mecanismo polar nucleofílico<sup>11</sup> (Figura 5) propuesto por Edmonson y cols.<sup>3</sup> establece que la oxidación comienza con un ataque nucleofílico del nitrógeno de la amina al  $C_{4a} - N_1$  de la flavina con una abstracción del protón  $\alpha$  del carbono de la amina por parte del  $N_5$  del anillo isoaloxacina. Esto forma un aducto covalente que permite la transferencia al  $N_5$ . Los productos de la reacción son la imina y la flavina reducida.

Las etapas propuestas para esta reacción son:

- La adición del sustrato para la formación del aducto flavina  $C_{4a} - N_1$ , por medio de un ataque no-enlazante.
- El aumento de la basicidad de la isoaloxacina en la posición  $N_5$
- La transferencia concertada del protón bencílico a la posición  $N_5$  de la flavina
- La eliminación del ión imonio y la flavina reducida
- La reoxidación del FAD por oxígeno molecular.

Este mecanismo ha sido respaldado por estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (en inglés, *Quantitative structure-activity relationship*, QSAR),<sup>20</sup> afinidad química con valores entre 1 y 2 para la constante de Hammett y un eficiente comportamiento cinético que hace viable su ocurrencia.<sup>21</sup>

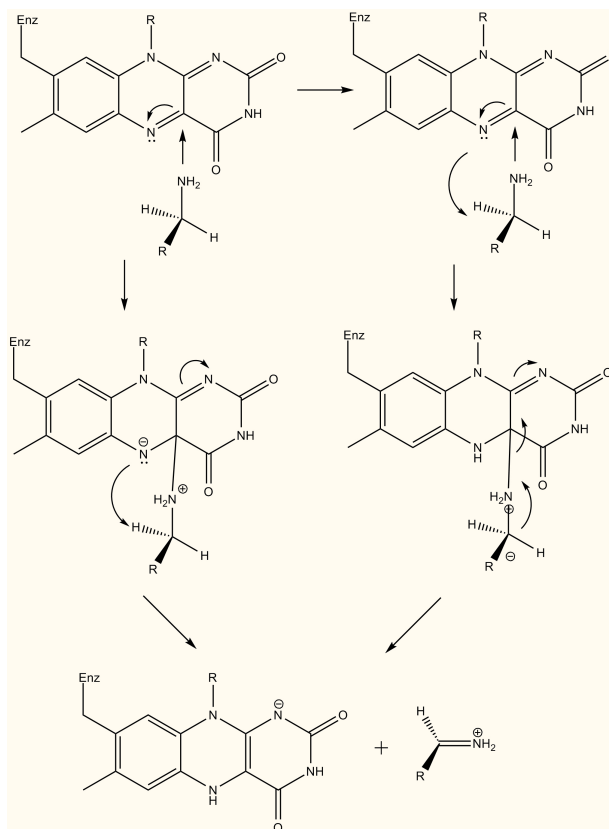


Figura 5.: Mecanismo polar nucleofílico o  $S_N2$ .

Otro estudio teórico de Erdem y cols<sup>22</sup> explora este mecanismo, considerando que la distancia de enlace  $N_5$ -hidrógeno es de 5,973 inicialmente y 1,328 en el estado de transición. La energía total calculada para la reacción es de 44,663 kcal/mol en el estado de transición. Estos valores validan la posibilidad de que el mecanismo sea  $S_N2$ . Concluyen también que al calcular con el funcional B3LYP la diferencia de energía es baja por lo que este mecanismo podría carecer de intermediario, lo que implicaría que la reacción ocurre mediante un mecanismo  $S_N2$  concertado<sup>23</sup>

### 1.3.3. Mecanismo de Hidruro: Fitzpatrick y Vianello

La Figura 6 ilustra la tercera vía descrita, el mecanismo de hidruro, el cual propone la electro-donación de un par de electrones  $\pi$  del  $N_5$  al enlace  $C_{4\alpha} - N_1$  de la flavina, que facilita el traspaso directo de un hidruro desde el carbono- $\alpha$  hacia la flavina  $N_5$ . Este mecanismo es propuesto por Fitzpatrick<sup>24</sup> El ión hidruro migra desde el  $C_\alpha$  de la amina al átomo  $N_5$  del anillo de flavina. Erdem y cols<sup>19</sup> indican que el mecanismo de hidruro es poco viable debido a que la barrera de energía asociada a dicho mecanismo es muy alta en comparación con la barrera del mecanismo  $S_N2$ <sup>25</sup> siendo este un punto desfavorable en esta propuesta.

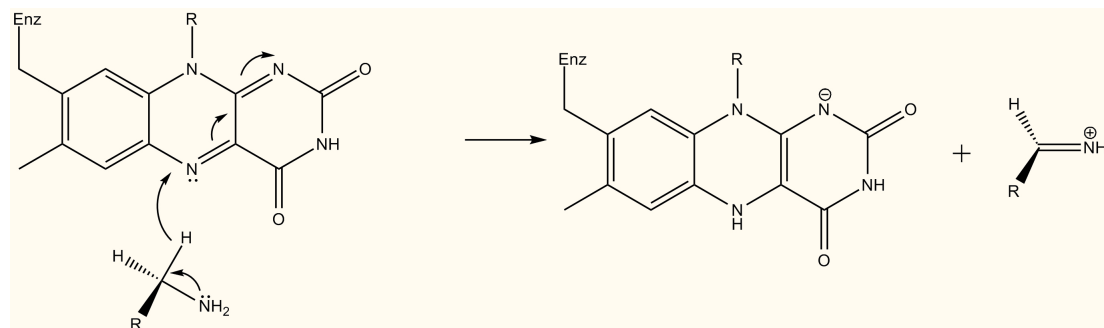


Figura 6.: Mecanismo de transferencia directa de hidruro.

A fines de 2012 Vianello y cols<sup>13</sup> proponen un nuevo mecanismo de hidruro en dos etapas para hMAO-B, a partir de la necesidad de una segunda reacción de parte de la enzima capaz de regenerar la enzima (Figura 7). Describen que la conversión de la imina está ligada a las moléculas de agua estructurales. Estas moléculas de agua presentes en el sitio realizarían la transferencia de un protón por un mecanismo de Grotthuss que reduce totalmente a la isoaloxacina en  $N_1$ .

El estudio realizado para bencilamina y dopamina se apoyan en el cálculo de una frecuencia de  $-933i \text{ cm}^{-1}$  para justificar esta transferencia, a través de un estudio teórico del mecanismo por modelos mínimos encuentran una energía para el paso limitante de 24,4 kcal/mol para la abstracción flavina- $N_5$  de un hidruro. La representatividad del sitio escogido requiere más estudios ya que con los datos no es posible encontrar el estado de transición de la segunda transferencia.

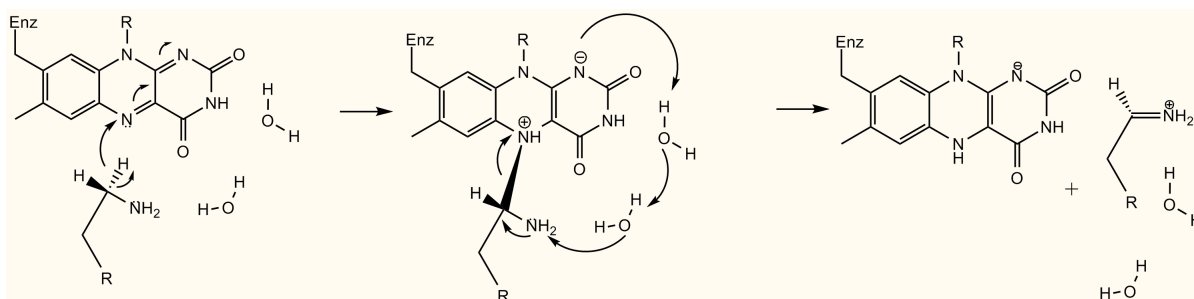


Figura 7.: Mecanismo de Vianello de hidruro en dos etapas. La primera es el traspaso del hidruro y la segunda un mecanismo de Grotthus.

Otras experiencias de interés indican que la estereoquímica del protón  $\alpha\text{-CH}_2$  es estrictamente pro-*R* en la reacción enzimática y fue determinado con estudios de efecto isotópico cinético para diferentes sustratos para ambas isoformas de MAO.<sup>26</sup>

En el trabajo de Macheroux y cols<sup>27</sup> estiman el valor de pKa de una flavina totalmente reducida  $N_5\text{-H}_2$ . Si esta flavina tiene pKa >4, esto indica que el grupo  $N_5\text{-H}^-$  posee suficiente basicidad para actuar como base frente al sustrato. Otro antecedente dado por Edmonson y colaboradores sobre el grupo isoaloxacina de ambas isoformas, es que muestran una curvatura de 30 de la planaridad del eje  $N_5 - N_{10}$ <sup>28</sup> al momento de ocurrir la catálisis. Esto ha sido corroborado por cálculos de reactividad química, hechos por North y colaboradores<sup>29</sup> en 2010.

Cabe destacar que en todos mecanismos los productos de la catálisis son la isoaloxacina reducida y la imina la cual es hidrolizada para formar un aldehído y amoniaco, la isoaloxacina, por otra parte, es oxidada por oxígeno molecular, produciendo peróxido de hidrógeno como producto.

## 1.4. Estado de Transición

Existen diversos métodos que permiten caracterizar los estados de transición, como MC/MM, ONIOM y MAC. Entre estos se utilizó el Método de Aproximación de Clúster.<sup>30</sup> La aproximación se implementa con la estrategia de tránsito lineal, que recorre la coordenada de reacción de interés, permitiendo caracterizar una interacción específica. La figura 8, ilustra esta idea, para una coordenada de reacción (curva) y un conjunto de ellas (superficie).

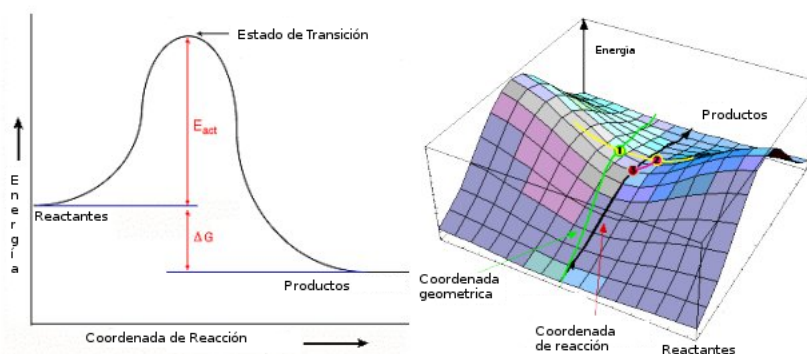


Figura 8.: Representación de una Curva de Reacción y una superficie de reacción.

En esta tesis utilizando el MAC se estudió la transferencia de un átomo de hidrógeno desde el carbono  $\alpha$  del sustrato hacia el nitrógeno cinco ( $N_5$ ) del anillo isoaloxacina explorado así en detalle la coordenada de reacción. La energía asociada a este intercambio es mejorada al incorporar efectos solvente (dieléctricos), cálculos de frecuencia (entropía) y valores de dispersión.

## 1.5. Aproximación de Clúster

Para comprender los mecanismos de reacción que dominan una enzima, la química cuántica representa la reacción enzimática como un encaje inducido,<sup>31</sup> el que constituye un complejo sustrato-enzima de máxima energía para el sistema en su estado de transición.

La Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (MC/MM) fue un primer método para representar estos sistemas, introducido en 1976 por Warshel y Levitt.<sup>32</sup> A finales de los años ochenta se propuso una metodología distinta de para enfrentar sistemas de gran tamaño, como los enzimáticos por la química computacional: el “*Método de Aproximación de Clúster*” (MAC) de modo de obtener una mayor correlación con datos experimentales, mejorar la exactitud de los métodos y disminuir los tiempos de los cálculos, resultando una metodología de relevancia teórica para elucidar mecanismos en sistemas biológicos.

Desarrollada por Siegbahn y cols,<sup>33</sup> la relevancia científica de la Aproximación de Clúster consiste en la reducción de los recursos computacionales y la mayor exactitud de los resultados para las energías de reacción, comparados con los métodos MC/MM. Esto, debido a que los errores que genera la interfase de métodos no existen, sólo se toma un segmento limitado y altamente representativo del sitio de reacción en la enzima.

Además el MAC permite cuantificar elementos que en las otras metodologías son pobremente descritos: efecto solvente, efecto sustituyente, contribución entrópica y otras modificaciones energéticas que ejerce el sistema, ya que se trabaja con sistemas simplificados, pero altamente representativos de la enzima.



## 1.6. Propuesta de Tesis

El estudio del mecanismo de la hMAO-A sigue siendo controversial debido a la falta de pruebas suficientemente consistentes para la demostración de una de las opciones descritas previamente. Al estudiar teóricamente este sistema, Erdem y col,<sup>1922</sup> han comparado estos mecanismos de reacción propuestos utilizando cálculos semiempíricos PM3 y metodologías como ONIOM, utilizando cálculos DFT, sin embargo, no fue posible discriminar cual mecanismo es el correcto.

En ese contexto, se propone obtener más antecedentes a nivel microscópico de los mecanismos propuestos. **Específicamente determinar mediante metodología de aproximación de clúster los estados de transición probables para los complejos Enzima-Sustrato. Con el conocimiento de estos estados de transición se podrá definir más claramente cuál de los mecanismos sería el más eficiente para hMAO-A.**

## HIPÓTESIS

*Entre los mecanismos propuestos para la deaminación oxidativa que cataliza hMAO-A, todos requieren la formación del complejo isoaloxazina-sustrato, que puede ser representado por métodos químicos cuánticos. Es así como la caracterización el estado de transición de dicho complejo, determinado mediante aproximación de clúster, discriminaría el tipo de mecanismo que ocurre en la enzima.*

## OBJETIVO GENERAL

Establecer las bases que guían el mecanismo de la oxidación en Monoamino Oxidasa A humana.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS Y ACCIONES

1. Implementar la aproximación de clúster en el estudio de mecanismos de monoamino oxidasa A
  - a) Replicar la metodología en un sistema modelo sencillo.
  - b) Determinar el estado de transición y sus correcciones para dicho modelo.
  - c) Comparar con otros resultados, tanto teóricos como experimentales, validando la metodología.
2. Determinar el complejo proteína-ligando y los residuos involucrados en las interacciones principales

- a) Seleccionar los mejores sustratos para hMAO-A para estudios de acoplamiento molecular.
  - b) Hacer estudios de Docking a partir de la estructura cristalina con sustratos seleccionados.
  - c) Observar el papel de la orientación de los sustratos hacia el sitio activo de la enzima.
  - d) Analizar el papel de residuos aminoacídicos que interreactúan para el centro de reacción.
  - e) Observar el papel de la hidratación de la cavidad de reacción.
3. Validar la metodología para modelar mecanismos de monoamino oxidasa A para un sustrato modelo.
- a) Aplicar la metodología al sustrato Serotonina.
  - b) Estudiar el cambio en las variables del sistema luego de varias correcciones. (efecto solvente, dispersión, otras contribuciones energéticas)
  - c) Aplicar criterios de validación del experimento. Comparación con resultados experimentales y teóricos

---

---

## CAPÍTULO 2

---

# METODOLOGÍA

*La ciencia es una sola luz, e iluminar con ella cualquier parte, es iluminar con ella el mundo entero.*

Isaac Asimov

Escritor de Ciencia Ficción

Químico y Bioquímico

### 2.1. Construcción de Sustratos y Ajuste de Cargas

La construcción y optimización a nivel DFT/B3LYP de los sustratos, serotonina, dopamina, noradrenalina y triptamina (protonada y neutra) se realizó utilizando Gaussian03<sup>34</sup> con el conjunto de base 6-31g (d,p). Posteriormente se trabajó con el programa RED.III.51 Tools para determinar las cargas RESP.<sup>35</sup>

## 2.2. Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) y Funciones de base

El método de cálculo que resulta necesario para utilizar la aproximación de clúster es la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT).<sup>3637</sup> Esta es la metodología más exacta y robusta que se puede utilizar en la actualidad para estos estudios, ya que incluye en su descripción términos de correlación e intercambio de alta exactitud. La DFT considera los efectos de correlación e intercambio electrónico en el clúster.

Para la obtención de las estructuras electrónicas y optimización de la geometría de los sistemas moleculares en cálculos DFT se utilizó una funcional popular en estudios de sistemas y mecanismos orgánicos, B3LYP.<sup>37</sup> Los motivos para el uso de esta funcional son fundamentalmente dos:

Primero, en términos de energía y geometría la funcional B3LYP es superior que otros funcionales DFT disponibles en la actualidad para un sistema de las características del clúster enzimático. Segundo, su exactitud es comparable con la del método *ab initio* más exacto disponible en la actualidad.

El conjunto de funciones de base que permiten generar los orbitales que definen la densidad electrónica se caracterizan por ser bases de tipo gaussiana (GTO: gaussian type orbital), utilizándose las bases 6-31g(d,p) y 6-311g(d,p). Estas bases se utilizaron incluyendo elementos capaces de considerar la polarización, que adiciona 5 orbitales d y uno s para los elementos distintos a hidrógeno.

Otros detalles sobre DFT se pueden encontrar en el Anexo [A](#)

## 2.3. Docking: Autodock 04 y Vina

Docking es una técnica que busca predecir las interacciones no enlazantes entre macromoléculas o más frecuentemente de macromoléculas y moléculas pequeñas, de forma eficiente. Con el objetivo de describir las conformaciones de enlace y afinidad de los sustratos en el sitio.

Para los estudios de docking se utilizó la estructura cristalina 2Z5X de hMAO-A en ausencia de ligando. Utilizando ADT<sup>38</sup> se prepararon los sustratos para los estudios de acoplamiento molecular y se estos fueron realizados en el centro de la cavidad, específicamente, entre las dos tirosinas del sitio activo. El volumen de la caja fue de 20 puntos La evaluación se realizó en AutoDock4 (AD4).

### 2.3.1. Selección de Poses de Docking

Posteriormente con el programa Discovery Studio<sup>39</sup> se realizó el alineamiento de las mejores estructuras con las estructura cristalina completa. En este proceso se superponen y editan los clústers incluyéndose las aguas estructurales y dejando solo en las estructuras los átomos requeridos para el MAC, luego del análisis de conformaciones.

### 2.3.2. Selección de Aguas Estructurales

Por otra parte, se analizaron las aguas estructurales del sitio activo, aplicando en el programa AutoDock Vina un método desarrollado por Ross y Cols en 2012.<sup>40</sup> El análisis de las entradas se realizo usando PyMol.<sup>41</sup> La interpretación de estos resultados se realizo considerando el trabajo de Bairagya y cols.<sup>42</sup>

Más detalles de los métodos de Docking se encuentran en el Anexo B

## 2.4. Estudio de Reactividad y Función de Fukui

Se incluyó en esta tesis un estudio de reactividad química según los índices de reactividad químicos descritos para DFT conceptual por Pearson, Parr y Yang.<sup>43</sup> Estos índices (como las funciones de Fukui) están descritos en el Anexo C; e incluyen el potencial químico, la electronegatividad, la electroafinidad, los índices de nucleofilia y electrofilia, como también cuantificaciones de la dureza y blandura globales. Todos estos cálculos se realizaron para constantes dieléctricas de 0, 2, 4, 12 y 20, para las estructuras de Isoaloxacina, 5-HT, DA, NT, BEA y FEA. Se analiza el efecto solvente en estos descriptores globales de Reactividad.

A través de las funciones de Fukui se exploró la reactividad local. Se determinó la electrofilia local en la isoaloxacina con el fin de determinar la posición más favorecida al intercambio del hidruro en la región de la Isoaloxacina con las distintas monoaminas, entre las cuales se propone  $N_5$ ,  $C_{4a}$  o  $N_1$ . El valor de las poblaciones iniciales se calculó en B3LYP/6-31g (d,p) determinando las poblaciones según el modelo Natural Bonding Orbital<sup>44</sup> (NBO).

Finalmente, a semejanza del trabajo de Rivas y colaboradores<sup>45</sup> se calcularon y compararon descriptores regionales de blandura para las monoaminas.

## 2.5. Aproximación de Clúster

El procedimiento que se trabaja en la aproximación de clúster es seleccionar un conjunto de definido y pequeño de átomos del sistema biológico (entre 50 a 200 átomos) que sean relevantes para la reacción enzimática. Esto toma dos aproximaciones para representar el entorno enzimático (ausente en el sistema a calcular), la primera que deja rígidos algunos átomos en el espacio modelado denominado Sistema mínimo de coordenadas fijas (SMCF) para modelar el efecto estérico y el método polarizable continuo (MPC), para aproximar el efecto eléctrico sobre el sistema.<sup>30</sup>

En el SMCF se seleccionan algunos átomos terminales, en una zona de truncamiento de la enzima, y se dejan fijas sus coordenadas. Esto mantiene la estabilidad estructural del conglomerado que representa al sitio de reacción. Los átomos rígidos impiden la pérdida de la forma que la estructura representa, manteniendo el resto del sistema estéricamente estable por los enlaces e interacciones que se calculan.

El Modelo Continuo polarizable<sup>46</sup> (MCP) corresponde a una aproximación utilizada para explicar el efecto solvente e implementada en el programa Gaussian03, determinando una constante dieléctrica continua por todo el sistema con solvente no explícito. Corresponde a representar una nube de cierto potencial que rodea todo el espacio con una cierta constante dieléctrica.

