

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

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

Gerald Amilcar Zapata Torres

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 30 de Mayo de 2002,

Director de Tesis:

Dra. Julia Parra Mouchet


.....

Dr. Bruce Cassels Niven

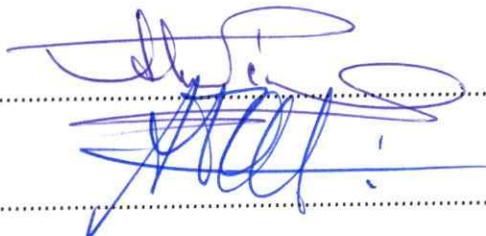

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Luis Núñez Vergara (Presidente)


.....

Dra. Luz María Pérez


.....

Dr. Alejandro Toro Labbé


.....

Dr. Marcos Caroli Rezende


.....

Le dedico esta tesis a Manuel Pinto, "Manolito".

Agradecimientos

A mi directora de tesis Dra. Julia Parra Mouchet, por su dedicación, apoyo, y enseñanzas no tan sólo en el mundo de la Química Cuántica, sino también por su calidez y por todas esas miles de discusiones que siempre me han enfrentado al desafío de aprender.

A mi director de tesis Dr. Bruce Cassels, por su incuestionable apoyo a cada una de mis ideas y a cada proyecto que emprendí durante la realización de esta tesis. Infinitas gracias por entregarme todas las herramientas para desarrollarla, por las discusiones y charlas que me han hecho crecer y ver el mundo desde otra perspectiva.

Al Dr. George G. Lunt, por su apoyo y empuje para empezar el doctorado y por darme la oportunidad de permanecer en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Bath donde obtuve grandes realizaciones tanto académicas como personales.

Al Dr. David Osguthorpe, por sus magníficas discusiones, por guiarme en el camino de la modelación molecular, por su actitud crítica frente a ésta, y, sobretodo, por el apoyo brindado en la realización de esta tesis al darme un espacio en su grupo de trabajo en la Unidad de Gráfica Molecular del Departamento de Química de la Universidad de Bath.

Al Dr. Gareth Adams, por su compañerismo y preocupación al inicio de esta tesis al entregarme las herramientas básicas del Unix y todas esas "triquiñuelas" para desarrollar mis modelos ya que sin éstas mis primeros intentos habrían sido un fracaso. Le doy gracias por esas largas conversaciones junto a un "pint of lager" y por hacer mis estadías en Bath más llevaderas.

A mi amigo Fernando Retamal por su cariño y apoyo durante todos estos años.

A mi padres y hermanos.

A Marco Rebolledo por su invaluable ayuda y a todos mis compañeros con los cuales he compartido gratas veladas de estudio, de trabajo y de relajó.

Quisiera agradecer al Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile por el financiamiento parcial de esta tesis a través de la Beca PG/054/98.

Agradecer a CONICYT por la beca de doctorado otorgada durante los años 1995-1998. También quisiera agradecer la beca obtenida British Council, que a través de CONICYT financió mi estadía del año 1997 en la Universidad de Bath.

Agradecer al proyecto FONDECYT Nº 2000009 por el financiamiento parcial de esta tesis.

A CONICYT por el proyecto de término de tesis de doctorado 2001.

Y por último, agradecer al Instituto Milenio para Estudios Avanzados en Biología Celular y Biotecnología.

INDICE DE MATERIAS

Lista de abreviaturas.....	7
Resumen	8
Summary	11
Capítulo I. Receptores de serotonina 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C} y sus ligandos.....	13
1.1 Esquema de la tesis.....	13
1.2 Resumen	15
1.3 Introducción a la investigación de receptores 5-HT ₂	15
1.3.1 Farmacología de 5-HT	16
1.3.2 Clasificación de receptores de 5-HT	16
1.4 Receptores 5-HT ₂	17
1.4.1 Modulación de receptores de la clase 5-HT ₂	17
1.4.2 Distribución de receptores de la clase 5-HT ₂	18
1.4.3 Estructura y clonación de receptores 5-HT ₂	18
1.4.4 Residuos involucrados en la estructura y función de GPCRs de la clase I.....	22
1.5 Ligandos para receptores 5-HT ₂	27
1.6 Comparaciones de afinidades de enlace de fenilisopropilaminas en receptores humanos clonados 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C}	29
1.7 Referencias.....	34
Capítulo II. Modelos tridimensionales de los receptores de serotonina 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C} ..	38
II.1 Resumen	38
II.2 Introducción	39
II.3 Metodología	40
II.4 Estructura tridimensional tentativa de receptores acoplados a proteínas-G.	40
II.5 Metodología de modelación de receptores acoplados a proteínas G	42
II.5.1 Elección de los segmentos helicoidales y esquema de numeración.....	42
II.5.2 Alineación de secuencias para receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C}	45
II.5.3 Diseño de la estructura de la región transmembranal	48
II.5.4 Construcción de la matriz de coordenadas internas para los átomos de C _α ..	50
II.5.5 Identificación de superficies internas	51

II.5.6 El arreglo de las hélices	53
II.6 Método de Modelación.....	55
II.6.1 Construcción de los modelos tridimensionales de receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C}	55
II.6.2 Procedimiento "Fold-Fit" usando Valence Force Field (VFF)	55
II.7 Evaluación del modelo 5-HT _{2A}	60
II.7.1 Simulaciones de dinámica molecular clásica (DM) y de Selectively Enhanced Molecular Dynamics (SEMD)	60
II.7.2 Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) entre dinámica molecular clásica y SEMD.....	63
II.8 Generación de modelo inserto en membrana	65
II.9 Conclusiones	66
II.10 Referencias.....	67
Capítulo III. "Docking" de ligandos agonistas de receptores 5-HT	70
III.1 Resumen	70
III.2 Introducción	71
III.3 Metodología.....	72
III.4 Modelos de farmacóforo para los receptores de 5-HT.....	72
III.5 Descripción del sitio de unión determinado experimentalmente	74
III.6 "Docking" de ligandos en los modelos de receptores	76
III.6.1 Entorno de 5-HT	77
III.6.2 Energías de interacciones específicas de 5-HT con los residuos cercanos...80	
III.7 Interacciones de 5-HT con moléculas de agua.....	82
III.8 Posición y descripción del sitio de enlace aromático	84
III.9 Sitio de enlace electrostático para otros ligandos agonistas.....	88
III.10 Conclusiones	91
III.11 Referencias.....	93
Capítulo IV. Modelos para la reproducción de los efectos del medio en la interacción entre receptores de 5-HT y sus ligandos.....	95
IV.1 Resumen.....	95

IV.2 Metodología.....	96
IV.3 Propiedades conformacionales de ligandos de receptores serotoninérgicos	96
IV.3.1 Análisis conformacional de 5-HT	96
IV.3.2 Análisis conformacional de DOB	98
IV.3.3 Racionalización de espectros de RMN de ¹ H de MDMA a través de análisis conformacional.....	100
IV.4 Basicidad y descriptores moleculares en el vacío.....	103
IV.4.1 Estado gaseoso	104
IV.4.2 Efecto de la polaridad del solvente en la basicidad de los sistemas modelo	108
IV.5 Basicidad intrínseca de ligandos serotoninérgicos.....	109
IV.6 Descriptores moleculares de la basicidad de agonistas 5-HT	114
IV.7 Influencia de la polaridad del solvente agua en la transferencia protónica para 5-HT y DOB en presencia de ácido fórmico	117
IV.8 Influencia de cargas puntuales en el enlace hidrógeno de sistemas amina-ácido fórmico	119
IV.8.1 Sistema modelo: amoníaco – ácido fórmico	120
IV.8.2 Orbitales moleculares.....	125
IV.8.3 Aplicación de campo externo a la transferencia 5-HT ... HCOOH.....	127
IV.8.4 Descriptores moleculares de la basicidad relativa de amoníaco y formiato	129
IV.9 Inversión del campo externo.....	133
IV.9.1 Influencia de campos externos en la transferencia protónica de sistemas DOX – ácido fórmico y descriptores moleculares de la basicidad de los ligandos DOX	134
IV.10 Conclusiones.....	138
IV.11 Referencias	140
Capítulo V. Conclusiones generales.....	143
V.1 Referencias	147
Apéndice I.....	148
Apéndice II. Metodología.....	149
A II.1 Métodos Mecano-cuánticos	149

A II 1.1 Métodos <i>ab initio</i>	150
A II 1.1.1 Base Mínima	154
A II 1.1.2 Conjunto de funciones de base de partición de la capa de valencia	154
A II 1.1.3 Conjuntos de bases extendidos.....	155
A II 2 Métodos DFT.....	158
A II.3 Métodos Semiempíricos	162
A II.4 Efecto del medio.....	165
A II.4.1 Modelos de Continúo	165
A II.5 Métodos Clásicos	167
A II.6 Simulaciones SEMD.....	173
A II.7 Referencias	174
Apéndice III.....	176
A III.1 Función de Fukui	176
A III.2 Referencias	180
Apéndice IV	181
Publicaciones generadas por la tesis.....	181
Presentaciones a congresos.....	182

INDICE DE TABLAS

Tabla I.1 Afinidades medidas de derivados de fenilisopropilaminas obtenidas de ref. [21]. Esta tabla incluye también las afinidades medidas para 5-HT [70], 2-Br-LSD [70] y m-CPP ref. [21] por receptores humanos 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C} usando el radioligando agonista [¹²⁵ I]DOI.	31
Tabla II.1 Receptor; indica el tipo de receptor en el cual la mutación fue hecha. Efecto; el tipo de cambio funcional reportado: (t) afinidad por antagonista afectada, (g) afinidad por agonista afectada, (t/g) ambos observados, (nt/g) g pero no se observa cambio en la afinidad por antagonista, (t/ng) t pero no se observa cambio en la afinidad por agonista.	52
Tabla III.1 Distancias de enlace por hidrógeno entre el residuo Asp conservado y grupo amonio de diferentes ligandos serotoninérgicos.	78
Tabla III.2 Residuos de los receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C} que interaccionan con 5-HT y otros ligandos serotoninérgicos obtenidos del proceso de "docking". Los residuos están coloreados para mejor comprensión de la tabla; también se indica la posición en cada receptor.	79
Tabla IV.1 Desplazamientos químicos de ¹ H y constantes de acoplamiento vecinales de protones de la cadena ^a y distribución de conformeros ^b de MDMA libre y protonado.	103
Tabla IV.2 Afinidad protónica (PA), diferencia en afinidad protónica (Δ PA), transferencia de carga (Δ N). Propiedades de sitio en el átomo de nitrógeno para complejos neutros, función de Fukui f_{NR} , blandura local (eV) ⁻¹ y dureza local (eV) para la serie de metilaminas a nivel HF/6-31g(d).	107
Tabla IV.3 Energías de OM (E OM) para la formas neutra y zwitteriónica para sistema modelo obtenidos para diferentes ctes. dieléctricas (ϵ) a nivel ab initio HF/6-31g(d)/PCM.	109
Tabla IV.4 Diferencias en afinidad protónica para ligandos 5-HT; constantes de afinidad de ref. [50] para receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C} usando como referencia [¹²⁵ I]DOI.	111
Tabla IV.5 Energía de enlace obtenida usando error de superposición de base. La segunda columna muestra la energía del complejo (Ligando/HCOOH) en Hartrees. La tercera y cuarta columna son las energías de las moléculas aisladas cada una en presencia de la otra (Hartrees). La quinta columna muestra la energía de enlace (kcal mol ⁻¹). Las columnas sexta y séptima muestran las constantes de afinidad medidas para estos ligandos usando [¹²⁵ I]DOI como ligando radioactivo.	113

Tabla IV.6 Funciones de Fukui calculadas en los tres últimos orbitales ocupados para la familia DOX (segunda, tercera y cuarta columna), energía del orbital molecular localizado en el átomo N (Hartrees) en la molécula aislada (quinta columna) y cuando está formando un complejo con HCOOH (sexta columna), blandura global de la molécula (séptima columna) y blandura local (octava columna) en (eV ⁻¹).....	114
Tabla IV.7 Ligando (primera columna), energía del complejo formado por ligando-ácido fórmico (segunda columna), considerando el error de superposición de base (BSSE), la energía en Hartrees del ligando en presencia de ácido fórmico (tercera columna), ácido fórmico en presencia del ligando (BSSE) (cuarta columna), la energía del enlace en kcal mol ⁻¹ (quinta columna), constantes de afinidad de ref. [48] (sexta y séptima columna).	115
Tabla IV.8 Diferencias de energías relativas entre forma neutra y zwitteriónica del complejo ácido-base amoníaco-ácido fórmico.	124
Tabla IV.9 Campos 5/1. Intensidad de campo (primera columna); energía total (au) de la forma neutra protonada en O1 (segunda columna), forma protonada en O7 (tercera columna), forma zwitteriónica (cuarta columna). Diferencias de energías en kcal mol ⁻¹ entre formas Z y NO1 y formas NO1 y NO7 (quinta y sexta columna), respectivamente.	129
Tabla IV.10 Campo aplicado forma N (primera columna), energía total (Hartrees), energía OM (Hartrees), tipo OM, función de Fukui f_N , función de Fukui f_O	130
Tabla IV.11 Campo aplicado forma Z (primera columna), energía total (Hartrees), energía OM (Hartrees), tipo OM, función de Fukui f_N , función de Fukui f_O	131
Tabla IV.12 Inversión del campo.....	133
Tabla IV.13 Campos aplicados (primera columna), energía total (Hartrees) forma neutra y zwitteriónica (segunda y tercera columna), ΔE diferencia de energía total entre ambas formas (cuarta columna), valor propio OM sobre par electrónico libre del nitrógeno (2pz) de la forma neutra, valor propio OM sobre par electrónico libre del O1 (2pz) de la forma zwitteriónica (quinta y sexta columna),respectivamente.	135
Tabla IV.14 Campos inversos aplicados (primera columna), energía total (Hartrees) forma neutra y zwitteriónica (segunda y tercera columna, respectivamente), ΔE diferencia de energía total entre ambas formas (cuarta columna), valor propio OM sobre par electrónico libre del nitrógeno	

(2pz) de la forma neutra, valor propio OM sobre par electrónico libre del O1 (2pz) de la forma zwitteriónica (quinta y sexta columna, respectivamente)..... 136

Tabla IV.15 Campos inversos aplicados, EC energía total complejo (Hartrees), energía total moléculas aisladas (cuarta y quinta columna, respectivamente), sexta columna equivale a la suma de las energías de las moléculas aisladas, ΔE diferencia de energía total entre EC y la suma de las energías totales de complejos aislados..... 137

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1 Estructuras de agonistas de receptores de 5-HT	15
Figura I.2 Representación esquemática de la topología de los GPCRs. Los segmentos transmembranales están indicados con la numeración de 1 a 7. La conexión de estas hélices es a través de lazos intra- y extracelulares. Esta figura fue obtenida de ref. [40] y traducida para mayor claridad.....	20
Figura I.3 Alineación de secuencias de receptores humanos 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C} (5h2a_h y 5h2c_h, respectivamente). Para mejor comprensión del texto, la numeración de residuos corresponde a cada secuencia por separado. Las secuencias de aminoácidos para el receptor 5-HT _{2A} [41] y 5-HT _{2C} [41] fueron obtenidas de la base de datos SWISS-PROT [42]. Las siete potenciales regiones transmembranales (Hx) han sido señaladas con (-) para los receptores 5-HT _{2A} y con (^) para los receptores 5-HT _{2C} . En la figura, para ambos receptores, los sitios de N-glicosilación han sido señalados con (g), los sitios de fosforilación con (f) y los sitios de palmitoilación con (p). Los residuos conservados en la familia de receptores 5-HT ₂ están indicados en la línea conservados y los residuos importantes para la familia GPCR de clase I están también señalados. Los aminoácidos también han sido coloreados según su polaridad, i.e., residuos no polares: Ala, Val, Leu, Ile, Met (magenta); residuos aromáticos: Tyr, Trp, Phe (celeste); residuos polares: Ser, Thr, Asn, Gln (verde); residuos ácidos: Asp, Glu (azul); residuos básicos: Lys, Arg, His (rojo); residuo Cys (amarillo); otros residuos: Gly, Pro (negro).	22
Figura I.4 Ejemplos de ligandos derivados de ergolinas para receptores de 5-HT. El átomo de nitrógeno básico está incorporado en un heterociclo y fijado en una conformación rígida.....	28
Figura I.5 Estructuras de fenilisopropilaminas: 1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)-2-aminopropano (DOM) y 1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano.	28
Figura I.6 Ligandos derivados de fenilisopropilaminas.	30
Figura I.7 Estructuras de agonistas y antagonistas en los receptores 5-HT _{2A} y 5-HT _{2C}	33
Figura II.1 Mapa de proyección de la rodopsina bovina. La numeración de las hélices está en el sentido de las manecillas del reloj. La vista del receptor es desde la superficie intracelular.....	41
Figura II.2. Distribución de residuos característicos para cada hélice y distribución de residuos polares de acuerdo a Baldwin [10]. Las posiciones de los residuos están numeradas a la derecha (1-26) de cada columna, hacia arriba para los segmentos I, III, V, VII y hacia abajo para los	

segmentos II, IV y VI; la superficie intracelular de la membrana está representada por la parte superior de la figura. La numeración a la izquierda corresponde a la numeración en la secuencia aminoacídica del primer y último residuo del receptor 5-HT_{2A}. Los símbolos en las posiciones indican si se trata de sitios ocupados por un residuo polar en unas pocas secuencias (++) o en más del 10% de las secuencias (###) de GPCRs. Cuando no hay ningún símbolo, significa que nunca hay residuos polares en este sitio. (residuos polares incluyen D, N, E, Q, H, R, K; todos los otros son capaces de orientarse hacia los lípidos). Los residuos altamente conservados en cada hélice están a la derecha junto con el porcentaje en que aparecen en la secuencia. La elección de 26 aminoácidos por hélice está explicada en el texto. De acuerdo con este esquema la hélice III debería estar situada al interior de las siete hélices debido a la mayor concentración de residuos polares y la hélice IV más expuesta al entorno lipídico debido a la mayor concentración de residuos apolares.44

Figura II.3. Secuencias de los dominios transmembranales de los subtipos de receptores humanos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} y sus alineamientos (por autor a la derecha de la figura) de acuerdo a la predicción PHD de Rost y col. ref. [33], Schmuck y col. ref. [27], Bremner y col. ref. [30]. Todas las definiciones de regiones transmembranales fueron hechas con las secuencias para receptores humanos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} obtenidas de la ref. [34]. El símbolo (*) en la línea inferior de algunos residuos indica los residuos conservados en todos los GPCRs.47

Figura II.4. Secciones extracelular, media e intracelular descritas a partir de los siete picos de densidad. Se observan cuatro estructuras que representan hélices casi perpendiculares a la membrana (4,5,6,7 de acuerdo a la figura) y las otras tres estructuras que adoptan una forma de arco más elongado en proyección, representando hélices en una posición más inclinada (1,2 y 3, respectivamente). Esta figura fue obtenida del sitio Web de Schertler "Rhodopsin" (http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/research/SS/Schertler_G).....49

Figura II.5. Posiciones relativas de los ejes de las hélices en las secciones media (verde), intracelular (azul) y extracelular (rojo), respectivamente.50

Figura II.6. Vista esquemática de la región transmembranal. El ordenamiento gira en sentido de las manecillas del reloj. En la figura están marcadas la posición III:7 donde se encuentra el residuo Asp y las posiciones V:7 y V:10 donde están situados los residuos de Ser.52

Lista de abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT _{2A}	receptor de serotonina subtipo 2A
5-HT _{2C}	receptor de serotonina subtipo 2C
CNS	sistema nervioso central
GPCRs	receptor(es) acoplado(s) a proteínas G
TM	segmento transmembranal
H _α	hélice alfa
DFT	teoría de funcionales de la densidad
SAR	relaciones estructura-actividad
bRh	bacteriorodopsina
rH	rodopsina
DM	dinámica Molecular
SEMD	dinámica molecular selectivamente aumentada
DMPC	dimiristoilfosfatidilcolina
RMSD	raíz de la desviación cuadrática media
VFF	valence force field
EM	minimización de energía
OM	orbital molecular
HOMO	orbital molecular ocupado de más alta energía
HF	Hartree-Fock
AM1	Austin Model 1
PTPF	perfiles de transferencia protónica

Resumen

En esta tesis, los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} fueron escogidos como modelos de la familia más amplia de receptores insertos en membranas y acoplados a proteínas-G con el propósito de estudiar las interacciones ligando-receptor. Utilizando el campo de fuerzas *Valence Force Field* fue posible construir las correspondientes estructuras tridimensionales a partir del conocimiento de las estructuras primarias y secundarias disponibles en la literatura científica. Usando una combinación de simulaciones de dinámica molecular y minimizaciones de energía, junto con algunas restricciones geométricas y una matriz de coordenadas internas de C α premodelada sobre bases experimentales, se lograron modelos confiables que pueden ser usados para el análisis de las propiedades dinámicas de estos receptores y que se podrían extender todos los receptores acoplados a proteínas-G. Otros modelos publicados han basado su construcción en dinámica molecular clásica la cual no es una metodología suficientemente poderosa como para permitir una búsqueda exhaustiva de nuevas conformaciones. También, la mayor parte de los modelos publicados no han tomado en cuenta los lazos conectivos entre hélices que sí han sido incorporados exitosamente en este trabajo, generando una representación más realista de los receptores.

Se efectuó en estos modelos el "docking" de ligandos agonistas de receptores de 5-HT pertenecientes a las tres clases más importantes: derivados de triptamina, tales como 5-HT, derivados de fenilisopropilaminas tales como 1-(2,5-dimetoxi-4-X-fenil)-2-aminopropanos (X = -Br, -I) y derivados de ergolinas como LSD y 2-Br-LSD. El "docking" con estos ligandos fue guiado principalmente usando la información experimental obtenida de receptores con mutaciones sitio dirigidas. Se encontró que en ambos modelos los agonistas interactúan con distintos tipos de residuos en varias hélices. Sin embargo, a pesar de que los ligandos presentan afinidades distintas por ambos receptores, estos sitios de enlace difieren muy poco para los agonistas estudiados, conservándose principalmente las interacciones descritas en la literatura. La mayor afinidad que presentan los ligandos por los receptores 5-HT_{2A} respecto de los 5-HT_{2C} puede ser interpretada a la luz de los resultados obtenidos en este estudio. El análisis de las energías involucradas muestra un buen acuerdo con los resultados experimentales descritos en la

literatura, siendo la interacción con mayor relevancia aquélla del grupo amonio de los ligandos con el residuo Asp¹⁵⁵ del receptor 5-HT_{2A} (Asp¹³⁴ del receptor 5-HT_{2C}), la cual es de carácter electrostático. Para los demás residuos que interactúan con los ligandos en el sitio de unión también existe un buen acuerdo, aunque su contribución a la energía es menor. Cabe destacar que, a pesar de que ambos receptores de 5-HT tienen residuos conservados en las mismas posiciones, la contribución de éstos a la energía de interacción es distinta, lo que podría dar cuenta de las diferencias en las afinidades presentadas por los ligandos. La inclusión de moléculas de agua en las simulaciones es de importancia también, ya que éstas aportan a la energía de la unión ligando-receptor en una medida similar a la de los residuos aminoacídicos que están cercanos al ligando. Estos modelos integran y evalúan la información obtenida de varios modelos postulados anteriormente, y por lo tanto constituyen una extensión y refinamiento de los mismos. Muestran cómo, en el enlace de agonistas estructuralmente parecidos, suele bastar con el reemplazo de un grupo sustituyente para cambiar la afinidad.

El trabajo químico cuántico se centró en la descripción de la superficie de energía potencial de ligandos serotoninérgicos basada en los análisis conformacionales a nivel AM1 de algunos ligandos. Las metodologías desarrolladas en el marco de la aproximación Hartree-Fock-Roothan proveen una buena descripción de dicha superficie y de las estructuras electrónicas de estos ligandos serotoninérgicos y, en particular, el hamiltoniano AM1 recupera los resultados experimentales de espectros RMN de ¹H.

Posteriormente se realizó un estudio sistemático de la interacción ligando-aspartato a través de un enlace por hidrógeno, utilizando como modelos resultados *ab initio* a nivel 3-21g y 6-31g(d) para la descripción de la interacción ligando serotoninérgico – ácido fórmico obteniendo resultados que están de acuerdo con los datos experimentales. Se estudió también el efecto de campos eléctricos en la interacción ligando – receptor, los cuales pueden ser creados por otros residuos o por moléculas de agua estructurales en el entorno del sitio de unión, obteniendo así una mayor comprensión de la interacción, incluyendo un posible mecanismo de activación o desactivación del receptor en lo que respecta a la unión o disociación del ligando.

Se examinaron descriptores moleculares de la basicidad de aminas y se demostró que la aproximación de core rígido no es aplicable a sistemas cuyo HOMO pertenezca al sistema π y el grupo amino al sistema σ . La conclusión más relevante es que dichos descriptores deben ser

evaluados en el orbital molecular que representa el par electrónico libre sobre el átomo de nitrógeno del grupo amino. Se propone que el valor propio de la energía del orbital molecular anteriormente mencionado constituye un descriptor molecular de la basicidad de aminas en general, aplicable a sistemas aislados, en solución o en la presencia de campos eléctricos. Una conclusión análoga vale para el ión formiato.

Summary

In this thesis, serotonergic 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors were chosen as models of the broader family of membrane-bound G-protein-coupled receptors, with the purpose of studying ligand - receptor interactions. Using *Valence Force Field* methodology, the corresponding three-dimensional structures were built starting from the knowledge of the primary and secondary structures available in the literature. Using a combination of molecular dynamics simulations and energy minimisations, together with some geometric restrictions and a matrix of internal C_α coordinates premodeled on an experimental foundation, reliable models were obtained which may be used for the analysis of the dynamic properties of these receptors and which could be extended to all G-protein-coupled receptors. Other published models have been based upon classical molecular dynamics, a methodology which is not sufficiently powerful to allow the exhaustive search of new conformations. In addition, most of the published models do not take into account the connective loops between alpha helices which have been incorporated in this work, generating a more realistic representation of the receptors.

Docking studies were performed with 5-HT receptor agonist ligands belonging to the three most important classes: tryptamine derivatives such as 5-HT, phenylisopropylamine derivatives such as 1-(2,5-dimethoxy-4-X-phenyl)-2-aminopropanes (X = -Br, -I), and ergoline derivatives such as LSD and 2-Br-LSD. The docking of these ligands was guided mainly by experimental information obtained from receptors with site-directed mutations. It was found that in both models the agonists interact with different kinds of residues in several helices. Nevertheless, although the ligands exhibit different affinities for both receptors, these binding sites differ very little for the agonists studied, largely reproducing the interactions described in the literature. The greater affinity shown by these ligands for 5-HT_{2A} with regard to 5-HT_{2C} receptors can be interpreted in the light of the results obtained in this study. The analysis of the energies involved is in good agreement with the experimental results recorded in the literature, with the most relevant interaction being that between the ammonium group of the ligands and the Asp¹⁵⁵ residue of the 5-HT_{2A} receptor (Asp¹³⁴ of the 5-HT_{2C} receptor), which is electrostatic in character. There is also

good agreement for the other residues interacting with the ligands in the binding site, although their contribution to the energy is smaller. It should be stressed that, although both 5-HT receptors have conserved residues at the same positions, the contribution of these to the interaction energy is different, which might account for the differences in affinity exhibited by the ligands. The inclusion of water molecules in the simulations is also important, as these contribute to ligand-receptor binding energy in a similar measure to the amino acid residues close to the ligand. These models integrate and assess information obtained from several models proposed previously, and are therefore an extension and a refinement of these. They show how, in the binding of structurally similar agonists, it is usually sufficient to replace a substituent group to change affinity.