El MAC se usa para encontrar el estado de transición del sistema utilizando Transito Lineal (*Linear Transit* o LT) donde optimizan una serie de distancias en la coordenada de reacción para determinar entre qué valores puede estar el estado de transición.

Se realizó una exploración de la coordenada de reacción en la superficie de potencial, utilizando la transferencia del átomo de hidrógeno desde el carbono  $\alpha$  del sustrato hasta el  $N_5$  de la Isoaloxacina, en intervalos de 0,1 o 0,2 Å para la una exploración de la coordenada de reacción en la superficie de potencial, como si una línea recorriera los puntos de reactantes y productos. La energía máxima corresponderá al punto donde se busca determina el estado de transición. El estado de transición se obtiene calculando el Hessiano de éste estado de transición en Gaussian03 con un calculo de frecuencia.

El cálculo de la energía libre final para el clúster en su estado de transición considera ciertas correcciones, como una mejora en la base utilizada, el efecto solvente del MPC, la energía de punto cero, la entropía del sistema y la dispersión.<sup>46</sup> Los valores de energía de punto cero (ZPE) y entropía se obtienen de un cálculo de termoquímica en Gaussian03, los que son utilizados en kcal/mol. La dispersión representa interacciones no covalentes intermoleculares de tipo atractivo en corto rango, como fuerzas de Van der Waals y London, que no superan más de 1 kcal/mol de energía en las reacciones biológicas. Esto se determina utilizando el programa



XYZ Viewer.<sup>47</sup> Esta corrección se hace debido a que B3LYP solo considera los elementos intermoleculares repulsivos, aumentando la energía al despreciar estas interacciones en su cálculo.

---

---

## CAPÍTULO 3

---

# DOCKING SOBRE hMAO-A

*Si quieres tener buenas ideas, tienes que tener muchas ideas. La mayoría de ellas serán erróneas, y solo tienes que aprender cuáles desechar.*

Linus Pauling  
Premio Nobel de Química 1954

### 3.1. Estudios de Docking

A partir del estudio del docking de cuatro sustratos seleccionados, Se evaluará la orientación en el sitio activo de hMAO-A (PDB 2Z5X), cuales son los residuos más importantes en contacto con los ligandos, como también describirá el papel de las aguas dentro del sitio activo para dos de estos sustratos.

### 3.1.1. Criterios de Selección de Sustratos

Para la selección de los sustratos a trabajar, se utilizó como primer criterio los valores de constantes de Michaelis-Menten, que cuantifican la afinidad de la enzima para la formación de productos para los distintos sustratos. Por su lado, la similitud estructural entre dopamina y noradrenalina, como entre serotonina y triptamina resulta particularmente llamativa de comparar entre ellas. Las tres primeras moléculas con buena afinidad para hMAO-A, mientras que la triptamina, una amina exógena y neurotransmisor de traza es una molécula de baja metabolización por hMAO-A. Sus constantes de Michaelis-Menten (explicadas en el Anexo D) están en la Tabla 1.

Tabla 1.: Constante de Michaelis-Menten para Sustratos hMAO-A

Sustrato	K <sub>m</sub> ( $\mu$ M)
Dopamina (DA)	212 $\pm$ 33
Noradrenalina (NA)	284 $\pm$ 17
Serotonina (5-HT)	137 $\pm$ 21
Triptamina (TA)	35 $\pm$ 5

### 3.1.2. Estudio de Orientaciones por Docking

Los estudios de docking para dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y triptamina (TA), cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 9. Se realizaron considerando estas moléculas en estado desprotonado y protonado utilizando Autodock 4.

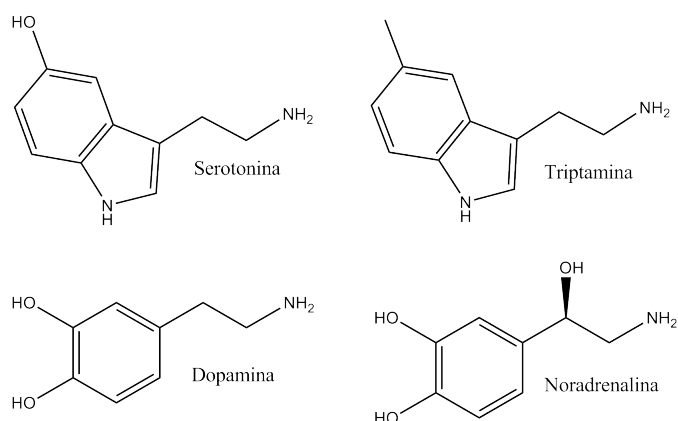


Figura 9.: Estructuras moleculares de sustratos de hMAO-A.

Tabla 2.: Energías de unión para neurotransmisores en estado neutro y protonado

Sustrato	Energías de unión Sus. Neutro (kcal/mol)	Energías de unión Sus. Protonado (kcal/mol)
Dopamina	-5,15	-6,97
Noradrenalina	-6,52	-6,68
Serotonina	-5,02	-6,98
Triptamina	-5,95	-7,16

Los resultados obtenidos del estudio de docking representa 8 conformaciones seleccionadas. La Tabla 2 muestra las energías de unión para cada pose seleccionada de los estudios de docking en sustratos.

Se observa que las energías calculadas para los sustratos cargados son menores que para los sustratos neutros, lo que se puede asociar a una mayor estabilidad estructural de las poses obtenidas en las especies protonadas versus los acoplamientos de especies desprotonadas.

La selección de la mejor conformación en cada experimento de docking, consideró los siguientes criterios, todos ellos apoyados en la literatura: - Presencia del neurotransmisor dentro o cerca de la caja aromática (Y407-Y444) - Perpendicularidad de los planos de la Isoaloxacina y

de entrada del neurotransmisores - Orientación del amino en dirección al anillo de isoaloxacina  
 - Posicionamiento del H del carbono- $\alpha$  en posición pro-R - Presencia de alguna interacción que estabilice al amino en posición cercana a  $C_{4a} - N_1$

### 3.1.3. Dopamina

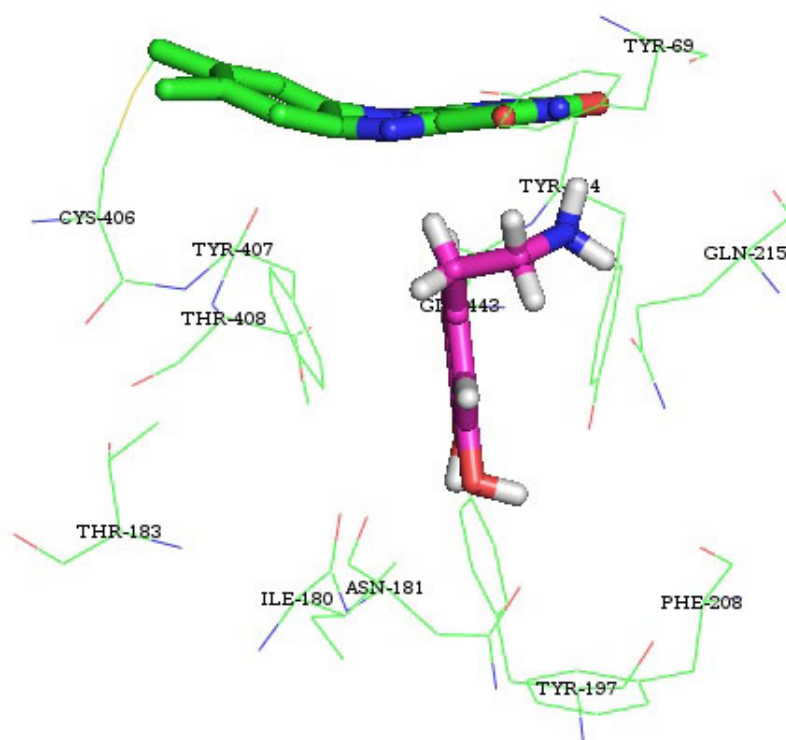


Figura 10.: Pose de dopamina neutra en sitio activo hMAO-A (color rosa). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X)

En la Figura 10 los residuos que interactúan con la dopamina son Y407, Y444, N181, Y197, Q215 e Y69. La Figura 9 ilustra la mejor configuración de interacciones obtenida en AD4 dentro del sitio activo para DA en estado neutro. Existe una distancia de 2.5 Å entre  $N_5$  y el protón pro-R del carbono  $\alpha$  de DA. El sustrato se ubica con el grupo amino orientado en

dirección al FAD y el protón pro-R.

La Y444 se observa fuera de alineamiento para describir una interacción de apilamiento  $\pi$ ; sin embargo, en el plano de acoplamiento se estima que existe una interacción hidrofóbica entre los anillos de dopamina e Y407.

Se detectan tres puentes de hidrógeno que estabilizan esta conformación: Y197 con el grupo hidroxilo del catecol; N181 con ese mismo grupo hidroxilo catecol y Q215 con  $\text{NH}_2$  del sistema, que favorece el posicionamiento del carbono  $\alpha$  hacia el FAD y da la idea de torsión del sistema promoviendo una posición de enlace favorable para la abstracción del protón pro-R.

Las interacciones que Y69 puede presentar están relacionadas con la estabilización de la Q215 y el FAD en el sitio, mientras que Y197 podría aparecer por interacciones a largo rango con los hidroxilos de dopamina.

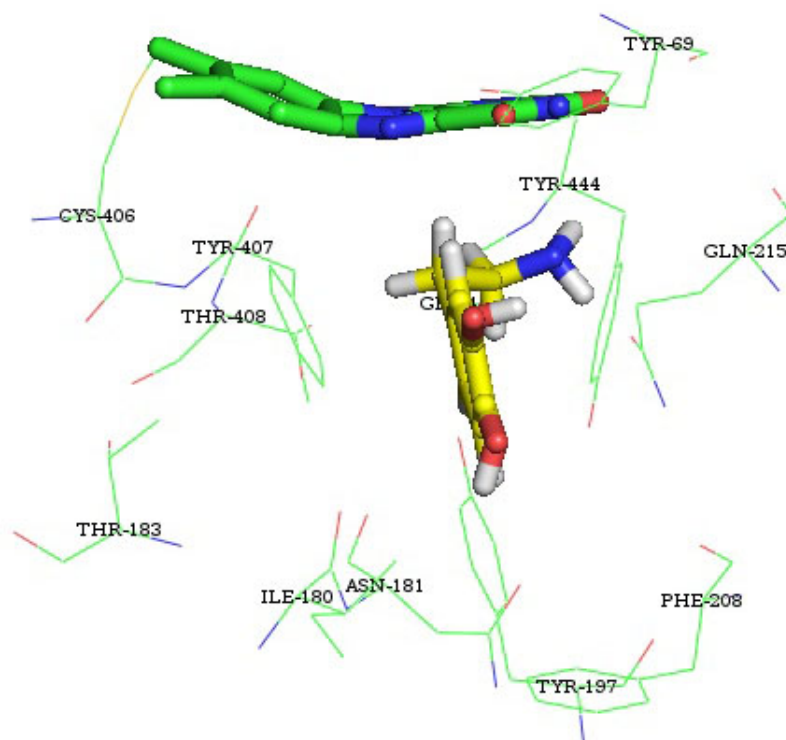


Figura 11.: Pose de dopamina cargada en sitio activo hMAO-A (color amarillo). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X)

Al realizar el docking para Dopamina protonada ninguna de las conformaciones obtenidas muestra las características descritas para una reacción favorable. La conformación más cercana se muestra en la Figura 11. Los aminoácidos que interactúan con hMAO-A en esta pose son Y197, Q215, Y444, Y407, F352, N181 e I180. Esta conformación ubica al amino en dirección contraria al FAD con el sistema apuntando los hidroxilos del grupo catecol hacia la zona del anillo isoaloxacina. Es la pose con más puentes de hidrógeno de todas las visualizaciones del estado protonado: Se observa un puente de hidrógeno entre el grupo amonio e Y407. Los otros dos puentes se observan entre hidroxilos catecólicos y dos residuos: N181 e Y197. A pesar de la estabilidad, el complejo DA-hMAO-A no se muestra como precursor de la reacción.

## 3.1.4. Noradrenalina

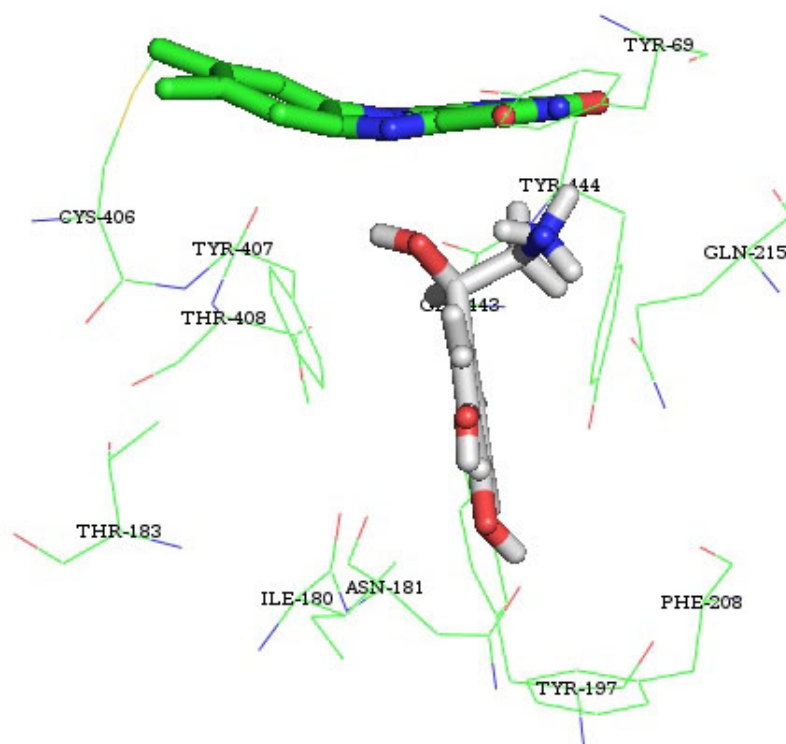


Figura 12.: Pose de noradrenalina neutra en sitio activo hMAO-A (color plateado). El grupo isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X)

Al realizar el Docking en AD4 para NA neutra, ilustrada en la Figura 12; los residuos que interactúan con NA son Y407, Y444, N181, Y197, Q215, G443, Y69, para dicha conformación. La amina se orienta hacia el FAD. Presenta un claro apilamiento  $\pi$  entre el catecol y las tirosinas; como también tres puentes de hidrógeno que estabilizan la estructura: Q215 con hidroxilo del carbono  $\beta$ , Y197 con hidroxilo del catecol y N181 con el otro OH catecol.

En contraste, para el caso de noradrenalina cargada, mostrada en la Figura 13, la mejor orientación del sustrato no es adecuada para la reacción a pesar de contener muchas interacciones de estabilización. Existen cinco puentes de hidrógeno en la pose: I180 con grupo amonio, N181



con grupo amonio, N181 con OH catecol, Y197 con hidroxilo catecol e Y407 con hidroxilo beta de la cadena en noradrenalina.

Los residuos que interactúan en la conformación de NA neutra son I180, N181, Y197, G443, T183, Y407, F352, Q215 e Y444.

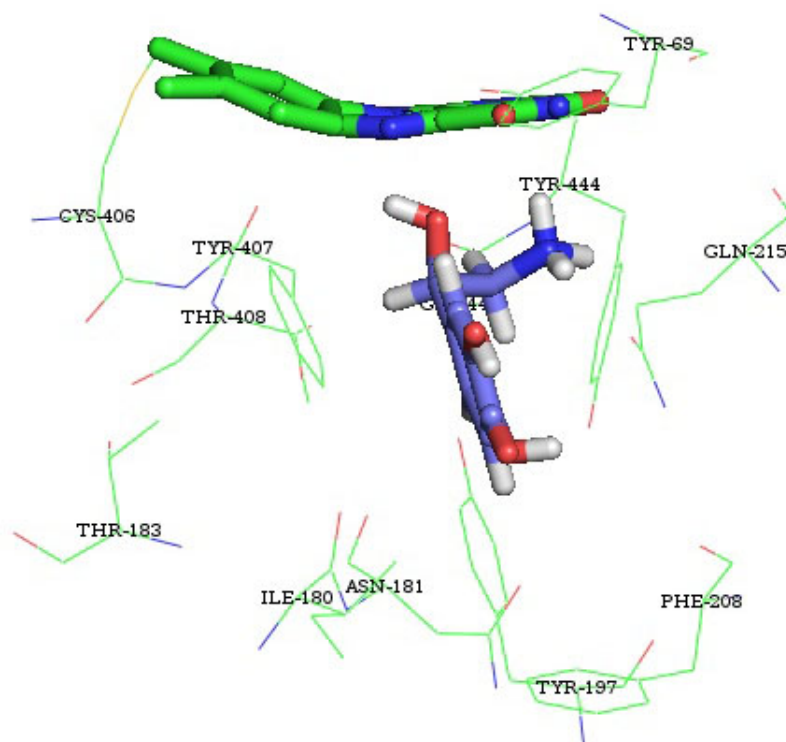


Figura 13.: Pose de noradrenalina cargada en sitio activo hMAO-A (color azul). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X)

### 3.1.5. Serotonina

5-HT dockeada en hMAO-A (PDB: 2Z5X) utilizando AD4 tiene una distancia calculada en la pose para la interacción el hidrógeno del carbono  $\alpha$  del sustrato y el  $N_5$  de 4.358. Los residuos involucrados en la interacción de esta pose son Q215, Y407, I180, N181, Y444, Y69.

Se observa en la Figura 14 que el grupo amino enlazado a la cétona del FAD por medio de un puente de hidrógeno. Este mismo tipo de interacción se observa con el residuo Q215 con la amina. Estos puentes de hidrógeno pueden ser consecuencia de una interacción polar no-enlazante entre el  $C_{4a} - N_1$  y el nitrógeno de la amina.

El hidroxilo del sustrato presenta otro puente de hidrógeno con N181 que estabiliza la estructura por la zona posterior del sitio activo y entrega un ángulo entre los vectores dirección de la serotonina y la isoaloxacina de aproximadamente  $15^\circ$ . Esto eleva a la región alílica de la serotonina y alinea adecuadamente entre las tirosinas 407 y 444. Por otra parte, en la Figura 14 se aprecia la torsión de la isoaloxacina, que se cree tiene relación con el aumento de la basicidad de sus nitrógenos. Este se conserva desde la estructura cristalina inicial.

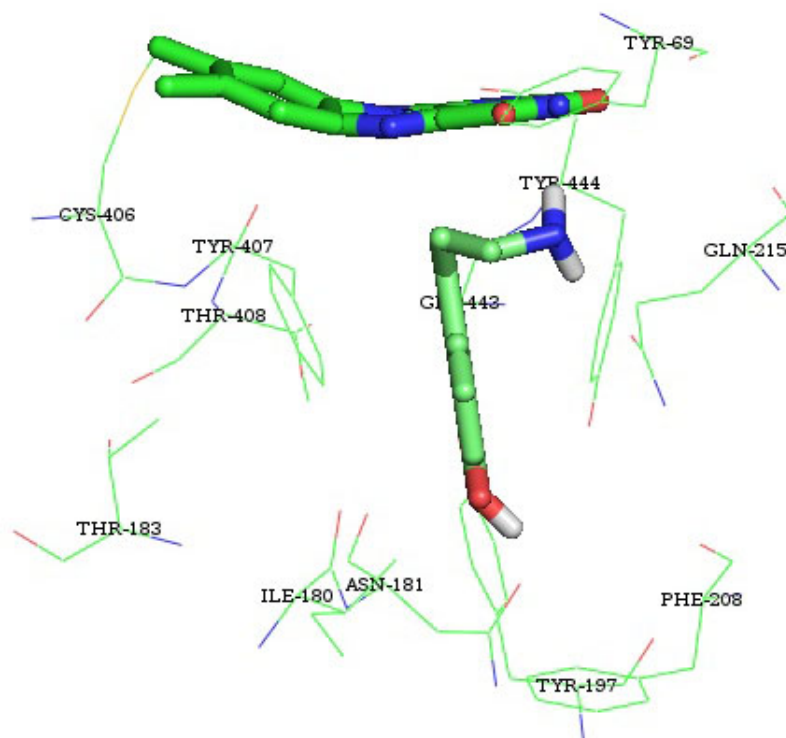


Figura 14.: Pose de serotonina neutra en sitio activo hMAO-A (color verde). El grupo isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X)

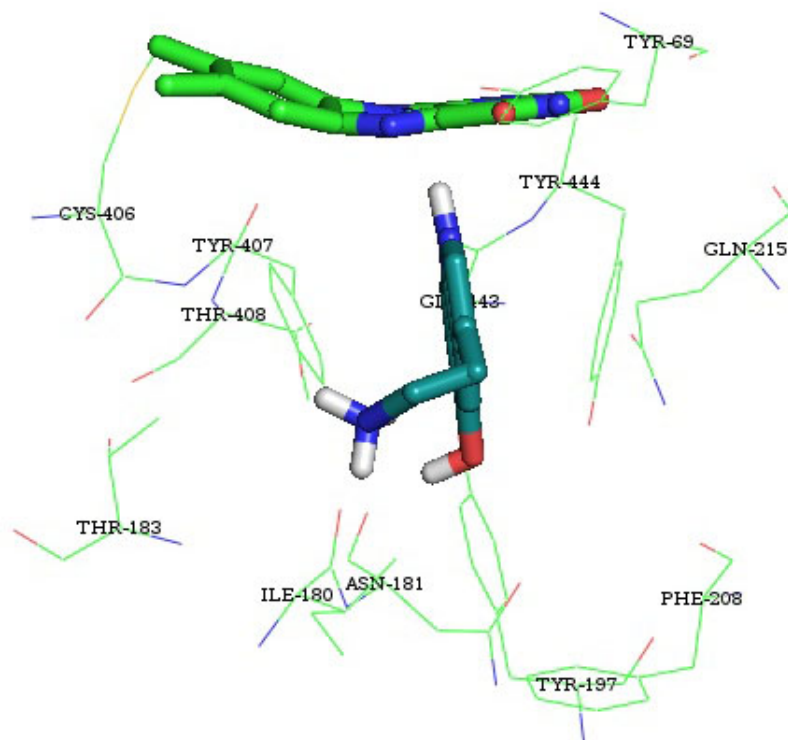


Figura 15.: Pose de serotonina cargada en sitio activo hMAO-A (color azul). El grupo isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X)

En el caso de 5-HT cargada la mejor conformación corresponde a la de menor energía, con  $-6,98$  kcal/mol como puntuación. La conformación se aprecia en la Figura 15 mostrándose la amina lejos del FAD a pesar de que se ilustra un apilamiento tipo  $\pi$  en el sistema. Los resultados muestran tres puentes de hidrógeno en esta disposición: hidroxilo de 5-HT con N181, grupo amonio con Y407 y nitrógeno del indol de 5-HT con la cétona del FAD.