The quantum-chemical study was centred on the description of the potential energy surface of serotonergic ligands, based upon conformational analyses at the AM1 level of some of them. The methodologies developed in the framework of the Hartree-Fock-Roothan approximation provide a good description of this surface and of the electronic structures of these serotonergic ligands and, in particular, the AM1 hamiltonian reproduces the experimental ^1H NMR spectroscopic results.

A systematic study was finally carried out on the ligand - aspartate interaction through a hydrogen bond, using *ab initio* results at the 3-21g and 6-31g(d) levels for the description of the serotonergic ligand - formic acid interaction as a model and obtaining results which are in agreement with the experimental data. The effect of electric fields on the ligand - receptor interaction was also studied, as these may be established by other residues or by structural water molecules in the vicinity of the binding site, thus yielding an improved understanding of the interaction, including a possible mechanism for the activation or deactivation of the receptor as related to the binding or dissociation of the ligand.

Molecular descriptors of the basicity of amines were studied, and it was shown that the rigid core approximation is not applicable to systems whose HOMO belongs to the π system and the amino group to the σ system. The most relevant conclusion is that these descriptors must be evaluated in the molecular orbital representing the amino group nitrogen lone pair. It is proposed that the eigenvalue of the energy of the aforementioned molecular orbital is a descriptor of amine basicity in general, applicable to isolated systems, to systems in solution, or in the presence of electric fields. An analogous conclusion holds for the formate ion.

Capítulo I. Receptores de serotonina 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} y sus ligandos

I.1 Esquema de la tesis

Los subtipos de receptores 5-HT₂ son interesantes objetivos de investigación ya que ellos han sido implicados en la ansiedad y en la depresión. Dar luz sobre los mecanismos que están involucrados con la afinidad por el receptor, selectividad y funcionalidad podría de ser de ayuda en la búsqueda de nuevos compuestos selectivos para estos receptores. El estudio de las interacciones ligando-receptor a nivel molecular, que pueda proveer tal información, ha sido ayudado por el rápido desarrollo de nuevas herramientas en biotecnología y modelación molecular.

Al comienzo de las investigaciones descritas en esta tesis, la primera estructura de la región transmembranal de una proteína inserta en membrana, bacteriorrodopsina, había sido publicada [1]. Esta estructura ha sido usada para la construcción de varios GPCRs [2], aunque la validez como una plantilla estructural de los GPCRs, no ha estado ausente de constante debate. Hacia 1997, la descripción de Baldwin de la estructura de rodopsina, que si es un GPCR, junto con la posterior obtención de la estructura de rodopsina [3], que validó la descripción, más la información de mutaciones sitio-dirigidas en los varios receptores de 5-HT, nos enfocamos en los receptores 5-HT₂ por su significado farmacológico y la abundancia de información disponible para estos subtipos de receptores.

La descripción de la estructura de rodopsina y los datos de mutación de los receptores 5-HT₂ que fueron usados para la construcción de modelos tridimensionales para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, son descritos en el Capítulo II. En este capítulo también se describe la metodología de modelación usando el campos de fuerza de valencia, así como las propiedades conformacionales de los receptores construidos.

La fuerza de los modelos para la predicción de las interacciones es evaluada en el Capítulo III. Usando técnicas gráficas de modelación junto con el programa Insight II, estudiamos diversos ligandos agonistas y la energía involucrada en la interacción en el sitio de unión. Sin embargo, como estas metodologías basadas en la mecánica clásica, no involucran el rompimiento ni formación de enlace, y la interacción con mayor relevancia descrita en este capítulo, confirma la interacción experimental descrita entre un ligando protonado y un residuo

de Asp conservado en posición en ambos receptores, estudiamos la transferencia protónica con metodologías de la mecánica cuántica en el Capítulo IV.

El capítulo IV presenta el estudio químico cuántico de ligandos de receptores 5-HT basado en el hecho que todos ellos son aminas y que el sitio de unión aniónico en los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} ha sido indicado como un residuo Asp. Estudiamos primero la estructura conformacional en fase gaseosa y condensada de moléculas aisladas tales como 5-HT y de algunos ligandos seleccionados representativos de las clases estructurales más importantes que interaccionan en estos receptores. Luego, debido a que en las interacciones ligando-receptor el enlace por hidrógeno tiene importancia fundamental, estudiamos junto a éste la transferencia de protón intramolecular dentro de un complejo ácido-base enlazado utilizando para ello un modelo amoníaco-ácido fórmico para predecir reactividad de aminas (basicidad) en la presencia de un ácido carboxílico. El residuo Asp fue modelado como ácido fórmico y las aminas como amoníaco. Este sistema simple admite la realización de cálculos de buena calidad y, además, permite controlar las variables que contribuyen a la basicidad de aminas. Los resultados de este modelo en fase gaseosa fueron interpretados en función de la diferencia entre la afinidad protónica de ambas bases (amoníaco y formiato). Una posterior aplicación de las diferencias en afinidad protónica usando distintos ligandos de receptores 5-HT fue realizada, dando cuenta de las tendencias en las afinidades presentadas por ellos.

Debido a que al interior de los sitios de unión en estos receptores se espera la existencia de campos eléctricos creados por el resto de los residuos involucrados en la unión al receptor y posible moléculas de agua descritas en el capítulo III, sometimos el sistema modelo amoníaco-ácido fórmico a campos eléctricos producidos por dipolos puntos cargas. La interpretación de estos resultados a través de los orbitales moleculares involucrados en el puente de hidrógeno constituye un índice de reactividad de las aminas con el ácido fórmico. Una aplicación posterior de este modelo con puntos-cargas a la transferencia protónica en el sistema 5-HT-ácido fórmico y DOB-ácido fórmico demuestran la posibilidad de modular esta transferencia protónica ya que los campos pueden producir una curva de doble pozo, condición necesaria para el equilibrio tautomérico entre las formas neutras y protonadas en el sitio de unión.

I.2 Resumen

En este capítulo de introducción, los aspectos estructurales y farmacológicos más importantes de la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) y sus receptores son revisados con un énfasis especial en los subtipos de receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}. Se revisa también la historia de la 5-HT, la relevancia que tiene hoy en el campo farmacológico y la clasificación de otros subtipos de receptores. En esta tesis, los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} fueron escogidos como modelos de una familia más amplia de receptores denominados receptores acoplados a proteínas-G (GPCRs), con el propósito de estudiar las interacciones ligando-receptor. De aquí que la estructura, función y distribución de estos receptores y los diferentes ligandos que muestran alta afinidad por ellos son discutidos con detalle.

I.3 Introducción a la investigación de receptores 5-HT₂

Erspermer en 1930 descubrió la enteramina, la cual más tarde se demostró que es idéntica al compuesto que hoy conocemos como serotonina [4]. El nombre de serotonina se debe al hecho que fue aislada por Rapport y col. en 1947 [5] de suero sanguíneo, e identificada como el compuesto responsable de las propiedades vasotónicas del suero. Posteriormente, los mismos investigadores [6] caracterizaron químicamente la serotonina como 5-hidroxitriptamina (5-HT, 1) (Figura I.1).

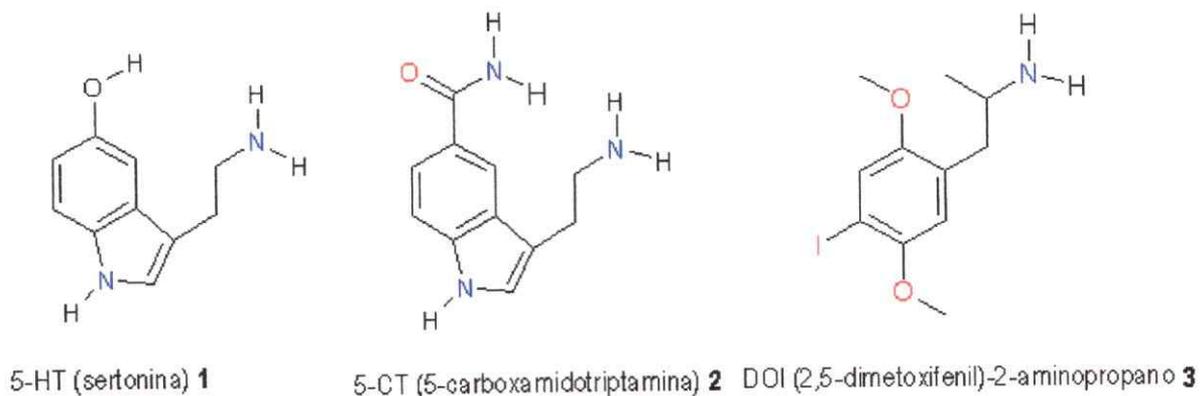


Figura I.1 Estructuras de agonistas de receptores de 5-HT

1.3.1 Farmacología de 5-HT

La 5-HT está involucrada en muchos procesos fisiológicos, en los cuales actúa como hormona o neurotransmisor. Los efectos periféricos de esta molécula incluyen la contracción y la relajación de fibras de músculo liso tal como se demostró originalmente en la pared arterial. También cumple una función en la agregación plaquetaria. En el sistema gastrointestinal la 5-HT induce motilidad intestinal y secreción de ácido gástrico. En el sistema nervioso central (SNC) es un neurotransmisor que afecta el sueño, la termorregulación, la hemodinámica, los procesos de aprendizaje y memoria, la percepción del dolor, el comportamiento (por ejemplo, está relacionada con la alimentación, conductas de agresión y sexualidad), la regulación endocrina, actividad motora, y los ritmos biológicos [7]. Los receptores centrales de 5-HT también están involucrados en varias condiciones patológicas como la ansiedad, depresión, agresividad, ataques de pánico, desórdenes obsesivos compulsivos, esquizofrenia, conductas suicidas, autismo, desórdenes neuro-degenerativos como la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson, el corea de Huntington, migraña, hipertensión, emesis y alcoholismo [8]. La 5-HT ejerce sus efectos interactuando con una multitud de tipos y subtipos de receptores 5-HT. Una breve reseña de la clasificación de estos receptores se da a continuación.

1.3.2 Clasificación de receptores de 5-HT

Inicialmente, sobre la base de estudios funcionales, dos tipos de receptores de 5-HT fueron identificados por Gaddum y Picarelli en 1957 [9]. Estos fueron denominados tipos D y M. Posteriormente en 1979 Peroutka y Snyder [10], usando estudios con radioligandos, los redefinieron como receptores 5-HT₁ y 5-HT₂. En 1986 Bradley y col. [11] sugirieron que los receptores de 5-HT deberían ser referidos como 'tipo-5-HT₁', 5-HT₂ y 5-HT₃, en un intento pragmático de combinación de los diferentes métodos de clasificación. Ellos demostraron que el tipo D se correspondía con el 5-HT₂ y redefinieron al clásico tipo M como receptores 5-HT₃. El término 'tipo-5-HT₁' fue reservado para aquellos receptores que mostraban una alta afinidad por 5-HT y 5-carboxamidotriptamina (5-CT, 2 ver Figura 1.1), pero que, para ese entonces, no podían ser clasificados de manera definitiva. Esta clasificación fundamental de receptores de 5-HT es la que hoy se utiliza, aunque las definiciones de receptores 5-HT₁, 5-HT₂ y 5-HT₃ han sido

modificadas levemente [12]. Es más, la familia de receptores de 5-HT ha sido extendida a nuevos tipos tales como 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇ [13-16]. El progreso de las técnicas de biología molecular ha permitido determinar subtipos de receptores dentro de cada familia de receptores. Por ejemplo dentro del tipo 5-HT₂, se han definido los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}. La clasificación de los receptores de 5-HT y su historia han sido extensamente revisadas por varios autores tales como Peroutka [17], Martin y Humphrey [18], Saudou y Hen [19] y Boess y Martín [20].

1.4 Receptores 5-HT₂

Los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} son los subtipos mejor estudiados de la clase 5-HT₂. Este es el resultado de varios reportes sobre estudios funcionales de algunos alucinógenos clásicos tales como ergolinas, indolilalquilaminas y fenilisopropilaminas que ejercen actividad agonista sobre los receptores 5-HT₂ tales como 1-(2,5-dimetoxi-4-yodofenil)-2-aminopropano (DOI, 3 Figura 1.1), así como la acción de antagonistas como la ketanserina, que ejercen acciones antipsicóticas además de antihipertensivas. Lo anterior se conoce como la hipótesis de acción alucinogénica en los receptores 5-HT₂ [21]. La investigación de los receptores de la clase 5-HT₂ ha conducido al descubrimiento de nuevos y potentes ligandos, con una mayor selectividad para los diversos subtipos. Un resumen de la importancia terapéutica de los compuestos que actúan sobre los receptores 5-HT₂ se da en la siguiente sección.

1.4.1 Modulación de receptores de la clase 5-HT₂

Algunas funciones que tradicionalmente han sido atribuidas a los receptores 5-HT_{2A} pueden ser debidas a la modulación de los receptores 5-HT_{2C}. Desgraciadamente ésta es una cuestión difícil de resolver, ya que no existen ligandos agonistas que sean altamente selectivos entre estos subtipos de receptores. Sin embargo, la modulación de los efectos mediados por la clase 5-HT₂ puede ser útil para el tratamiento de un gran número de enfermedades [22]. Por ejemplo, varios estudios clínicos indican que las respuestas neuroendocrinas mediadas por 5-HT son anormales en pacientes depresivos. Hasta la fecha, parece más fácil discriminar los subtipos

usando antagonistas que retengan alguna selectividad. De hecho, el bloqueo usando antagonistas selectivos de las respuestas mediadas por 5-HT₂ (e.g., mianserina) ha demostrado ser útil en el tratamiento de la depresión.

La combinación de la modulación de los receptores 5-HT₂ con la actividad sobre otros receptores como los del subtipo 5-HT_{1A} parece ser de importancia terapéutica también. La adición de componentes antagonistas 5-HT₂ a agonistas 5-HT_{1A} (y *viceversa*) ha sugerido un posible mejoramiento de antidepresivos selectivos para los subtipos de 5-HT₂ (ó 5-HT_{1A}) [23].

1.4.2 Distribución de receptores de la clase 5-HT₂

Los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC [24]. El receptor 5-HT_{2A} está expresado en varias regiones corticales [25], músculo liso vascular y otros tejidos [26]. En la mayoría de los tejidos los receptores 5-HT_{2A} activan la hidrólisis de phosphoinositidas [27]. Además, los receptores 5-HT_{2A} pueden regular el co-transporte de Na⁺/K⁺/Cl⁻ [28]. Los receptores 5-HT_{2C} se encuentran en el plexo coroideo [29] donde están asociados a la hidrólisis de fosfatidilinositol [30], así como en otras regiones del cerebro que incluyen la corteza, hipocampo e hipotálamo [31]. También los receptores 5-HT_{2C} pueden regular el co-transporte de Na⁺/K⁺/Cl⁻ [28].

1.4.3 Estructura y clonación de receptores 5-HT₂

Los ADN que codifican los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} humanos han sido clonados y expresados por Pritchett y col. [32] y Gundersen y col. [33] respectivamente. El receptor humano 5-HT_{2A} contiene 471 aminoácidos y el receptor 5-HT_{2C} 460 aminoácidos, y muestran 91% y 90% de identidad de aminoácidos con los análogos de rata respectivamente [34]. La identidad entre las secuencias aminoácidas de los receptores 5-HT₂ es más bien baja: ésta corresponde aproximadamente a un 50%, siendo la identidad con el subtipo 5-HT_{1A} más distante (≈ 25%); sin embargo, estas secuencias poseen un 80% de identidad en los dominios transmembranales (TM) [35] a los que se hará referencia más adelante. Este orden de identidad se ve reflejado en los perfiles farmacológicos (e.g., enlace de ligandos y sistemas efectores).

El tipo de receptores 5-HT₂ pertenece a la clase de los receptores acoplados a proteínas-G (GPCRs). Todos los GPCRs utilizan una proteína-G, denominada así porque enlaza un nucleótido de guanosina, para activar un sistema de segundo mensajero. Las proteínas-G son heterotriméricas y se enlazan al receptor en el lado citoplasmático de la membrana celular. La activación de la familia 5-HT₂ conlleva la habilidad de estimular la fosfolipasa C, la cual conduce a un aumento de la hidrólisis de fosfatidilinositol en la célula [14], sin ser éste, sin embargo, el único mecanismo de transducción posible [36].

Todos los miembros de la familia de GPCRs comparten un gran número de características esenciales y comunes tanto en su estructura como en la activación de sistemas de segundos mensajeros. Aunque sólo existe hasta la fecha una estructura tridimensional experimental, basada en difracción de rayos X de la rodopsina, que es un GPCR [3]. Todos estos receptores probablemente contienen siete hélices α (H_{α}) que atraviesan la membrana plasmática, conectadas por tres lazos extracelulares y tres lazos citoplasmáticos (ver Figura 1.2). La región N-terminal está localizada del lado extracelular de la membrana, y la región C-terminal está localizada en el interior de ésta. Las partes lipofílicas de las TM están en contacto con los lípidos de la membrana celular, mientras que los residuos polares y los que se encuentran altamente conservados, se encuentran hacia el interior de las siete H_{α} , formando un núcleo de carácter más bien hidrofílico. Esta topología de GPCRs estuvo inicialmente basada en análisis de alineaciones de secuencias múltiples y análisis de perfiles de hidrofobicidad. Estos análisis teóricos han sido corroborados experimentalmente [37-39]. La Figura 1.3 muestra las secuencias de los dominios transmembranales para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} y la alineación con otros subtipos de receptores de 5-HT.

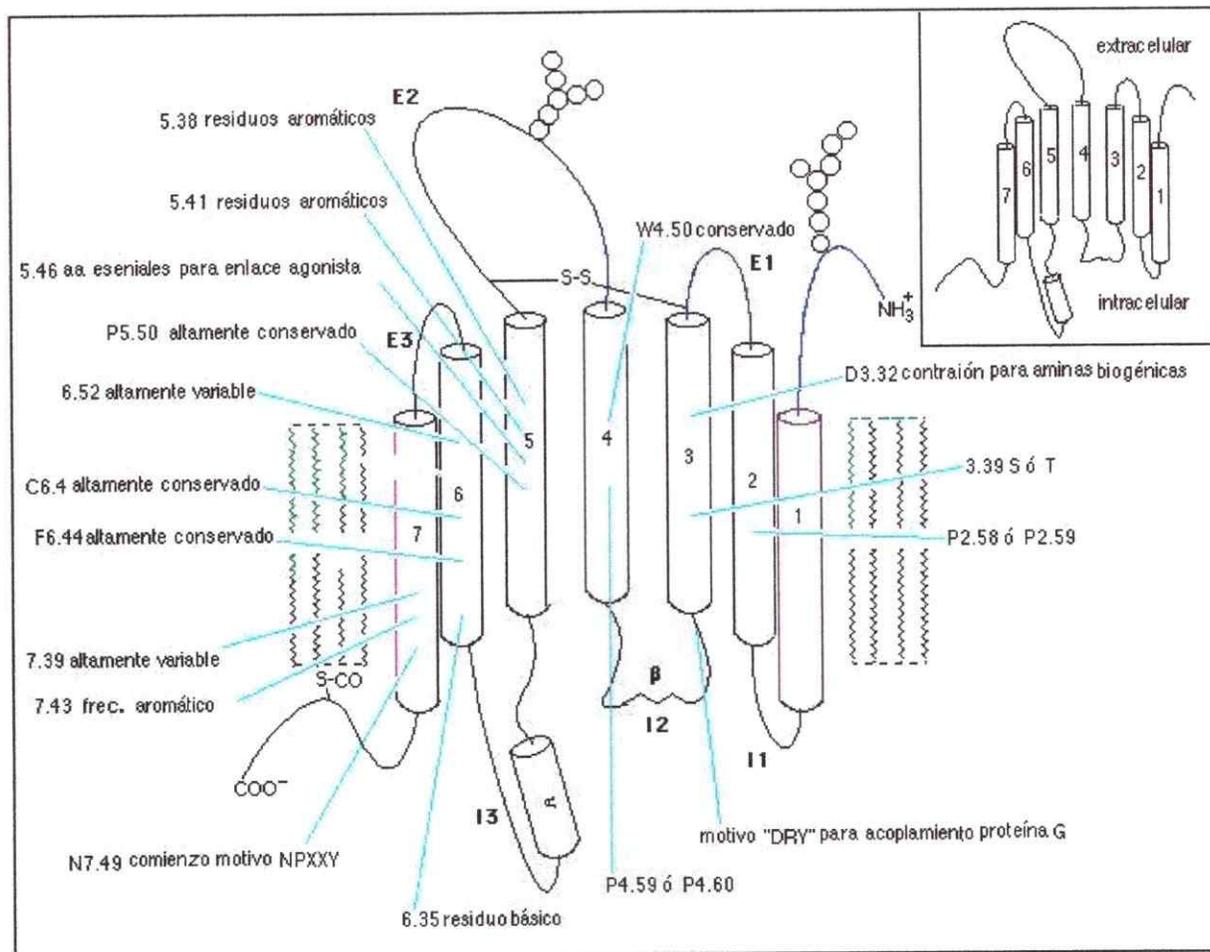


Figura 1.2 Representación esquemática de la topología de los GPCRs. Los segmentos transmembranales están indicados con la numeración de 1 a 7. La conexión de estas hélices es a través de lazos intra- y extracelulares. Esta figura fue obtenida de ref. [40] y traducida para mayor claridad.

```

5h2a_h      1 MDILCEENTS LSSTTNSLMQ LNDDTRLYSN DFNSGEANTS DAFINWTVDSE 50
              g                               g                               g
5h2c_h      1 MVNLRNAVHS FLVHLIGLLV WQDISV... ..SPVAAIVT DIFN..... 39
              g
conservados M.....

5h2a_h      51 NRTNLSCEEG LSPSCLSLH LQEKNSALL TAVVIILTIA GNILVIMAVS 100
              -----(Hx I)-----
5h2c_h      40 ..... TSDGGRFKFP DGVQNPALS IVIIIIMTIG GNILVIMAVS 79
              ^^^^^^^^^^^^^^^^^(Hx I)^^^^^^^^^^^^
conservados .....W.AL.....TI. GN.LVI.AV.

5h2a_h      101 LEKKLQATN YFLMSLAID MLLGFLVMPV SMLTILYGYR WPLPSKLCV 150
              -----(Hx II)-----
5h2c_h      80 MEKKLHNATN YFLMSLAID MLVGLLVMPV SLLAILYDVV WPLPRYLCPV 129
              ^^^^^^^^^^^^^^^^^(Hx II)^^^^^^^^^^^^
conservados .EK.L...ATN YFLMSLA.ID .L.G..VPM. .L.I..... WPLP..LC..
clase I .....C..

5h2a_h      151 WIYLDVLFST ASIMHLCAIS LDRYVAIQNP IHHSRFNSRT KAFKIIAVW 200
              -----(Hx III)-----
5h2c_h      130 WISLDVLFST ASIMHLCAIS LDRYVAIRNP IEHSRFNSRT KAIMKIIAVW 179
              ^^^^^^^^^^^^^^^^^(Hx III)^^^^^^^^^^^^
conservados W.....LFST ASIMHLCAIS .DRY.A...P .....N.R. .A..KI..VW
clase I .....DRY.....

5h2a_h      201 TISVGISMPI PVFGLQDDSK VF.KEGSCLL ADDNFVLIGS FVSFFIPLTI 249
              -(Hx IV)-----
5h2c_h      180 AISIGVSVPI PVIGLRDEEK VFNNTTCVL NDPNFVLIGS FVAFFIPLTI 229
              ^ (Hx IV) ^^^^^^^^^
              ^^^^^ (Hx V) ^^^^^^^^^
conservados .IS.G...P. P..G.....C.L....F...GS ...FF.PL.I
clase I .....C..

5h2a_h      250 MVITYVFLTIK SLQKEATLCV SDLGTRAKLA SFSFLPQSSL SSEKLFQRSI 299
              ^^^^^^^^^
              f
5h2c_h      230 MVITYCLTIY VLRRQALMLL HGHTTEPPGL SLDFLKCC.K RNTAEEENSA 278
conservados M..TY.LTI. .L.....

5h2a_h      300 HREPGSVTGR R..... TMQISINBQK ACKVLGIVVF LFVVMWCPFF 340
              f
              -----(Hx VI)-----
5h2c_h      279 NPNQDQARR RKKKERRPRG TMQAINNERK ASKVLGIVVF VFLIMWCPFF 328
              ^^^^^^^^^(Hx VI)^^^^
conservados .....Q.I.NE.. A.K.LG.VF. .F..MWCPFF

5h2a_h      341 ITNIMAVICK ESCNEDVIGA LLNVFVWIGY LSSAVNPLVY TLFNKTYRSA 390
              -----(Hx VII)-----
              f
5h2c_h      329 ITNILSVLCE KSCNQKIMEK LLNVFVWIGY VCSGINPLVY TLFNKIYRRA 378
              ^^^^^^^^^(Hx VII)^^^^^^^^
conservados ITN.....C. ..CN..... LL..FVW.GY ..S..NPL.Y TLFNK..R.A
clase I .....NP..Y.....

5h2a_h      391 FSRVIQCQYK ENKKPLQLIL VNTIPALAYK SSQQLQMGQKK NSKQDAKTTD 440
              p
5h2c_h      379 FSNYLRCNYK VEKKP.PVRQ IFRVAATALS GRELVNVIYR HTNEPVIEKA 427
              p
              f
conservados F..Y..C.V. ....
clase I .....C..

5h2a_h      441 NDCSMVALGK QHSEEASKDN SDGVNEKVSQ V 471
5h2c_h      428 SDNEPGIEMQ VENLELPVNP SSVVSERISS V 458
              f
conservados .....S.

```

Figura 1.3 Alineación de secuencias de receptores humanos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} (5h2a_h y 5h2c_h, respectivamente). Para mejor comprensión del texto, la numeración de residuos corresponde a cada secuencia por separado. Las secuencias de aminoácidos para el receptor 5-HT_{2A} [41] y 5-HT_{2C} [41] fueron obtenidas de la base de datos SWISS-PROT [42]. Las siete potenciales regiones transmembranales (Hx) han sido señaladas con (-) para los receptores 5-HT_{2A} y con (^) para los receptores 5-HT_{2C}. En la figura, para ambos receptores, los sitios de N-glicosilación han sido señalados con (g), los sitios de fosforilación con (f) y los sitios de palmitoilación con (p). Los residuos conservados en la familia de receptores 5-HT₂ están indicados en la línea conservados y los residuos importantes para la familia GPCR de clase I están también señalados. Los aminoácidos también han sido coloreados según su polaridad, i.e., residuos no polares: Ala, Val, Leu, Ile, Met (magenta); residuos aromáticos: Tyr, Trp, Phe (celeste); residuos polares: Ser, Thr, Asn, Gln (verde); residuos ácidos: Asp, Glu (azul); residuos básicos: Lys, Arg, His (rojo); residuo Cys (amarillo); otros residuos: Gly, Pro (negro).