En estas condiciones, La protonación del sustrato muestra desfavorecida la interacción con el sitio de reacción, quedando capturado el grupo amonio en la zona posterior de la cavidad hidrofóbica. No se encontraron modos de unión donde exista una conformación favorable para la reacción. Los aminoácidos de la conformación corresponden a Y444, Y407, N181, I180, Q215, F352 e Y69.

### 3.1.6. Triptamina

Para esta molécula se aprecia un apilamiento  $\pi$  entre los anillos de tirosina y el sustrato, en la Figura 16. El grupo amino interactúa con el grupo carbonilo de la isoaloxacina por medio de un puente de hidrógeno. La distancia H- $N_5$  es de 4.182 Å. Los residuos que interactúan con la triptamina son Q215, N181, I180, Y444, Y407, G443, Y197, Y69. Pueden existir interacciones tipo dipolo-dipolo entre la región nitrogenada del anillo indólico y los residuos N181 e I180. La Y197 y G443 se muestran orientadas con la Y407, cual se asignó como residuo móvil de la conformación en el docking. También se observa que Q215 presenta interacciones con el grupo amino que estabilizan al sustrato en esa conformación.

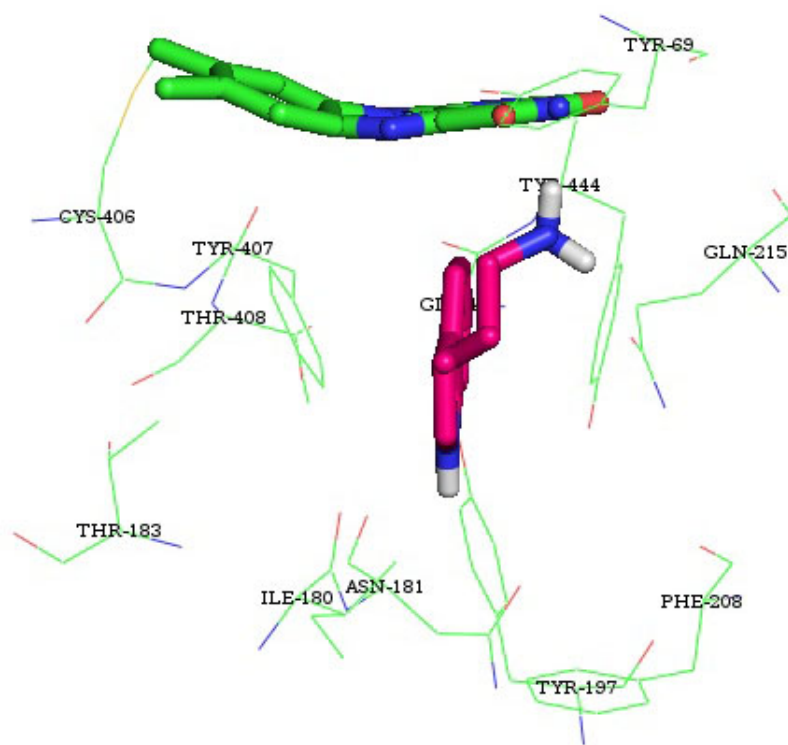


Figura 16.: Pose de triptamina neutra en sitio activo hMAO-A (color fucsia). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X)

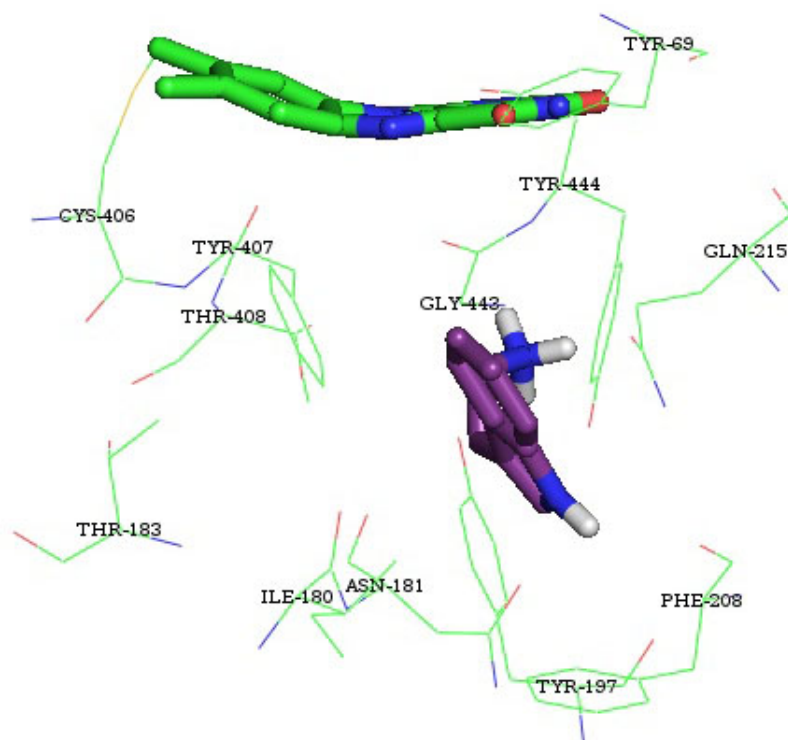


Figura 17.: Pose de triptamina cargada en sitio activo hMAO-A (color amarillo). El grupo Isoaloxacina se observa como una estructura de varas, mientras las líneas representan los aminoácidos del sitio activo. (PDB: 2Z5X)

Por último, el docking en AD4 de la molécula Triptamina protonada los mismos residuos que interactúan con la TA en esta pose son Q215, I180, Y444, Y407, F352, Y69. El sistema muestra en la conformación un apilamiento  $\pi$  y la distancia relativa entre  $N_5$  de FAD y amino es de 12,343 Å. Hay un puente de hidrógeno en la conformación que corresponde a N del indol y el carbonilo  $O_2$  del FAD, lo que estabiliza la conformación no reactiva. La F352 es el residuo que podría ser responsable de la orientación de la amina de la TA hacia los residuos posteriores del sitio activo, como se muestra en la Figura 17.

### 3.1.7. Análisis de Conformaciones de Sustratos

A partir de los estudios de docking es posible confirmar que el sitio activo de la hMAO-A corresponde a una cavidad altamente hidrofóbica. Los principales aminoácidos que interactúan con hMAO-A son Y407, Y444, I180, N181 y Q215. Las interacciones entre Y407 e Y444 son fundamentales en la orientación del sustrato en la dirección adecuada para que la especie pueda ser reactiva. El apilamiento  $\pi$  entre la enzima y el neurotransmisor debe contribuir a la disminución de las energías del sistema, ya que en el docking de las especies protonadas no se observa dicha interacción, sus energías promedio son más altas que en las especies no protonadas que sí la presenta, siendo esta interacción también un criterio de la estabilidad de la enzima para un determinado sustrato.

Un resumen de los residuos que interactúan con la mejor pose en cada acoplamiento molecular muestra en la Tabla 3. En ella se aprecia que los residuos Y444, Y407, N181, I180, N181, Q215 e Y69 son los residuos que presentan el mayor número de interacciones. El residuo Q215 e N181 destacan por la alta frecuencia de esta fuerte interacción no covalente con los sustratos de hMAO-A.

Tabla 3.: Resumen de residuos que interactúan en los acoplamientos moleculares

	Y444	Y407	Q215	N181	I180	Y69	Y197	T183	T352	G443
DA 0 AD4	X	X	X	X		X	X			
DA + AD4	X	X	X	X	X		X		X	
NA 0 AD4	X	X	X	X		X	X			X
NA + AD4	X	X	X	X*	X		X	X	X	X
5-HT 0 AD4	X	X	X	X	X	X				
5-HT + AD4	X	X	X	X	X	X			X	
TA 0 AD4	X	X	X	X	X	X	X			X
TA + AD4	X	X	X		X	X			X	

Las mejores conformaciones de los neurotransmisores en estado neutro presentan puentes de hidrógeno entre N181 o I180 con los sustituyentes no hidroxilo de los anillos. Los hidroxilos de

catecol en DA y NA y el hidroxilo de 5-HT se ven estabilizados con dicha interacción. La N181 presenta un grupo amino capaz de hacer puentes de hidrógeno desde los residuos posteriores y la I180 un residuo hidrofóbico que contribuye en la orientación del sustrato en el sitio.

El residuo Q215 aparece en todas las conformaciones, presentando puentes de hidrógeno frecuentemente, desde la región superior del anillo de isoaloxacina sitio, siendo esta una interacción que disminuye la distancia entre  $N_5$  de FAD y el carbono  $\alpha$  de los NTs. Su rol es facilitar la orientación del sustrato en posición reactiva, ubicando el grupo amino hacia la dirección de la región de la isoaloxacina con carbonilos (donde se presenta  $N_1$  y  $N_3$ ).

Cuando está presente se considera una mejor conformación para la reacción. Las poses de neurotransmisores neutros presentan un puente de hidrógeno del grupo amino con el carbonilo-2 del FAD o con Q215, siendo esta interacción favorable para el sustrato. La relevancia del residuo Y69 en las conformaciones radica en la estabilización hidrofóbica con el sustrato e interacciones intermoleculares con otros residuos, particularmente los de la caja aromática. Este residuo es también considerado en el trabajo de Vianello y cols,<sup>13</sup> por su importancia en la estabilización del complejo proteína-sustrato.

En algunas de las conformaciones también existen interacciones de contacto cercano (como pueden ser dipolo-dipolo) con G443, Y197, F352, C408, T183, C406 y F208. Estos aminoácidos resultan ser auxiliares en las conformaciones no-protonadas, pero en las poses en que los neurotransmisores llegan protonados toman mucha importancia. Estos residuos podrían ser capaces de desviar la trayectoria de ingreso de los neurotransmisores al sitio de reacción, siendo otro antecedente respecto al ingreso de los sustratos de manera desprotonada. Para confirmar esto se deben hacer estudios de mecánica molecular. Estos aminoácidos también interactúan con puentes de hidrógeno y probablemente con interacciones dipolo-dipolo con el amino protonado que lo orientan hacia estos residuos, evitando las conformaciones de enlace y reacción con el centro activo. Estas interacciones inclinan a los sustratos dejando a grandes distancias (sobre 5 Å) del sitio de reacción. La abstracción del hidrógeno se hace muy difícil en estas condiciones.

Los residuos que interactuaron en todos los acoplamientos desprotonados fueron Y407, Y444, N181, Q215, Y69 e Y197. La pose obtenida en AD4 para DA y 5-HT neutras son buenos precursores para un sistema de aproximación de clúster.

Al comparar las interacciones de los neurotransmisores catecólicos estudiados (DA y NA) se aprecia los puentes de hidrógeno con los hidroxilos del anillo, que estabilizan las estructuras en la posición de reacción. Estos puentes por lo general se observan con el residuo N181. Las puntuaciones de los docking de DA fueron menores que las de NA, esto permite pensar que la estructura de NA es más inestable que la de DA en el sitio de la hMAO-A. El grupo hidroxilo pro-R en el carbono beta debería ser el responsable de esta diferencia de energía. El efecto estructural deslocaliza la carga del carbono- $\alpha$ , explicándose los mayores valores de constante de afinidad para NA.

Los docking de neurotransmisores indólicos, 5-HT y TA podrían ayudarnos a entender la afinidad que dichos sustratos presentan en hMAO-A. La 5-HT es un sustrato más bien específico de MAO-A, mientras que la TA no es un buen sustrato. La diferencia estructural entre ambos se encuentra únicamente en el grupo hidroxilo de la posición 5 del indol. Este sustituyente presenta efectos electrónicos sobre la 5-HT aumentan su reactividad. Esto, sumado a la estabilización del hidroxilo por residuos posteriores dentro del sitio de hMAO-A llevaría a hacer mucho más probable la reacción de la 5-HT que la de TA neutra dentro del sitio. Las poses corroboran esta idea al mostrar mayor cantidad de interacciones observadas en las poses. El clúster de serotonina para MAC se extrae de la pose obtenida en AD4, que muestra la mayor conformidad entre todos los docking con los criterios estructurales inicialmente descritos.

Asumiendo que el sustrato pudiese llegar al sitio activo protonado, el trabajo de Zapata-Torres y cols.<sup>6</sup> describe el anclaje de parte de las estructuras protonadas con los aminoácidos de la región posterior del sitio activo (N181, V210, I325, I335, I180), lo que hace improbable la obtención de conformaciones favorables para la reacción cuando el sustrato está cargado. Además, las características hidrofóbicas del sitio activo disminuyen las energías calculadas por el docking, lo que puede deberse a la desviación o falta del apilamiento  $\pi$  con las Y444 e Y407 en



las poses obtenidas. Estos resultados son coherentes con nuestras simulaciones y comprueban la importancia de dichas interacciones en la formación de un complejo activo enzima-sustrato.

Por otra parte, todos los mecanismos descritos para la MAO ocurren con el sustrato desprotonado. Ninguna de las propuestas mecanísticas descritas en la literatura ha sido descrita para sustratos protonados, por la imposibilidad de conseguir estructuras de partida que sean capaces de llevar la reacción a cabo. Por las pruebas encontradas en este análisis estructural y los recientes trabajos de Edmonson y Vianello, la búsqueda de mecanismos en las especies protonadas no resulta tener interés científico en la elucidación del mecanismo por ser una vía no reactiva dentro del sitio activo.

### 3.2. Aguas estructurales

A partir de los antecedentes estructurales, se exploró el rol de las aguas funcionales a la estructura cristalina de hMAO-A. Esto es posterior al alineamiento de las estructuras dockeadas. Este estudio fue realizado para las moléculas 5-HT y DA en su estado neutro a partir de la estructura cristalina original.

Desde una perspectiva química, las aguas que se encuentran cristalizadas no son aguas rígidas en la estructura y pueden desplazarse libremente. Sin embargo, las aguas conservadas tienen una mayor probabilidad de encontrarse en ciertas posiciones y presentan una tarea de carácter en la estructura o reactividad de la enzima.

El criterio para la determinación de las aguas estructurales es el descrito por el experimento propuesto por Ross y cols. y utilizado en AutoDock Vina (ADV) en el cual se estudió el acoplamiento molecular de moléculas de aguas dentro de la estructura cristalina 2Z5X (a la cual se le eliminaron los datos de aguas, surfactante y sustrato). Las aguas dockeadas al interior de la enzima se muestran en la Figura 18. En ella los átomos de oxígeno representan las moléculas de agua dentro del sistema.

Destacan moléculas de agua que aparecen sobre el anillo de isoaloxacina del FAD, cercanos a Y444 y entre el FAD y G215. La mayor cantidad de aguas cercanas al FAD se distribuyen alejados del átomo de Azufre de la C406. La Figura 18 también ilustra un conjunto de aguas cercanas a I180 y N181, las cuales se encuentran altamente dispersas en el experimento. Finalmente se observa en la zona central un conglomerado de aguas reunidas, justo en la posición donde se debe ubicar el sustrato. Se seleccionan cuatro de estas aguas, las que fueron incluidas en la estructura del clúster, junto a los neurotransmisores.

Se seleccionaron estas cuatro moléculas de agua predichas por diferentes funciones que realizan dentro del sitio:

- Presencia en el sitio activo y en la estructura del sistema.
- Reportes que sugieren funcionalidad análoga.
- Posibilidades de reacción: Capaces de dar explicaciones a protonaciones probables y transferencias descritas.

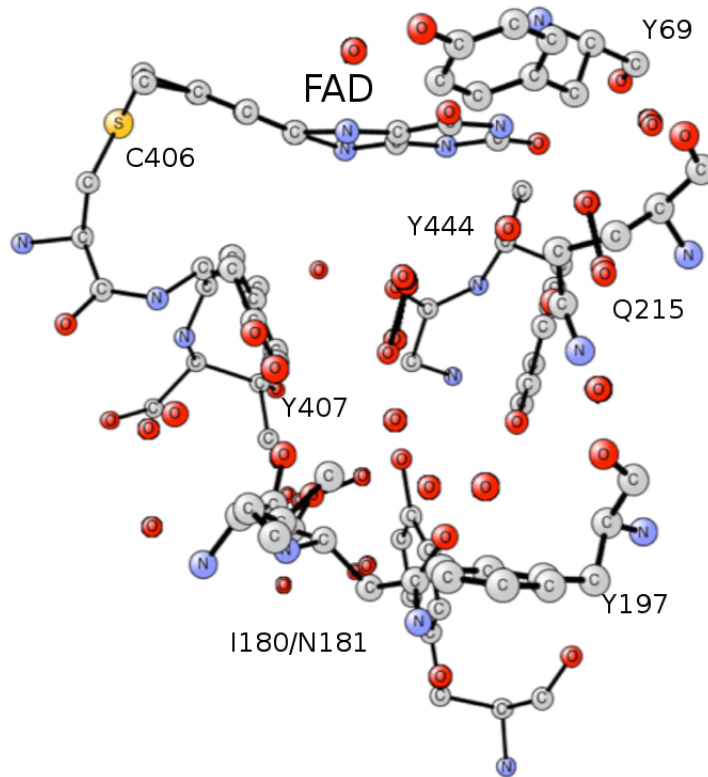


Figura 18.: Aguas conservadas predichas. De este experimento se tomaron las coordenadas de solo cuatro de éstas, las que también presentan documenta su importancia.

Las Figuras 19 y 20 muestran las aguas de los sistemas.

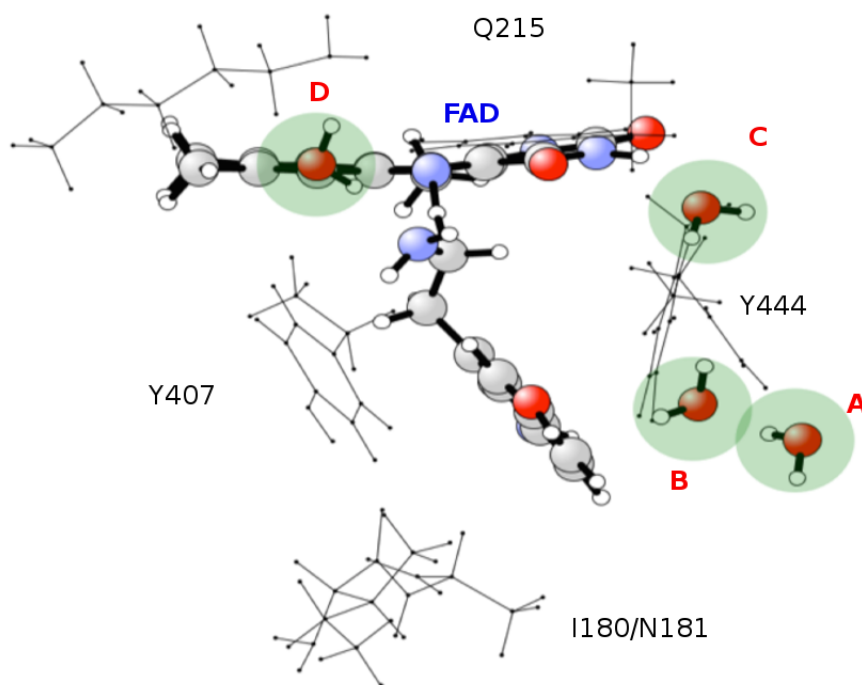


Figura 19.: Aguas en sitio activo de hMAO-A con 5-HT.

La molécula de serotonina incluye cuatro aguas en su clúster. Estas moléculas podrían tener varias funciones de interesantes dentro de los mecanismos. En el orden que está puesto en la Figura 19, una de las moléculas indicada como A cumple roles orientadores direccionando a la 5-HT. Esta molécula podría desplazar la posición del residuo Y444 afectando la posibilidad de existencia del apilamiento pi que orienta a los sustratos al centro de reacción. Las aguas B y C descritas para un mecanismo de Grotthus con el sistema que se relaciona con el más reciente mecanismo de hidruro. La molécula de agua C podría además ser desprotonada por la isoaloxacina para protonar al  $N_1$  y formar el  $FADH_2$  de la reducción completa de está molécula. Finalmente, la molécula de agua D representada sobre la lisina se presume tiene un papel sobre el residuo, desactivandola por una protonación. En la Figura 20 se muestran las aguas conservadas en la estructura de clúster de la dopamina.