Una revisión de las estructuras de cadenas laterales de aminoácidos esta dada en el [Apéndice I](#).

1.4.4 Residuos involucrados en la estructura y función de GPCRs de la clase I

Los receptores 5-HT₂ pertenecen a los GPCRs de clase I [43] (los denominados del tipo de la rodopsina), de los cuales se tiene variada información experimental. Dentro de esta clase I, existen varios patrones de aminoácidos característicos. En general, se cree que los aminoácidos que se están altamente conservados en las secuencias tienen una función especial tanto en la estructura del receptor como en los mecanismos de transducción de señales. Sin embargo, los residuos involucrados en el enlace de ligandos están menos conservados, probablemente debido a que diferentes subclases de receptores reconocen ligandos que son estructuralmente distintos. Esta clase I de GPCRs comparte aproximadamente 20 residuos en común, donde se incluyen dos residuos de Cys que forman un puente de disulfuro entre dos lazos extracelulares, un motivo Asp-Tyr-Arg (DRY) al final de la hélice III, un motivo Asn-Pro-X-X-Tyr en la hélice VII, además de

un residuo de Cys que sirve como un sitio para la palmitoilación en el dominio C-terminal. Las posiciones relativas de estos residuos se encuentran descritas en la Figura.1.3.

N-glicosilación, palmitoilación y fosforilación. Los sitios de N-glicosilación en la región N-terminal pueden ser importantes para la correcta incorporación del receptor dentro de la membrana [44].

Los residuos de Cys en la región intracelular C-terminal pueden enlazarse al ácido palmítico a través de un enlace tioéster. Este ácido palmítico que se enlaza covalentemente puede llegar a intercalarse en la bicapa lipídica, formando de esta manera un cuarto lazo intracelular. La palmitoilación es probablemente importante para el acoplamiento a las proteínas G.

La fosforilación interrumpe el acoplamiento entre el receptor y la proteína G, resultando en una menor afinidad del receptor por los agonistas (desensibilización). La probable fosforilación por una proteína quinasa C (PKC) de dos o tres sitios posibles, se ha reportado como un mecanismo de desensibilización de los receptores 5-HT₂ [45]. Estos posibles sitios de fosforilación, tienen una secuencia de consenso Ser/Thr-X-Arg/Lys (i.e., [S/T]X[R/K]; donde X puede ser cualquier residuo), localizada en el segundo y el tercer lazo citoplasmático.

Plegamiento del receptor. Dos residuos de Cys que se encuentran altamente conservados son importantes para el correcto plegamiento de la proteína, probablemente debido a la formación de un puente disulfuro entre el segundo lazo extracelular (entre las hélices IV y V) y la región N-terminal de la hélice III. Estudios de mutación de estos residuos en los receptores β -adrenérgicos, rodopsina bovina, y receptores muscarínicos de acetilcolina apoyan esta hipótesis [46-48]. En el tercio extracelular de la hélice III de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, estos residuos corresponderían a los residuos de Cys¹⁴⁸ y Cys¹²⁷ y a los residuos Cys²²⁷ y Cys²⁰⁷ en el segundo lazo extracelular respectivamente.

En la mayoría de los GPCRs existen residuos de prolina altamente conservados en las hélices V, VI, VII. Varios de estos residuos de Pro están rodeados por un gran número de otros residuos aminoacídicos también conservados, tales como el motivo PFF en la hélice VI, o el motivo NP en la hélice VII. Se sabe que los residuos de Pro pueden inducir cambios estructurales en las hélices α de proteínas de membrana [1,2]. Sin embargo, Trumpp-Kallmeyer y col.

[49] sugieren que estas Pro altamente conservadas en todos los GPCRs son necesarias para la correcta estructura del receptor y no sólo para permitir cambios conformacionales.

Modulación de los estados de afinidad del receptor. Se ha postulado que muchos GPCRs tienden a adoptar múltiples estados los cuales se suponen asociados con diferentes conformaciones, las que, además, tienen diferentes afinidades tanto para agonistas como para las proteínas G. Sin embargo, la mayoría de los antagonistas no discriminan entre estos múltiples estados de afinidad. Varios residuos que están probablemente involucrados en la modulación de esta condición del receptor han sido identificados. Por ejemplo, el residuo de Asp altamente conservado del motivo Leu-Ala-X-X-Asp (i.e., LAXXD; X puede ser cualquier residuo; en los receptores 5-HT_{2A} este motivo corresponde a Leu¹¹⁶-Ala¹¹⁷-Ile¹¹⁸-Ala¹¹⁹-Asp¹²⁰ y en los 5-HT_{2C} corresponde a Leu⁹⁵-Ala⁹⁶-Ile⁹⁷-Ala⁹⁸-Asp⁹⁹) en el lado citoplasmático de la hélice II se encontró que tiene influencia en el enlace de agonistas para varios GPCRs [50], pero difícilmente afecta las afinidades de los antagonistas probados.

Varios investigadores del grupo de la Mount Sinai School of Medicine de Nueva York, entre ellos Zhou y col. [51] y Sealton y col. [52], encontraron que el residuo de Asp en la hélice II interactúa con el residuo de Asn que se encuentra en el motivo altamente conservado NP en la región intracelular de la hélice VII, indicando que las hélices II y VII están próximas en el espacio.

Acoplamiento de Proteínas G. La afinidad del receptor también puede ser modulada por su unión a la proteína G. El desacoplamiento de la proteína G disminuye la afinidad por el neurotransmisor a través de mecanismos alostéricos. Estudios de mutagénesis indican que las regiones N- y C-terminales del tercer lazo citoplasmático son importantes para el acoplamiento y la selectividad de proteínas G. El mecanismo por el cual ocurre este proceso no ha sido elucidado todavía, ya que otros lazos citoplasmáticos estarían también involucrados [44,53]. Existe un residuo de Asp del motivo 'DRY' que se encuentra altamente conservado en el lado intracelular de la hélice III (ver Figura 1.3). Savarese y col. han demostrado que este residuo de Asp interacciona con la proteína-G en varios GPCRs [44]. Oliveira y col. [54] demostraron que el residuo de Arg del motivo 'DRY', que es el único conservado entre todas los GPCRs interacciona con el residuo de Asp de la hélice II.

Residuos involucrados en el enlace de ligandos. Todos los receptores de neurotransmisión con ligandos que son bioaminas, las cuales se encuentran mayoritariamente en

su forma protonada a pH fisiológico, contienen un residuo de Asp conservado en la posición correspondiente al residuo Asp¹⁵⁵ en los receptores 5-HT_{2A} y Asp¹³⁴ en los 5-HT_{2C}. Este residuo de Asp está ausente en otros GPCRs. Muchos estudios de mutagénesis han confirmado la importancia de este residuo para el enlace de agonistas y antagonistas [44,50]. En el párrafo anterior se discutió la presencia de otro residuo de Asp conservado en la hélice II correspondiente al Asp¹²⁰ en el receptor 5-HT_{2A} y Asp⁹⁹ en el receptor 5-HT_{2C}. Ho y col. [55] reportaron que la mutación del residuo Asp¹¹⁶ por Asn y del residuo Asp⁸² por Asn en el receptor 5-HT_{1A} produce una disminución de la afinidad por 5-HT. Wang y col. [56] reportaron la mutación de los residuos correspondientes en el receptor 5-HT_{2A} por residuos de Asn: Asp¹²⁰-Asn, Asp¹⁵⁵-Asn, Asp¹⁷²-Asn. Estos resultados indicaron que el Asp¹²⁰ es necesario para la activación alostérica de la proteína G. La mutación de Asp¹⁵⁶ indicó que este residuo es necesario para enlaces de alta afinidad de los ligandos, probablemente al actuar como el contraión del grupo amino de éstos. La mutación de Asp¹⁷² no produjo cambios significativos en el enlace de agonistas y antagonistas comparado con el receptor nativo.

Los resultados experimentales referidos al residuo de Asp conservado han sido usados como punto de partida en la mayoría de los experimentos de "docking" de receptores de 5-HT, al encontrarse ausente en otros GPCRs. Por lo tanto, desde el punto de vista químico, se espera que la interacción de este residuo con el átomo de nitrógeno cargado del ligando sea a través de interacciones iónicas y de puente de hidrógeno, interacciones que discutiremos en los capítulos III y IV de esta tesis.

La hélice V contiene algunos residuos capaces de formar puentes de hidrógeno con los ligandos, los cuales han mostrado su importancia en el enlace de agonistas serotoninérgicos. Kao y col. [57] demostraron que la mutación Ser²⁴²-Ala en el receptor 5-HT_{2A} humano altera la farmacología de este receptor a aquélla del receptor 5-HT_{2A} de rata. A la inversa, Johnson y col. [58] reportaron que la mutación Ala²⁴²-Ser del receptor 5-HT_{2A} de rata resulta en un receptor con farmacología similar a la del receptor 5-HT_{2A} humano.

Los estudios hechos por el grupo de Heidelberg [49] han postulado que los residuos aromáticos que están altamente conservados en la mayoría de los GPCRs pueden estar

involucrados tanto en la transducción de la señal como en el enlace de ligandos. Los estudios de mutación sitio-dirigida en los receptores β -adrenérgicos y los receptores 5-HT_{2A} han validado la importancia de los residuos de Phe del motivo 'PFF' de la hélice VI para el enlace de ligandos [59,60].

De esta manera, las mutaciones en la hélice VI hechas por Choudhary y col. [60] se han centrado en los residuos conservados de Phe. La mutación Phe³⁴⁰-Leu (Phe³²⁸ en el receptor 5-HT_{2C}) en el receptor 5-HT_{2A} disminuye la afinidad de enlace de agonistas y de algunos derivados de ergolinas pero no afecta el enlace del antagonista selectivo ketanserina (4, Figura 1.1). En contraste, la mutación Phe³³⁹-Leu (Phe³²⁷ en el receptor 5-HT_{2C}) sólo tiene influencia en el enlace de este antagonista. Roth y col. [61] hicieron estudios adicionales con el receptor 5-HT_{2A} mutante Phe³⁴⁰-Leu, los cuales indicaron que la habilidad de los agonistas para inducir estados de alta afinidad no se correlaciona con la producción de segundos mensajeros, lo que los llevó a proponer que un complejo terciario da cuenta al mismo tiempo de la afinidad de enlace y de la eficacia intrínseca.

En otra publicación hecha por Roth y col. [62] la mutación de residuos aromáticos altamente conservados del receptor 5-HT_{2A}, Trp²⁰⁰-Ala (Trp¹⁷⁹ en el receptor 5-HT_{2C}), Trp³³⁶-Ala (Trp³²⁴ en el receptor 5-HT_{2C}) y Trp³⁶⁷-Ala (Trp³⁵⁵ en el receptor 5-HT_{2C}) reducen la afinidad y la eficacia de los agonistas. Las mutaciones de Phe³⁴⁰ (Phe³²⁸ en el receptor 5-HT_{2C}) y Trp³⁷⁰-Ala (Tyr³⁵⁸ en el receptor 5-HT_{2C}) tienen efectos similares, pero las mutaciones Phe³³⁹-Leu (Phe³²⁷ en el receptor 5-HT_{2C}) y Phe³⁶⁵-Leu (Phe³⁵³ en el receptor 5-HT_{2C}) tienen un efecto mínimo en el enlace de agonistas pero se reduce la eficacia de éstos. Con estos resultados experimentales se ha propuesto entonces que las hélices III, V, VI y VII interaccionan unas con otras dejando las cadenas laterales de estos residuos aromáticos orientados hacia la hendidura central del receptor.

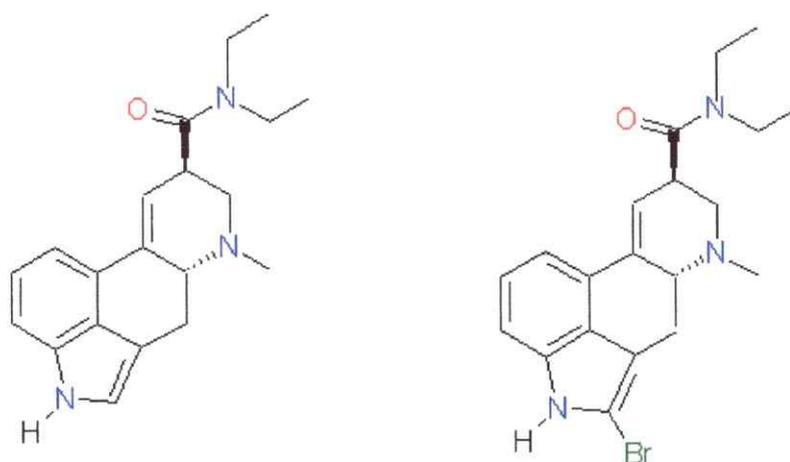
Buck y col. en 1991 [63] demostraron que los mutantes por delección del receptor 5-HT_{2A} no pierden su actividad biológica al remover los dominios N-terminal o C-terminal. Choudhary y col. en 1992 [64] mostraron que para receptores quiméricos del tipo 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, antagonistas 5-HT_{2A} que difieren estructuralmente utilizan distintas regiones del receptor 5-HT_{2A} cuando se enlazan a éste.

I.5 Ligandos para receptores 5-HT₂

Variadas clases estructurales de ligandos muestran afinidad por los receptores 5-HT₂ [65]. En esta sección se presenta un breve resumen de las clases de ligandos más importantes, donde se incluyen agonistas (parciales y totales). Las moléculas representativas se muestran en la [Figura I.1](#). Estas clases son discutidas con mayor detalle en los capítulos III-IV. Todos los ligandos que presentan afinidad por los receptores de 5-HT contienen al menos un anillo aromático y un átomo de nitrógeno básico (el cual como dijimos anteriormente se encuentra en su forma protonada a pH fisiológico). Estas características estructurales son esenciales para el reconocimiento del sitio del receptor de todas las aminas biogénicas [66]. Sin embargo, se requieren grupos adicionales para una alta afinidad y selectividad para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}.

Las indolilaquilaminas forman una clase de ligandos serotoninérgicos pero son agentes relativamente *no*-selectivos que se enlazan a los múltiples subtipos de receptores de 5-HT. Entre ellos se encuentra el neurotransmisor endógeno 5-HT (**1**, [Figura I.1](#)), que es un derivado de triptamina. Los grupos funcionales 5-OH y N-H indólico son esenciales para la afinidad presentada por estos ligandos. Sin embargo, el grupo hidroxilo puede ser reemplazado por un grupo metoxilo sin pérdida de su actividad o afinidad [67].

Los alucinógenos derivados de ergolinas, son compuestos que presentan una estructura parcial de triptamina rigidizada por la incorporación de una porción de 2-aminotetralina, donde la función amina se encuentra incorporada en un heterociclo. Derivados de ergolinas como la N,N-dietilamida del ácido lisérgico (LSD, **4** [Figura I.4](#)) o el derivado halogenado en la posición 2 del LSD, 2-Br-LSD, que no posee propiedades alucinogénicas (**5**, [Figura I.4](#)), son moléculas no selectivas que muestran una alta afinidad por receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ y actúan como agonistas parciales. Estudios de los sitios de interacción de estas moléculas en los receptores 5-HT₂ se encuentran en la referencia [68].



ácido N,N-dietilamida lisérgico, LSD 4

ácido 2-Br-dietilamida lisérgico 2-Br-LSD 5

Figura 1.4 Ejemplos de ligandos derivados de ergolinas para receptores de 5-HT. El átomo de nitrógeno básico está incorporado en un heterociclo y fijado en una conformación rígida.

La Figura 1.5 muestra otra clase importante de ligandos de 5-HT. Éstos son los derivados de fenilisopropilaminas tales como 1-(2,5-dimetoxi-4-X-fenil)-2-aminopropanos donde X = -CH₃, -I (i.e., DOM, **6** y DOI, **7** respectivamente). De acuerdo con una reseña publicada por Glennon en 1996 [69], estos compuestos no han mostrado enlazarse con afinidad significativa a ninguna población de receptores de 5-HT excepto en los receptores 5-HT₂. De esta manera, los estudios de interacción ligando-receptor se han enfocado hacia el uso de derivados de fenilisopropilaminas empleando [¹²⁵I]DOI como radioligando agonista en estudios de afinidad.

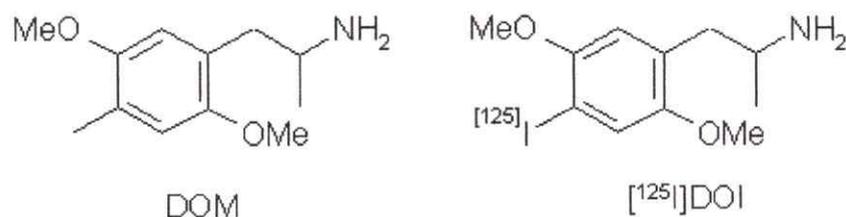


Figura 1.5 Estructuras de fenilisopropilaminas: 1-(2,5-dimetoxi-4-metilfenil)-2-aminopropano (DOM) y 1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano.

1.6 Comparaciones de afinidades de enlace de fenilisopropilaminas en receptores humanos clonados 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}

Desde que se reportó que los efectos sobre el comportamiento producidos por los alucinógenos clásicos ocurrían a través de un mecanismo que involucra la activación de los receptores 5-HT₂ (i.e., la hipótesis serotoninérgica de la acción de alucinógenos), se ha demostrado que los receptores pertenecientes a esta familia son tres subtipos diferentes: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}. En la actualidad, existe un consenso que implica principalmente los receptores 5-HT_{2A} sobre los 5-HT_{2C} en los efectos conductuales provocados por estas moléculas. Nelson y col. [21] realizaron un estudio con una serie de fenilisopropilaminas representativas para determinar si existe especificidad farmacológica de estas moléculas simples en estos receptores altamente relacionados. En este estudio se evaluó la afinidad por desplazamiento de un radioligando agonista ([¹²⁵I]DOI) en ambos subtipos de receptores humanos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}. Los datos de K_i obtenidos por Nelson y col. [21] están resumidos en la Tabla 1.1, donde se comparan las afinidades de enlace de estas 17 fenilisopropilaminas estudiadas (Figura 1.6). También en esta tabla están incluidas las afinidades para 5-HT [70], 2-Br-LSD [70] y *m*-CPP (*meta*-clorofenilpiperidina) [21] sobre los dos subtipos, obtenida de la base de datos PDSP (Psychoactive Drug Screening Program) [71].

El estudio desarrollado por Nelson y col. [21] destaca que existe una notable correlación ($r > 0.9$) entre las afinidades de los agentes para los subtipos de esta familia de receptores 5-HT₂, tal que la modificación estructural en estas moléculas sólo resulta en pequeñas diferencias en la afinidad para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} (Figura 1.6). También cabe destacar que existe una correlación significativa entre la afinidad que muestran estos compuestos para ambos receptores y la potencia alucinógena en humanos.

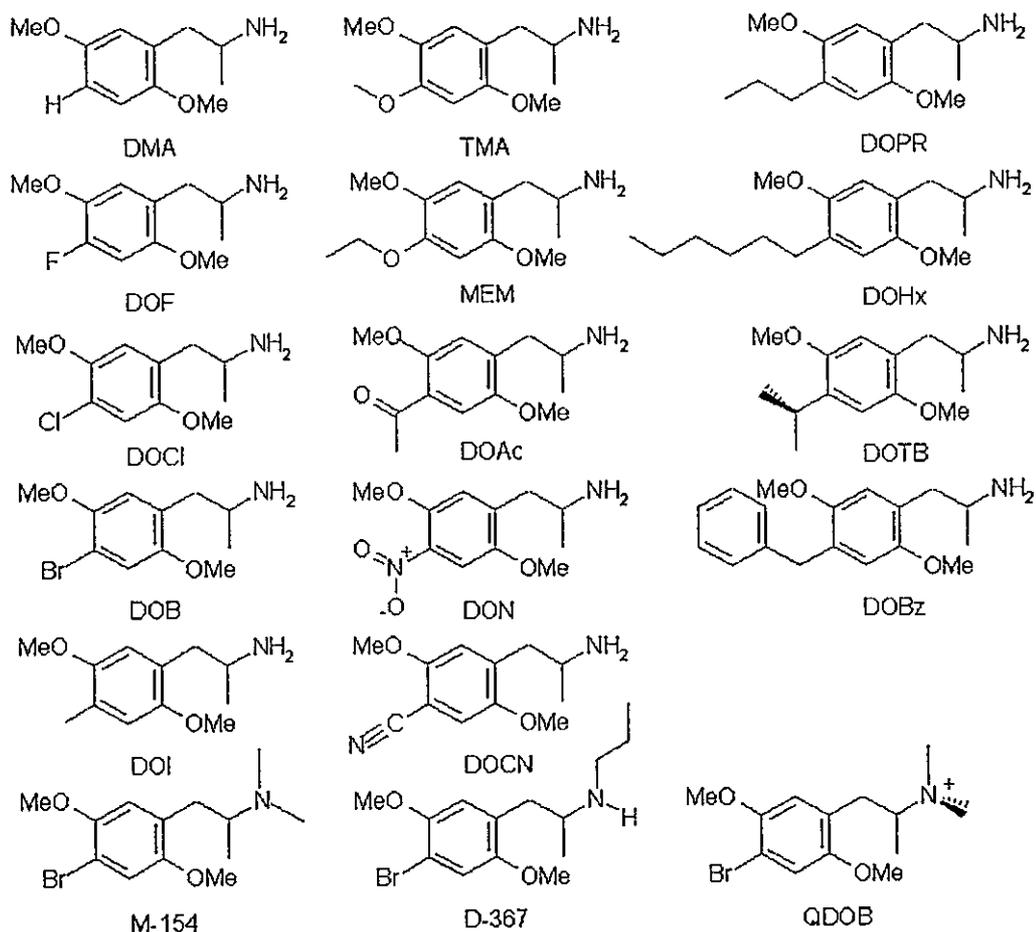


Figura I.6 Ligandos derivados de fenilisopropilaminas.

Sin embargo, se ha demostrado que algunos antagonistas 5-HT_{2A} y antagonistas no-selectivos 5-HT_{2A}/5-HT_{2C} (antagonistas con baja afinidad por los receptores 5-HT_{2B}) bloquean los efectos estimulantes de las fenilisopropilaminas alucinógenas. Es probable que los receptores 5-HT_{2A} tengan una función predominante en mediar tales efectos a pesar de la afinidad semejante mostrada por estos agentes por los tres subtipos de receptores.

Tabla 1.1 Afinidades medidas de derivados de fenilisopropilaminas obtenidas de ref. [21]. Esta tabla incluye también las afinidades medidas para 5-HT [70], 2-Br-LSD [70] y m-CPP ref. [21] por receptores humanos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} usando el radioligando agonista [¹²⁵I]DOI.

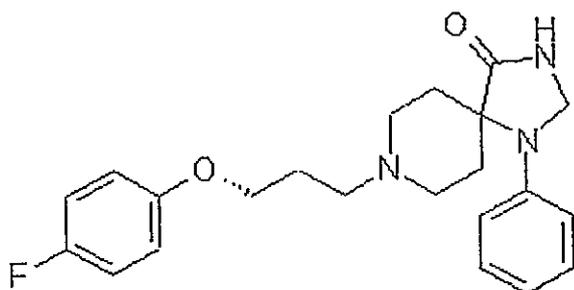
Valores de K _i [nM]			
LIGANDO	5-HT _{2A}	LIGANDO	5-HT _{2C}
DOHX	0.1	DOHX	0.7
DOBZ	0.4	DOBZ	1
2-Br-LSD	0.48	DOPR	1.1
DOB	0.6	DOB	1.3
DOI	0.7	DOC	2
DOPR	0.9	DOTB	2.2
DOC	1.4	DOI	2.4
DOTB	3.7	m-CPP	3.4
DON	5.5	2-Br-LSD	7.14
5-HT	7.77	5-HT	15.5
m-CPP	32.1	DON	22.4
DOF	41.7	DOF	28.7
DOCN	45.7	M-154	68.1
TMA	57.9	TMA	87.7
MEM	73	DOAC	91.3
DOAC	80.5	DMA	104
D-367	88.5	MEM	124
M-154	94.2	D-367	514
DMA	211	DOCN	1011
QDOB	2155	QDOB	6298

De acuerdo a Glennon [69] los alucinógenos clásicos son agentes que:

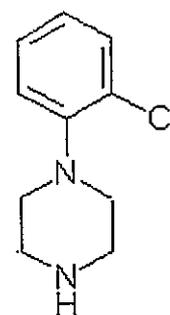
- Producen efectos alucinogénicos en humanos,
- Se sustituyen por DOM en animales entrenados para reconocer DOM en pruebas de generalización de estímulo.
- Se enlazan a receptores 5-HT₂.

La hipótesis original serotoninérgica relacionó la actividad alucinogénica con los receptores que ahora conocemos como 5-HT_{2A}. Sin embargo, con la identificación de los subtipos de receptores 5-HT_{2C} y la subsecuente correlación encontrada entre la afinidad por el receptor 5-HT_{2C} y la potencia alucinogénica, llegó a ser importante determinar cual (o si ambas) subpoblación(es) de receptores 5-HT₂ muestra(n) una función más importante en los efectos conductuales producidos por las feniletilaminas. Ismael y col. en 1993 [72] demostraron que el antagonista AMI-193 (6, Figura I.7, un agente que muestra una selectividad de > 2.000 veces por los receptores 5-HT_{2A} sobre los receptores 5-HT_{2C}), bloquea potentemente los efectos estimulantes de DOM en animales entrenados para reconocer esta droga, lo que sugiere que estos efectos de DOM son mediados a través de receptores 5-HT_{2A}. En un estudio similar, Schreiber y col. en 1994 [73] no tuvieron éxito en bloquear el efecto estimulante de DOI con un antagonista selectivo para los receptores 5-HT_{2C}, mientras que sí lo lograron con un antagonista selectivo para los receptores 5-HT_{2A}. Fiorella y col. en 1995 [74], usando un análisis de correlación de antagonistas sugirieron un mecanismo que involucra predominantemente los receptores 5-HT_{2A} sobre los receptores 5-HT_{2C} en los efectos de comportamiento mediados por DOM. Mas aún, Ishida y col. [75] en 1995 observaron que la *m*-CPP (7 Figura I.7), que es un metabolito del antidepresivo *trazodona*, no se relaciona con efectos alucinogénicos en humanos, a pesar de que es conocido desde un reporte de Cohen y col. [76] que *m*-CPP sería un agonista 5-HT_{2C} pero un antagonista 5-HT_{2A}. De esta manera, existe variada información que favorece la participación de los receptores 5-HT_{2A} más que los receptores 5-HT_{2C} en las acciones estimulantes de las fenilisopropilaminas alucinogénicas en ratas.