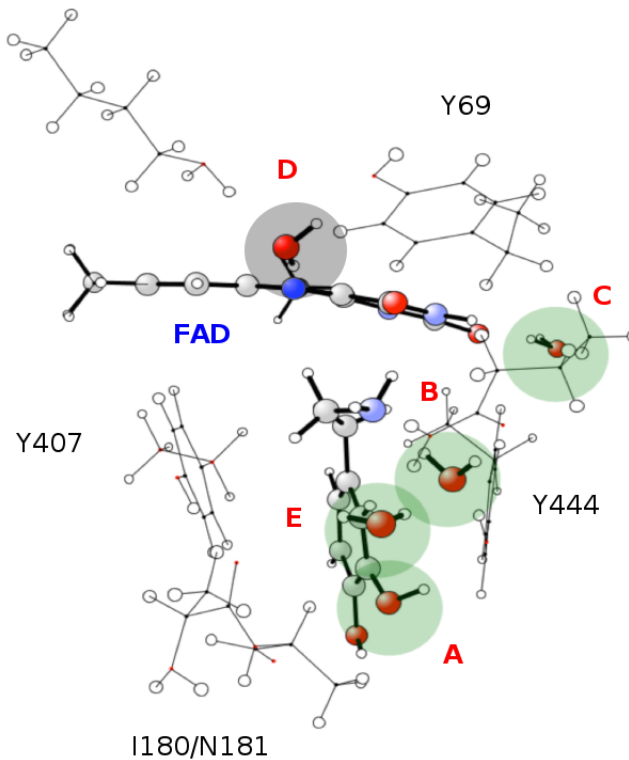


Figura 20.: Aguas estructurales de hMAO-A (PDB: 2Z5X) en el clúster de dopamina neutra. En esta figura se observa en el centro el neurotransmisor y el grupo isoaloxacina. Las moléculas señaladas con un área circular son las aguas más relevantes.

Al comparar con la Figura 19 con la Figura 20, se observa que hay una convergencia en el caso de las aguas estructurales de las posiciones de las cuatro moléculas de agua en los dos clústers como su importancia funcional valida a estas moléculas de agua seleccionadas como estructurales. La conservación de estas moléculas indica que son frecuentes en las estructuras, como se puede observar también en otras oxidases y que las interacciones aparentemente favorables de las moléculas con su entorno, a pesar del carácter hidrofóbico de los residuos que rodean a los neurotransmisores en la MAO-A.

---

---

## CAPÍTULO 4

---

# MECANISMOS DE REACCIÓN

*El futuro es incierto... pero esta incertidumbre está en el corazón mismo de la creatividad humana*

Ilya Prigogine  
Premio Nobel de Química 1983

*La determinación del mecanismo de reacción para hMAO-A se realizó utilizando la metodología de aproximación del Clúster. En este apartado se muestran los resultados para un sistema mínimo Isoaloxacina-Bencilamina y para el mecanismo con el Clúster construido con 5-HT; para los mecanismos Transferencia Directa de Hidruro y Radicalario (Fitzpatrick y Silverman, respectivamente)*

## 4.1. Modelo mínimo: Bencilamina

La implementación del método de aproximación de clúster se realizó con el sustrato más simple para la hMAO Bencilamina ( $C_7H_9N$ ), una molécula que a temperatura ambiente es líquida e incolora, que corresponde a un grupo bencilo enlazado a una amina. Esta molécula presenta un pKa de 11,4 a 20°C y resulta nociva al ingerir, por lo que no tiene funciones biológicas conocidas. Se ha mostrado en estudios in vitro que es sustrato de Monoamino oxidasa, dándole nombre a una de las vías de metabolismo (la misma que ocurre para todas las moléculas en hMAO-A).

El sistema también incluye un anillo de isoaloxacina. Para la implementación se dejaron fijas las coordenadas del enlace H (pro-R)- $N_5$  de acuerdo a la Figura 2. Se realizaron cálculos de tránsito línea para el mecanismo de Hidruro (Fitzpatrick) y el mecanismo radicalario (Silverman). La carga de ambos modelos es 0, pero la multiplicidad es 1 y 3, respectivamente. El sistema mínimo construido se muestra en la Figura 21.

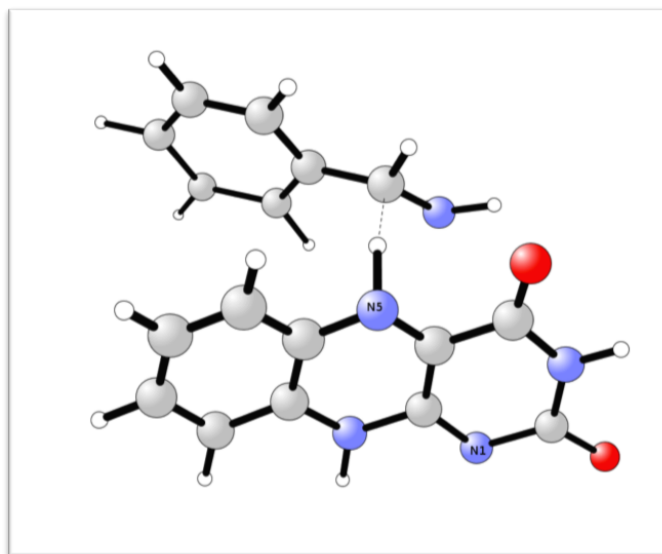


Figura 21.: Sistema mínimo, corresponde a una bencilamina con una isoaloxacina

Para obtener el estado de transición se realizó el tránsito líneal (entre el hidrógeno Pro- $R-N_5$ ) entre 3,2 a 1,0 Å con un intervalo entre puntos de 0,2 Å. La curva del tránsito líneal para el mecanismo de hidruro en la bencilamina se muestra en la Figura 22, donde el máximo corresponde a 22,6 kcal/mol a una distancia N-H de 1,2 Å. Una vez determinado el valor se procede a determinar el estado de transición a través de la optimización de este punto, con el posterior cálculo de frecuencia, con el fin de confirmar que se está en un estado de transición.

Con este valor del máximo en el tránsito líneal y en el estado de transición se procede a obtener cálculos de energía 'single point' de una base B3LYP/6-311+G(2d,2p). Esto se realiza con el objetivo de obtener valores más precisos, que consideren las diversas interacciones posibles del sistema que contribuyen a mejorar la energía libre. Por ello también se incluyen para la Energía de Punto Cero del sistema que corrigen la diferencia con el pozo de potencial; Energías de dispersión (DFT-D) y entropía que representan las interacciones no enlazantes y efectos conformacionales y las energías para diferentes dieléctricos, según el MPC, las cuales, de ser convergentes para diferentes valores de dieléctrico, validan el MAC, como ha descrito Siegbahn e Himo (2011).<sup>48</sup> Estos cálculos se realizaron también para las estructuras de los reactantes y los productos optimizadas. Los resultados se encuentran en la Tabla 4.

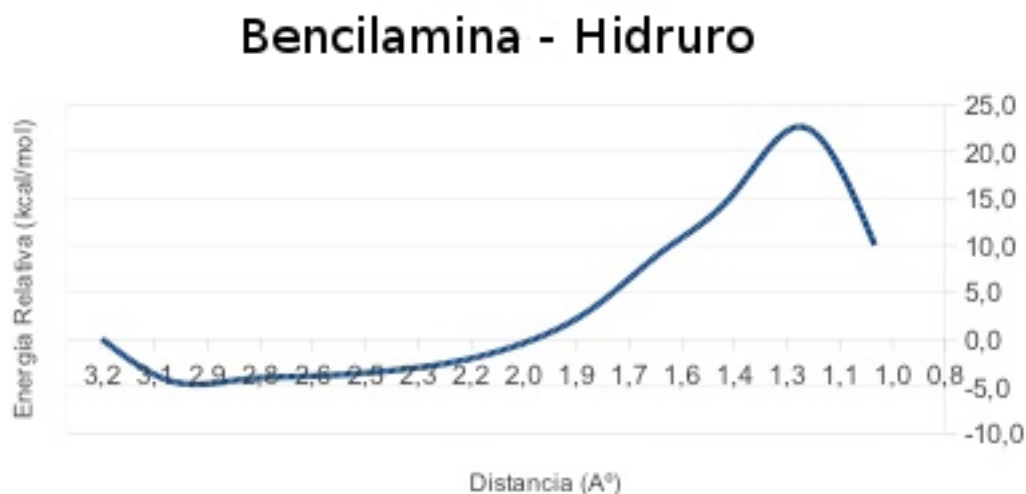


Figura 22.: Curva de tránsito líneal bencilamina con mecanismo de hidruro en isoaloxacina



Tabla 4.: Valores normalizados de parámetros termodinámicos del sistema Isoaloxacina-bencilamina para el mecanismos de hidruro.  
Iso=Isoaloxacina, Sus=Bencilamina

	Fase Gas	BBS	$\Delta_s(\epsilon)=8$	$\Delta_s(\epsilon)=78$	$\Delta_s$ ZPE	$\Delta_s$ S	$\Delta_s$ B3LYP-D	E total	Etotal
	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	$(\Delta)s e(\epsilon)=8$	$(\Delta)s(\epsilon)=78$
Iso+sus Hidruro	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TS Hidruro	22,68	24,75	3,25	3,66	-2,38	10,5	-11,59	24,55	24,95
Producto	103,87	96,85	-81,15	-92,84	-0,9	0,04	-0,48	14,37	2,68

Se puede observar que existe una disminución del valor de las energías libres a medida que se aplican las correcciones. Entre las columnas de fase gas a la de solvente, la energía va numéricamente, disminuyendo. Los otros valores son las correcciones que incluyen los efectos del número de conformaciones, la energía de punto cero (ZPE) y la energía de dispersión.

Posteriormente estos valores se normalizaron los valores por la suma de la energía de los reactantes, asignándole el valor de cero al sistema neutro de multiplicidad 1. A partir de los cálculos de las propiedades termodinámicas del efecto solvente (dieléctricos 7 y 20), la energía de punto cero, la dispersión y la entropía se obtuvo el valor de energías libres.

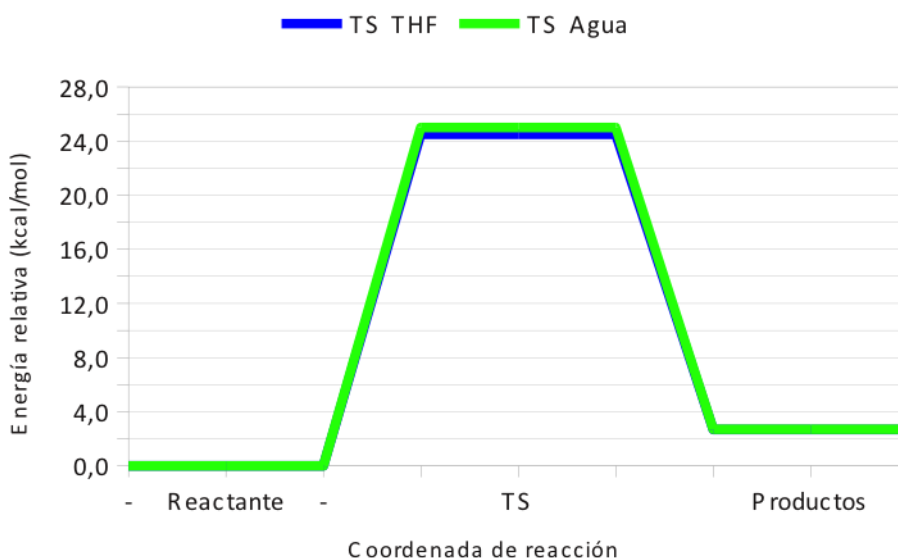


Figura 23.: Energía de Reacción, con su Estado de Transición obtenido para bencilamina en mecanismo de hidruro

Los valores de energía se representan en un gráfico de energía libre versus coordenada de reacción, correspondiente a la Figura 23. Cabe reforzar que la metodología del cálculo de esta energía (en kcal/mol) está dada por la suma de 5 energías: BBS + Dieléctrico + ZPE + Entropía + Dispersión. De los resultados se desprende que la energía de reacción en caso de hacerse en el dieléctrico del agua la reacción corresponde a 24,95, mientras que se hace en

un dieléctrico menor (aproximadamente 8) ( $pK_a \sim 20$ ) este valor disminuye en 0,5 kcal/mol. La convergencia de este valor a distintos solventes muestra que es casi independiente al efecto solvente y valida a nuestro modelo mínimo para usarse en la descripción del problema.

Para el mecanismo radicalario el sistema utiliza el mismo punto de partida, pero en el tránsito lineal de ambas curvas fue realizado independientemente. Esta reacción se calcula con carga del sistema 0 y multiplicidad 3. La curva del tránsito lineal se aprecia en la Figura 24. El punto máximo de este sistema ocurre en 1,7 Å con una energía de 47 kcal/mol.

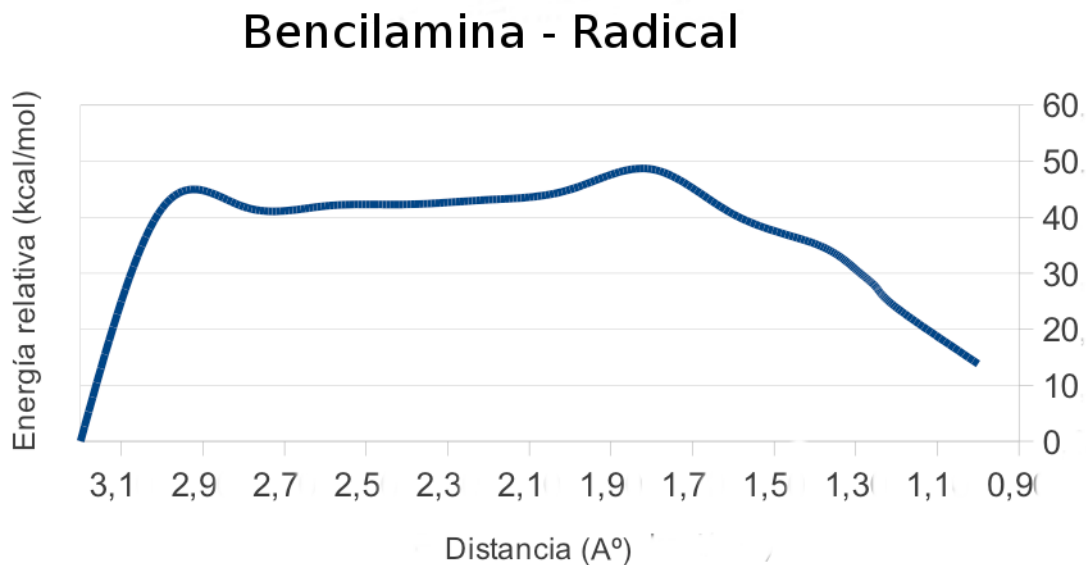


Figura 24.: Tránsito lineal del sistema bencilamina-isoaloxacina para mecanismo radicalario

De la curva se desprende que la reacción obtiene rápidamente una alta energía. Aplicando el mismo cálculo de normalización anterior.

Tabla 5.: Valores termodinámicos normalizados del sistema para bencilamina en mecanismo radicalario. // \*|iso=|soaloxacina;  
Sus=Bencilamina

	Fase Gas	BBS	( $\Delta$ )s ( $\epsilon$ )=8	( $\Delta$ )s ( $\epsilon$ )=78	( $\Delta$ )s ZPE	( $\Delta$ )s S	( $\Delta$ )s B3LYP-D	E total	Etotal
	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	E(kcal/mol)	( $\Delta$ )s ( $\epsilon$ )=8	( $\Delta$ )s ( $\epsilon$ )=78
Iso+sus radical	20,42	18,39	-0,56	-0,74	-1,63	-2,08	-0,2	13,93	13,75
TS radical	44,56	47,29	4,07	3,72	-4,08	7,37	-8,05	46,59	46,25
Producto	103,87	96,85	-81,15	-92,84	-0,9	0,04	-0,48	14,37	2,68

La Tabla 5 muestra las contribuciones energéticas al estado de transición de la bencilamina en un mecanismo radicalario. En la Figura 24 se grafican el estado de transición para el sistema mínimo por el mecanismo alcanza un valor de 46,56 kcal/mol en dieléctrico 8, mientras que para una constante dieléctrica como el agua es de 46,25 kcal/mol. Estos valores, al compararlos con otras reacciones enzimáticas, resultan ser demasiado altos, por tanto poco viable la reacción por la alta energía.

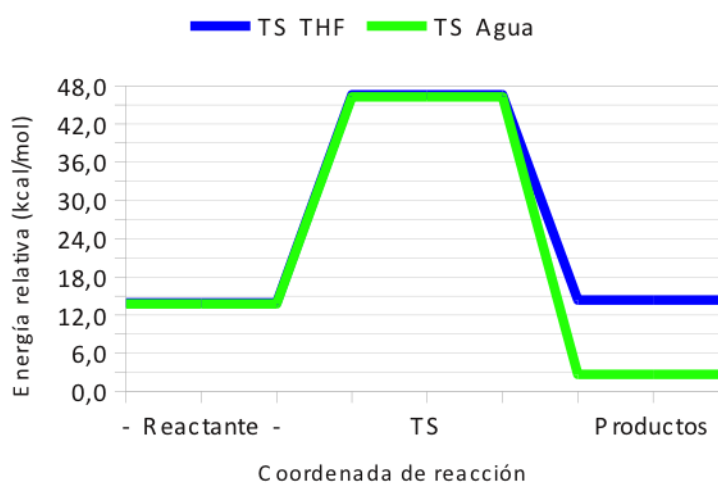


Figura 25.: Energía de Reacción, con su Estado de Transición obtenido para bencilamina en mecanismo radicalario

Los valores de energía entre la reacción de hidruro y la reacción polar nucleofílica difieren esencialmente porque en una se transfiere un hidruro y en otra un radical. Esta diferencia de energías entre ambos sistemas tiene su resolución en el mecanismo. Considerando el sistema mínimo la reacción con mayor posibilidad de ocurrir es la de menor barrera de energía libre, es decir, el de hidruro.

Con estos resultados se considera implementada el Método de Aproximación de Clúster y nos da un primer análisis del mecanismo. Para Bencilamina en el sistema mínimo corresponde al mecanismo de hidruro de Fitzpatrick.

## 4.2. Estados de Transición Clúster Serotonina

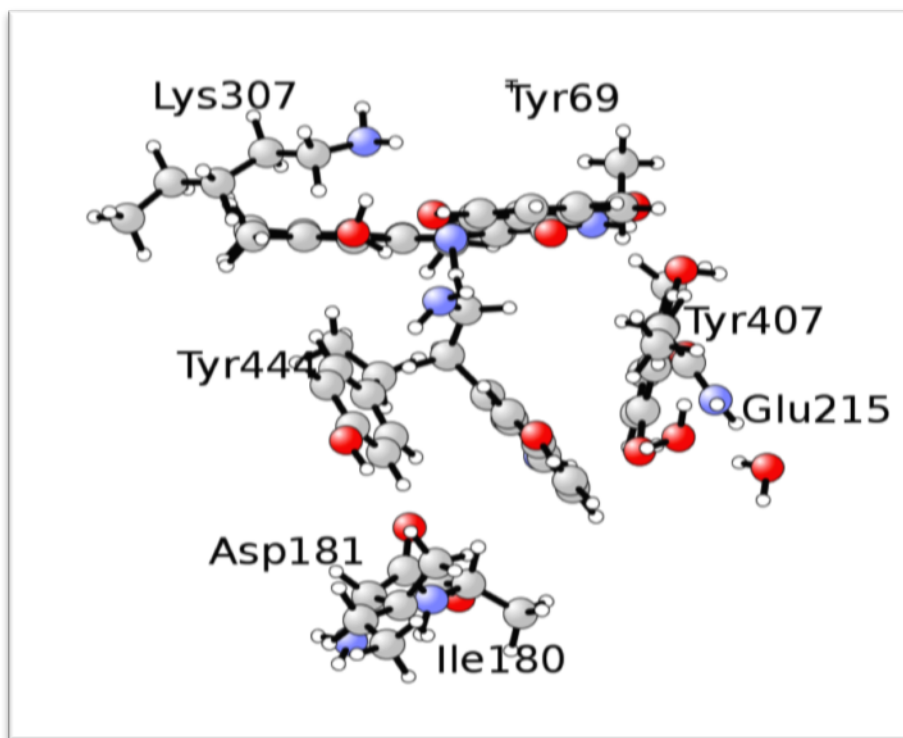


Figura 26.: Clúster de la Serotonina. Esta fue la estructura inicial para calcular los estados de transición de hMAO-A

El clúster de serotonina, muestra los residuos aminoácidos (Y69, I180, N181, L305, Y407, Y444) y las moléculas de agua en la Figura 26, como se indica en el análisis del capítulo 3. Además el anillo isoaloxacina de la flavina responde como el centro de reacción. Incluyendo la presencia de las cuatro aguas estructurales el sistema quedo completo discutidas en el capítulo anterior. El sistema de coordenadas fijas se implemento dejando con coordenadas determinadas a átomos del sistema en cuestión. Esta opción se denomina “frozen”

### 4.2.1. Mecanismo de Hidruro

Se logro caracterizar la curva de reacción de tránsito líneal de la reacción con 5-HT neutra, que se representa en el Figura 27. Su máximo esta en el punto 1,38 Å .Al respecto podemos describir que se realizó un barrido de optimizaciones entre 2,98 y 1,1 Å con pasos de 0,1 Å.