En esta tesis las clases de ligandos con mayor importancia fueron incluidas en un intento de racionalizar la afinidad, actividad y selectividad. Estos resultados son discutidos en los capítulos siguientes.



AMI-193



m-CPP

Figura 1.7 Estructuras de agonistas y antagonistas en los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}.

1.7 Referencias

1. R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing, *J. Mol. Biol.*, **213**, 899-929 (1990).
2. von Heijne, *J. Mol. Biol.*, **218**, 499-503 (1991).
3. B. B. Brodie, P. A. Shore, en Goodman & Gilman, "*Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*", Ed. Medica Panamericana, Buenos Aires, 249-260, Séptima Edición (1986).
4. M. M. Rapport, A. A. Green, I. H. Page, *J. Biol. Chem.*, **176**, 1243-1251 (1948).
5. M. M. Rapport, *J. Biol. Chem.*, **180**, 961-969 (1949).
6. E. Zifa, G. Fillion, *Pharmacol. Rev.*, **44**, 401-408 (1992).
7. S. J. Peroutka, *CNS Drugs*, **4**, 18-28 (1995).
8. J. H. Gaddum, Z. P. Picarrelli, *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **12**, 323-328 (1957).
9. S. J. Peroutka, S. H. Snyder, *Mol. Pharmacol.*, **16**, 687-695 (1979).
10. P. B. Bradley, G. Engel, W. Feniuk, J. R. Fozard, P. A. Humphrey, D. N. Middlemiss, E. J. Mylecharane, B. P. Richardson, P. R. Saxena, *Neuropharmacol.*, **25**, 563-576 (1986).
11. P. A. Humphrey, P. Hartig, D. Hoyer, *TIPS*, **14**, 233-236 (1993).
12. A. Dumuis, R. Bouhelal, M. Sebben, R. Cory, J. Bockaert, *Mol. Pharmacol.*, **34**, 880-887 (1988).
13. J. Plassat, U. Boschert, N. Amlaiky, R. Hen, *EMBO J.*, **11**, 4479-4786 (1992).
14. F. J. Monsma, J. R. Yong Shen, R. P. Ward, M. W. Hambling, D. R. Sibley, *Molecular Pharmacol.*, **43**, 320-327 (1992).
15. Y. Shen, F. J. Monsma, M. A. Metcalfe, P.A. Jose, M. W. Hamblin, D. R. Sibley, *J. Biol. Chem.*, **24**, 18200-18204 (1993).
16. J. S. Peroukta, *Synapse* **18**, 241-260 (1994).
17. G. R. Martin, P. A. Humphrey, *Neuropharmacol.*, **33**, 263-271 (1994).
18. F. Sadou, R. Hen, *Neurochem. Int.*, **25**, 503-532 (1994).
19. F. G. Boess, J. L. Martin, *Neuropharmacol.*, **33**, 275-317 (1994).
20. D. L. Nelson, V. L. Lucaites, D. B. Waincott, R. A. Glennon, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **359**, 1-6 (1999).
21. G. Müller, *Current Med. Chem.*, **7**, 861-888 (2000).

22. M. J. Millan, M. H. Canton, G. Lavielle, *DN&P*, **5**, 397-406 (1992).
23. F. Radja, et al., *Neurochem, Int.*, **18**, 1-15 (1991).
24. B. L. Roth, D. M. Chuang, *Life Science*, **41**, 1051-1064 (1987).
25. D. Hoyer, D. Clarke, J. Fozard, P. Hartig, G. Martín, E. Mylecharane, P. Saxena, P. Humphrey, *Pharmacol. Rev.*, **46**, 157-203 (1994).
26. P. J. Conn, E. Sanders-Bush, *Neuropharmacol.*, **23**, 993-996 (1984).
27. S. E. Mayer, E. Sander-Bush, *Mol. Pharmacol.*, **45**, 991-996 (1994).
28. A. Pazos, D. Hoyer, J. M. Palacios, *Eur. J. Pharmacol.*, **106**, 539-546 (1984).
29. P. J. Conn, E. Sanders-Bush, B. J. Hoffman, P. R. Hartig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4086-4088 (1986).
30. S. E. Molineaux, T. Jessell, R. Axel, D. Julius, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6793-6797 (1989).
31. D. B. Prittchet, A. W. Bach, M. Wozny, O. Taleb, R. Dal Toso, J. C. Shih, P. H. Seeburg, *EMBO J.*, **7**, 4135- (1988).
32. C. D. Gundersen, R. Miledi, I. Parkin, *Proc. R. Soc. London*, **219**, 412- (1983).
33. S. J. Peroutka, T. A. Howell, *Neuropharmacol.*, **33**, 319 (1994).
34. M. Bös, F. Jencks, J. R. Martin, J. L. Moreau, A. J. Sleight, J. Wichmann, U. Widmeer, *J. Med. Chem.*, **40**, 2762 (1997).
35. K. A. Berg, S. Maayani, J. Goldfarb, W. P. Clarke, *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **861**, 104-110 (1985).
36. K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **289**, 739-745 (2000).
37. M. Sautel, G. Milligan, *Current Medicinal Chemistry* **7**, 889-896 (2000).
38. C. Liebmann, F. D. Böhmer, *Current Medicinal Chemistry* **7**, 911-943 (2000).
39. T. Haltia, E. Freire, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1228**, 1-27, (1995).
40. A. M. van Rhee, K. A. Jacobson, *Drug Dev. Res.*, **37**:1-38 (1996).
41. A.G. Saltzman, B. Morse, M. M. Whitman, Y. Ivanshchenko, M. Jaye, S. Felder, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 1469-1478(1991).

42. A. Bairoch, B. Boeckmann, *The SWISS-PROT protein sequence data bank Nucleic Acids Res.*, **20**, 2019-2022(1992).
43. L. F. Kolakowski, *Receptor and Channels* **5**, 434 (1994).
44. T. M. Savarese, C. M. Fraser, *Biochem. J.*, **283**, 1-19 (1992).
45. L. Yu, H. Nguyen, H. Le, L. J. Bloem, C. A. Kozak, B. J. Hoffman, T. P. Snutch, H. A. Lester, N. Davidson, H. Lubbert, *Mol. Brain Res.*, **11**, 143-149 (1991).
46. T. M. Savarese, C. D. Wang, C. M. Fraser, *J. Biol. Chem.*, **267**, 11439-11448 (1992).
47. R.A. Dixon, I. S. Sigal, E. Rands, R. B. Register, R. M. Candelore, W. Scattergood, C. D. Strade, *EMBO J.*, **6**, 3269-3275 (1987).
48. S. S. Karnik, H. G. Khorana, *J. Mol. Biol.*, **265**, 17520-17524 (1990).
49. S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoflack, A. Bruinvels, M. Hibert, *J. Med. Chem.*, **35**, 3448-3462 (1992).
50. T. Schwartz, *Curr. Opinion Biotech.* **5**, 434-444 (1994).
51. W. Zhou, C. Flanagan, J. A. Ballesteros, K. Konvicka, J. S. Davison, H. Weinstein, R. P. Millar, S. C. Sealfon, *Mol. Pharmacol.*, **45**, 165-170 (1994).
52. S. C. Sealfon, L. Chi, B. J. Ebersole, V. Rodic, D. Zhang, J. A. Ballesteros, H. Weinstein, *J. Biol. Chem.*, **270**, 16683-16888 (1995).
53. N. H. Lee, N. R. Kerlavage, *Tr. Biochem. Res.*, **6**, 448-497 (1993).
54. L. Oliveira, A.C. Paiva, G. Vriend, *TIPS* **15**, 170-172 (1994).
55. B. Y. Ho, A. Karschin, T. Branchek, N. Davison, H. A. Lester, *FEBS Lett.*, **312**, 259-262 (1992).
56. C. D. Wang, T. K. Gallaher, J. C. Shih, *Mol. Pharmacol.* **43**, 931-940 (1993).
57. H. T. Kao, N. Adham, M. A. Olsen, R. L. Weinsbank, T. A. Branchek, *FEBS Lett.*, **307**, 324- (1992).
58. M. P. Johnson, R. J. Loncharich, M. Baez, D. L. Nelson, *Mol. Pharmacol.*, **45**, 277- (1994).
59. C. D. Strader, I. S. Sigal, R.A. Dixon, *FASEB J.*, **3**, 1825-1832 (1989).
60. M. S. Choudhary, S. Graigo, B. L. Roth, *Mol. Pharmacol.* **43**, 755-761 (1993).
61. B. L. Roth, M. S. Choudhary, N. Khan, A. Z. Uluer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 259-266 (1997).

62. B. L. Roth, M. S. Choudhary, N. Khan, M. Shoham, *Mol. Pharmacol.* **52**, 259-266 (1997).
63. F. Buck, W. Meyerhof, H. Werr, D. Richter, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **178**, 1421-1428 (1991).
64. M. S. Choudhary, S. Graigo, B. L. Roth, *Mol. Pharmacol.* **42**, 627-633 (1993).
65. G. Whishart, D. H. Bremner, K. R. Sturrock, *Recept. Chann.* **6**, 317-335 (1999).
66. E. J. Lloyd, P. R. Andrews, *J. Med. Chem.*, **29**, 453-462 (1986).
67. R. A. Glennon, C. Chaurasia, M. Titeler, *J. Med. Chem.*, **33**, 2777-2784 (1990).
68. R. A. Bond, A. G. Orstein, D. E. Clarke, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **249**, 401-410 (1989).
69. R. A. Glennon, *Classical Hallucinogens*. 343-371. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1996).
70. D.B. Wainscott, V.L. Lucaites, J.D. Kursar, M. Baez, D.L. Nelson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 720-727 (1996).
71. B.L. Roth, W.K. Kroeze, S. Patel, E. Lopez, *The Neuroscientist*, **6**, 252-262 (2000).
72. A. M. Ismael, J. de los Angeles, M. Teitler, S. Ingher, R. A. Glennon, *J. Med. Chem.*, **36**, 2519-2525 (1993).
73. R. Schreiber, M. Brocco, M. J. Millan, *Eur. J. Pharmacol.*, **264**, 99-102 (1994).
74. D. Fiorella, R. A. Rabin, J. C. Winter, *Psychopharmacol.*, **121**, 347-356 (1995).
75. M. Ishida, K. Otani, S. Kaneko, T. Ohkubo, T. Osanai, N. Yasui, K. Mihara, H. Higushi, K. Sugawara, *Int. J. Clin. Psychopharmacol.*, **10**, 143-146 (1995).
76. M. L. Cohen, R. W. Fuller, *Life Sci.* **32**, 711-718 (1983).

Capítulo II. Modelos tridimensionales de los receptores de serotonina 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}.

II.1 Resumen

Como se discutió en el Capítulo I, debido a las dificultades en la obtención de estructuras cristalinas de proteínas insertas en membrana, entre las que se encuentran los receptores de 5-HT, la modelación molecular de éstas se ha enfocado en buscar nuevas metodologías para contrarrestar el problema. Este capítulo describirá la metodología creada con ese fin, usando el campo de fuerzas *Valence Force Field* (VFF) desarrollado por el grupo de Dauber-Osguthorpe y col. [1]. Esta metodología posibilitó la construcción de las estructuras tridimensionales (3-D) de receptores de serotonina 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} a partir de la información de las estructuras primaria y secundaria disponible en literatura. Las bases del desarrollo de este proceso se discuten más adelante y luego el proceso que fue llevado a cabo para producir estructuras 3-D para los receptores es explicada.

El proceso de modelación involucra información general acerca de receptores bioaminérgicos [2,3], tales como las consideraciones teóricas de los probables patrones de plegamiento dentro de la membrana, los datos experimentales sobre la orientación topológica de los residuos en las hélices y las propiedades de enlace ligando-receptor para esta familia de receptores [4,5] entre otras. La metodología usa una combinación de simulaciones de dinámica molecular y minimizaciones de energía de las estructuras, junto con restricciones en algunas coordenadas atómicas y de ángulos diedros (ψ, ϕ) para luego obtener modelos completos usando una matriz de coordenadas internas de C $_{\alpha}$ premodelada, que corresponde a la región transmembranal constituida por siete hélices α . Esta metodología permite que los aminoácidos sean agregados por secciones con una estructura secundaria que ha sido predeterminada para la parte predicha del receptor. Los modelos obtenidos usando esta metodología son estructuras confiables que pueden ser usadas para el posterior análisis de las propiedades dinámicas de estos receptores.

II.2 Introducción

Los modelos 3-D para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} fueron construidos a partir de la descripción de la posible orientación de las regiones transmembranales de GPCRs, descritas sobre la base del mapa bidimensional de densidades electrónicas de rodopsina bovina obtenida con una resolución de 9 Å [6]. Esta descripción fue utilizada con el propósito de crear una plantilla estructural de los átomos de C_α (i.e. las coordenadas cartesianas de estas posiciones) de los aminoácidos que forman parte de las hélices transmembranales (TM). Este modelo de la región transmembranal de GPCRs fue generado usando métodos de gráfica computacional donde los datos experimentales publicados [7-9], el arreglo probable de las hélices [10] discutido en el Capítulo I, más consideraciones teóricas de los patrones de "plegamiento" fueron usadas como guía en el proceso de modelación.

Esta metodología desarrollada para obtener receptores de serotonina 5-HT₂, supuso que:

- (a) los receptores poseen siete dominios transmembranales con una estructura helicoidal (hélice α) dispuestos en forma antiparalela y consecutiva,
- (b) la mutación de aminoácidos menos importantes para la función y estructura del receptor ocurre en las regiones donde estas hélices quedan expuestas hacia la membrana lipídica,
- (c) las mutaciones de residuos importantes o bien conservados entre las secuencias de las TM de GPCRs no están orientadas hacia la membrana.

Primero, esta matriz simplificada de la sección transmembranal tiene que considerar además las inclinaciones descritas respecto de la membrana, así como las orientaciones de cada una de las hélices α para satisfacer las condiciones estructurales descritas previamente [10]. Segundo, haciendo uso de técnicas de dinámica molecular y minimización de energía de manera consecutiva esta matriz se refina para obtener una representación total de la secuencia de aminoácidos de ambos receptores. De esta manera los modelos generados para los receptores de serotonina 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} muestran que los dominios transmembranales pueden ser

modelados directamente a partir de datos publicados, además de proveer un mejor entendimiento de las propiedades de enlace de agonistas (y/o antagonistas) a partir de estos mismos datos.

II.3 Metodología

En este capítulo II todas las simulaciones de dinámica molecular (DM) (las que incluyen todo el proceso de Fold-Fit) y dinámica molecular selectivamente aumentada (SEMD) para el análisis de las fluctuaciones en las conformaciones en el tiempo fueron realizadas con el programa Valence Force Field (VFF) [1]. El procedimiento para las simulaciones usó dos algoritmos de minimización: "steepest descent", con un criterio de convergencia de 0.001 kcal mol⁻¹ Å y con un número máximo de iteraciones de 2000 pasos para luego continuar con el algoritmo "conjugate gradient", con el mismo criterio de convergencia pero con un número máximo de iteraciones de 3000 pasos. Una vez que las estructuras de partida estuvieron minimizadas, la DM comenzó su búsqueda conformacional a una temperatura de 298 K (25 °C) utilizando el campo de fuerzas VFF mencionado anteriormente [1]. Las simulaciones SEMD también utilizan este campo de fuerzas. (ver Apéndice II).

II.4 Estructura tridimensional tentativa de receptores acoplados a proteínas-G.

El mapa de proyección de rodopsina bovina determinado a 9 Å usando cristalografía electrónica de cristales bidimensionales [6] fue utilizado para diseñar la plantilla de los segmentos transmembranales. Baldwin en 1994 [10] interpretó este mapa de acuerdo a los picos de densidad resueltos en la proyección. Cuatro de ellos corresponderían a hélices que son perpendiculares a la membrana, y la región que tiene forma de arco correspondería a otras tres hélices que estarían inclinadas, y que se superponen en proyección. Estas conclusiones, más las alineaciones de secuencias descritas más adelante fueron utilizadas para localizar estas hélices particulares. El ordenamiento probable propuesto por Baldwin se muestra en la Figura II.1.

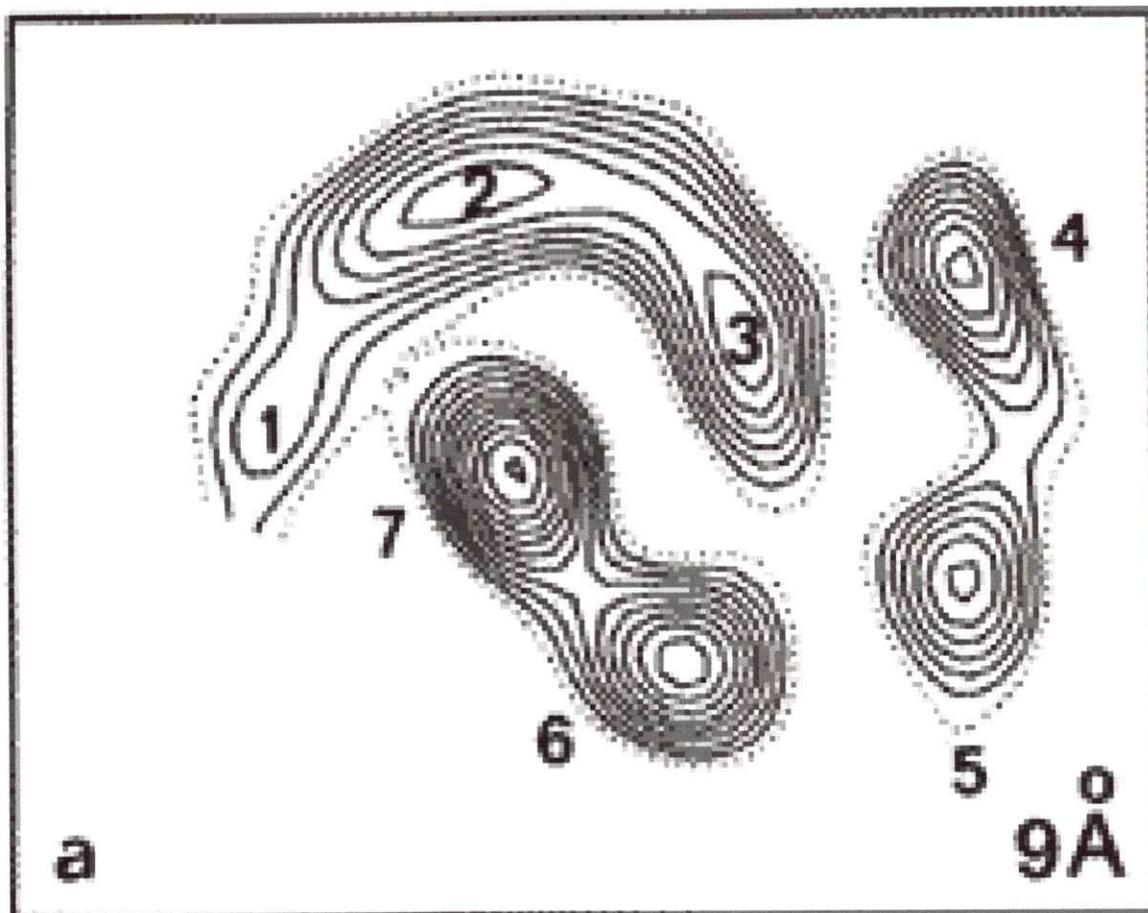


Figura II.1 Mapa de proyección de la rodopsina bovina. La numeración de las hélices está en el sentido de las manecillas del reloj. La vista del receptor es desde la superficie intracelular.

Palczewski y col. [11] recientemente publicaron la estructura cristalina del primer GPCR inserto en membrana que se ha cristalizado, rodopsina bovina, la que confirmó la presencia de las siete hélices postuladas en el mapa de proyección. A pesar de que este receptor es un GPCR, su ligando no es una amina biogénica sino que la molécula 11-cis-retinal. Más aún, este receptor no es un receptor de 5-HT; por tanto, la modelación molecular es una vía alternativa y

por ahora imprescindible para obtener información sobre la estructura 3-D de estos receptores. El hecho más importante de estos estudios experimentales, es la indicación que todos los GPCRs comparten una topología similar [12]. Más aun, el arreglo probable de las hélices descritas por Baldwin [10] y la estructura cristalina obtenida está en total acuerdo, lo que posibilita la construcción de modelos 3-D para los receptores de 5-HT con una base más sólida.

El cromóforo 11-cis-retinal se enlaza a rodopsina bovina a través de la formación de una imina y este fue el nexo para que el uso de otra proteína inserta en membrana con estructura cristalina [13], bacteriorrodopsina, se utilizara como plantilla de varios modelos reportados en literatura [14-18]. Sin embargo, la validez de algunos de estos modelos es cuestionable. De todas maneras, el conocimiento de los aminoácidos involucrados en el enlace de ligandos adquiridos a través de mutaciones sitio-dirigidas junto con modelos de receptores de 5-HT, sigue proporcionando información válida para los estudios de interacción entre ligando y receptor. Un resumen de estudios de mutaciones está descrito más adelante.

II.5 Metodología de modelación de receptores acoplados a proteínas G

II.5.1 Elección de los segmentos helicoidales y esquema de numeración

Como las longitudes de las regiones N- y C-terminales y de los lazos que conectan las hélices varían entre los distintos miembros de la familia de GPCRs, se hace necesario describir un esquema numérico integrado para las posiciones relativas de los aminoácidos de cada receptor a modelar. Usando el esquema numérico descrito por Baldwin [10], el cual permite incluir 26 aminoácidos en cada hélice junto con la descripción de las posibles regiones transmembranales hechas por Findlay y col. [19] donde algunas hélices podrían llegar a incluir hasta 30 aminoácidos, adaptamos la numeración de los aminoácidos en las secuencias de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} a este esquema, con el propósito de definir el comienzo y el final de cada hélice y a la vez definir las posiciones relativas de los residuos importantes de cada hélice en nuestros receptores.

Los diferentes tipos de residuos fueron clasificados de acuerdo a cada una de las dos categorías siguientes:

- (A) Residuos que pueden estar en contacto con el entorno lipídico de la membrana.
- (B) Residuos que no tienen necesariamente contacto con los lípidos.

Esta clasificación usada es compatible con las características generales observadas en las estructuras de proteínas insertas en membrana que se conocen, por ejemplo, el centro de reacción fotosintética [20] y bacteriorodopsina [13]. La clase (A) incluye todos los residuos que generalmente son clasificados como hidrofóbicos, incluyendo Ser, Thr y Tyr. Cabe mencionar que los residuos Ser y Thr son residuos que pueden satisfacer su enlace por hidrógeno enlazándose a la cadena principal de una hélice y pueden entonces estar orientados hacia la superficie lipídica. El residuo Tyr ha sido observado en las superficies que se orientan hacia la membrana en la estructura de bacteriorodopsina, estando localizadas principalmente en los límites polares y no polares de la membrana. Los residuos de la clase (B) incluyen todos los residuos cargados y todos aquellos capaces de formar más de un enlace por hidrógeno; el término polar aquí será usado para describir éstos aunque los residuos Ser, Thr y Tyr fueron excluidos. La distribución de estas dos clases de residuos a través de los siete segmentos se muestra en la Figura II.2. Los residuos característicos en las secuencias de los siete segmentos se muestran alineados en forma vertical. Los residuos de los segmentos I, III, V y VII están numerados hacia arriba y hacia abajo se encuentran numerados los de los segmentos II, IV y VI. De esta manera la superficie intracelular está representada en la parte superior de la Figura II.2. Las posiciones en cada segmento han sido definidas como: () siempre ocupadas por la clase (A); (+) ocupadas por la clase (B) en unas pocas secuencias; (##) ocupadas por la clase (B) en un porcentaje mayor al 10% de las secuencias de GPCRs.

Hx I	Hx II	Hx III	Hx IV	Hx V	Hx VI	Hx VII
##	##	##	##	##	##	##
----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----
101 ## 26	108 ## 1	174 ++ 26 Y 74	191 ## 1	259 ++ 26	322 1	361 ## 26
++	++	## 25 R 100	##	25 IW 76	++	##
	##	## 24 D/E 99	++	##	## 3 K/R 79	++
++	## 4 N 70		##	++	++	
22	++ 5	++ 22 S/A 90	++ 5	++ 22 Y 90	5	++ 22
21 V 80	++	21 I/L 86	++		++	21 Y 95
	++ 7 I/L 77	++	++	++		
	++					
## 18 N 100	## 9 N/S 91	++ 18 L 78		++ 18 M 79		18 P 100
++ 17 G 70	10 L 97	##				## 17 N 93
	11 A/S 96	++	11 W 99		++	++
					++ 12 F 87	
14	13 A/S 83	14 S 75	13	14 P 94	13	++ 14 S/A 97
13	## 14 D 91	13	14 S/A 88	13	14	## 13 N/S 82
	++ 16 L/F 80	##			15 C/S 79	
++	++		11 F/Y 84	++ 16 W 90	## 11	
	++	##		##		++
	++	++			18 P 99	9 L/F 83
			++			++ 19 F/Y 75
++	++	##	20 P 69	++	##	##
	##		## 21 P 49	##		
5	++ 22	++ 5	++ 22	++ 5	++ 22	5
++	++	##	++	++	##	##
++	++	##	++	##		##
	++	++	##	++	++	++
76 ## 1	133 ++ 26	149 ## 1	216 ## 26	234 ++ 1	347 ## 26	386 ## 1
----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----
##	++	0 C 95	##	##	++	##

Figura II.2. Distribución de residuos característicos para cada hélice y distribución de residuos polares de acuerdo a Baldwin [10]. Las posiciones de los residuos están numeradas a la derecha (1-26) de cada columna, hacia arriba para los segmentos I, III, V, VII y hacia abajo para los segmentos II, IV y VI; la superficie intracelular de la membrana está representada por la parte superior de la figura. La numeración a la izquierda corresponde a la numeración en la secuencia aminoacídica del primer y último residuo del receptor 5-HT_{2A}. Los símbolos en las posiciones indican si se trata de sitios ocupados por un residuo polar en unas pocas secuencias (++) o en más del 10% de las secuencias (##) de GPCRs. Cuando no hay ningún símbolo, significa que nunca hay residuos polares en este sitio. (residuos polares incluyen D, N, E, Q, H, R, K; todos los

otros son capaces de orientarse hacia los lípidos). Los residuos altamente conservados en cada hélice están a la derecha junto con el porcentaje en que aparecen en la secuencia. La elección de 26 aminoácidos por hélice esta explicada en el texto. De acuerdo con este esquema la hélice III debería estar situada al interior de las siete hélices debido a la mayor concentración de residuos polares y la hélice IV más expuesta al entorno lipídico debido a la mayor concentración de residuos apolares.

Como describimos más arriba, el esquema numérico de Baldwin [10] permite que cada hélice incluya 26 aminoácidos. Según esta autora, si las hélices fueran perpendiculares a la membrana, aproximadamente 18 residuos (residuos 5-22 en la Figura II.2) abarcarían el grosor de la membrana; sin embargo, el mapa de proyección bidimensional de Rodopsina [6] indica que existen hélices inclinadas que no son perpendiculares a la membrana, lo que aumentaría la cantidad de residuos a considerar para cada hélice. En el caso de hélices perpendiculares a la membrana, se espera que los residuos polares no estén expuestos hacia la membrana y que éstos se concentren hacia los finales de esta sección media de 18 sitios. La región central (enumerada 13-14 en la Figura II.2) de cada hélice puede ser asignada como la región media, y por ende esta región debería contener la mayor cantidad de sitios que pueden estar en contacto con los lípidos; esto es observado para la mayor parte de las hélices según Baldwin [10], aunque para la hélice III el cambio en el carácter de los residuos hacia los finales de esta hélice no es tan evidente. Además, todas las hélices a excepción de la hélice IV tienen residuos polares acomodados en la región media (que es la más hidrofóbica), y las hélices II, III, y VII tienen varios. Así, la elección de 26 residuos para cada hélice es bastante práctica y es incierta sólo para unos pocos residuos, i.e. hacia las tercios intra y extracelulares, donde la variabilidad de los residuos es mayor.

II.5.2 Alineación de secuencias para receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}

Los gráficos de hidrofobicidad de las secuencias de GPCRs indican la presencia de siete segmentos transmembranales [5] separados por lazos que difieren en longitud entre los diferentes miembros. Las secuencias son alineadas dentro de los segmentos a partir de patrones de residuos que son característicos para cada segmento, aún cuando el porcentaje de identidad

entre miembros relacionados distantemente sea tan bajo como el 20%. Por lo menos algunos, y usualmente todos los residuos del patrón están presentes en la hélice correspondiente para todos los miembros identificados de esta familia; unas pocas secuencias de receptores de ligandos no peptídicos como aminas no-catiónicas no están claramente alineados en la transmembrana V [10]. Los residuos característicos están mostrados en la Figura II.2, en la cual se señalan la posición relativa en la secuencia y el porcentaje de incidencia de cada residuo en las secuencias en la cual cada residuo aparece.

El punto de partida para la modelación de receptores 5-HT₂ comienza con la colección de secuencias de GPCRs conocidos que guardan homología con las secuencias extraídas de la base de datos de secuencia OWL [21] para los receptores humanos 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, usando el servidor de domino público SWISS-PROT [22] (Protein Sequence Database). Las múltiples alineaciones de secuencia fueron llevadas a cabo usando los análisis de secuencia y de predicción de estructura terciaria entregados por el programa *Predict Protein* (PHD) de Rost y col. [23-26]. Estas alineaciones son hechas para determinar los aminoácidos conservados y las porciones de alineaciones que definen las potenciales regiones transmembranales. Estos resultados obtenidos fueron comparados con otros alineamientos de GPCRs descritos en la literatura [27-33]. En este punto cabe destacar que al no existir estructura cristalina, la definición de los segmentos transmembranales es de suma importancia y la comparación con datos publicados de los posibles segmentos es imprescindible para asegurar que todos los aminoácidos pertenecientes a las hélices estén considerados.

La Figura II.3 muestra la alineación de los dominios transmembranales (TM) de las siete regiones para los receptores humanos 5-HT_{2A} [34] y 5-HT_{2C} [34] fueron usados tanto la metodología PHD junto con las porciones de secuencia I - VII descritos por otros autores [27,30]. La Figura II.3 muestra a manera de ejemplo, la variación en la longitud de las hélices consideradas para un mismo receptor según diversos autores. Al mostrar este alineamiento queremos destacar que los residuos patrones que se conservan en las hélices son siempre considerados por estos autores, pero que las regiones terminales de cada hélice presentan una gran variación. Estos últimos se encuentran en el tercio extracelular y tercio intracelular respectivamente y que nosotros en nuestra modelación los usamos como indicadores de los posibles límites de las hélices.

II.5.3 Diseño de la estructura de la región transmembranal

Es conocido que el sitio de enlace de los receptores de neurotransmisión que utilizan aminas biogénicas se encuentra entre sus siete segmentos mayoritariamente hidrofóbicos [35] y que la interacción con un residuo Asp que está localizado en la hélice III es necesaria para agonistas de alta afinidad. Para determinar la ubicación de este residuo, es necesario interpretar los antecedentes entregados más arriba. A partir del mapa de proyección de rodopsina bovina, tanto la orientación y profundidad de las hélices en la membrana se ajusta a tres niveles para cada una de ellas, haciendo calzar de esta manera los tres niveles con la estructura de proyección y de esta manera obtener una interpretación tridimensional. Con la definición de las secciones correspondientes a la parte interna, media y externa de cada hélice se puede obtener una matriz de coordenadas internas para los átomos de C_{α} que refleje las inclinaciones de las regiones transmembranales. La [Figura II.4](#) muestra la definición de estas tres secciones las cuales corresponden al tercio extracelular, la sección media y la tercio intracelular respectivamente.

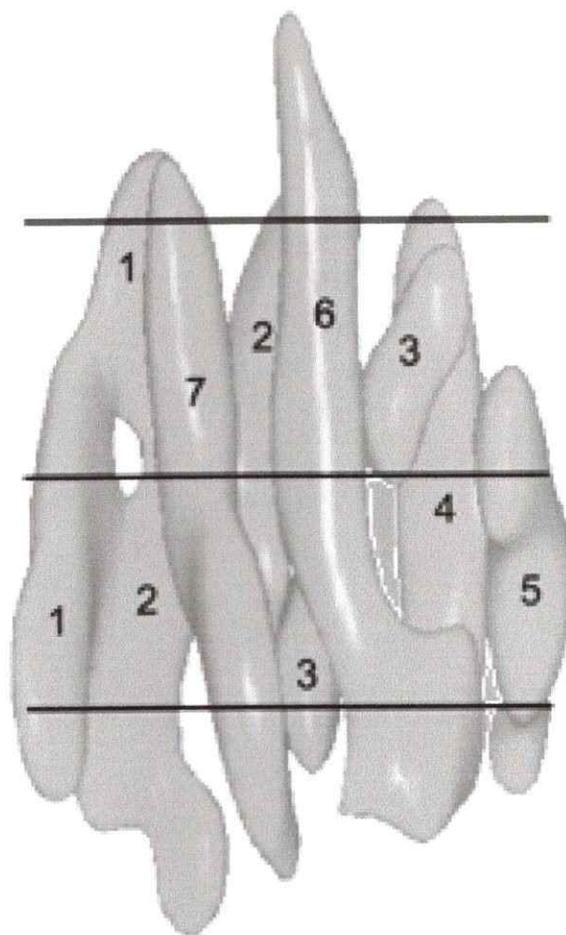


Figura II.4. Secciones extracelular, media e intracelular descritas a partir de los siete picos de densidad. Se observan cuatro estructuras que representan hélices casi perpendiculares a la membrana (4,5,6,7 de acuerdo a la figura) y las otras tres estructuras que adoptan una forma de arco más elongado en proyección, representando hélices en una posición más inclinada (1,2 y 3 respectivamente). Esta figura fue obtenida del sitio Web de Schertler "Rhodopsin" (http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/research/SS/Schertler_G).

II.5.4 Construcción de la matriz de coordenadas internas para los átomos de C_{α}

Una vez definidas las secciones dentro de cada transmembrana (intra-, media, extracelular), la representación simplificada del receptor, i.e. sólo la región transmembranal se obtiene a través de un modelo geométrico como el que se muestra en la [Figura II.5](#). Este modelo considera las distintas secciones para cada segmento transmembranal. En la figura cada punto (coloreados para mayor claridad) representa la posición de cada sección en cada una de las hélices. Estas secciones corresponden a un número determinado de residuos (aproximadamente 9 residuos por sección).

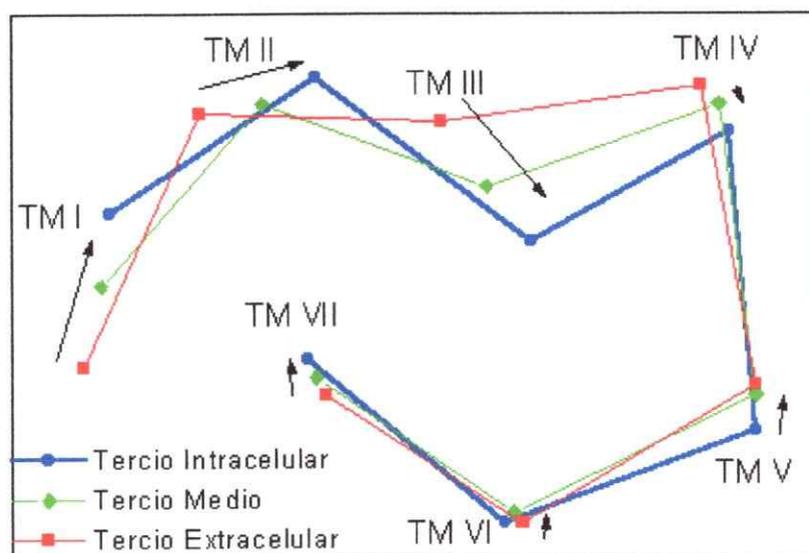


Figura II.5 Posiciones relativas de los ejes de las hélices en las secciones media (verde), intracelular (azul) y extracelular (rojo) respectivamente.

En este modelo geométrico el conjunto de posiciones calza con el mapa de proyección descrito por Schertler [Figura II.1](#). Se puede observar cuatro hélices paralelas IV, V, VI, VII y una región donde aparece la superposición de las tres hélices restantes I, II, III que dan una forma de arco en el mapa de proyección.

Este modelo satisface el criterio adicional respecto de la hélice III que exige que esté rodeada por las hélices restantes en la parte intracelular de los receptores. Esta condición se satisface si el final de la región en forma de arco corresponde al final intracelular de la hélice III y si las pendientes de las otras hélices se alejan desde el centro hacia la región extracelular. De esta manera en un diagrama de proyección como el de Baldwin, la región extracelular de la hélice III se superpone con el final intracelular de la hélice II, y el final extracelular de esta última hélice se superpone con extremo intracelular de la hélice I. Las otras cuatro hélices restantes quedan orientadas casi perpendicularmente a la membrana.

II.5.5 Identificación de superficies internas

La identificación de las superficies internas de las hélices se basa en el reconocimiento de los sitios (residuos de aminoácidos) que están involucrados en el enlace de agonistas y/o antagonistas para estos receptores; estos sitios deben estar al interior de la molécula formando parte de un bolsillo de unión con el ligando. Los sitios de unión de ligandos agonistas y antagonistas no son necesariamente idénticos, más aun ellos se pueden superponer [36]. La [Tabla II.1](#) muestra algunos de los datos de estudios de mutación sitio-dirigidas, marcaje químico u otros estudios que han establecido la participación de residuos particulares. Estos sitios están señalados en la [Figura II.6](#) por puntas de flechas; puede observarse que la mayoría de estos sitios están orientados hacia el interior de las hélices. Con la excepción de la hélice I, todas las hélices han demostrado su contribución al sitio de unión. Casi todos los sitios involucrados están en la mitad extracelular de las transmembranas.

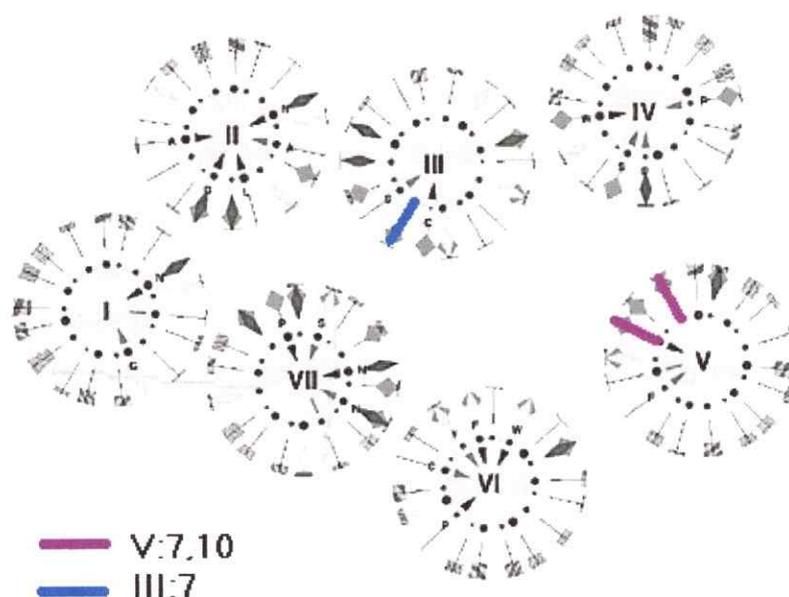


Figura II.6 Vista esquemática de la región transmembranal. El ordenamiento gira en sentido de las manecillas del reloj. En la figura están marcadas la posición III:7 donde se encuentra el residuo Asp y las posiciones V:7 y V:10 donde están situadas los residuos de Ser.

Tabla II.1 Receptor; indica el tipo de receptor en el cual la mutación fue hecha. Efecto; el tipo de cambio funcional reportado: (t) afinidad por antagonista afectada, (g) afinidad por agonista afectada, (t/g) ambos observados, (nt/g) g pero no se observa cambio en la afinidad por antagonista, (t/ng) t pero no se observa cambio en la afinidad por agonista.

Sitios de mutaciones que afectan el enlace de agonistas y antagonistas					
Posición-Hélice	Mutación	Receptor	Efecto		Referencia
III:7	Asp156Ala	5-HT ₂	humano	g	[37]
V:7	Ser239Ala	5-HT ₂	humano	g	[38]
V:10	Ser242Ala	5-HT ₂	humano	t	[39]
VI:19	Phe339Leu	5-HT ₂	humano	t/ng	[39]
VI:20	Phe340Leu	5-HT ₂	humano	g	[39]

fue llamada "Fold-Fit" y consiste de dos etapas, la primera cuando construye las secuencias en segmentos de estructura secundaria predeterminados y la segunda cuando traslada los átomos de C_{α} de estas secciones a las posiciones equivalentes en la matriz de coordenadas internas de C_{α} .

Etapas 1

Durante la construcción de la estructura, las secciones pre-existentes tienen una matriz de coordenadas internas equivalente de átomos de C_{α} restringidos a las coordenadas cartesianas de la matriz construida. Los ángulos diedros de los aminoácidos también están restringidos a sus valores en una hélice α (ψ , ϕ de -65° y -40° respectivamente) para prevenir que los lazos de conexión de las hélices o las regiones N- o C- terminales se superpongan con los nuevos segmentos de estructura agregados. Un archivo de control instruye al programa VFF sobre qué residuo debe ser construido en cada iteración del procedimiento de Fold-Fit. Para acelerar el proceso de construcción de los lazos extra- e intracelulares, éstos fueron construidos en bloques desde el último residuo de cada hélice hasta el primer residuo de la siguiente. Los primeros cuatro residuos de cada hélice se construyen individualmente. De esta manera nos aseguramos que la hélice está direccionada correctamente de acuerdo con el eje de la hélice equivalente en la matriz de C_{α} . La estructura total de los receptores se construye con la estructura secundaria definida de manera tal de minimizar la posibilidad de construir residuos con geometrías no deseadas. Todas las secciones transmembranales fueron construidas como hélices α_R y las secciones correspondientes a los lazos y regiones terminales como láminas β . Esto último tiene un sentido práctico ya que la falta tanto de una estructura cristalina como de una descripción adecuada de la estructura secundaria y terciaria para estas regiones nos permite suponer una estructura secundaria que facilite su modelación.

Etapa 2

La parte construida de la estructura es sometida a simulaciones de dinámica molecular. En esta etapa sólo los átomos de C_{α} de las secciones transmembranales son forzados a adoptar la posición de las coordenadas de la matriz de C_{α} , mientras que las secciones no transmembranales junto con las cadenas laterales de aminoácidos no tienen ninguna restricción. Las secciones transmembranales tienen sus ángulos diedros restringidos a los valores descritos en la Etapa 1, de manera de prevenir la formación de ángulos diedros distorsionados, cuando los átomos de C_{α} son "forzados" a sus nuevas posiciones. Este proceso es repetido hasta que la región C-terminal es construida. Las estructuras finales de algunas etapas del proceso de Fold-Fit mientras se construye el receptor se aprecia en la [Figura II.9](#) y la estructura final del receptor se muestra en la [Figura II.10](#). Un diagrama del proceso de Fold-Fit se muestra en la [Figura II.11](#).

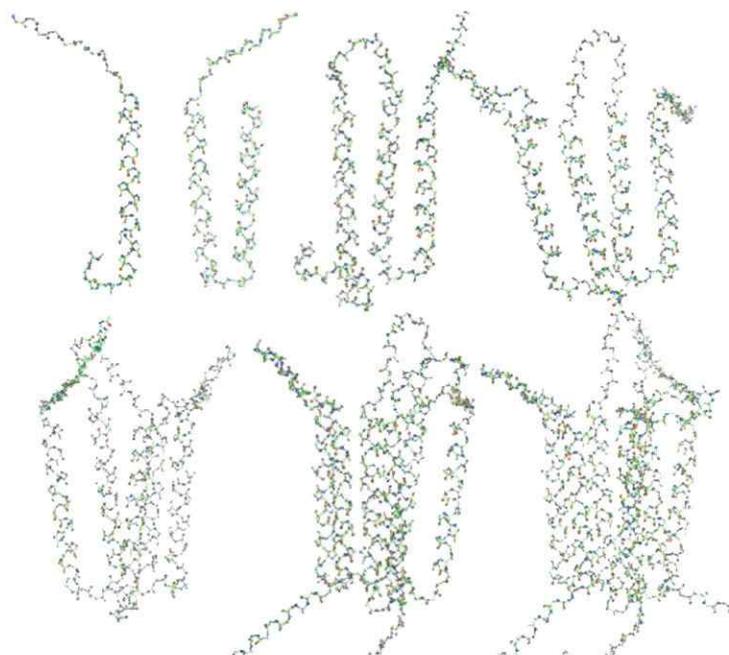


Figura II.9 Conformaciones minimizadas obtenidas en diferentes instancias (en picosegundos de simulación) durante las simulaciones de dinámica molecular del programa Fold-Fit. La figura muestra la formación de la estructura del receptor 5-HT_{2A} por etapas de acuerdo a la descripción del texto. Tanto las hélices α como las láminas β se muestran sin sus cadenas laterales.

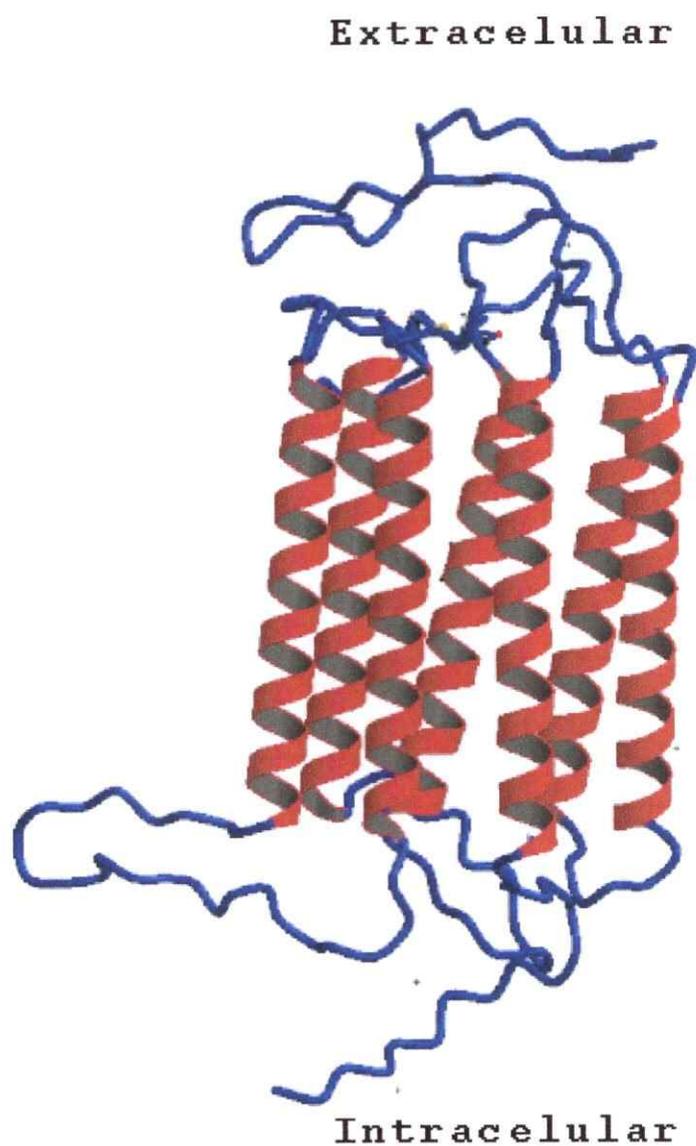


Figura II.10 Diagrama de cintas de la región transmembranal (roja) correspondiente a las siete hélices α y de los lazos de conexión extra- e intracelulares (azul). El modelo final muestra el empaquetamiento más estable y el mejor acuerdo con el modelo descrito por Baldwin.

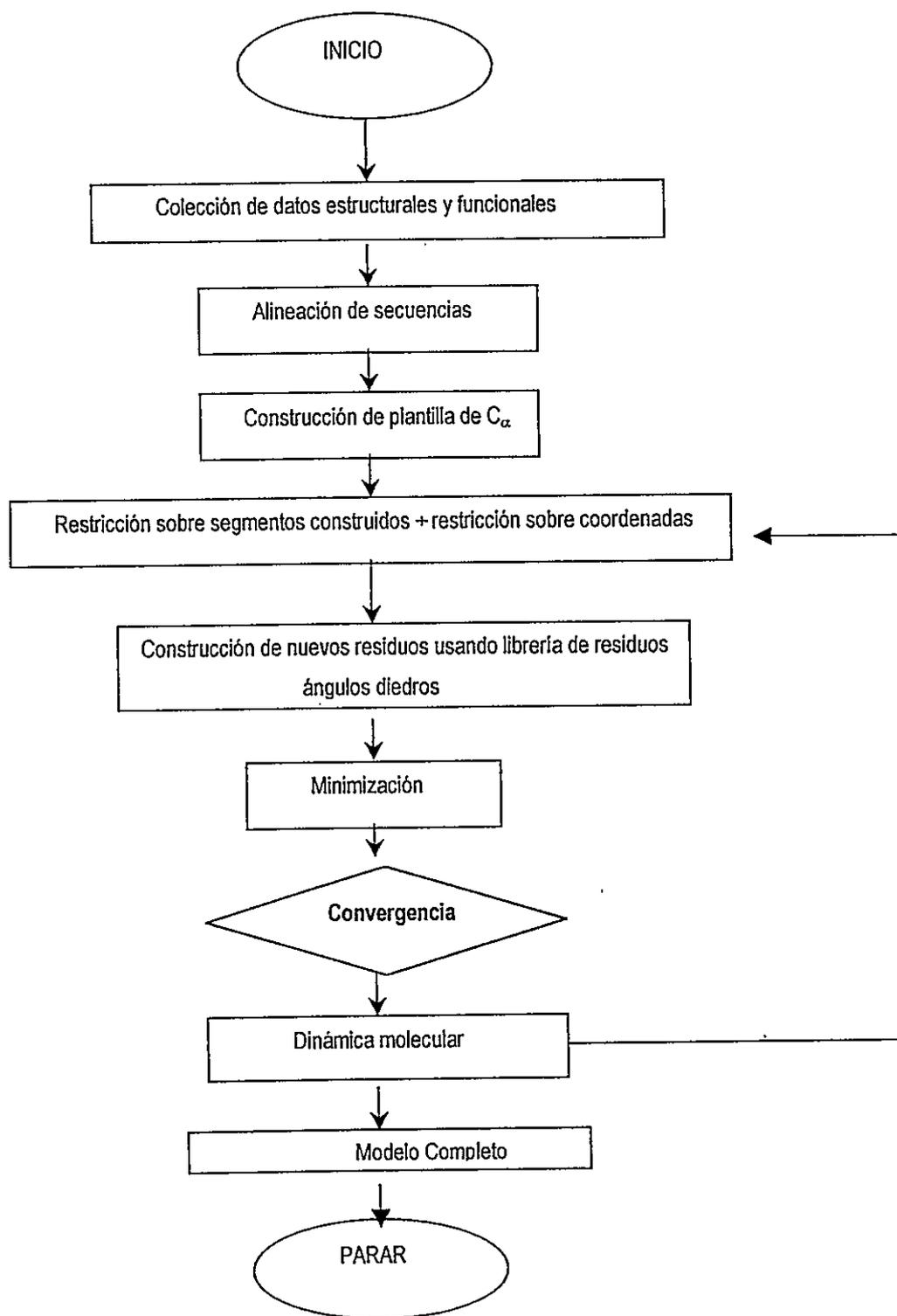


Figura II.11 Diagrama simplificado del método Fold-Fit.

II.7 Evaluación del modelo 5-HT_{2A}

II.7.1 Simulaciones de dinámica molecular clásica (DM) y de Selectively Enhanced Molecular Dynamics (SEMD)

La flexibilidad conformacional es esencial en muchos eventos biológicos. El movimiento colectivo de grandes regiones (o partes) de una molécula ocurre en fenómenos tan importantes tales como la regulación alostérica [40-42], el cierre de dominios enzimáticos una vez que éstos enlazan a un ligando [43,44], el desenrollamiento parcial de la hélice de DNA durante la intercalación de una droga [45] e inactivación de canales de potasio por la interacción de un dominio citoplasmático con la apertura del canal [46]. Es por lo tanto, de gran interés entender los procesos dinámicos en los sistemas biológicos como las proteínas. No existe ninguna técnica experimental capaz de entregar información detallada acerca del movimiento de una proteína a escala atómica. Sin embargo, se puede obtener información limitada acerca de la flexibilidad y movimiento de proteínas a través de la técnica de rayos X [47]. El conocimiento de las escalas de tiempo del movimiento en proteínas ha sido obtenido a través del uso de espectroscopia Raman [48], y en particular de estudios de resonancia magnética nuclear RMN [49]. Aún así, todas estas técnicas experimentales entregan una escasa información sobre los desplazamientos involucrados.

Una vez obtenidos los modelos para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, éstos fueron investigados usando los métodos de la mecánica molecular: minimización de energía (ME), dinámica molecular clásica (DM) y dinámica molecular aumentada selectivamente (SEMD). Este estudio estuvo orientado a una mayor comprensión de las tendencias conformacionales y la estabilidad de los receptores 5-HT₂ obtenidos. En esta etapa fueron incluidos explícitamente los lazos y las regiones N- y C-terminales y moléculas de agua explícitas fueron agregadas al interior de la región formada por las siete hélices. La técnica SEMD filtra los modos que tienen frecuencias altas (éstas son las correspondientes a los modos normales de estiramiento y flexión de enlaces) y se aplica a las trayectorias de dinámica molecular obtenidas para extraer información acerca de los movimientos de interés, i.e. los movimientos de baja frecuencia, en particular los cambios conformacionales que son los movimientos más significativos en las proteínas (éstos están en el rango de frecuencias aproximado de 50 cm⁻¹).