Figura 27.: Tránsito líneal 5-HT para mecanismo de hidruro

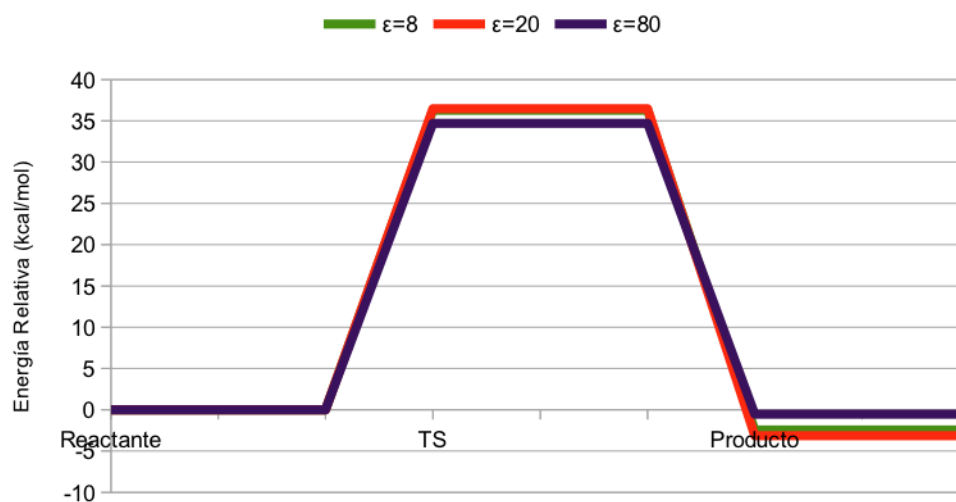


Figura 28.: Estado de Transición para hMAO-A de 5-HT con mecanismo de hidruro

La Figura 28 da cuenta del estado de transición obtenido para hMAO-A, con tres dieléctricos diferentes, correspondientes en orden creciente a los valores para THF, Acetona y Agua. El valor promedio, luego de normalizar según el valor del reactante, es de 35,69 kcal/mol para estado de transición. La Tabla 4.2.1 nos entrega la información numérica para este sistema. Se observa una convergencia de los valores de estado de transición y productos para el sistema, teniendo una desviación estándar de 0,72 kcal/mol lo que es baja considerando las bases y modelo utilizado.

Tabla 6.: Valores de Energía libre relativa en kcal/mol para distintos dieléctricos. Mecanismo de Hidruro

Condición ( $\epsilon$ )	Reactante	TS	Producto
Vacio (1)	0	35,29	-3,13
THF (8)	0	36,47	-2,44
Acetona (20)	0	36,28	-3,17
Agua (80)	0	34,7	-0,52



### 4.2.2. Mecanismo radicalario

Siguiendo el mismo procedimiento para el caso anterior; El tránsito líneal de la reacción de transferencia de electrones. Esta coordenada de reacción tiene su máximo a los 1,63 Å con una energía cercana a los 108,1 kcal/mol. La Figura 29 muestra la energía según la coordenada de reacción.

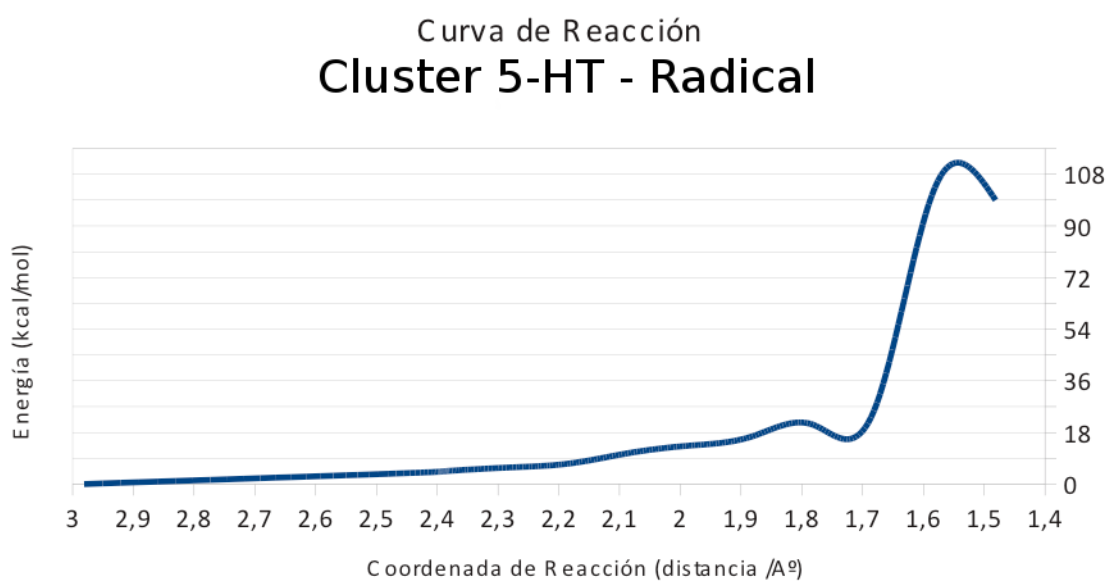


Figura 29.: Tránsito líneal 5-HT en Serotonina para mecanismo radicalario

Al determinar el estado de transición, se aplicaron los mismos dieléctricos anteriores. Los valores de energía obtenidos son documentado en la Tabla 4.2.2.

Tabla 7.: Valores de Energía libre relativa en kcal/mol para distintos dieléctricos. Mecanismo Radicalario

Condición ( $\epsilon$ )	Reactante	TS	Producto
Vacio (1)	0	94,96	-3,53
THF (8)	0	89,52	-3,24
Acetona (20)	0	90,78	-3,26
Agua (80)	0	87,65	-3,17

De los resultados obtenidos, los valores para el mecanismo radicalario bordean las 90 kcal/mol. Esto hace poco razonable esta vía la reacción por dicho mecanismo para el sistema. La Figura 30 es especialmente ilustrativa en la diferencia de energía que se observa para esta reacción.

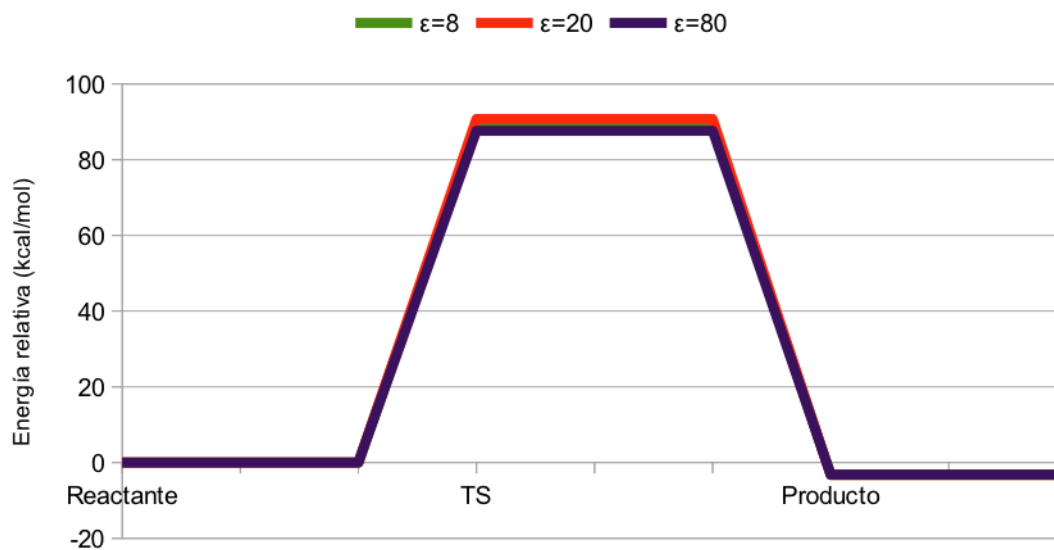


Figura 30.: Estado de Transición para hMAO-A por MAC con mecanismo radicalario

Considerando ambos mecanismos, podemos discriminar al mecanismo de hidruro como el responsable de la reacción de deaminación oxidativa en la Monoamino Oxidasa A humana, a la luz de los resultados expuestos.

### 4.3. Análisis de Estados de Transición por MAC

Con todos los antecedentes descritos, es de interés contrastarlo con otros trabajos del área.

Vianello y cols<sup>13</sup> desarrollan un trabajo similar, para hMAO-B en Dopamina, el cual aborda que los mecanismos propuestos son insuficientes para explicar la reacción y a partir de cálculos de sistema mínimo proponen que la reacción ocurre por un mecanismo de hidruro modificado, descrito en la introducción. Las energías que describen ellos son de 24,4 kcal/mol para un mecanismo de transferencia directa de hidruro y de 37,3 kcal/mol para un mecanismo polar-nucleofílico. Nuestro resultado para esta última reacción en hMAO-A está por sobre los valores por ellos obtenidos, pero sigue teniendo la menor energía entre los sistemas estudiados. En cambio, el resultado de nuestro sistema radicalario corresponde a un valor cuatro veces superior al de Vianello.

Respecto a los valores de la dispersión, estos son energías de pequeña magnitud numérica para hMAO-A, pero que representan interacciones no enlazantes muy relevantes en el cálculo energético del sistema biológico, como han mostrado otros estudios sobre enzimas.<sup>49</sup> Sin esta corrección la aproximación de clúster estaría incompleta para un sistema enzimático como éste, el cual presenta interacciones tipo  $\pi$ , dipolo-dipolo e hidrofóbicas que solo la dispersión es capaz de representar.

Las diferencias entre los resultados de nuestros modelos y otros publicados, puede ser a que nosotros consideramos en nuestro sistema muchos más residuos y electrones para representar el sitio activo, lo que da cuenta de un proceso mucho más específicos en el entorno directo

de la enzima. La estructura con la que modelan algunos autores este sistema es común en diferentes oxidasas (caja aromática), por lo que nuestro resultado lo consideramos más específico al problema planteado. Además, si observamos nuestro sistema mínimo (que no incluye nada más que BEA e Isoaloxacina) tiene valores de energías libres muy similares para ambas reacciones. Respecto a las distancias obtenidas, son de magnitudes similares. El mecanismo de radicalario, de ocurrir, es de 0,3 a 0,4 Å mayor que la reacción de transferencia de hidruro, para un mismo sistema.

Otro antecedente de interés son dos publicaciones de Erdem, de los años 2006<sup>22</sup> y 2011,<sup>19</sup> donde a nivel PM3 explora estas reacciones con sistema mínimo y ONIOM, sin las ventajas de la representación por aproximación de clúster. Las energías libres obtenidas para BEA con Isoaloxacina en diferentes condiciones geométricas varían entre los 22,19 y 43,66 kcal/mol para el mecanismo nucleofílico; mientras que en la transferencia biradicálica van de 44,30 a 66,18 kcal/mol. Ellos logran discriminar, con una base menor(HF/6-31G\*), la prevalencia del mecanismo polar nucleofílico por sobre el biradicálico, no así sobre el moelo de transferencia de hidruro.

Estos autores no hacen uso de la aproximación de clúster e indican ciertos grados de inexactitud en su estudio. También, al haber utilizado BEA como sustrato, se alejan de las condiciones biológicas del sistema, ya que BEA no resulta ser un neurotransmisor, si no una sustancia citotóxica. Su estudio eso si, clarifica muchas condiciones geométricas requeridas en la reacción y la relación estructura-actividad, que lo hacen muy valorable, pero no representa una solución a nuestro problema mecanístico al utilizar solo un sistema mínimo. Requerimos de incluir varios neurotransmisores que caractericen el sitio activo.

Nuestro trabajo tiene por ventaja la representatividad del sistema, como también valores convergentes a diferentes dieléctricos, que dan cuenta de la poca o nula variación del sistema, sean cuales sean las condiciones eléctricas internas dentro de hMAO-A. Clarifica también que la conformación, en el sistema estudiado debiese ser concertada, con las energías obtenidas para ambos mecanismos. Las energías obtenidas gracias al MPC corroboran al Método de

Aproximación de Clúster como una alternativa valida para enfrentar el problema del mecanismo, al obtenerse resultados con poca variación de energías libres en diferentes valores de dieléctrico, a un nivel DFT/6-311+G(2d,2p)

Finalmente podemos discriminar al mecanismo de transferencia de hidruro como el responsable de la reacción de deaminación oxidativa en la Monoamino Oxidasa A humana, a la luz de los resultados obtenidos por nuestro estudio. Esto es convergente con el trabajo de Vianello; pero una publicación de Orru<sup>23</sup> y cols en Marzo 2013 nos rebate nuestro estudio. Según los cinéticos de  $k_{cat}$  y estudios QSAR, la evidencia apunta a que hMAO-A y hMAO-B van por mecanismos distintos. hMAO-B por un mecanismo de hidruro (como comprueba para dopamina el equipo de Vianello) y hMAO-A por el mecanismo polar nucleofilico de Edmonson, pero en esté trabajo se observa que las energías más bajas son obtenidas en una representación del mecanismo de transferencia directa de hidruro.

---

---

## CAPÍTULO 5

---

# ESTUDIOS DE REACTIVIDAD QUÍMICA

*Únicamente los niños saben lo que buscan. Pierden el tiempo con una muñeca de trapo que viene a ser lo más importante para ellos y si se la quitan, lloran. . .*

Antoine de Saint-Exupery

El Principito - 1943

Para una mayor comprensión del comportamiento del sitio de reacción con neurotransmisores, se llevaron a cabo estudios de índices de reactividad descritos en la DFT conceptual. Una vez abordados se puede esclarecer el comportamiento de especies en su estado fundamental y caracterizar propiedades globales y locales del sistema, de modo de dilucidar los sitios más reactivos para el anillo y los neurotransmisores y los mejores sustratos al momento de ocurrir la reacción enzimática de la hMAO-A.

## 5.1. Índices de Reactividad Química Global

Se analizaron los descriptores de reactividad química para la Isoaloxacina, y las moléculas 5-HT, DA, NT, BEA y FEA. Los descriptores analizados a nivel B3LYP con base 6-31g (d,p) son potencial químico ( $\mu$ ), los índices de nucleofilia y electrofilia, dureza ( $\eta$ ) y blandura globales (S). La electronegatividad ( $\chi$ ), la electroafinidad ( $\alpha$ ), energía de ionización (I) son parámetros también estudiados para la determinación de algunos de los Índices de reactividad química global.

Es sabido que la densidad electrónica se modifica con el medio en que se encuentra. Para enzimas típicamente, el sitio activo tiene una constante dieléctrica entre  $\epsilon=2-20$ . De igual manera, los descriptores varían con la constante dieléctrica ( $\epsilon$ ), representada con el MPC para dieléctricos de  $\epsilon = 1$  (vacío),  $\epsilon = 2$  (Ciclohexano),  $\epsilon = 4$  (1-FluorOctano),  $\epsilon = 12$  (1-hexanol) y  $\epsilon = 20$  (Acetona). Este efecto podrá ser observado. En los Gráficos de este capítulo la constante dieléctrica va en orden creciente y representará los valores de dieléctrico antes indicados.

### 5.1.1. Potencial Químico

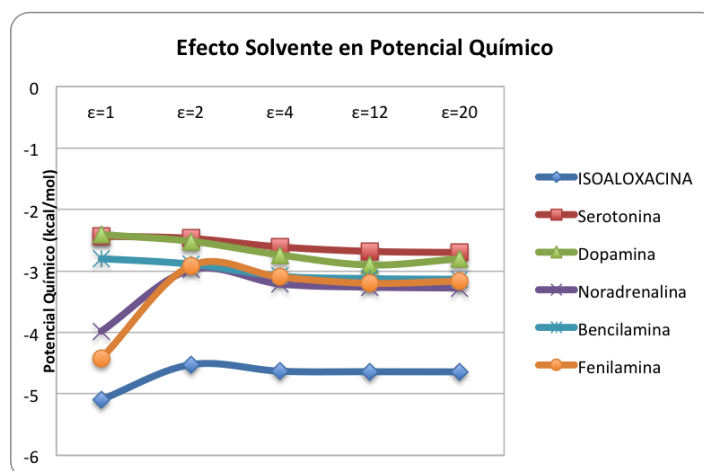


Figura 31.: Gráfico de Efecto Solvente en Potencial Químico.

El potencial químico  $\mu$  representa la facilidad de intercambio de la densidad electrónica de un sistema con el medio en estado fundamental. Esta propiedad permite determinar inequívocamente el flujo de la densidad electrónica para una reacción química. Al comparar los valores de  $\mu$  del anillo de Isoaloxacina con todos los neurotransmisores estudiados, se observa que sin importar el sustrato o la constante dieléctrica del medio que  $\mu_{\text{isoaloxacina}} < \mu_{\text{sustrato}}$  para todas las condiciones seleccionadas, como muestra la Figura 21. Esto confirma el carácter electrófilo en la transferencia total de hidruro desde las monoaminas al sitio.

Se observa que a medida que la constante dieléctrica aumenta, la brecha entre el potencial químico de monoaminas e isoaloxacina disminuye. Para DA de una diferencia inicial de 2,6 kcal/mol al vacío, pasa a una diferencia de 1,4 para medios de  $\epsilon = 20$ . Mientras que el potencial químico disminuye para la Isoaloxacina con la constante dieléctrica (es más fácil entregar electrones para ella), las monoaminas aumentan su potencial químico (les es más difícil entregar electrones en medios polares).

Esta tendencia puede explicar el abrupto cambio del índice de electrofilicidad para la Isoaloxacina con el aumento de la constante dieléctrica. Sus valores que toman son mostrados en la Tabla 8

Tabla 8.: Valores de Potencial Químico Electrónico con el efecto solvente.

	Potencial Químico				
	$\epsilon = 1$	$\epsilon = 2$	$\epsilon = 4$	$\epsilon = 12$	$\epsilon = 20$
ISOALOXACINA	-5,093	-4,524	-4,630	-4,638	-4,640
Serotonina	-2,431	-2,469	-2,609	-2,680	-2,699
Dopamina	-2,409	-2,515	-2,739	-2,902	-2,803
Noradrenalina	-3,980	-2,980	-3,211	-3,263	-3,276
Bencilamina	-2,794	-2,889	-3,083	-3,124	-3,13
Fenilamina	-4,422	-2,916	-3,099	-3,199	-3,164



### 5.1.2. Dureza

La dureza química es la propiedad que describe la resistencia de la molécula a un cambio en la distribución electrónica. La Tabla 9 muestra los valores de la dureza, que disminuyen para todas las especies con la constante dieléctrica. El mayor cambio apreciado entre el vacío y  $\epsilon=20$  es para BEA con 2,2 unidades, mientras que para FEA es de 0,3 unidades. No se observa una relación entre el tamaño de la molécula y la valor de la dureza.

Tabla 9.: Efecto Solvente en Dureza

	Dureza				
	$\epsilon = 1$	$\epsilon = 2$	$\epsilon = 4$	$\epsilon = 12$	$\epsilon = 20$
ISOALOXACINA	3,094	2,438	1,938	1,672	1,611
Serotonina	4,324	3,448	2,889	2,580	2,510
Dopamina	4,840	3,322	2,937	2,515	2,556
Noradrenalina	4,506	3,927	3,429	3,118	3,048
Bencilamina	5,330	4,249	3,612	3,275	3,199
Fenilamina	3,572	4,144	3,608	3,231	3,206

La Figura 32 ilustra esta tendencia, mostrando la estabilidad de la dureza con la variación del dieléctrico frente a otros compuestos. La Figura 32 muestra también como la Isoaloxacina es el compuesto menos duro del conjunto, continuando con su comportamiento esperado. Esto puede deberse a una óptima distribución de carga dentro del sistema, como muestra la Figura 33, con las superficies de energía potencial para la FEA.

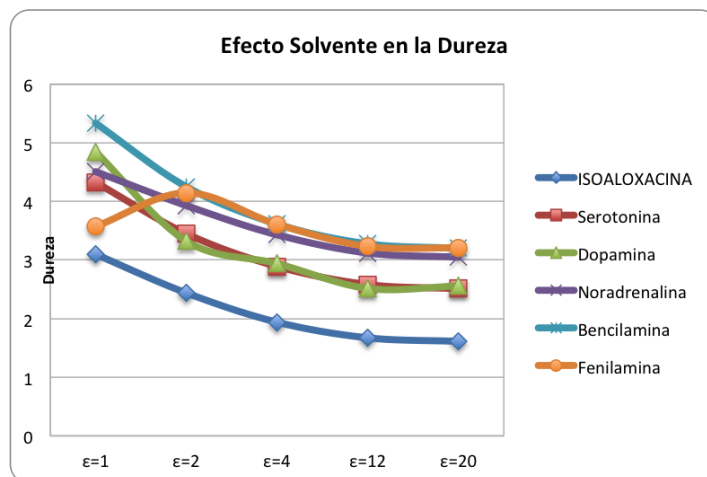


Figura 32.: Gráfico de Efecto Solvente en Dureza

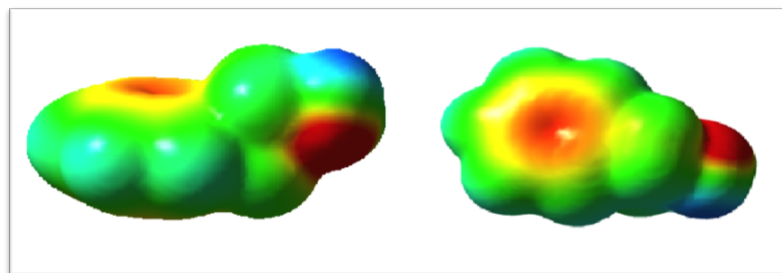


Figura 33.: Superficie de energía potencial de Feniletilamina

### 5.1.3. Blandura

La blandura, como propiedad recíproca a la dureza, representa de la facilidad de una especie química de modificar sus nubes electrónicas. En este caso, los valores más altos corresponden al electrófilo isoaloxacina, que presenta deslocalización de carga, que hace factible el mecanismo de reacción.