Los cálculos presentados en este capítulo están basados en el campo de fuerzas empírico VFF [1], en el cual la energía potencial del sistema está definida por una función analítica de las coordenadas internas y las distancias interatómicas (descrito en el Apéndice II). Los parámetros para esta función fueron refinados para reproducir datos experimentales de un conjunto de compuestos modelo los que incluyen grupos funcionales que están presentes en aminoácidos. [50,51] Las trayectorias de dinámica molecular clásica (DM) fueron generadas usando el programa VFF. Durante las simulaciones DM las ecuaciones de movimiento de Newton se resuelven numéricamente para producir una trayectoria de posiciones atómicas, velocidades y energías. [52,53]. Estas trayectorias de las posiciones atómicas representan una descripción más realista del movimiento molecular, el cual incluye pequeñas y grandes fluctuaciones estructurales además de transiciones conformacionales, también pueden tomar en cuenta los efectos de solvente explícitamente. Aunque las leyes de movimiento son simples, las trayectorias obtenidas son bastante complicadas y la interpretación del movimiento no es para nada trivial. En particular, es difícil investigar los movimientos colectivos. Una novedosa manera de identificar el movimiento colectivo en proteínas a partir de simulaciones DM es haciendo uso de las simulaciones SEMD desarrolladas por Osguthorpe y col. [54], las cuales involucran la reasignación de las velocidades atómicas para que se correspondan con aquellos modos en un rango seleccionado de frecuencia, i.e. se aplica un filtro sobre las velocidades atómicas.

El método SEMD involucra los siguientes pasos:

- (i) cálculo de las coordenadas y velocidades de acuerdo a los algoritmos de DM.
- (ii) reasignación de las velocidades atómicas para que se correspondan con aquellos de los modos seleccionados en un rango de frecuencia.
- (iii) re-escalamiento de las velocidades de manera uniforme para restaurar la temperatura promedio calculada antes de aplicar el filtro. La "temperatura" en una simulación de SEMD se calcula a partir de las velocidades atómicas, al igual como en las simulaciones de DM, y refleja el promedio de las velocidades atómicas. Sin embargo, esto no implica que la energía esté distribuida entre los modos de movimiento de la misma manera. Para una temperatura particular cada modo debería tener la misma energía en una trayectoria equilibrada de DM, mientras que en las simulaciones SEMD la energía es canalizada hacia unos

pocos modos de movimiento, permitiendo obtener distintas conformaciones de la proteína.

Varias simulaciones de DM fueron llevadas a cabo usando distintas temperaturas (en grados Kelvin): 100 K, 200 K, 300 K y superiores hasta 500 K. Estas simulaciones consideraron aguas explícitas al interior de la cavidad formada por las regiones transmembranales. También utilizamos valores en el rango de 100-200 kcal mol⁻¹ para los potenciales de torsión de manera de mantener las secciones transmembranales restringidas. En las simulaciones desarrolladas a temperaturas más bajas (hasta 300 K) el receptor se mantuvo intacto durante el tiempo de simulación, sin cambio aparente en las estructuras de la región transmembranal; sin embargo, a mayores temperaturas (sobre 400 K) se desarrolló un proceso de "desplegamiento" de las hélices después de los primeros 20 ps de simulación, con destrucción del modelo alrededor de los 30 ps.

Las simulaciones de SEMD se llevaron a cabo con diferentes factores de amplificación y duración del tiempo de filtrado. Cada una de estas simulaciones fue precedida por 60 ps de dinámica molecular clásica para alcanzar el equilibrio térmico y permitir que los modos naturales de movimiento en los receptores evolucionaran. Estas simulaciones mostraron varios grados de "desplegamiento" en las hélices y de deformación de la estructura terciaria de los receptores. La Figura II.12 muestra estructuras obtenidas a intervalos de 10 ps a través de una simulación de SEMD. El movimiento de "contorsión" leve observado en las simulaciones de dinámica molecular se amplifica en los primeros 10 ps de SEMD, con un aumento gradual de la "torsión" del empaque de siete hélices. Después de 30 ps este movimiento de "contorsión" de las hélices se transforma en un movimiento de "doble contorsión" en todo el paquete de hélices. Al final de las simulaciones de SEMD este movimiento se convierte en el despliegamiento y estiramiento de las hélices.

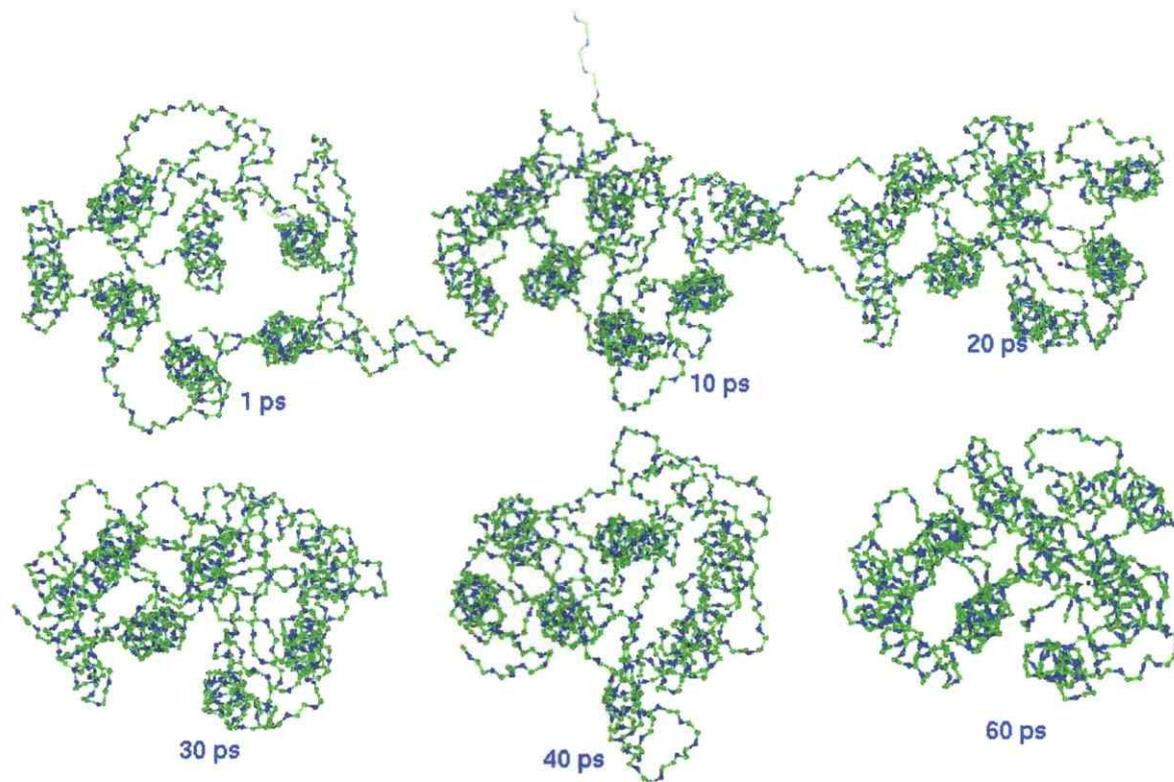


Figura II.12 Las siete hélices antiparalelas I-VII, las cuales forman la mayor proporción de la estructura secundaria de los receptores y contienen el sitio de unión, se mantienen juntas y forman una unidad relativamente rígida. El movimiento típico revelado por esta parte del receptor es un movimiento de "torsión alternada". Este movimiento involucra el movimiento de las hélices exteriores (I, IV y V).

II.7.2 Raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) entre dinámica molecular clásica y SEMD

La desviación de la raíz cuadrática media (RMSD) en los átomos de C_{α} de los residuos pertenecientes a las hélices fueron obtenidas a partir de las simulaciones de dinámica molecular y SEMD. La RMSD describe la suma de todos los cambios en las posiciones atómicas en una molécula y es expresada en Å. La Figura II.13 muestra la RMSD como función del número de hélice (TMI-TMVII). Las fluctuaciones atómicas de los C_{α} de los residuos transmembranales que ocurren en las simulaciones DM se muestran en la Figura II.13(a), mientras que las fluctuaciones

de las posiciones de los mismos átomos después de remover los movimientos de altas frecuencias se muestran en [Figura II.13\(b\)](#). Los desplazamientos promedio observados en dinámica molecular clásica son significativamente menores, aproximadamente 2 Å, mientras que mediante las simulaciones SEMD el valor de RMSD obtenido es aproximadamente 5 Å. De esta manera queda demostrada la efectividad en la búsqueda conformacional usando la metodología SEMD. La amplificación de las oscilaciones conformacionales deja un aumento en la ocurrencia de transiciones conformacionales.

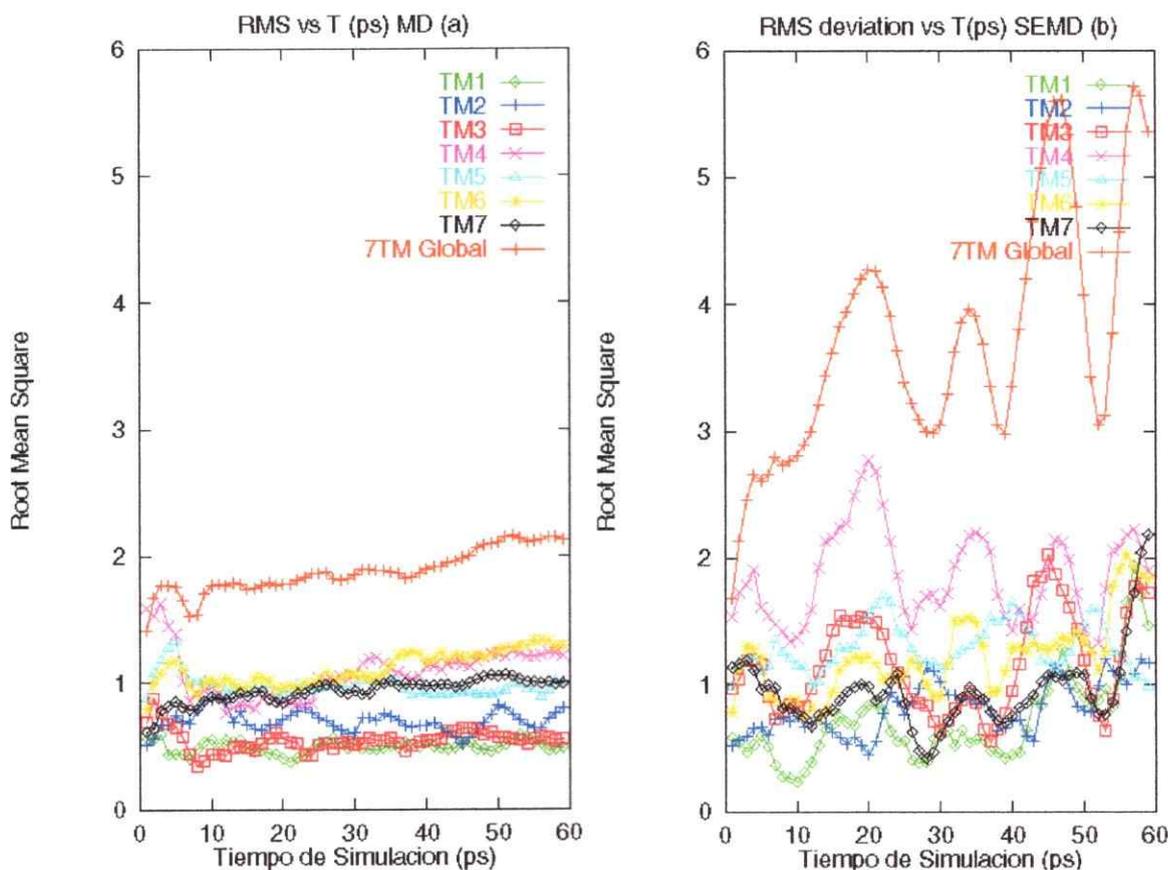


Figura II.13 (a) Izquierda: Desviaciones RMS (en angstroms) de los C α de la región transmembranal en el modelo de receptor 5-HT $_{2A}$, relativas a la estructura de partida en la simulación de dinámica molecular clásica. (b) Derecha: Desviaciones RMS (en angstroms) de los C α en el modelo 5-HT $_{2A}$ en simulaciones de SEMD.

II.8 Generación de modelo inserto en membrana

La inserción de la representación del receptor 5-HT_{2A} en un modelo de la bicapa lipídica hidratada se hizo con el objetivo de generar un modelo solvatado del receptor. Este debería asegurar una representación razonable de los efectos del solvente sobre los lazos extracelulares y de los residuos expuestos a las cadenas lipídicas y los lazos citosólicos. La inserción del modelo en DMPC dio cuenta de que la elección de los segmentos transmembranales que abarcan la bicapa están de acuerdo con las dimensiones del modelo de ésta (aproximadamente 30 Å) y que los lazos de conexión de las hélices quedan en los dominios hidrofílicos tanto intra- como extracelulares. La [Figura II.14](#) muestra al receptor 5-HT_{2A} inserto en la membrana DMPC.

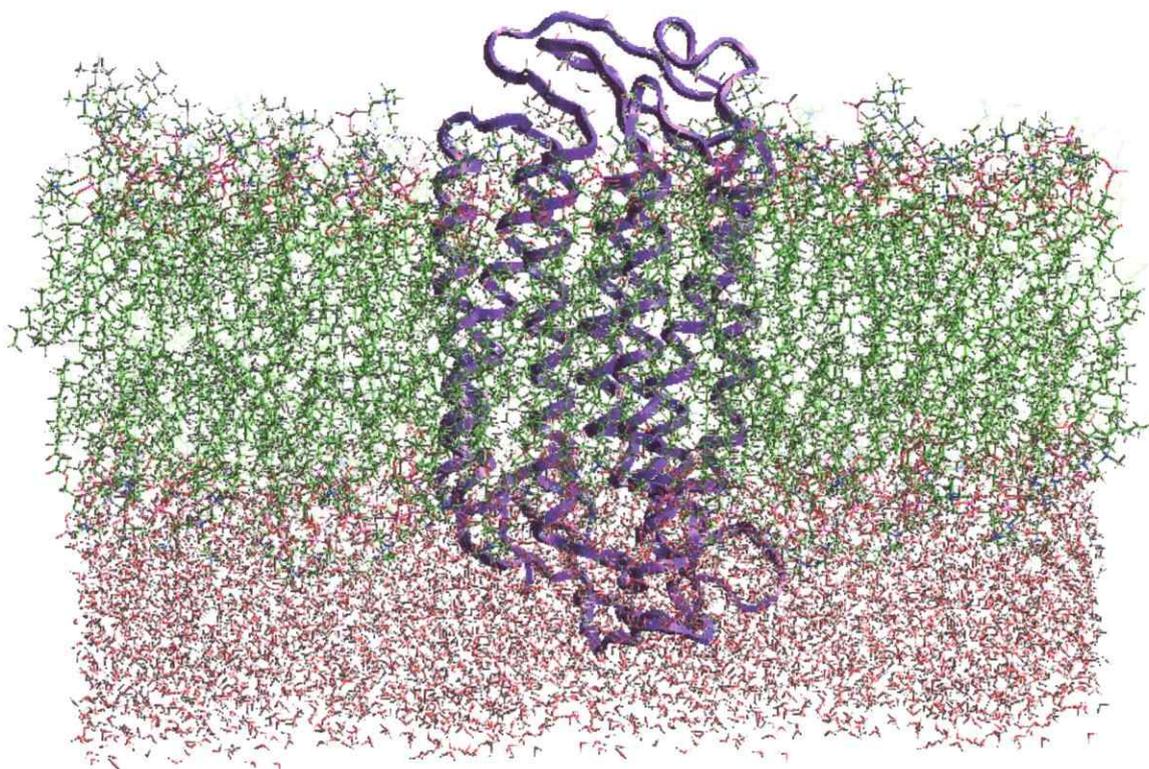


Figura II.14 Receptor 5-HT_{2A} inserto en membrana. Para mayor claridad se han borrado de la figura las moléculas de agua de la cara extracelular.

19. D. Donnelly, J.B.C. Findlay, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 582-589 (1994).
20. J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michael, *Nature*, **318**, 618-624 (1985).
21. "The OWL database", University of Leeds 1997, 1998.
22. A. Bairoch, B. Boeckman, "The SWISS-PROT" Protein Sequence Databank *Nucleic Acids Res.*, **19**, Suppl., 2247-2249 (1991).
23. B. Rost, C. Sander, *Proteins*, **20**, 216-226 (1994).
24. B. Rost, C. Sander, *J. Mol. Biol.*, **232**, 584-599 (1993).
25. B. Rost, C. Sander, *Proteins*, **19**, 55-72 (1994).
26. B. Rost, R. Casadio, P. Fariselli, C. Sander, *Prot. Sci.*, **4**, 521-533 (1995).
27. K. Schmuck, C. Ullmer, P. Engels, H. Lubbert, *FEBS. Lett.*, **342**, 85-90 (1994).
28. F.O. Levy, T. Guderman, M. Birnbaumer, A.J. Kaumann, L. Birnbaumer, *FEBS Lett.*, **296**, 201-206 (1992).
29. S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoflack, A. Bruinvels, M. Hibert, *J. Med. Chem.*, **35**, 3448-3462 (1992).
30. G. Wishart, D.H. Bremner, K. R. Sturrock, *Receptor and Channels.*, **6**, 317-335 (1999).
31. D.H. Bremner, N.S. Ringan, G. Wishart, *Eur. J. Med. Chem.*, **32**, 59-69 (1997).
32. M. Kuipers, C.G. Kruse, I.van Wijngaarden, P.J. Standaar, M.T.M. Tulp, N. Veldman, A.L. Spek, A. Ijzerman, *J. Med. Chem.*, **40**, 300-312 (1997).
33. "Profile Network Prediction" (PHD) , B. Rost, C. Sander, *vide supra*.
34. A.G. Saltzman, B. Morse, M. M. Whitman, Y. Ivanshchenko, M. Jaye, S. Felder, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 1469-1478 (1991).
35. C.D. Wang, T.K. Gallaher, J.C. Shih, *Mol. Pharmacol.*, **43**, 931-940 (1993).
36. H. Höljte, U.K. Jendretzki, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **328**, 577-584 (1995).
37. K. Kristiansen, W. K. Kroeze, D. L. Willins, E. I. Gelber, J. E. Savage, R. A. Glennon, B. L. Roth, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 735-746 (2000).
38. D. A. Shapiro, K. Kristiansen, W. K. Kroeze, B. L. Roth, *Mol. Pharmacol.*, **58**, 877-886 (2000).
39. M.S. Choudhary, S. Craigo, B.L. Roth, *Mol. Pharmacol.*, 1993, **43**, 755-761.
40. B. Ho, A. Karschin, T. Branchek, N. Davidson, H.A. Lester, *FEBS Lett*, **312**, 259-262 (1992).

41. R. J. Fletterick, N. B. Madsen, *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 145-148 (1977).
42. M. F. Perutz, *Scient. Am.*, **239**, 68-86 (1978).
43. S. Remington, G. Wiegand, R. Huber, *J. Mol. Biol.*, **158**, 111-152 (1982).
44. A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S Derwenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hugejensen, S. A. Patkar, L. Thim, *Nature*, **351**, 491-494 (1991).
45. S. Neidle, M. J. Waring, "*Molecular Aspects of Anti-Cancer Drug Action*", Macmillan Press, London (1983).
46. W. N. Sagota, T. Hoshi, R. W. Aldrich, *Science*, **250**, 568-571 (1990). W. N. Sagota, T. Hoshi, R. W. Aldrich, *Science*, **250**, 533-538 (1990).
47. A. Kaspra, D. L. D. Caspar, J. Clarage, D. M. Salunke, M. Clarage, *Nature*, **332**, 659-662 (1988).
48. N. T. Yu, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **4**, 229-280 (1977).
49. K. Wuethrich, "*Nuclear Magnetic Resonance in Biological Research- Peptides and Proteins*", North-Holland, Amsterdam (1976).
50. A. T. Hagler, E. Huler, S. Lifson, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 5319-5326 (1974).
51. S. Lifson, A. T. Hagler, P. Dauber, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5111-5121 (1979).
52. J. A. McCammon, S. C. Harvey, "*Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*", Cambridge University Press, Cambridge, (1987).
53. M. P. Allen, D. J. Tisdeley, "*Computer Simulations of Liquids*", Clarendon, Oxford (1987).
54. P. Dauber-Osguthorpe, D. J. Osguthorpe, P. S. Stern, J. Moult, *J. Comp. Phys.*, **151**, 169-189 (1999).

Capítulo III. "Docking" de ligandos agonistas de receptores 5-HT

III.1 Resumen

Este capítulo III discutirá el proceso de acoplamiento de ligandos en el sitio de unión de receptores serotoninérgicos, en los modelos obtenidos para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}. Este proceso es un proceso dinámico, donde se toman en cuenta las diferentes conformaciones y propiedades tanto del ligando como del sitio del receptor. Debido a que no existe una palabra en español que de cuenta exactamente de su significado, y que el término en inglés "docking" es más explícito para representar este fenómeno, éste será el término utilizado de aquí en adelante. Los ligandos escogidos para "docking" fueron agonistas serotoninérgicos los cuales pertenecen a varias clases estructurales y que muestran distintas afinidades por ambos receptores. Hemos incluido las tres clases más importantes, i.e. derivados de triptamina, tales como 5-HT, derivados de fenilisopropilaminas tales como 1-(4-X-2,5-dimetoxifenil)-2-aminopropano (X= -Br, -I) y derivados de ergolinas como LSD y 2-Br-LSD, compuestos 1-5, ver Figura III.1. El proceso de "docking" con estos ligandos fue guiado principalmente con la información experimental obtenida de receptores con mutaciones sitio dirigidas.

En ambos modelos para receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, los agonistas interactúan con distintos tipos de residuos en varias hélices. Sin embargo, a pesar de que los ligandos presentan afinidades distintas por ambos receptores, estos sitios de enlace difieren muy poco para los agonistas estudiados, conservándose principalmente las interacciones descritas en la literatura, validando de esta manera los modelos obtenidos. Más aún, la energía de interacción por residuos obtenida en los estudios de "docking" indica que la mayor contribución se debe a la interacción electrostática que ocurre entre el grupo amonio de los ligandos con el residuo conservado Asp de la hélice III. También, la mayor afinidad que presentan los ligandos por los receptores 5-HT_{2A} respecto de los 5-HT_{2C} puede ser interpretada a la luz de los resultados obtenidos en este estudio.

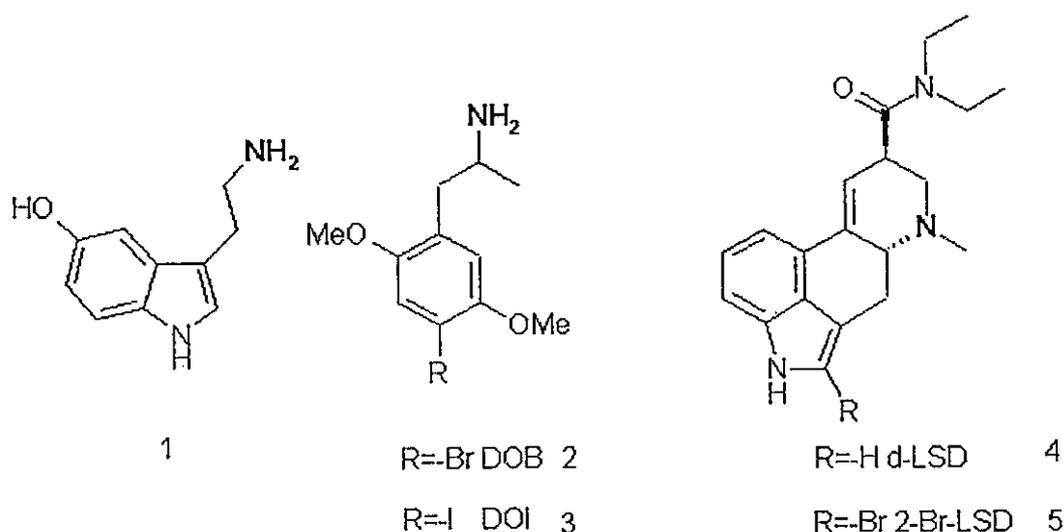


Figura III.1 Ejemplos de ligandos de receptores 5-HT₂ pertenecientes a varias clases. El átomo de nitrógeno básico que puede estar protonado a pH fisiológico está impreso en **negrita** en cada estructura.

III.2 Introducción

En la literatura científica se han publicado varios modelos para racionalizar las afinidades y propiedades funcionales de ligandos de receptores 5-HT₂ [1,2]. Para ligandos agonistas, la hipótesis que ellos se enlazan en un sitio de unión similar está apoyada por datos experimentales como los discutidos en el capítulo I. Los datos de mutación sitio dirigida de los receptores indican que todos los neurotransmisores que contienen la función amina se enlazan en el espacio comprendido entre las hélices transmembranales III, V y VI. Esta región estaría ubicada en el tercio extracelular de los receptores [3]. También, para la mayoría de los agonistas 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} las relaciones estructura-actividad (SARs) muestran tendencias similares entre clases estructuralmente diferentes [4,5]. Esto permite la superposición de ligandos agonistas en el proceso de "docking".

III.3 Metodología

En este capítulo III las simulaciones de dinámica molecular (DM) para el análisis de las fluctuaciones de las conformaciones de "docking" en el tiempo fueron realizadas con el programa Discover_3, que está implementado en el paquete de programas Insight II [6]. El procedimiento para las simulaciones de "docking" comenzó con una minimización usando el algoritmo de "conjugate gradient", con un criterio de convergencia de $0.001 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}$ y con un número máximo de iteraciones de 2000 pasos. Una vez que la estructura de partida estuvo minimizada, el proceso de "docking" comenzó su búsqueda conformacional a una temperatura de 298 K (25 °C) utilizando el campo de fuerzas "Consistent Valence Force Field" [7] (CVFF) implementado en el programa Discover_3 (ver Apéndice II).

III.4 Modelos de farmacóforo para los receptores de 5-HT

Lloyd y Andrews en 1986 [8] propusieron un modelo de farmacóforo de drogas que actúan en el sistema nervioso central (SNC). Basados en la estructura cristalina de ocho compuestos establecieron su similitud topográfica y sobre ella construyeron tres puntos del receptor: R_1 , R_2 y R_3 . R_1 y R_2 representan enlaces hidrofóbicos ubicados a 3.5 \AA por arriba y por abajo del centro de un anillo aromático escogido como el origen de coordenadas. El punto R_3 representa un enlace por H ubicado a 2.8 \AA del átomo de nitrógeno como muestra la Figura III.2a. Estos autores concluyeron que la presencia de un anillo aromático y un átomo de nitrógeno a una distancia y en una orientación definidas es una característica común de las drogas con estructura de amina que actúan a nivel del SNC.

Otros modelos de farmacóforo para ligandos de 5-HT agonistas y antagonistas también han sido reportados en literatura. Por ejemplo, Hibert y col. [9] describieron un farmacóforo que contenía los mismos elementos estructurales mencionados más arriba, con la excepción de la distancia entre el centro del anillo aromático y el átomo de nitrógeno, y la elevación de este último sobre el plano del anillo, siendo éstas de 5.6 \AA y 1.5 \AA para antagonistas y 5.3 \AA y 0.2 \AA para agonistas respectivamente (Figura III.2b). Este modelo contiene los dos elementos que son característicos para todos los ligandos serotoninérgicos; sin embargo, es bastante ambiguo y no diferencia entre distintos subtipos de receptores de 5-HT. Las razones de la selectividad por los

subtipos no se conocen y constituyen en la actualidad uno de los objetivos de mayor interés en los estudios de este tipo.

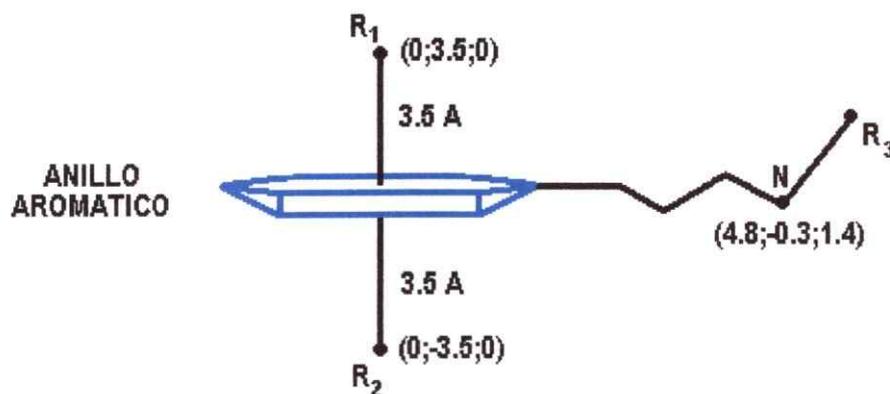


Figura III.2a Modelo de farmacóforo de drogas que actúan en el sistema nervioso central de acuerdo a Lloyd y Andrews de 1986 (ref. [8]).

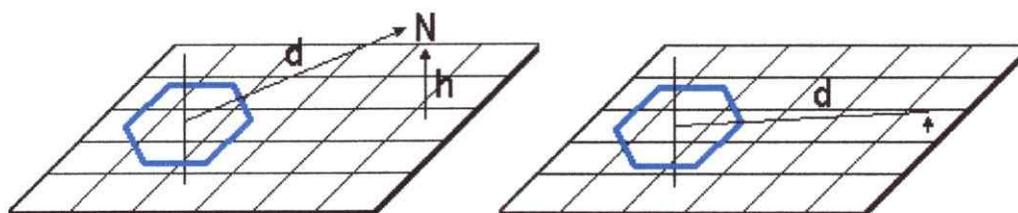


Figura III.2b Modelo de farmacóforo para moléculas agonistas y antagonistas según Hibert y col. (1989, ref [9]) $d=5.3 \text{ \AA}$ en agonistas y $h=1.5 \text{ \AA}$ y en antagonistas $d=5.6 \text{ \AA}$ y $h=0.2 \text{ \AA}$.

III.5 Descripción del sitio de unión determinado experimentalmente

Se han determinado experimentalmente varios residuos que están involucrados en el enlace de ligandos. Estos aminoácidos se describen brevemente a continuación ya que son la base para el proceso de "docking" que se describe más adelante.

Sitio de enlace I. Asp¹⁵⁵ en el receptor 5-HT_{2A} y Asp¹³⁴ en el 5-HT_{2C}. De acuerdo con Kristiansen y col. [10] el papel principal de este residuo de Asp es "anclar" el grupo amonio de los ligandos serotoninérgicos facilitando de esta manera las interacciones aromáticas con los residuos de la hélice VI. Los estudios de mutación sitio-dirigida en varios receptores bioaminérgicos han indicado que, para la mayoría de los ligandos de receptores de 5-HT, una interacción entre el grupo básico (amonio) y el terminal carboxilato de este residuo Asp estabiliza el enlace [11].

Sitio de enlace II. Ser¹⁵⁹ en el receptor 5-HT_{2A} y Ser¹³⁸ en el 5-HT_{2C}. Según Sealton y col. [12] este residuo también formaría un enlace por H con la 5-HT protonada a través del grupo amonio. Este residuo se encontraría adyacente en 3-D al residuo de Asp conservado en la hélice III, pudiendo participar en el enlace como un segundo sitio de interacción para 5-HT. De acuerdo con el modelo planteado por Sealton, el grupo amonio de la 5-HT queda equidistante de las cadenas laterales del Asp¹⁵⁵ y de Ser¹⁵⁹. La distancia un átomo de oxígeno del grupo carboxilato del residuo Asp¹⁵⁵ es de 1.9 Å y al átomo de oxígeno de Ser¹⁵⁹ es 1.8 Å. La distancia del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo al oxígeno de carboxilato es 4.0 Å, la cual es muy grande para un enlace por hidrógeno eficiente. La mutación sitio-dirigida de este residuo Ser¹⁵⁹Ala produce una disminución en la afinidad de 5-HT por el receptor 5-HT_{2A}.

Sitio de enlace III. Ser²³⁹ en el receptor 5-HT_{2A} y Ser²¹⁹ en el 5-HT_{2C}. Se ha descrito que el grupo hidroxilo en la posición 5 de la 5-HT es necesario para que ésta molécula presente alta afinidad por estos receptores [13], los que conservan este residuo en la misma posición relativa (ver Figura II.1). Debido a que los datos de mutación sitio-dirigida indican que es probable que este residuo esté directamente involucrado en el enlace de 5-HT [14], en una interacción dipolo-dipolo con formación de puente de hidrógeno.

Sitio de enlace IV. Phe³³⁹ y Phe³⁴⁰ en el receptor 5-HT_{2A} Phe³²⁷ y Phe³²⁸ en el 5-HT_{2C}. Estos residuos aromáticos están conservados en todos los receptores de 5-HT. Se ha propuesto que ellos ayudan a anclar el anillo aromático de 5-HT [15] vía interacciones del tipo $\pi-\pi$ o de

apilamiento ("stacking"). También se ha reportado que el enlace de ligandos alucinógenos en los receptores 5-HT₂ es a través de interacciones planas con áreas desconocidas del receptor [16].

La Figura III.3a muestra los compuestos 5-HT, LSD y DOB en el sitio de enlace para agonistas en los receptores 5-HT₂. El compuesto corresponde a un híbrido:

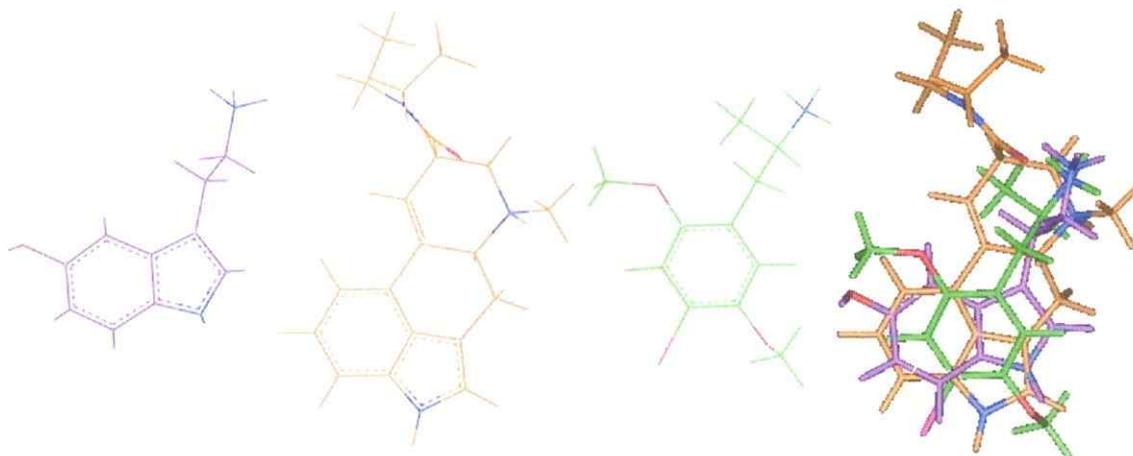


Figura III.3a Superposición de ligandos 5-HT (violeta); LSD (anaranjado) y DOB (verde) haciendo coincidir los átomos de nitrógeno básico, que han sido coloreados en azul. Los átomos de oxígeno han sido coloreados en rojo. Se puede observar que la región aromática se ha hecho coincidir en las tres estructuras y el átomo de nitrógeno de la cadena alquímica queda en la misma posición en estas conformaciones.

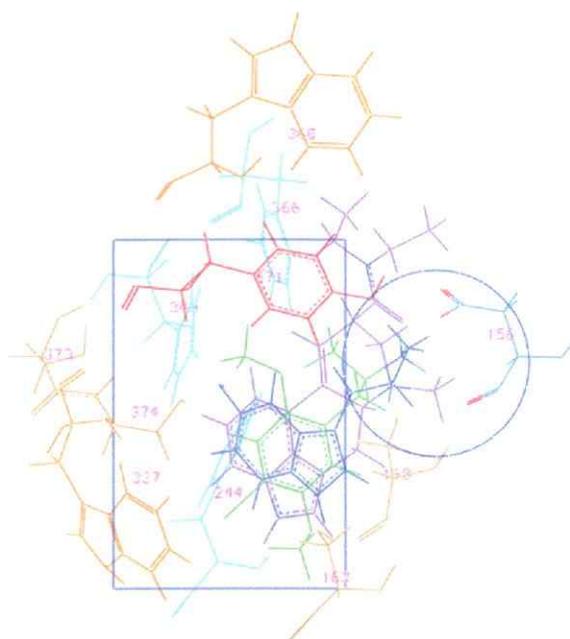


Figura III.3b Entorno de los ligandos en el proceso de "docking". El sitio de unión de agonistas tiene un carácter polar. El complejo Asp¹⁵⁵-amonio (círculo) y la región aromática (rectángulo) están rodeados por residuos aromáticos (Phe, celeste; Tyr, rojo; Trp, anaranjado).

III.6 "Docking" de ligandos en los modelos de receptores

Una vez que se ha descrito la importancia de las interacciones con los aminoácidos previamente mencionados, la posición de los ligandos dentro del sitio de unión en los receptores de 5-HT queda completamente determinada. La Figura III.4 muestra esquemáticamente la posición de 5-HT. Primero describiremos los sitios de enlace de forma global y después discutiremos el entorno en el cual están inmersos los ligandos. Los resultados obtenidos se ilustran y se comparan con modelos descritos ya en literatura científica [17-19]. La habilidad de identificar estos residuos en los modelos obtenidos y la superposición de los grupos funcionales importantes en los ligandos de 5-HT, refuerza la idea que los complejos formados entre ligando y receptor ocupan regiones similares en ambos modelos estudiados.

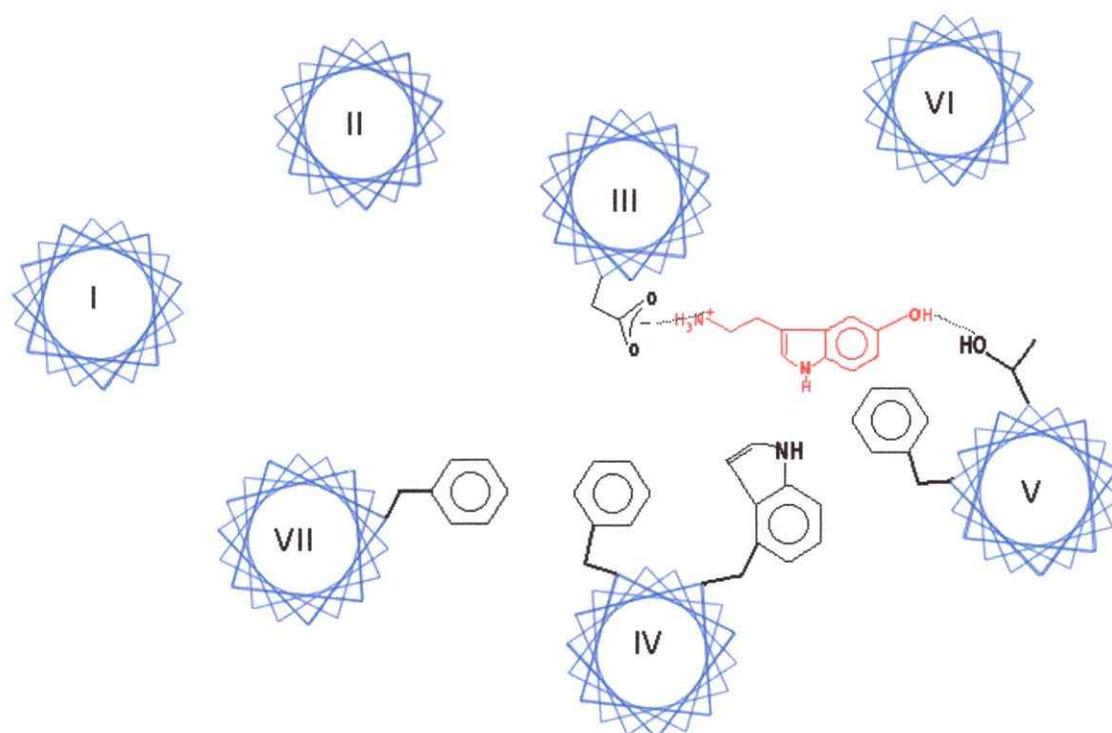


Figura III.4 Representación esquemática de las interacciones en el modelo de receptor 5-HT₂. El grupo amonio de 5-HT interactúa con el formiato del residuo de Asp. El grupo hidroxilo interactúa a través de puentes de H con el residuo de Ser en la hélice V. Los residuos de la región aromática están distribuidos principalmente en las hélices VI y VII.

III.6.1 Entorno de 5-HT

En ambas estructuras tridimensionales obtenidas para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, el átomo de nitrógeno protonado de 5-HT forma puentes de hidrógeno con el residuo Asp¹⁵⁵ en el receptor 5-HT_{2A} y Asp¹³⁴ en el receptor 5-HT_{2C}. La distancia de la función amina de 5-HT a estos residuos es de 2.9 Å en 5-HT_{2A} y 2.8 Å en 5-HT_{2C} respectivamente. Las distancias de enlace por H para otros ligandos estudiados en el proceso de "docking" se pueden apreciar en la Tabla III.1. También, existen puentes de hidrógeno con otros residuos en el sitio de unión de los receptores. La Ser tiene como grupo funcional un hidroxilo (ver Apéndice I) el cual se encuentra

normalmente formando enlaces de hidrógeno con NH de otros enlaces peptídicos para estabilizar la estructura secundaria de la proteína, en nuestro modelo por ejemplo para el receptor 5-HT_{2A}, el grupo hidroxilo 5-OH de la 5-HT forma un puente de hidrógeno débil con el grupo hidroxilo del residuo de Ser³⁷³, a una distancia de 3.3 Å.

Tabla III.1 *Distancias de enlace por hidrógeno entre el residuo Asp conservado y grupo amonio de diferentes ligandos serotoninérgicos.*

Ligando	Distancia enlace-H	
	5-HT _{2A} (Å)	5-HT _{2C} (Å)
5-HT	2.89	2.82
2-Br-LSD	2.42	2.7
DON	2.12	2.11
DOB	2.12	2.06
DOCN	2.26	2.25

La Tabla III.2 presenta un resumen de los residuos que interactúan con algunos ligandos serotoninérgicos seleccionados, 5-HT, DOB, DON y LSD en ambos receptores modelados. Esta Tabla III.2 fue confeccionada tomando en cuenta una esfera de 6 Å de radio alrededor de cada ligando. Cabe destacar que el tipo de residuos indicados en esta tabla pueden tener una interacción directa con el ligando como hemos discutido anteriormente, o bien ser importantes para mantener una conformación tal de la proteína, de modo que pueda interactuar con el ligando. Los datos de mutación sitio dirigida discutidos anteriormente de determinados residuos de aminoácidos tales como el residuo Asp de la hélice III sugieren que su modificación afecta la interacción directa con el ligando. Sin embargo, otros residuos que aparecen en esta tabla y de los cuales no se tiene información de mutaciones sitio dirigidas podrían ser necesarios para mantener una conformación determinada. Los residuos han sido coloreados para mejor

III.6.2 Energías de interacciones específicas de 5-HT con los residuos cercanos

Las características estructurales del sitio de unión se reflejan en la energía de interacción entre los ligandos y los residuos importantes del sitio de unión. Para la 5-HT, los residuos más relevantes están descritos en la Tabla III.3. Cabe destacar que la interacción más importante obtenida en el proceso de "docking", es la interacción electrostática que ocurre entre el grupo amonio de 5-HT y el formiato del residuo de Asp¹⁵⁵ en el receptor 5-HT_{2A} (residuo Asp¹³⁴ en los receptores 5-HT_{2C}). El aporte de esta interacción (quinta columna de la Tabla III.3) es cercano al 50 % de la energía de interacción total. Las energías de interacción en la tabla, corresponden a la suma de la energía de van der Waals y coulombica obtenidas en el proceso de "docking" (ver Apéndice II). Éstas son del orden de -48.6 kcal mol⁻¹ y de -45.6 kcal mol⁻¹ respectivamente. Además de las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados, tales como la interacción entre el grupo amonio de los ligandos y el carboxilato del residuo Asp ya mencionada, la presencia de otros fragmentos en el sitio de unión, ya sean provenientes de las cadenas laterales de otros residuos o de átomos del esqueleto peptídico, involucran nuevas interacciones de largo alcance, las cuales tienen un aporte por residuo más bien discreto a la energía de unión de los ligandos, cuando ellos se enlazan al sitio de unión en ambos receptores. En los receptores 5-HT_{2A}, algunas de las energías de interacción entre la 5-HT con los residuos más cercanos (a distancias no mayores a 6 Å) tales como: Ser¹⁵⁹, Ser¹⁶², Ile¹⁶³, Phe²⁴⁴, Phe³⁴⁰, Phe³⁶⁵, Trp³³⁶, Val³⁶⁶, Tyr³⁷⁰ tienen una energía del orden de -4.7, -1.4, -0.46, -1.80, -1.62, -0.87, -0.46, -0.29, -1.48 kcal mol⁻¹ respectivamente. Sin embargo, a pesar de que el aporte es más bien discreto cuando se comparan estas energías con la energía de interacción entre el grupo amonio y el carboxilato, la suma de todas ellas aporta el otro 50 % a la energía total de interacción, a este punto nos referiremos mas adelante. En la Tabla III.3 sólo se muestra algunos residuos a modo de ejemplo; si fueran todos incluidos las sumas de las energías daría el 100 %. Cabe destacar que los valores de energía de interacción obtenida por residuo en los otros ligandos estudiados siguen la misma tendencia que la presentada aquí para la 5-HT.

Tabla III.3 Energía por residuo (sólo se muestra una porción de ellos) de la 5-HT enlazada a receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}. La suma "Total" corresponde a la suma de las energías de van der Waals y coulombica por residuo. El % coloreado en rojo es el aporte de la interacción electrostática a la energía de interacción total que no se muestra en la tabla.

Receptor	Ligando	Residuo	VDW		Energías en kcal mol ⁻¹		
			Rep	Disp	Coul.	Total	%
5-HT _{2A}	5-HT	III:7 Asp 155	4.7	-3.1	-49.8	-48.2	44.2
		VI:6 Phe 340	0.72	-2.2	-0.3	-1.78	1.6
		VII:6 Phe 366	0.01	-0.5	-0.98	-1.47	1.3
		VI:16 Trp 336	0	-0.5	-0.15	-0.65	0.6
		VII:11Tyr 370	0	-0.5	-0.91	-1.41	1.3
		III:11 Ser 159	4.4	-5.9	0.3	-1.2	1.1
5-HT _{2C}	5-HT	III:7 Asp 134	0.63	-1.4	-44.9	-45.6	44
		VI:6 Phe 328	0	0.23	-0.63	-0.4	0.39
		VII:6 Phe 353	0	0.11	-1.16	-1.05	1
		VI:16 Trp 324	0	-0.48	-1.5	-1.98	1.9
		VII:11Tyr 358	0	0.35	-1.1	-0.75	0.72
		III:11 Ser 138	2.9	-4.1	-1.2	-2.4	2.31

En los receptores 5-HT_{2C}, la 5-HT mantiene las mismas interacciones electrostáticas y del tipo van der Waals con algunos de los residuos conservados; sin embargo, otros residuos presentan una energía de interacción distinta, por ejemplo los residuos Ser¹³⁸, Ser²¹⁹, Ile¹⁴², Trp³²⁴, Phe³²⁸, Leu³⁵⁰, Phe³⁵³, Val³⁵⁴, Tyr³⁵⁸ muestran una energía de interacción con 5-HT es -2.7, -0.11, -0.97, -1.15, -0.71, -1.63, -1.54, -1.49 respectivamente. En los receptores 5-HT_{2A}, Ser¹⁵⁹, Ile¹⁶³, Phe³⁴⁰, Phe³⁶⁵ y Val³⁶⁶ son los residuos con un mayor aporte a la energía de interacción entre 5-HT y el sitio de unión; sin embargo, en los receptores 5-HT_{2C} a pesar de la existencia de la conservación de estos residuos en las mismas posiciones, el residuo Phe³²⁸ que corresponde al residuo Phe³⁴⁰ en el 5-HT_{2A}, presenta una interacción de menor energía con el ligando en comparación al mismo residuo en este último. En contraste al residuo Trp³³⁶ que en el receptor 5-HT_{2A} tiene un aporte energético menos importante a la unión, el correspondiente residuo Trp³²⁴ en el receptor 5-HT_{2C}, presenta una mayor contribución a la energía de enlace para los ligandos en este receptor. Esto estaría reflejando las posiciones y distancias relativas de las cadenas laterales de estos residuos respecto de los ligandos. Por ejemplo, Ser¹⁵⁹ queda a 3.5 Å,

Tyr³⁷⁰ queda aproximadamente a 6 Å y Trp³³⁶ a 7 Å del ligando. Estas distancias difieren un poco en los receptores 5-HT_{2C}, donde Ser¹³⁸ queda a 3.71 Å, el residuo Tyr³⁵⁸ a 7 Å y Trp³²⁴ a 6 Å del ligando, pudiendo dar cuenta de esta manera de las diferencias observadas en ambos receptores.

III.7 Interacciones de 5-HT con moléculas de agua

En los sitios de unión de ambos modelos de receptores, varias moléculas de agua han sido incluidas en las simulaciones. En el proceso de "docking" observamos que estas moléculas de agua se coordinan con 5-HT y con otros residuos para formar una red de puentes de hidrógeno. En el receptor 5-HT_{2A} existe un par de moléculas de agua⁹⁸ y agua²⁶⁷ (aquí la numeración de las moléculas de agua es arbitraria) que se coordinan al grupo amonio de 5-HT a una distancia (NH⁺...O) de 2.06 Å y de 2.22 Å respectivamente. La molécula de agua²⁶⁷, direcciona el protón al átomo de oxígeno del grupo carbonilo del enlace peptídico del residuo Leu³⁶² a una distancia de 3.7 Å. También, existe otra molécula de agua¹²⁸ a una distancia (O_{agua}...HO_{5-HT}) de 1.54 Å al grupo hidroxilo de 5-HT y que forma un puente de hidrógeno con la el grupo hidroxilo del residuo de Ser³⁷³, cuya distancia (H_{agua}...OH_{Ser}) es de 1.68 Å.

Para los receptores 5-HT_{2C}, esta red de enlaces por hidrógeno también existe: por ejemplo, el grupo amonio de 5-HT presenta puentes de hidrógeno con la molécula de agua²⁰⁰ a una distancia (NH_{5-HT}...O) de 2.05 Å. Otra molécula, agua¹⁸³, forma otro puente de hidrógeno, a una distancia (NH_{5-HT}...O) de 2.25 Å. El grupo hidroxilo de la 5-HT, queda coordinado con la molécula de agua²³⁷ a una distancia (OH_{5-HT}...O_{agua}) de 2.26 Å y el grupo N-H indólico queda coordinado con otra molécula de agua²¹³ a una distancia (NH...O) de 2.37 Å. De esta manera, las conformaciones de menor energía obtenidas muestran un patrón de enlaces por hidrógeno más elaborado alrededor de 5-HT. La Figura III.5 muestra las moléculas de agua en el sitio de unión coordinadas al grupo amonio de 5-HT y al grupo hidroxilo respectivamente.

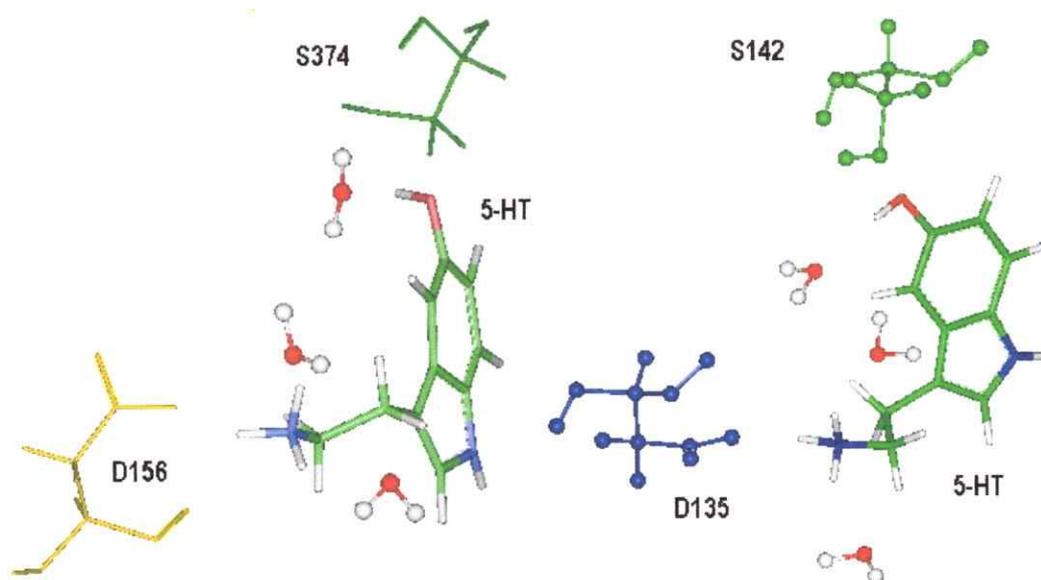


Figura III.5 Moléculas de agua interaccionando con el grupo amonio de 5-HT. Para el receptor 5-HT_{2A} (izquierda) el residuo Asp (D155, amarillo) forma puente de hidrógeno con el grupo amonio. A la derecha, para el receptor 5-HT_{2C} el residuo D134 (azul) forma la misma interacción. El residuo Ser (verde) interaccionan con el grupo hidroxilo a través de las moléculas de agua.