Los monoaminas seleccionados toman valores de blandura entre 0,187 y 0,398, como muestra la Tabla 10.

Tabla 10.: Efecto Solvente en Blandura en kcal/mol

	Blandura				
	$\epsilon = 1$	$\epsilon = 2$	$\epsilon = 4$	$\epsilon = 12$	$\epsilon = 20$
ISOALOXACINA	0,323	0,410	0,515	0,597	0,620
Serotonina	0,231	0,289	0,346	0,387	0,398
Dopamina	0,206	0,301	0,340	0,397	0,391
Noradrenalina	0,221	0,254	0,291	0,320	0,328
Bencilamina	0,187	0,235	0,276	0,305	0,312
Fenilamina	0,279	0,241	0,277	0,309	0,311

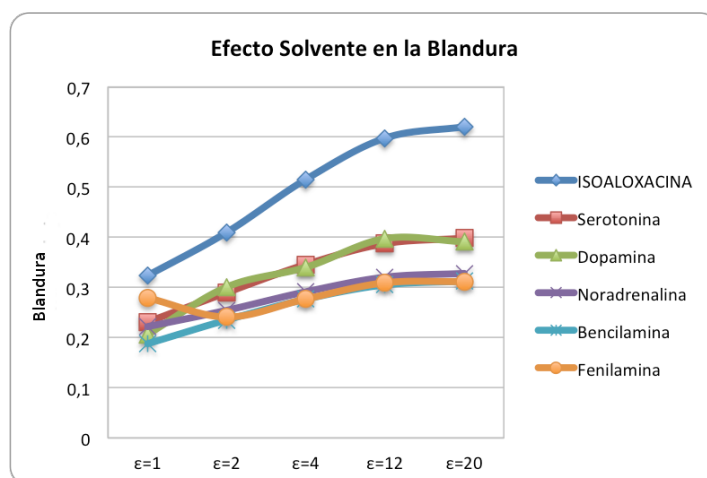


Figura 34.: Gráfico de Efecto Solvente en Blandura

La Figura 34 da cuenta del cambio de la blandura con el dieléctrico. En este podemos ver como los monoaminas se agrupan en la región de 0,3, mientras que la isoaloxacina aumenta considerablemente la blandura con la polaridad. A medida que aumenta la polaridad del medio este comportamiento genera una diferencia numérica mayor. Cabe destacar como también se agrupa DA con 5HT con una blandura cercana a 0,4 a  $\epsilon=20$ , mientras que NA, BEA y FEA no superan la blandura 0,3.

## 5.1.4. Índice de electrofilia

Tabla 11.: Efecto Solvente en Índice de Electrofilia en kcal/mol

	Índice de Electrofilia				
	$\epsilon = 1$	$\epsilon = 2$	$\epsilon = 4$	$\epsilon = 12$	$\epsilon = 20$
ISOALOXACINA	40,139	24,960	20,789	17,994	17,353
Serotonina	12,782	10,519	9,838	9,274	9,148
Dopamina	14,051	10,513	11,024	10,594	10,045
Noradrenalina	35,703	17,446	17,689	16,605	16,364
Bencilamina	20,819	17,734	17,169	15,985	15,721
Fenilamina	34,943	17,623	17,331	16,541	16,058

El índice de electrofilia es un indicador de la estabilización que adquiere una especie química cuando recibe densidad electrónica. En este caso, este indicador confirma que el electrófilo (es decir, la especie que recibe electrones en una reacción tipo sustitución-eliminación) es la Isoaloxacina, que para todos los valores de dieléctrico presenta el valor más alto. Esto es cuantificado en la Tabla 11.

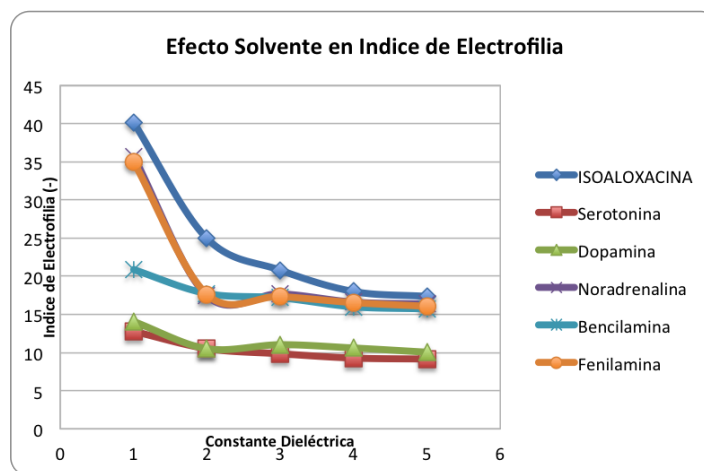


Figura 35.: Efecto Solvente en índice de Electrofilia.

Por otra parte, la Figura 35 da cuenta de como este índice se reduce abruptamente con el aumento de la polaridad del medio, llegando a ser muy cercano entre Isoaloxacina, BEA, FEA

y NA a  $\epsilon=20$ . Destaca la diferencia entre las electrofilias de DA y 5HT con Isoaloxacina, que es bastante alta, manteniendo a la Isoaloxacina como el electrófilo a todos los dieléctricos. Este puede ser un indicio de la razón que explica la gran afinidad a DA y 5HT por las oxidadas.

### 5.1.5. Índice de Nucleofilia

El índice de nucleofilia da cuenta del carácter nucleófilo, para el caso de una reacción de sustitución-eliminación de los monoaminas e Isoaloxacina. La Tabla 12 muestra los valores para los diferentes dieléctricos de esta propiedad. Los valores máximos se observan en 5-HT y DA, las que, a medida que aumenta el dieléctrico, aumenta el valor de dicho índice.

Tabla 12.: Efecto Solvente en Índice de Nucleofilia

	Índice de Nucleofilia				
	$\epsilon = 1$	$\epsilon = 2$	$\epsilon = 4$	$\epsilon = 12$	$\epsilon = 20$
ISOALOXACINA	0,0249	0,040	0,048	0,055	0,057
Serotonina	0,078	0,095	0,101	0,107	0,109
Dopamina	0,071	0,095	0,090	0,094	0,099
Noradrenalina	0,028	0,057	0,056	0,060	0,061
Bencilamina	0,048	0,056	0,058	0,062	0,063
Fenilamina	0,028	0,056	0,057	0,060	0,062

En la Figura 36 se ilustra lo expuesto en la tabla anterior, destacando cómo, con el aumento de la constante dieléctrica, el índice de nucleofilia para 5HT y DA aumenta hasta valores cercanos a 0,1. Esto puede explicar la alta afinidad de estos sustratos con las oxidadas y nos da luces de que aumenta con el efecto solvente.

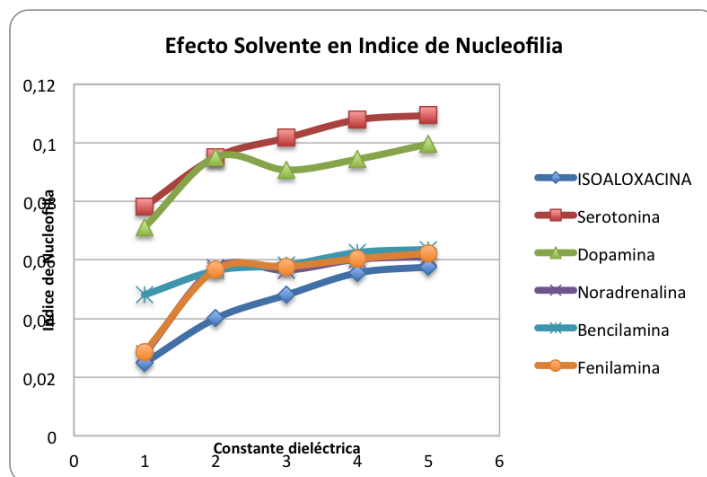


Figura 36.: Gráfico de Efecto Solvente en Índice de Nucleofilia

## 5.2. Función de Fukui Local y Electrofilia

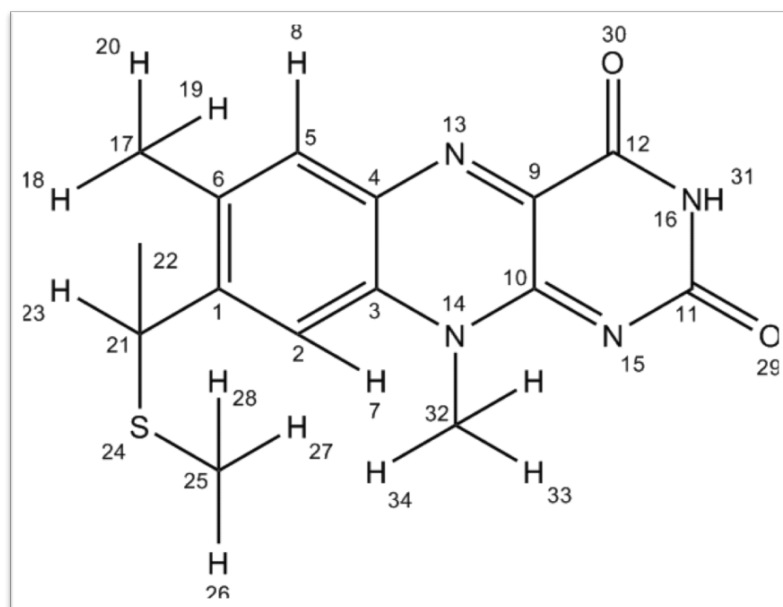


Figura 37.: Estructura Isoaloxacina y numeración de sus átomos.

La isoaloxacina como el centro electrofílico de la reacción puede ser explorada utilizando con la función de Fukui para describir los comportamientos de cada átomo del sistema. El cálculo de la electrofilia local y la electrofilia relativa,<sup>50</sup> para distintos dieléctricos, permite distinguir cual es el papel de cada uno de los centros atómicos en el mecanismo de MAO. La Figura 37 muestra a la numeración que tomaron los átomos de la molécula en este calculo, cuyos resultados se resumen en la tabla 13.

La primera observación interesante se encuentra en los átomos que son descritos en la literatura sobre hMAO-A<sup>1</sup>:  $C_{4a}$  (9),  $N_5$  (13) y  $N_1$  (15). Los valores de electrofilia local para cada uno de estos centros disminuye con el aumento del dieléctrico, pero aumenta el valor relativo de ésta. Esto significa que a pesar de la disminución de la intensidad de la propiedad para cada átomo, estos son más propensos a sufrir un ataque nucleofílico en medios de mayor polaridad.

Entre los tres átomos señalados como los responsables de la transferencia del hidruro en hMAO-A, el átomo con mayor electrofilia es el  $N_5$  (13), lo que es consecuente con las propuestas mecanísticas de Silverman y Fritzpatrick. El orden creciente de la electrofilia local es de  $N_1$  (15) <  $C_{4a}$  (9) <  $N_5$  (13). El trabajo de Orru y cols<sup>23</sup> también hace mención a esta posibilidad, por lo que el centro Reactivo descrito por Edmonson para el mecanismo  $S_N2$  no debiese ser el  $C_{4a}$ , sino que el  $N_5$ . Esto será relevante al momento de realizar el mecanismo por la aproximación de clúster. Sobre la electrofilia relativa de estos átomos el orden anterior se invierte, lo que da cuenta de que aquellos átomos con grandes funciones  $f^-$ , presentan también altos valores de  $f^+$ , siendo centros muy reactivos.

Respecto al resto de la molécula, la menor electrofilia la muestra el átomo de azufre (24), mientras los átomos menos electrofilos son los carbonos adyacentes al azufre, C (21) y C (25).

Sobre los valores de electrofilia relativa, estos no muestran una tendencia particular con la electrofilia local de los átomos de isoaloxacina. Si muestra esta propiedad relación con el aumento

<sup>1</sup>La numeración entre paréntesis corresponde a la 13 mientras que la de la isoaloxacina esta referida a la figura

de la electrofilia relativa de la mayoría de los átomos de la especie. Es decir, la Isoaloxacina tiene centros mucho más electrofílicos en solventes de mayor polaridad. En definitiva, esto esclarece cual es el átomo más electrofílico para la reacción de hMAO-A, y este corresponde a  $N_5$  (13) y la electrofilia de los átomos esta favorecida en ambientes con mayores dieléctricos.

Sobre esta sección podemos concluir que los índices de reactividad local muestran que el  $C_{4a}$  y  $N_5$  son los átomos más reactivos de la Isoaloxacina, lo que es consecuente con el mecanismo de transferencia de hidruro.



Tabla 13.: Electrofilia local y relativa para átomos de Isoaloxacina. Destacan  $C_{4a} - N_1(9)$ ,  $N_5(13)$  y  $N_1(15)$  // \*Electrofilia local en kcal/mol. Electrofilia relativa sin unidades

Atom	N°	$\epsilon = 1$	Electrofilia L	Electrofilia R	Electrofilia L	Electrofilia R	Electrofilia L	Electrofilia R	$\epsilon = 4$	Electrofilia L	Electrofilia R	Electrofilia L	Electrofilia R	$\epsilon = 12$	Electrofilia L	Electrofilia R	$\epsilon = 20$	Electrofilia L	Electrofilia R
C	1	0,303	0,075	0,38	0,177	-0,344	0,204	0,189	-0,251	0,267	0,189	-0,251	0,186						
C	2	0,835	0,918	0,622	0,925	-0,568	1,197	1,375	-0,567	-0,567	1,375	-0,567	1,421						
C	3	0,951	0,719	0,671	0,729	-0,838	0,912	0,923	-0,782	-0,792	0,923	-0,782	0,927						
C	4	1,853	-1,811	-1,296	3,013	-1,104	-3,088	-3,895	-0,912	-0,946	-3,895	-0,912	-4,217						
C	5	0,056	0,025	-0,15	0,098	-0,177	0,145	0,205	-0,226	-0,217	0,205	-0,226	0,221						
C	6	3,401	5,804	-2,024	6,467	-1,902	6,985	7,205	-1,661	-1,705	7,205	-1,661	7,268						
H	7	0,637	0,744	-0,453	0,765	-0,377	0,867	0,909	-0,308	-0,322	0,909	-0,308	0,915						
H	8	0,92	1,079	-0,592	0,943	-0,461	0,979	0,953	-0,362	-0,381	0,953	-0,362	0,944						
C	9	1,928	0,513	-1,061	0,407	-0,972	0,451	0,45	-0,825	-0,851	0,45	-0,825	0,45						
C	10	0,788	-1,893	0,288	0,757	0,236	-0,551	-0,35	0,128	0,148	-0,35	0,128	-0,305						
C	11	0,627	-1,459	0,152	0,331	0,146	-0,405	-0,197	0,053	0,07	-0,197	0,053	-0,152						
C	12	0,317	-0,434	0,003	0,005	0,022	-0,035	0,028	-0,026	-0,017	0,028	-0,026	0,041						
N	13	0,505	0,093	0,424	0,129	-0,357	0,114	0,113	-0,309	-0,318	0,113	-0,309	0,113						
N	14	2,629	1,275	1,772	1,544	-1,305	1,223	1,158	-1,086	-1,126	1,158	-1,086	1,143						
N	15	5,881	2,944	3,72	3,061	-3,137	3,218	3,314	-2,572	-2,675	3,314	-2,572	3,343						
N	16	0,354	0,742	0,149	0,924	-0,171	0,786	0,74	-0,144	-0,149	0,74	-0,144	0,727						
C	17	0,684	2,005	0,361	1,576	0,285	2,04	2,387	0,229	0,239	2,387	0,229	2,499						
H	18	0,4	0,663	0,323	0,922	-0,297	1,238	1,504	-0,259	-0,266	1,504	-0,259	1,594						
H	19	0,843	1,573	0,468	1,418	-0,344	1,51	1,534	-0,255	-0,272	1,534	-0,255	1,54						
H	20	0,965	1,316	0,593	1,386	-0,478	-0,014	1,806	-0,378	-0,396	1,806	-0,378	1,863						
C	21	0,694	0,7	0,431	0,826	0,306	0,863	0,91	0,233	0,247	0,91	0,233	0,918						
H	22	0,908	1,332	0,541	1,248	-0,42	1,373	1,453	-0,326	-0,344	1,453	-0,326	1,473						
H	23	0,77	1,465	0,463	1,279	-0,36	1,378	1,438	-0,289	-0,302	1,438	-0,289	1,458						
S	24	7,564	6,527	3,837	5,081	-3,167	5,523	5,687	-2,696	-2,794	5,687	-2,696	5,685						
C	25	0,126	-0,292	0,089	-0,54	0,032	-0,243	-0,568	0,052	0,048	-0,568	0,052	-0,697						
H	26	0,856	2,096	0,439	2,094	-0,305	2,566	3,055	-0,223	-0,239	3,055	-0,223	3,213						
H	27	0,859	1,432	0,427	1,433	-0,273	1,658	1,923	-0,18	-0,197	1,923	-0,18	2,008						
H	28	0,836	2,228	0,43	2,15	-0,305	2,59	3,082	-0,227	-0,242	3,082	-0,227	3,18						
O	29	4,227	1,165	2,374	1,274	-1,859	1,245	1,258	-1,431	-1,508	1,258	-1,431	1,264						
O	30	2,486	0,688	1,277	0,657	-1,036	0,608	0,565	0,547	-0,823	0,565	0,547	-0,391						
H	31	0,798	0,761	0,57	0,757	-0,365	0,707	0,679	-0,262	-0,28	0,679	-0,262	0,672						
C	32	0,346	1,189	0,173	1,034	0,109	0,848	0,828	0,079	0,085	0,828	0,079	0,822						
H	33	0,76	0,822	0,544	0,935	-0,4	0,876	0,886	-0,322	-0,336	0,886	-0,322	0,887						
H	34	0,851	0,892	0,584	0,975	-0,423	0,906	0,901	-0,33	-0,347	0,901	-0,33	0,901						
H	35	0,353	0,761	0,263	0,758	-0,18	0,738	0,751	-0,145	-0,152	0,751	-0,145	0,753						

---

---

## CAPÍTULO 6

---

# CONCLUSIONES

De los resultados expuestos, podemos concluir que:

- Los resultados de Docking muestran a los residuos Y444, Y407, Q215, Y69, Ile180 y N181 como fundamentales para el adecuado posicionamiento del sustrato en la posición de reacción. La interacción puente de hidrógeno entre carbonilo de la Isoaloxacina y/o Q215 con el N-amino del sustrato resulta clave en una correcta alineación. Además existen presentes al menos 4 aguas estructurales, que consideramos relevantes para la interacción con el ligando.
- Al comparar los estados de transición para bencilamina para un sistema mínimo, el mecanismo hidruro es el requiere menor energía, siendo así el más viable de ocurrir en dicha reacción. El mecanismo de transferencia de hidruro tiene una energía de 24 kcal/mol, mientras que el mecanismo radicalario una energía de 40 kcal/mol.
- Al aplicar la Aproximación de Cluster para el sistema de hMAO-A con 5-HT encontramos que el mecanismo viable es el hidruro. Esto es consecuente con los resultados teóricos y experimentales publicados a la fecha. El sistema presenta claras ventajas por sobre otras metodologías y discrimina con claridad las energías para los mecanismos. En el caso de

---

radical de 92,34 y del hidruro de 35,69 kcal/mol.

- La coherencia de los resultados de energía entre el modelo mínimo y los modelos a partir de estudios de acomplamiento molecular demuestran la consistencia de la metodología
- La isoaloxacina muestra valores altos de electroafinidad, blandura e índice de electrofilia, confirmándolo como el electrófilo de la reacción. un orden creciente de la electrofilia local es de  $N_1 < C_{4\alpha} < N_5$ , clarificando el átomo más reactivo para el mecanismo.
- *Finalmente, fue posible representar por métodos químico cuánticos los complejos isoaloxacina-sustrato para dos mecanismos de deaminación oxidativa catalizada por monoamino oxidasa A humana. El análisis de los estados de transición de los complejos obtenidos mediante aproximación de clúster indicaron que el mecanismo de deaminación es preferentemente vía transferencia directa de hidruro.*

---

De los antecedentes descritos en el presente informe obtenemos las siguientes perspectivas para trabajos futuro:

- La implementación del MAC ha mostrado buenos resultados para los estados de transición de 5-HT. Es interesante comprobarlo para el mecanismo radicalario, el que no fue posible concluir en este estudio
- La ampliación de los sustratos estudiados a Dopamina y Noradrenalina, para comparar las energías obtenidas y las afinidades relativas de hMAO-A
- La Aplicación de estos conocimientos en el diseño racional de fármacos para la depresión, principal patología asociada a la sobreexpresión de hMAO-A
- Contribuir a esclarecer mecanismos de otras oxidasas, de similares características, por el método de aproximación de clúster.

---

---

## APÉNDICE A

---

# TEORIA FUNCIONAL DE LA DENSIDAD

### A.1. Teoría Funcional de la Densidad (DFT)

Los métodos de DFT proceden de la mecánica cuántica, concretamente del modelo Thomas-Fermi-Dirac (1920) y de los trabajos de Slater (1950). La aproximación DFT se basa en la estrategia de introducir la correlación electrónica usando funcionales de la densidad electrónica.

La correlación electrónica da cuenta de la repulsión electrónica entre los electrones del sistema, mientras la energía de intercambio es la energía asociada al intercambio entre electrones de un mismo espín, el cual representa la naturaleza indescriptible de los electrones caracterizada por el Principio de Incertidumbre.

Estos métodos utilizan el teorema de Hohenberg-Kohn,(1964),<sup>51</sup> en el que se demuestra la existencia de un solo funcional que determina la energía del estado fundamental y la densidad electrónica exactamente. Sin embargo, el teorema no da la forma del funcional.

Siguiendo el trabajo de Kohn y Sham,<sup>52</sup> la energía electrónica se divide en varios términos:

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC}$$

donde  $E^T$  es la energía cinética electrónica,  $E^V$  la energía potencial de atracción núcleo-electrón y repulsión entre pares de núcleos,  $E^J$  es el término de repulsión electrón-electrón y  $E^{XC}$  es la energía de correlación de intercambio e incluye las interacciones electrón-electrón. Todos los términos, excepto la repulsión núcleo-núcleo son funciones de  $\rho$  (densidad electrónica).  $E^T + E^V + E^J$  corresponde a la energía clásica de la distribución de carga  $\rho$ . El término  $E^J$  viene dado por la siguiente expresión:

$$E^J = \frac{1}{2} \iint \rho(\mathbf{r}_1) (\Delta r_{12})^{-1} \rho(\mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2$$

La energía  $E^{XC}$  es una funcional de la densidad electrónica según demostró Hohenberg-Kohn:

$$E^{XC}(\rho) = \int f(\rho\alpha(\mathbf{r}), \rho\beta(\mathbf{r}), \nabla\rho\alpha(\mathbf{r}), \nabla\rho\beta(\mathbf{r})) d^3\mathbf{r}$$

$E^{XC}$  se divide en dos partes, que corresponden a interacciones del mismo spin  $E^X$  y mezcla de spin  $E^C$ .

$$E^{XC}(\rho) = E^X(\rho) + E^C(\rho)$$

donde  $E^X$  se llama funcional de cambio y  $E^C$  funcional de correlación  $E^X$  y  $E^C$  pueden ser funcionales locales que dependen solamente de la densidad electrónica  $\rho$ .

La funcional  $E^{XC}(\rho)$  es expresada típicamente como la interacción entre la densidad electrónica y la densidad de energía  $\varepsilon_{XC}$ , que depende de  $\rho$  y es separada en sus componentes de intercambio y correlación.

$$E[\rho(r)] = \int (\rho(r)) \varepsilon_{XC}[\rho(r)] dr$$

$$\varepsilon_{XC}[\rho(r)] = \varepsilon_X[\rho(r)] + \varepsilon_C[\rho(r)]$$

donde  $\varepsilon_{XC}$  debe ser entendida como densidad por partícula (la densidad electrónica es una densidad por unidad de volumen). Otra expresión es la densidad en termino de radio efectivo de una orbita en esfera, con la densidad definida en su centro.

$$x = \left( \frac{3}{4\pi\rho(r)} \right)^{1/3}$$

Para la obtención de la energía de intercambio, un término común a la densidad de energía de intercambio de Slater<sup>53</sup>

$$\varepsilon_X[\rho(r)] = \frac{-9\alpha}{8} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{1/3} \rho(r)^{1/3}$$

Por último los efectos de espín son tratados simplemente separando la densidad correspondiente a la contribución de las densidades  $\alpha$  y  $\beta$ , es decir,  $\rho(r) = \rho_\alpha(r) + \rho_\beta(r)$  y utilizando las funcionales individuales para ellas; entonces las densidades de espín en cualquier posición son expresadas en términos de la polarización de espín normalizada  $\xi$

$$\xi(r) = \frac{\rho^\alpha - \rho^\beta(r)}{\rho(r)}$$

En la aproximación, el valor de  $\varepsilon_{XC}$  es calculado desde su valor local, lo que se denomina Local density approximation (LCA) Cuando se desprecian los efectos de la polarización en el sistema, este corresponde a un caso especial del modelo LSDA (local spin density aproximación), que si tomamos la densidad de energía de intercambio del modelo LDA tenemos que la funcional para la energía de intercambio corresponde a:

$$E_X^{LDA}[\rho(r)] = \frac{-3}{2} \left(\frac{3}{4\pi}\right) \sum_{\sigma} (\rho_{\alpha}^{4/3}(r) + \rho_{\beta}^{4/3}(r)) d^3r$$

donde  $\rho$  indica si se trata de espín  $\alpha$  o  $\beta$ ,

Vosko, Wilk y Nusair<sup>54</sup> derivaron funcionales analíticas con la intención de reproducir la energía de correlación de varios modelos. Este modelo para la densidad de energía de correlación es similar a LDA, pero se expresa en términos del radio efectivo, quedando descrita como

$$E_X^{LDA}[\rho(r)] = \int \rho(r) \varepsilon_C(x, \xi) d^3r$$

Debido a que en los sistemas reales la densidad electrónica no se comporta uniformemente en el espacio, estas aproximaciones poseen limitaciones. La corrección más razonable es representar la energía no solo en función de la densidad, si no que también según los cambios locales del gradiente de densidad. Esto se conoce como *Generalized Gradient Approximation* (GGA)

$$\varepsilon_X^{GGA}[\rho(r)] = \varepsilon_X^{LDA}[\rho(r)] + \Delta\varepsilon_{XC} \left[ \frac{\nabla\rho(r)}{\rho^{3/4}(r)} \right]$$

Para poder integrar elementos que mejoren la representación de los sistemas se desarrollan las funcionales híbridas. Estas funcionales conectan la energía de intercambio de correlación para un

sistema no interactuante con uno completamente interactuante. La base del método es incluir en el término de intercambio una parte de la teoría Hartree-Fock y una parte DFT

$$E_{XC} = (1 - \alpha)E_{XC}^{DFT} + \alpha E_X^{HF}$$

El término  $E_X^{HF}$  hace referencia al intercambio exacto de Hartree-Fock. En este punto el valor de  $\alpha$  puede ser solamente optimizado para obtener un conjunto de valores que reproducen la energía de intercambio y correlación esperada. La funcional B3LYP es una funcional híbrida en que se utilizaron métodos empíricos para determinar el mejor valor de  $\alpha$  y a la vez contribuir con diferentes funcionales de intercambio y correlación. La funcional de tres parámetros de Becke tiene la forma:

$$F^{B3LYP} = AF_X^{HF} + (1 - A)F_X^{Slater} + BF_X^{Becke} + CF_C^{LYP} + (1 - C)F_C^{VWN}$$

Donde  $F_X^{HF}$  es el intercambio de Hartree-Fock,  $F_X^{Slater}$  es el intercambio de Slater,  $F_X^{Becke}$  la parte gradiente del funcional de Becke,  $F_C^{LYP}$  es la correlación funcional de Lee y col. y  $F_C^{VWN}$  es la correlación funcional de Vosko y col. Los coeficientes A, B y C son determinados por la minimización de la desviación absoluta promedio para la diferencia entre teoría y experimentos para 116 propiedades atómicas y moleculares. Los motivos para el uso de esta funcional son que en términos de energía y geometría la funcional B3LYP es superior que otros funcionales DFT disponibles en la actualidad y su exactitud es comparable con el método ab initio más exacto.

## Error en Teoría Funcional de la Densidad

Los métodos DFT presentan a su vez tres fuentes de error que deben ser consideradas en la metodología:

1. El error de auto-interacción: El que da una interacción distinta de cero para la interacción algunos casos.
2. La escasez de interacciones de van der Waals, lo que puede llevar a errores significativos a sistemas de grandes interacciones.



3. La escasez de correlación estática: Este error es inherente a la descripción de determinantes simples que usa DFT y no permite la correcta disociación de los enlaces en algunos casos.

Los dos primeros errores tienden a cancelarse en la mayoría de los casos, e incluso se puede considerar que las funcionales se optimizan para cancelar estos errores. Para disminuir el error producido por la falta de interacciones de van der Waals se realizan cálculos de dispersión del sistema que lo corrigen por una fórmula empírica, y más recientemente por la aplicación de métodos B3LYP, que son del orden de 10 kcal/mol y que resultan en mejoras significativas de las energías para estos sistemas.

Otra consideración es la funcional de intercambio exacto (FIE) que corresponde a un 20 % de la funcional B3LYP y que ha podido resolver, con su interpretación como regla empírica general, muchos problemas que teóricamente parecían incorrectos y que luego de la interpretación de la FIE resultan ser altamente similares a los valores experimentales esperados inicialmente.

---

---

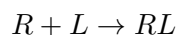
## APÉNDICE B

---

# CONSIDERACIONES SOBRE DOCKING

### B.1. Concepto de Docking

El Docking o Acoplamiento Molecular es un método semiempírico para encontrar conformaciones de unión entre dos moléculas, algo similar a anclar, como en los juegos de niños de encaje de piezas. La metodología de Docking es una estrategia de mecánica molecular que busca predecir los enlaces no-covalentes de macromoléculas entre si, o más frecuentemente de macromoléculas con ligandos y moléculas pequeñas eficientemente. El objetivo es describir las conformaciones de enlace y afinidad. Considerando la representación de la unión no-covalente entre receptores y ligandos, podemos representarla como:



en donde podemos escribir una constante de equilibrio como:

$$K_u = [RL]/[R][L]$$

La energía libre de unión de esta reacción  $\Delta G_u$  se calcula como  $\Delta G_u = -RT \ln K_u$ , donde  $R$  es la constante de los gases ideales (8,31 J/K mol) y  $T$  la temperatura en Kelvin. El Docking busca reproducir los potenciales químicos de los sistemas químicos con su función de puntuación, por lo que utiliza los algoritmos para aproximar  $\Delta G_u$ , también conocido como ranqueo o *scoring*.

Todos los programas de docking divergen en los algoritmos del “Paso de puntuación”, compartiendo el problema del orden correcto de las conformaciones obtenidas. Para ello asigna según una función de puntuación un valor de energía a dicha conformación. Debido al carácter aproximado de las energías de la función de puntuación, éstas no tienen una correlación entre las energías de unión experimentales y las predichas por estas funciones, lo que genera una diferencia respecto de la selección de la conformación natural y la imposibilidad de interpretarlas como potenciales químicos.

Autodock es el programa más ampliamente usado para realizar este procedimiento. Autodock considera dos suposiciones iniciales en su procedimiento:

- Se asume que no cambian las distribuciones de carga ni protonación entre la forma libre y unida del ligando
- Se considera que el receptor es rígido (ángulos y distancias de enlace son constantes), teniendo una pequeña porción de átomos rotables (el flexible)

La plataforma Autodock Tools<sup>55</sup> presenta dos metodologías posibles de cálculo que divergen respecto a sus funciones de puntuación y programación: Autodock 4 y Autodock Vina.

AutoDockTools (ADT) parametriza de manera cartesiana los sistemas receptor-ligando. Se define un centro de caja (x,y,z) y el tamaño de una caja (x,y,z) en formato PDBQT.

## Autodock 4

AutoDock4 (AD4) utiliza para el cálculo del potencial químico un algoritmo que considera las siguientes contribuciones energéticas<sup>56</sup>

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conf} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

Donde  $\Delta G_{vdw}$  es la energía libre de Van der Waals,  $\Delta G_{hbond}$  es la energía libre de enlace de hidrogeno,  $\Delta G_{elec}$  es la energía libre de la población electrónica, obtenida por un calculo mecanico-estadístico.  $\Delta G_{conf}$  es la energía libre de conformación,  $\Delta G_{tor}$  de torsión y  $\Delta G_{sol}$  incluye los efectos del solvente, de encontrarse explicito en la estructura.

Utilizando ecuaciones basadas en la físicoquímica, se consideran de 6-12 veces la magnitud de interacciones de Van der Waals y energía de Coulomb como parte inicial de las funciones de puntuación. Ellas necesariamente son revisadas y probadas con los datos empíricos, en parte de la diferencia de energía y energías libres. En el caso particular de AD4, todas estas energías provienen del ciclo termodinamico de Wesson y Einsberg, las cuales se incorporan elementos teóricos,<sup>56</sup> de modo que resulta la función:

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\ & + \Delta G_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\ & + \Delta G_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\varepsilon(r_{ij}) r_{ij}} \\ & + \Delta G_{tor} N_{tor} \\ & + \Delta G_{vdW} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) \exp(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2) \end{aligned}$$

AutoDock4 utiliza como entrada donde aplicar el algoritmo y definir las conformaciones y sus puntuaciones a los mapas de coordenadas que le entrega el script Autogrid, programa hermano que calcula estas mapas de posición como grillas de coordenadas, entregándolo en un lenguaje comprensible para AD4. Para los estudios de Docking realizados se utilizo la estructura cristalina 2Z5X de hMAO-A, la cual con ayuda del visualizador Pymol<sup>41</sup> se edito, dejando únicamente los residuos aminoacidicos. Se utilizaron las entradas previamente diseñadas en Gaussian03 sobre la plataforma ADT.

Los parámetros seleccionados para los estudios en AD4 fueron una población inicial de 150 individuos, con un número máximo de evaluaciones de energía de 15.000.000, un número

máximo de generaciones de 500.000, una probabilidad de mutación o crossover de 0,02 y 0,08 respectivamente. El número de veces que se ejecuto el algoritmo fue de 200 veces, correspondiente a las 200 conformaciones de salida o poses. Se realizo esto sin las aguas explicitas. Estás fueron ordenas en agrupaciones, con una puntuación (o energía) promedio. El elemento de menor energía de un agrupamiento se considera como mejor pose, la cual está numerada según su número de salida respecto a las otras conformaciones del experimento. El análisis y visualización de los resultados se realizo utilizando ADT y Pymol.

## Autodock Vina

Autodock Vina<sup>57</sup> (ADVina) es otro programa que funciona por ADT para el acoplamiento molecular, que es más veloz que AD4. El aumento de velocidad ocurre por el paralelismo computacional que el programa aplica usando cálculos en paralelo (multithreading) en maquinas multinúcleo. Autodock Vina calcula automáticamente los mapas de grilla y clústers de los resultados. El desarrollo de la función de puntuación en Autodock Vina proviene del modelo de interacción entre un par de átomos, matemáticamente como;

$$c = \sum_{i < j} f_{t_i t_j}(r_{ij})$$

Donde c es la sumatoria de todos los pares de átomos que pueden ser relativos unos con otros, excluyendo las interacciones 1-4, lo que puede ser reescrito como:

$$c = c_{inter} + c_{intra}$$

La optimización descrita da un valor global mínimo de c y otros puntajes bajos, los que se ordenan según la energía libre de enlace calculada, la que es obtenida desde la parte intermolecular de la conformación de puntuación como:

$$s_1 = g(c_1 - c_{intra1}) = g(c_{inter1})$$

Donde  $g$  es una función esencialmente arbitraria y no lineal. Por razones modulares muchos de los programas ajustan en una forma particular  $F_{t_i t_j}$  o  $g$ . Estas funciones se toman como

parámetros del resto del código y representan las interacciones intermoleculares. La desviación de nuestra función de puntuación cambia con algunos correctores de potencial electrostático y datos de sistemas empíricos. La interacción  $f_{t_it_j}$  es definida sobre la superficie de distancia

$$d_{ij} = r_{ij} - R_{t_i} - R_{t_j}$$

donde,  $R_t$  representa el radio de Van der Walls de  $t$ .  $h_{t_it_j}$  es la suma de la interacción es-térica, idéntica para todos los pares de átomos. De aquí se ponderan por factores definidos estadísticamente para las siguientes funciones dependientes de esas distancias  $d_{ij}$ .

Tabla 14.: Contribuciones en energía en interacción en algoritmo de Autodock Vina

Termino	Gauss1	Gauss2	Repulsión	Hidrofóbica	Enlace Hidr.	Etor
Ponderación	-0,0356	-0,00516	0,84	-0,0351	-0,587	0,0585

Estas funciones están definidas como sigue:

$$\text{gauss}_1(d) = e^{-(d/0,5\text{\AA})^2} \quad \text{gauss}_2(d) = e^{-((d-3\text{\AA})/2\text{\AA})^2} \quad \text{repulsión} = \begin{cases} d^2 & \text{si } d < 0 \\ 0 & \text{si } d \geq 0 \end{cases}$$

Las función hidrofóbica es igual a 1 cuando  $d < 0,5\text{\AA}$  y 0 cuando  $d > 1,5\text{\AA}$ . Cualquier punto intermedio se interpola. Para la función de interacción de hidrógeno está es igual a 1 cuando  $d < -0,7\text{\AA}$  y 0 cuando  $d > 0$ , interpolando los valores intermedios. Todas las interacciones  $F_{t_it_j}$  son acortadas hasta  $r_{ij} = 8\text{\AA}$ . Por último, la función  $g$  del algoritmo corresponde a la "conformación independiente" y se define como:

$$g(c_{inter}) = \frac{c_{inter}}{1 + wN_{rot}}$$

Donde  $N_{rot}$  es el número de enlaces activos que rotan entre átomos pesados y  $w$  es su peso asociado.

---

---

## APÉNDICE C

---

# POTENCIAL QUIMICO Y FUNCIONES DE FUKUI

El potencial químico electrónico de un sistema termodinámico es el cambio de energía que experimentaría el sistema si fuera introducida en éste un electrón al sistema, considerando la entropía y el volumen como magnitudes constantes. Este puede ser representado por la siguiente ecuación:

$$\mu = \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)$$

Mientras mayor sea la diferencia de potenciales químicos entre dos moléculas, más factible será su reacción.

Se conoce que hay una relación entre Electronegatividad y potencial químico electrónico debido a su definición, éstas resultan ser magnitudes numéricas inversas, de modo que la electronegatividad se define como el cambio de la energía del sistema a causa de la modificación del número de electrones del sistema.<sup>43</sup> Esto se escribe:

$$\chi = -\mu = - \left( \frac{\partial E}{\partial N} \right)$$

Dos propiedades periódicas muy relevantes, asociadas a la electronegatividad son el potencial de ionización y la electroafinidad. El potencial de ionización (I) inicialmente se definía como el

---

potencial mínimo necesario para que un electrón saliese de un átomo que queda ionizado. La afinidad electrónica (AE) se define como la energía involucrada cuando un átomo gaseoso neutro en su estado fundamental (de mínima energía) captura un electrón y forma un ión negativo.

Para estas propiedades moleculares la unidad con que mide es en electrón-voltios. Es una de las unidades aceptadas para su uso en el Sistema Internacional, especialmente para magnitudes que representan cambios de electrones en un sistema. Corresponde a Equivale a  $1,602176462 \times 10^{-19}$  J. Para una misma molécula, este cálculo se puede llevar a cabo utilizando las energías de la especie neutra  $[E(M)]$ , la especie al aceptar un electrón extra, o el anión  $[E(M^-)]$  y la especie al perder un electrón desde su forma neutra  $[E(M^+)]$ , o forma catiónica. Para una misma molécula la electroafinidad y el potencial de ionización se pueden calcular como:

$$I = E(M^+) - E(M^0)$$

$$A = E(M^0) - E(M^-)$$

Con estas magnitudes es posible redefinir el potencial químico y la electronegatividad en función de estas, de modo que podemos representar por medio de intercambios de monolectrones en el sistema a dichas propiedades, quedando expresadas como:

$$\mu = \frac{-(I + A)}{2} \quad \chi = \frac{I + A}{2}$$

Aunque además, la electronegatividad es posible de representar como el promedio de las energías de los orbitales de frontera, de modo que:

$$\chi = - \left( \frac{E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}}}{2} \right)$$

Posteriormente, Parr y Pearson vinculan otra propiedad química, la dureza, con los Orbitales Moleculares de Frontera. La dureza es una propiedad química que cuantifica la polarizabilidad de una especie. A mayor dureza la especie es menos polarizable, por lo tanto, es un mejor electrofilo. La dureza corresponde a la segunda derivada de la energía sobre el número de electrones (población), representado por:

$$\eta = \frac{1}{2} \left( \frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right) = \frac{I - A}{2}$$



Correspondiendo la dureza a un medio de la derivada del potencial químico (segunda derivada de la energía del sistema).

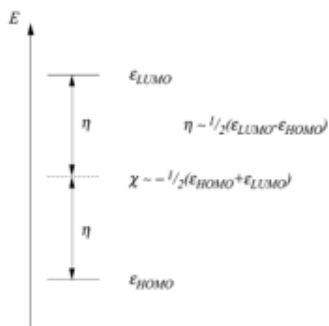


Figura 38.: Dureza y Electronegatividad en el contexto de Orbitales Moleculares

## Función de Fukui

La función de Fukui está definida como la sensibilidad de la densidad electrónica de una especie al cambio en el número de electrones de una especie. Esta función descrita en los años ochenta permite la cuantificación de la reactividad de un átomo dentro de una molécula conociendo la distribución de la población de electrones - o la carga puntual, ya que resulta ser que el número atómico (Z) es la suma de la carga (Q) y la población de electrones presentes (q) -. La función queda definida por el formalismo:

$$\mathcal{F}(r) = \left[ \frac{\partial \rho}{\partial N} \right]$$

La función de Fukui se define para 3 casos: centro electrofilo, centro nucleofilo y centro radicalario. Esto se determina al operar las distribuciones de población de las especies aniónica, neutra y catiónica de cada átomo. Se calculan según la siguientes relaciones:

$$\begin{aligned} \mathcal{F}_k^+ &= q_k(N+1) - q_k(N) && \text{para un átomo como electrofilo} \\ \mathcal{F}_k^- &= q_k(N) - q_k(N+1) && \text{para un átomo nucleofilo} \\ \mathcal{F}_k^0 &= 1/2[q_k(N+1) - q_k(N-1)] && \text{para un radical} \end{aligned}$$

---

Con estas ecuaciones se representan pequeños cambios del número de electrones en el LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) y HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) para una determinada especie. Donde  $q_k(N)$  representa a la población electrónica en un átomo. Estos cálculos requieren ser hechos en especies de la misma geometría.

El poder electrófilo, también denominado “electrofilia” corresponde a la magnitud que cuantifica esta propiedad en un determinado ligando. Se define por:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \approx \frac{(I + A)^2}{8(I - A)}$$

El poder electrofilo máximo ( $I = 0$ ) se considera el mayor flujo de electrones del sistema.

---

---

## APÉNDICE D

---

# PROPIEDADES CINÉTICAS DE LAS ENZIMAS

La base de la mayoría de las determinaciones cinéticas es la observación de como la velocidad ( $v$ ), de una reacción varía directamente con la concentración de cada una de las sustancias que actúan como reactivos para producir el producto. Esta observación es expresada por medio de una ecuación de velocidad:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Primeramente<sup>1</sup>, tiene lugar una reacción química bimolecular entre la enzima E y el sustrato S, formándose el complejo enzima-sustrato ES. Aunque el mecanismo enzimático para una reacción unimolecular  $ES \rightarrow E + P$  puede ser bastante complejo, existe una etapa enzimática limitante que permite que el mecanismo sea simplificado como una etapa cinética única cuya constante es  $k_2$ .

$$v = k_2[ES]$$

$k_2$  también llamado  $k_{cat}$  o número de recambio, hace referencia al máximo número de reacciones enzimáticas catalizadas por segundo.

---

<sup>1</sup>Agradecimientos al Dr. Christian Wilson M. quien me guío en la preparación de este anexo.

A bajas concentraciones de sustrato, la enzima permanece en un equilibrio constante entre la forma libre E y el complejo enzima-sustrato ES. Aumentando la [S] también aumentamos la [ES] a expensas de la [E], desplazando el equilibrio de la reacción hacia la derecha. Puesto que la velocidad de reacción depende de la [ES], la velocidad es sensible a pequeños cambios en la [S]. Sin embargo, a altas [S], la enzima se satura y solo queda la forma unida al sustrato ES. Bajo estas condiciones, la velocidad de la reacción ( $v = k_2[E]_{tot} = V_{m\acute{a}x}$ ) deja de ser sensible a pequeños cambios en la [S]. En este caso, la concentración total de enzima ( $[E]_{tot}$ ) es aproximadamente igual a la concentración del complejo ES:

$$[E]_{tot} = [E] + [ES]$$

La ecuación de Michaelis-Menten aún se mantiene bajo estas condiciones más generales, como puede derivarse de la aproximación del estado estacionario. Durante el período inicial, la velocidad de la reacción es más o menos constante, indicando que la [ES] también se mantendrá constante:

$$\frac{d}{dt}[ES] = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_{-1}[ES] \approx 0$$

De esta forma, la concentración de ES viene dada por la siguiente expresión:

$$[ES] \approx \frac{[E]_{tot}[S]}{[S] + K_m}$$

donde la constante de Michaelis  $K_m$  se define así:

$$K_m \stackrel{\text{def}}{=} \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \approx \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Con lo cual, después de operar todos los factores, obtenemos una fórmula general para la velocidad de la reacción que coincide con la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_{tot}[S]}{[S] + K_m} = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_m}$$

La constante de especificidad  $k_{cat}/K_m$  mide la eficiencia con la que una enzima convierte un sustrato en producto. Utilizando la definición de la constante de Michaelis  $K_m$ , la ecuación de Michaelis-Menten podría escribirse de la siguiente forma:

$$v = k_2[ES] = \frac{k_2}{K_m}[E][S]$$

---

donde  $[E]$  es la concentración de enzima libre. Así, la constante de especificidad se convierte en una constante bimolecular efectiva de la enzima libre que reacciona con sustrato libre para formar producto. Esta constante viene definida por la frecuencia con la que el sustrato y la enzima se encuentran en una solución, y ronda aproximadamente un valor de  $10^{10}$  molaridad $M^{-1}$  segundos $^{-1}$  a 25°C. Curiosamente, este máximo no depende del tamaño del sustrato o de la enzima. La proporción de las constantes de especificidad para dos sustratos es una comparación cuantitativa de la eficiencia de la enzima para convertir en productos dichos sustratos. La pendiente de la ecuación de Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato (cuando  $[S] \ll K_m$ ) también proporciona la constante de especificidad.

Las velocidades de las reacciones enzimáticas dependen de las condiciones de la solución y de la concentración de sustrato. Aquellas condiciones que desnaturalizan una proteína, como temperaturas elevadas, pHs extremos o altas concentraciones de sal, dificultan o impiden la actividad de la proteína, mientras que elevadas concentraciones de sustrato tienden a incrementar la actividad. Para encontrar la máxima velocidad de una reacción enzimática, la concentración de sustrato se incrementa hasta que se obtiene una tasa constante de formación de producto.

La saturación ocurre cuando la concentración de sustrato aumenta, disminuye la concentración de enzima libre, que se convierte en la forma con sustrato unido (ES). A la máxima velocidad ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de la enzima, todos los sitios activos de dicha enzima tienen sustrato unido, y la cantidad de complejos ES es igual a la cantidad total de enzima. Sin embargo,  $V_{m\acute{a}x}$  es sólo una de las constantes cinéticas de la enzima. La cantidad de sustrato necesario para obtener una determinada velocidad de reacción también es importante.

Este parámetro viene dado por la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), que viene a ser la concentración de sustrato necesaria para que una enzima alcance la mitad de su velocidad máxima. Cada enzima tiene un valor de  $K_m$  característico para un determinado sustrato, el cual puede decirnos cómo de afín es la unión entre el sustrato y la enzima. Otra constante útil es  $k_{cat}$ , que es el número de moléculas de sustrato procesadas por cada sitio activo por segundo.

Como las reacciones catalizadas por enzimas son saturables, la velocidad de catálisis no

---

muestra un comportamiento lineal en una gráfica al aumentar la concentración de sustrato. Si la velocidad inicial de la reacción se mide a una determinada concentración de sustrato (representado como  $[S]$ ), la velocidad de la reacción (representado como  $V$ ) aumenta linealmente con el aumento de la  $[S]$ , como se puede ver en la figura. Sin embargo, cuando aumentamos la  $[S]$ , la enzima se satura de sustrato y alcanza su velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), que no sobrepasará en ningún caso, independientemente de la  $[S]$ .

La constante de Michaelis  $K_m$  se define como la concentración a la que la velocidad de la reacción enzimática es la mitad de la  $V_{m\acute{a}x}$ . Esto puede verificarse sustituyendo la concentración de sustrato por dicha constante ( $[S] = K_m$ ). Si la etapa limitante de la velocidad de la reacción es lenta comparada con la disociación de sustrato ( $k_2 \ll k_1$ ), la constante de Michaelis  $K_m$  será aproximadamente la constante de disociación del complejo ES, aunque sea una situación relativamente rara.

---

## Bibliografía

- <sup>1</sup> Dale E Edmondson, Claudia Binda, and Andrea Mattevi. Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases a and b. *Archives of biochemistry and biophysics*, 464(2):269–276, 2007.
- <sup>2</sup> AW Bach, Nancy C Lan, Deborah L Johnson, Creed W Abell, Michael E Bembenek, Sau-Wah Kwan, Peter H Seeburg, and Jean C Shih. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase a and b: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(13):4934–4938, 1988.
- <sup>3</sup> Luigi De Colibus, Min Li, Claudia Binda, Ariel Lustig, Dale E Edmondson, and Andrea Mattevi. Three-dimensional structure of human monoamine oxidase a (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(36):12684–12689, 2005.
- <sup>4</sup> Se-Young Son, Jichun Ma, Youhei Kondou, Masato Yoshimura, Eiki Yamashita, and Tomitake Tsukihara. Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: the control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15):5739–5744, 2008.
- <sup>5</sup> J Richard Miller and Dale E Edmondson. Structure-activity relationships in the oxidation of para-substituted benzylamine analogues by recombinant human liver monoamine oxidase A. *Biochemistry*, 38(41):13670–13683, 1999.

- <sup>6</sup> Gerald Zapata-Torres, Angelica Fierro, Sebastian Miranda-Rojas, Carlos Guajardo, Patricio Saez-Briones, J Cristian Salgado, and Cristian Celis-Barros. Influence of protonation on substrate and inhibitor interactions at the active site of human monoamine oxidase-a. *Journal of chemical information and modeling*, 52(5):1213–1221, 2012.
- <sup>7</sup> Ma Cecilia Scorza, Cecilia Carrau, Rodolfo Silveira, Gerald Zapata-Torres, Bruce K Cassels, and Miguel Reyes-Parada. Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives: structure–activity relationships. *Biochemical pharmacology*, 54(12):1361–1369, 1997.
- <sup>8</sup> Franco Chimenti, Rossella Fioravanti, Adriana Bolasco, Paola Chimenti, Daniela Secci, Francesca Rossi, Matilde Yanez, Francisco Orallo, Francesco Ortuso, and Stefano Alcaro. Chalcones: a valid scaffold for monoamine oxidases inhibitors. *J. Med. Chem*, 52(9):2818–2824, 2009.
- <sup>9</sup> Nigel S Scrutton. Chemical aspects of amine oxidation by flavoprotein enzymes. *Natural product reports*, 21(6):722–730, 2004.
- <sup>10</sup> Richard B Silverman. Radical ideas about monoamine oxidase. *Accounts of chemical research*, 28(8):335–342, 1995.
- <sup>11</sup> DE Edmondson, A Mattevi, C Binda, M Li, and F Hubalek. Structure and mechanism of monoamine oxidase. *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development*, 2004.
- <sup>12</sup> Paul F Fitzpatrick. Oxidation of amines by flavoproteins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 493(1):13–25, 2010.
- <sup>13</sup> Robert Vianello, Matej Repič, and Janez Mavri. How are biogenic amines metabolized by monoamine oxidases? *European Journal of Organic Chemistry*, 2012(36):7057–7065, 2012.
- <sup>14</sup> Xingliang Lu, MariÀa RodrìAguéz, Wenxin Gu, and Richard B Silverman. Inactivation of



- mitochondrial monoamine oxidase b by methylthio-substituted benzylamines. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(20):4423–4430, 2003.
- <sup>15</sup> Stephen EJ Rigby, Robert MG Hynson, Rona R Ramsay, Andrew W Munro, and Nigel S Scrutton. A stable tyrosyl radical in monoamine oxidase a. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6):4627–4631, 2005.
- <sup>16</sup> Rachel V Dunn, Andrew W Munro, Nicholas J Turner, Stephen EJ Rigby, and Nigel S Scrutton. Tyrosyl radical formation and propagation in flavin dependent monoamine oxidases. *ChemBioChem*, 11(9):1228–1231, 2010.
- <sup>17</sup> Christopher WM Kay, Hassane El Mkami, Gianluca Molla, Loredano Pollegioni, and Rona R Ramsay. Characterization of the covalently bound anionic flavin radical in monoamine oxidase a by electron paramagnetic resonance. *Journal of the American Chemical Society*, 129(51):16091–16097, 2007.
- <sup>18</sup> Larry A Hull, George Thomas Davis, David H Rosenblatt, and Charles K Mann. Oxidations of amines. vii. chemical and electrochemical correlations. *The Journal of Physical Chemistry*, 73(7):2142–2146, 1969.
- <sup>19</sup> Safiye S Erdem and Burcu Büyükmeneş. Computational investigation on the structure–activity relationship of the biradical mechanism for monoamine oxidase. *Journal of Neural Transmission*, 118(7):1021–1029, 2011.
- <sup>20</sup> Dale E Edmondson, Claudia Binda, Jin Wang, Anup K Upadhyay, and Andrea Mattevi. Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. *Biochemistry*, 48(20):4220–4230, 2009.
- <sup>21</sup> Claudia Binda, Min Li, Frantisek Hubálek, Nadia Restelli, Dale E Edmondson, and Andrea Mattevi. Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase b from high-resolution crystal structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

100(17):9750–9755, 2003.

- <sup>22</sup> Safiye Sağ Erdem, Özlem Karahan, İbrahim Yıldız, and Kemal Yelekçi. A computational study on the amine-oxidation mechanism of monoamine oxidase: insight into the polar nucleophilic mechanism. *Organic & biomolecular chemistry*, 4(4):646–658, 2006.
- <sup>23</sup> R Orru, M Aldeco, and DE Edmondson. Do mao a and mao b utilize the same mechanism for the c–h bond cleavage step in catalysis? evidence suggesting differing mechanisms. *Journal of Neural Transmission*, pages 1–5, 2013.
- <sup>24</sup> Ravi K Nandigama and Dale E Edmondson. Structure-activity relations in the oxidation of phenethylamine analogues by recombinant human liver monoamine oxidase a. *Biochemistry*, 39(49):15258–15265, 2000.
- <sup>25</sup> Claudia Binda, Jin Wang, Min Li, Frantisek Hubalek, Andrea Mattevi, and Dale E Edmondson. Structural and mechanistic studies of arylalkylhydrazine inhibition of human monoamine oxidases a and b. *Biochemistry*, 47(20):5616–5625, 2008.
- <sup>26</sup> Peter H Yu, Bruce A Bailey, David A Durden, and Alan A Boulton. Stereospecific deuterium substitution at the  $\alpha$ -carbon position of dopamine and its effect on oxidative deamination catalyzed by mao-a and mao-b from different tissues. *Biochemical pharmacology*, 35(6):1027–1036, 1986.
- <sup>27</sup> Peter Macheroux, Sandro Ghisla, Christoph Sanner, Heinz Rüterjans, and Franz Müller. Reduced flavin: Nmr investigation of n (5)-h exchange mechanism, estimation of ionisation constants and assessment of properties as biological catalyst. *BMC biochemistry*, 6(1):26, 2005.
- <sup>28</sup> Moussa BH Youdim, Dale Edmondson, and Keith F Tipton. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(4):295–309, 2006.

- <sup>29</sup> Michael A North, Sudeep Bhattacharyya, and Donald G Truhlar. Improved density functional description of the electrochemistry and structure- property descriptors of substituted flavins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(46):14907–14915, 2010.
- <sup>30</sup> Per EM Siegbahn and Fahmi Himo. Recent developments of the quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 14(5):643–651, 2009.
- <sup>31</sup> DE Koshland Jr. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(2):98, 1958.
- <sup>32</sup> Gérald Monard, Xavier Prat-Resina, Angels González-Lafont, and José M Lluch. Determination of enzymatic reaction pathways using qm/mm methods. *International journal of quantum chemistry*, 93(3):229–244, 2003.
- <sup>33</sup> Per EM Siegbahn. Current status of the multiconfiguration–configuration interaction (mc–ci) method as applied to molecules containing transition-metal atoms. In *Faraday Symp. Chem. Soc.*, volume 19, pages 97–107. The Royal Society of Chemistry, 1984.
- <sup>34</sup> M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople. Gaussian

- 03, Revision C.02, 2004. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- <sup>35</sup> François-Yves Dupradeau, Adrien Pigache, Thomas Zaffran, Corentin Savineau, Rodolphe Lelong, Nicolas Grivel, Dimitri Lelong, Wilfried Rosanski, and Piotr Cieplak. The red tools: advances in resp and esp charge derivation and force field library building. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(28):7821–7839, 2010.
- <sup>36</sup> Wolfram Koch, Max C Holthausen, and Max C Holthausen. *A chemist's guide to density functional theory*, volume 2. Wiley-Vch Weinheim, 2001.
- <sup>37</sup> Axel D Becke. Density-functional thermochemistry. iii. the role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, 98:5648, 1993.
- <sup>38</sup> Garrett M Morris, David S Goodsell, Robert S Halliday, Ruth Huey, William E Hart, Richard K Belew, and Arthur J Olson. Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14):1639–1662, 1998.
- <sup>39</sup> Accelrys Software Inc. Discovery studio, cerius2 modeling environment, release 4.7, 2003.
- <sup>40</sup> Gregory A Ross, Garrett M Morris, and Philip C Biggin. Rapid and accurate prediction and scoring of water molecules in protein binding sites. *PloS one*, 7(3):e32036, 2012.
- <sup>41</sup> Schrödinger, LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1. August 2010.
- <sup>42</sup> Hridoy R Bairagya, Bishnu P Mukhopadhyay, and Asim K Bera. Conserved water mediated recognition and the dynamics of active site cys 331 and tyr 411 in hydrated structure of human impdh-ii. *Journal of Molecular Recognition*, 24(1):35–44, 2011.
- <sup>43</sup> Robert G Parr and Weitao Yang. *Density-functional theory of atoms and molecules*, volume 16. Oxford university press, 1989.

- <sup>44</sup> Eric D Glendening, Clark R Landis, and Frank Weinhold. Natural bond orbital methods. *Wiley interdisciplinary reviews: computational molecular science*, 2(1):1–42, 2012.
- <sup>45</sup> Pilar Rivas, Gerald Zapata-Torres, Junia Melin, and Renato Contreras. Probing the hydride transfer process in the lumiflavine–1-methylnicotinamide model system using group softness. *Tetrahedron*, 60(19):4189–4196, 2004.
- <sup>46</sup> Kathrin H Hopmann and Fahmi Himo. Quantum chemical modeling of the dehalogenation reaction of haloalcohol dehalogenase. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4(7):1129–1137, 2008.
- <sup>47</sup> Sándor Kristyán and Péter Pulay. Can (semi) local density functional theory account for the london dispersion forces? *Chemical physics letters*, 229(3):175–180, 1994.
- <sup>48</sup> Per EM Siegbahn and Fahmi Himo. The quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 1(3):323–336, 2011.
- <sup>49</sup> Maria ES Lind and Fahmi Himo. Quantum chemistry as a tool in asymmetric biocatalysis: Limonene epoxide hydrolase test case. *Angewandte Chemie*, 125(17):4661–4665, 2013.
- <sup>50</sup> Rahul Kar and Sourav Pal. Effect of solvents having different dielectric constants on reactivity: A conceptual dft approach. *International Journal of Quantum Chemistry*, 110(9):1642–1647, 2010.
- <sup>51</sup> Pierre Hohenberg and Walter Kohn. Inhomogeneous electron gas. *Physical review*, 136(3B):B864, 1964.
- <sup>52</sup> Walter Kohn and Lu Jeu Sham. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Physical Review*, 140(4A):A1133, 1965.
- <sup>53</sup> John C Slater. A simplification of the hartree-fock method. *Physical Review*, 81(3):385, 1951.

- <sup>54</sup> Seymour H Vosko, LI Wilk, and M Nusair. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Canadian Journal of Physics*, 58(8):1200–1211, 1980.
- <sup>55</sup> Garrett M Morris, Ruth Huey, William Lindstrom, Michel F Sanner, Richard K Belew, David S Goodsell, and Arthur J Olson. Autodock4 and autodocktools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16):2785–2791, 2009.
- <sup>56</sup> Ruth Huey, Garrett M Morris, Arthur J Olson, and David S Goodsell. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of computational chemistry*, 28(6):1145–1152, 2007.
- <sup>57</sup> Oleg Trott and Arthur J Olson. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2):455–461, 2010.
- <sup>58</sup> M Reyes-Parada, A Fierro, P Iturriaga-Vásquez, and Bruce K Cassels. Monoamine oxidase inhibition in the light of new structural data. *Current Enzyme Inhibition*, 1(1):85–95, 2005.
- <sup>59</sup> Eliseo Ruiz, Joan Cano, Santiago Alvarez, and Pere Alemany. Broken symmetry approach to calculation of exchange coupling constants for homobinuclear and heterobinuclear transition metal complexes. *Journal of computational chemistry*, 20(13):1391–1400, 1999.
- <sup>60</sup> Edward L Mertz and Lev I Krishtalik. Low dielectric response in enzyme active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(5):2081–2086, 2000.
- <sup>61</sup> Daniel A Karp, Apostolos G Gittis, Mary R Stahley, Carolyn A Fitch, Wesley E Stites, and Bertrand García-Moreno E. High apparent dielectric constant inside a protein reflects structural reorganization coupled to the ionization of an internal asp. *Biophysical journal*, 92(6):2041–2053, 2007.

- <sup>62</sup> Liangfa Gong, Jieming Xiong, Xinmin Wu, Chuansong Qi, Wei Li, and Wenli Guo. Density functional study of structures and electron affinities of bro4f/bro4f. *International journal of molecular sciences*, 10(7):3128–3148, 2009.
- <sup>63</sup> M Torrent-Sucarrat, F De Proft, PW Ayers, and P Geerlings. On the applicability of local softness and hardness. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(5):1072–1080, 2010.