De acuerdo con los modelos de receptores de 5-HT obtenidos, los sitios de unión para ambos receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} contienen varias moléculas de agua, como describimos más arriba. Las interacciones más importantes encontradas en el "docking" de 5-HT en los modelos 3-D y moléculas de agua son las discutidas anteriormente. Estas interacciones son del mismo orden de magnitud cuando se comparan con las interacciones más fuertes entre 5-HT y los residuos que están formando el sitio de unión (Tabla III.2, excluyendo por supuesto la interacción con el residuo Asp cargado). Esto refuerza la idea que las moléculas de agua deben considerarse como parte estructural de estos receptores. También sirve para enfatizar la importancia de incluir agua como "moléculas de agua estructurales" tanto en la construcción de modelos 3-D así como en las simulaciones de dinámica molecular. La interacción de estas moléculas de agua con los ligandos puede llegar a ser tan importante como la interacción con cualquier otro residuo. En los receptores 5-HT_{2A}, las tres moléculas de agua⁹⁸ y agua²⁶⁷ que forman puentes de hidrógeno con el grupo amonio y el grupo hidroxilo de 5-HT contribuyen con energías de -5.7 y -1.53 kcal mol⁻¹ a la energía de total de interacción entre ligando y receptor respectivamente. En los receptores 5-

HT_{2C} las moléculas de agua²⁰⁰ y agua¹⁸³ tienen energías de interacción de -1.49 y -2.68 kcal mol⁻¹ respectivamente. Estas energías de interacción reflejan las diferencias en las distancias y en la orientación relativa de las moléculas de agua que surgen del balance entre la capacidad de formar puentes de hidrógeno con el ligando, de las interacciones con el receptor y con otras moléculas de agua. También, existen moléculas de agua que no forman enlaces de hidrógeno directamente con el ligando pero que aún exhiben interacciones significativas con otros residuos, las cuales son principalmente de carácter electrostático, las que pueden contribuir de manera importante al campo eléctrico en el sitio de unión, al cual haremos referencia en el Capítulo IV. Estos resultados indican que no es suficiente incluir una esfera de solvente para simular el ambiente del ligando dentro del sitio de unión, sino que, además, hay que considerar las moléculas de agua cercanas que aunque no forman necesariamente puentes de hidrógeno con el ligando, podrían tener un papel crucial en las interacciones de los ligandos cuando ellos llegan a interactuar con los residuos en el sitio activo.

III.8 Posición y descripción del sitio de enlace aromático

Se ha descrito que el sitio de unión de 5-HT está localizado en el tercio extracelular de la región transmembrana del receptor [20]. La Figura III.6 muestra que agonistas como 5-HT, se fijan principalmente entre las hélices III, V, VI y VII donde éstos quedan rodeados por los residuos aromáticos altamente conservados en estos receptores, tales como Trp³³⁶ en el receptor 5-HT_{2A} y Trp³²⁴ en 5-HT_{2C}; Phe³⁴⁰ en el receptor 5-HT_{2A} y Phe³²⁸ en el 5-HT_{2C} en la hélice VI, Phe³⁶⁵ en el receptor 5-HT_{2A} y Phe³⁵³ en el 5-HT_{2C} de la hélice VII. En el espacio tridimensional, todos estos residuos quedan próximos al grupo amonio de 5-HT en las conformaciones de mínima energía (ver Figura III.6a,b). En la vecindad de la hélice V, el sitio de enlace de agonistas tiene un carácter más hidrofílico como resultado de la presencia de residuos polares tales como el residuo de Ser²³⁹ en el receptor 5-HT_{2A} y de Ser²¹⁹ en el 5-HT_{2C}. En el receptor 5-HT_{2A}, otro residuo de Ser, el residuo de Ser²⁴² queda cercano también, pero éste es reemplazado por un residuo de Ala²²² en los receptores 5-HT_{2C}. Este tercio extracelular contiene también otros residuos alifáticos lipofílicos en la hélice V tales como los residuos Val²³⁵ en el receptor 5-HT_{2A} y Val²¹⁵ en el 5-HT_{2C}, el residuo de Gly²³⁸ en el receptor 5-HT_{2A} y Gly²¹⁸ en el 5-HT_{2C}, los cuales quedan

convenientemente situados para la interacción con las cadenas alquílicas presentes en otros ligandos.

En la conformación de menor energía obtenida en el proceso de "docking", el anillo indólico de 5-HT queda situado principalmente entre las hélices V, VI, VII. Aquí se presenta una diferencia importante entre ambos receptores. En el receptor 5-HT_{2A} existe un cluster de residuos aromáticos donde se incluyen Phe²⁴⁴ de la hélice V, Phe³⁴⁰ y Trp³³⁶ de la hélice VI y Phe³⁶⁵ de la hélice VII. También el residuo de Tyr³⁷⁰ de la hélice VII muestra una interacción con el grupo amonio de 5-HT. En el receptor 5-HT_{2C}; este cluster de residuos aromáticos está presente; sin embargo es más pequeño o bien las cadenas laterales están más lejanas. Aquí, la interacción aromática ocurre principalmente vía dos residuos aromáticos de la hélice VI; el residuo de Phe³²⁸ y el Trp³²⁴. Otro residuo de la hélice VII, el residuo de Phe³⁵³, de acuerdo a nuestro modelo también estaría involucrado en la estabilización del anillo indólico de 5-HT. El residuo de Tyr³⁵⁸ que está conservado en posición en este modelo está más alejado del grupo amonio y no llega a interactuar con éste como lo hace en el modelo para el receptor 5-HT_{2A}.

En cierto modo, estos resultados no son del todo sorprendentes, ya que de acuerdo a los estudios experimentales de afinidad de ligandos serotoninérgicos [21] discutidos en el capítulo I, existe una correlación significativa entre las afinidades de estos por ambos subtipos de receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}. Además, ellos validan los modelos de receptores obtenidos y discutidos en este capítulo, lo cual nos permite obtener una idea más elaborada de las interacciones que ocurren a nivel entre ligando y receptor en el sitio de unión. Lo que cabe destacar de estos estudios es la posibilidad de tener una idea del ambiente que rodea los ligandos y dar luces de las posibles interacciones con residuos particulares y su modo de afectar la interacción de estos una vez unidos al sitio.

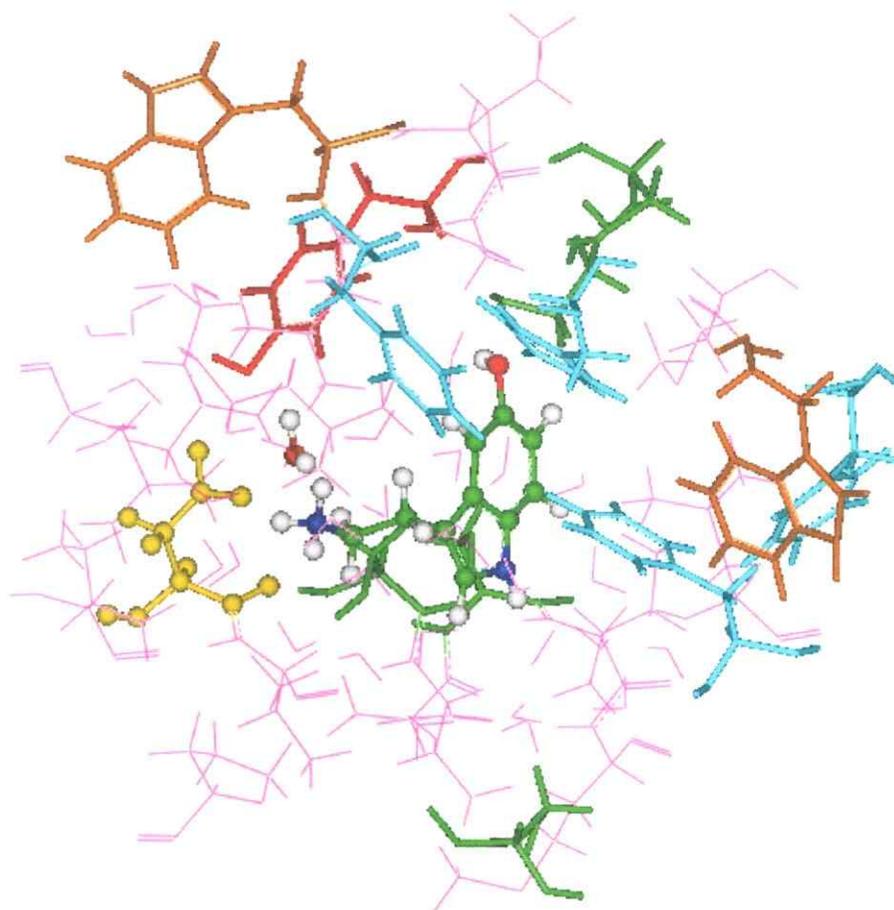


Figura III.6a Imagen del sitio activo en el receptor 5-HT_{2A} con 5-HT (coloreada en verde) adosada (obtenida del proceso de "docking") en el sitio. El residuo Asp¹⁵⁵ está colorado en amarillo; los residuos de Phe están coloreados en celeste, el residuo Trp³³⁶ en naranja, y los residuos de Ser están coloreados en verde.

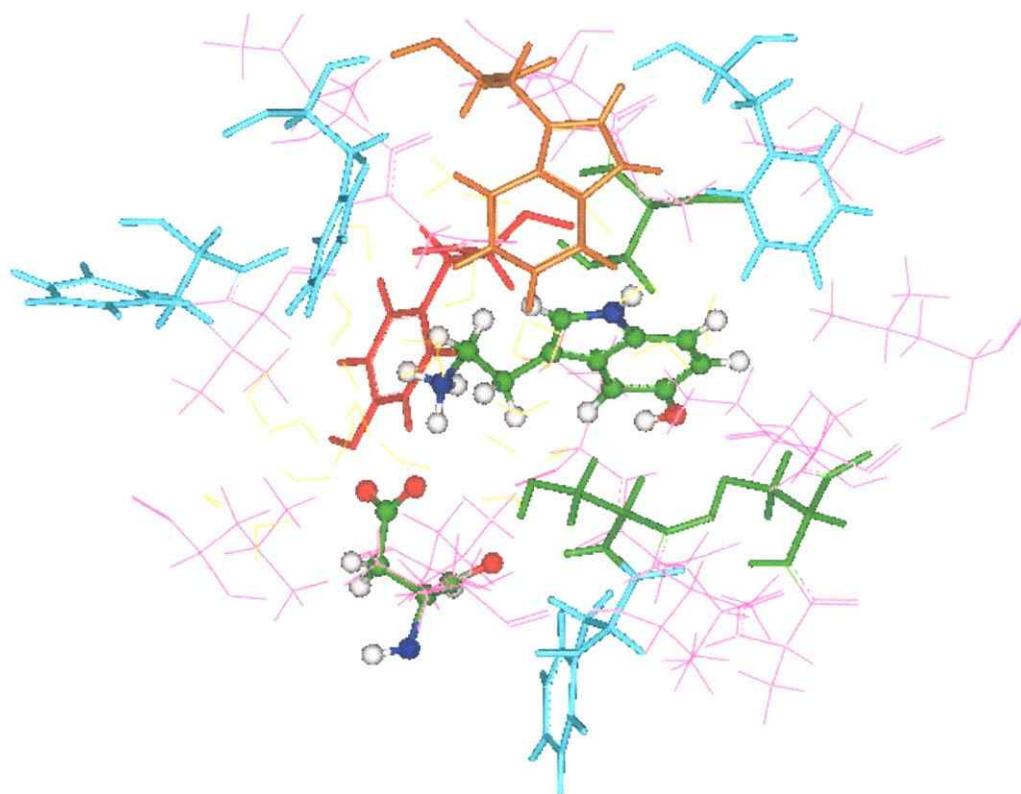


Figura III.6b Imagen del sitio activo en el receptor 5-HT_{2c} con 5-HT (coloreada en verde) adosada (obtenida del proceso de "docking") en el sitio. El residuo Asp¹³⁴ está coloreado por átomo; los residuos de Phe están coloreados en celeste, el residuo Trp³²⁴ en naranja, y los residuos de Ser están coloreados en verde.

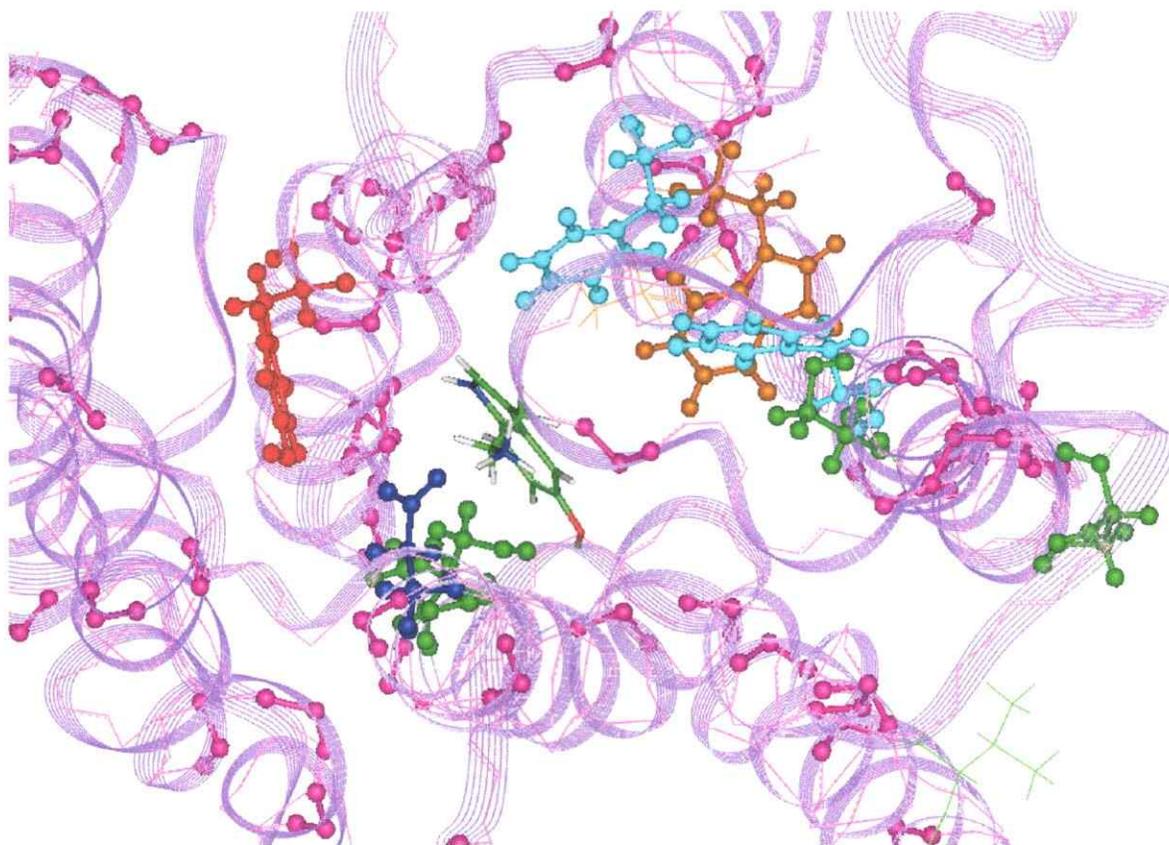


Figura III.7 En el receptor 5-HT_{2A}, la posición del residuo Asp¹⁵⁵ en la hélice III (residuo coloreado en azul) y el residuo de Ser²³⁹ (coloreado en verde) junto con otros residuos de Ser determinan la posición del ligando en el sitio de unión. El residuo de Phe³⁴⁰ (coloreado en celeste) junto con otros residuos aromáticos como el residuo de Trp³³⁶ (coloreado en anaranjado) muestran elementos del cluster aromático.

El bolsillo lipofílico. En la literatura se ha descrito que diversos ligandos que tienen sustituyentes halogenados tales como DOB o DOI actúan como agonistas con alta afinidad en los receptores 5-HT₂ [21]. Nuevos estudios indican, además, que los derivados de fenilisopropilaminas con sustitución 2,5-dimetoxi- con grupos aromáticos o cadenas alifáticas (de cadena corta o larga) en la posición *para*- aumentan la afinidad por los receptores 5-HT₂. Sin embargo, estos estudios no hacen referencia a la eficacia de estos compuestos [22]. Las ergolinas como el LSD o 2-Br-LSD, que poseen dos cadenas N-etiladas, mantienen uno de ellas

localizada entre las hélices III y VII, cerca del residuo Val³⁶⁶ en los receptores 5-HT_{2A} (Val³⁵⁴ en los receptores 5-HT_{2C}), cuya interacción parece ser óptima y puede contribuir a la alta afinidad que presenta este ligando por estos receptores.

Además, los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} conservan en la posición 120 un residuo Ser¹⁵⁹ en 5-HT_{2A} (Ser¹³⁸ en 5-HT_{2C}), que queda convenientemente situado para una interacción con el nitrógeno básico de los ligandos, no formando un puente de hidrógeno, pero si creando un ambiente polar que puede estabilizar las formas cargadas.

La presencia de un grupo metilo en posición α con respecto a la función amina en las fenilisopropilaminas, no aumenta su afinidad *in vitro* por el receptor de 5-HT, pero si ocasiona un aumento de la potencia y duración de la acción *in vivo*. Se ha especulado que esto pueda deberse en parte a una mayor estabilidad metabólica, pero trabajos recientes muestran que la presencia del grupo α -metilo está asociada con una mayor eficacia intrínseca en ambos receptores [23]. En el modelo de receptor 5-HT_{2A}, este grupo alquilo se encuentra rodeado por los residuos de Leu¹²³, Ser¹⁵⁹, Ser¹⁶², Val³⁶⁶ los cuales también están presentes en el receptor 5-HT_{2C}.

Existe un gran número de residuos en los modelos que están en contacto con el anillo aromático al igual que en el caso del anillo indólico en 5-HT, en el receptor 5-HT_{2A} por ejemplo los residuos aromáticos Phe³⁴⁰, Trp³³⁶, Ser¹⁵⁹, Ser¹⁶², Ile¹⁶³, Ser³⁷³, Leu¹²³.

La sustitución por grupos alquilos en el átomo de nitrógeno disminuye la afinidad de agonistas por ambos receptores: mientras la afinidad de DOB en el receptor 5-HT_{2A} tiene una constante de disociación $K_i = 0.6$ nM y $K_i = 1.3$ nM en el receptor 5-HT_{2C}, la adición de una cadena n-propilo, disminuye la afinidad a $K_i = 88.5$ nM en el receptor 5-HT_{2A} y a $K_i = 514$ nM en el receptor 5-HT_{2C}. Más aún, al cuaternizar el centro básico con grupos metilo, la afinidad pierde casi toda la relevancia farmacológica: obteniéndose una constante de disociación para el receptor 5-HT_{2A} de $K_i = 2155$ nM y de $K_i = 6298$ nM para 5-HT_{2C} [22].

Estas moléculas presentan una baja afinidad y no se ha discutido en la literatura la eficacia que presentan; sin embargo, según Höltje y col. [24] los sitios de enlace para agonistas y antagonistas parecen superponerse parcialmente lo que podría indicar que estas moléculas ocupan áreas de antagonismo o tener una interacción con los residuos que están involucrados en el enlace de antagonistas.

El hecho que los modelos no necesiten ser muy precisos para explicar los datos SAR, se confirma con estudios en otros modelos descritos en literatura [25-27]. Aunque se sigan otros procedimientos en la modelación de receptores u otras alineaciones de secuencias sean hechas, la mayoría de los patrones de residuos conservados en todos los GPCRs son los residuos propuestos en el sitio de unión para los diferentes modelos. Por ejemplo, los residuos Asp, Trp, Phe, y Ser aquí descritos son reconocidos por todos los modelos anteriores.

III.10 Conclusiones

El análisis de las energías involucradas en las estructuras minimizadas obtenidas a través del proceso de "docking", muestra un buen acuerdo con los resultados experimentales descritos en la literatura. La interacción con mayor relevancia observada es aquella del grupo amonio de los ligandos con el residuo de Asp¹⁵⁵ del receptor 5-HT_{2A} (Asp¹³⁴ del receptor 5-HT_{2C}), la cual es de carácter electrostático. Para los residuos que interactúan con los ligandos en el sitio de unión, también existe un buen acuerdo, aunque con una contribución menor a la energía. Las interacciones de largo alcance son las predominantes a la energía de interacción de los residuos vecinos al anillo indólico de 5-HT, al anillo aromático de 1-(2,5-dimetoxi-4-X-fenil)-2-aminopropanos (X= -Br, -NO₂, -CN) o el anillo de la ergolina en el caso del LSD o 2-Br-LSD. Cabe destacar, que a pesar de que ambos receptores de 5-HT tienen residuos conservados en las mismas posiciones, la contribución a la energía de interacción de éstos es distinta, lo que podría dar cuenta de las diferencias en las afinidades presentadas por los ligandos, las cuales a pesar de ser distintas mantienen una tendencia paralela en ambos receptores [22].

La inclusión de moléculas de agua en las simulaciones es de importancia también, ya que éstas también aportan a la energía de unión ligando-receptor. La magnitud de la energía de interacción de las moléculas de agua cercanas que forman puentes de hidrógeno con los ligandos es similar a la de los residuos que están cercanos al ligando. De esta manera, la inclusión de varias moléculas de agua en el sitio, puede ser de importancia para las simulaciones del sitio de unión en los complejos ligando-receptor. Cabe destacar que aunque las moléculas de agua no son parte de la secuencia de aminoácidos para estos receptores, estas moléculas pueden considerarse como residuos "introducidos" en el sentido que mantienen la integridad del

sitio de unión. La minimización permite la reorientación de los átomos de hidrógeno de las moléculas de agua, tal que los requerimientos de enlace por hidrógeno son satisfechos para obtener complejos moleculares de energía mínima.

A pesar de las limitaciones en los procedimientos de construcción, los modelos para receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} entregan resultados que están en buen acuerdo con los datos experimentales disponibles de afinidad y selectividad para agonistas. Estos modelos integran y evalúan la información obtenida de varios modelos postulados anteriormente, y por lo tanto constituyen una extensión y refinamiento de ellos mismos. Muestran que en el enlace de agonistas, a pesar de ser estructuralmente parecidos, a veces basta con el reemplazo de un grupo (i.e un átomo de halógeno por un grupo polar) para cambiar la afinidad. Por tanto, el "docking" de ligandos no debe tomar en consideración sólo la estructura sino también las características funcionales de los ligandos.

III.11 Referencias

1. D. Zhang, H. Weinstein, *J. Med. Chem.*, **36**, 934-938 (1993).
2. D. R. Garmer, *J. Biol. Struct. Dyn.*, **5**, 525-547 (1997).
3. T. Schwartz, *Curr. Op. Biotech.*, **5**, 434-444 (1994).
4. P. A. Pierce, J. Y. Kim, S. J. Peroutka, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **346**, 4-11 (1992).
5. M. R. Seggel, M.Y. Yousif, R.A. Lyon, M. Titeler, B. Roth, E. A. Suba, R.A: Glennon, *J. Med. Chem.*, **33**, 1032-1036 (1990).
6. Insight II, *Molecular Simulations Inc.*, San Diego, USA.
7. P. Dauber-Osguthorpe, V.A. Roberts, D. J. Osguthorpe, J. Wolf, M. Genest, A. T. Hagler, *Prot. Struct. Func. Gen.*, **4**, 31-40 (1988).
8. E. J. Lloyd, P. R. Andrews, *J. Med. Chem.*, **29**, 453-462 (1986).
9. M.F. Hibert, S. Trumpp-Kallmeyer, A. Bruinvels, J. Hoflack, *Mol. Pharmacol.*, **40**, 8-15 (1991).
10. K. Kristiansen, W. K. Kroeze, D. L. Willins, E. I. Gelber, J. E. Savage, R. A. Glennon, B. L. Roth, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **293**, 735-746 (2001).
11. C.D. Strader, I.S. Sigal, M.R. Candelore, E. Rands, W. S. Hioll, R.A. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 4384-4388 (1987).
12. N. Almaula, B. J. Ebersole, D. Zhang, H. Weinstein, S. C. Sealfon, *J. Biol. Chem.*, **25**, 14672-14675 (1996).
13. E. Zifa, G. Fillion, *Pharmacol. Rev.*, **40**, 401-408 (1992).
14. Pazos, D. Hoyer, J. M. Palacios, *Eur. J. Pharmacol.*, **106**, 531-538 (1984)..
15. M.F. Hibert, S. Trumpp-Kallmeyer, A. Bruinels, J. Hoflack, *Mol.Pharmacol.*, **40**, 8-15 (1991).
16. D.E. Nichols, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **24**, 335-340 (1986).
17. O. Edvarsen, I. S. Sylte, S. G. Dahl, *Mol. Brain Res.*, **14**, 166-178 (1992).
18. D. Zhang, H. Weinstein, *J. Med. Chem.*, **7**, 934-938 (1993).
19. K. Kristiansen, S. G. Dahl, *Eur. J. Pharmacol.*, **306**, 195-210 (1996).

20. G. Wishart, D.H. Bremner, K. R. Sturrock, *Receptors and Channels*, **6**, 317-355 (1999).
21. R.A. Glennon, M. R. Seggel, W. Soine, K. H. Davies, R. A. Lyon, M. Titeler, *J. Med. Chem.*, **31**, 5-7 (1988).
22. D.L. Nelson, V.L. Lucaites, D.B. Wainscott, R.A. Glennon, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **359**, 1-6 (1999).
23. C. Acuña-Castillo, C. Villalobos, P. R. Moya, P. Sáez, B. K. Cassels, J. P. Hidobro-Toro, *Br. J. Pharmacol.*, in press (2002).
24. H.D Hölftje, U.K Jendretzki, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **328**, 577-584 (1995).
25. K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **289**, 739-745 (2000).
26. M. F. Hibert, S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoflack, A. Bruinvels, *Trends Pharmacol. Sci.*, **14**, 7-12 (1993).
27. R. B. Westkamper, R. A Glennon, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **40**, 1019-1031 (1991).
28. I. T. Forbes, S. Dabbs, D. M. Duckworth, P. Ham, G. E. Jones, F. D. King, D. V. Saunders, F. E. Blaney, C. B. Naylor, G. S. Baxter, T. P. Blackburn, G. A. Kennett, M. D. Wood., *J. Med. Chem.*, **39**, 4966-4977 (1996).

Capítulo IV. Modelos para la reproducción de los efectos del medio en la interacción entre receptores de 5-HT y sus ligandos.

IV.1 Resumen

El trabajo químico cuántico se centró en la descripción de la superficie de energía potencial de ligandos serotoninérgicos y en un estudio sistemático de la interacción ligando-aspartato vía enlace hidrógeno.

En la primera parte se presentan los análisis conformacionales a nivel AM1 de algunos ligandos, incluyendo la racionalización de espectros de RMN de ^1H .

En la segunda parte se presentan resultados *ab initio* a nivel 3-21g y 6-31g(d) para la descripción de la interacción ligando serotoninérgico – ácido fórmico, utilizado como modelo del aspartato de los receptores 5HT_{2A} y 5HT_{2C}.

Se estudió también el efecto de campos eléctricos en la interacción ligando – receptor. Estos campos pueden ser creados por otros residuos o por moléculas de agua estructurales en el entorno del sitio de unión.

Se examinaron descriptores moleculares de la basicidad de aminas y demostramos que la aproximación de core rígido no es aplicable a sistemas cuyo HOMO pertenezca al sistema π y el grupo amino al sistema σ . En este capítulo proponemos que dichos descriptores sean medidos en el orbital molecular que representa al par electrónico libre sobre el átomo de nitrógeno del grupo amino.

Finalmente proponemos que el valor propio de la energía del orbital molecular anteriormente mencionado constituye un descriptor molecular de la basicidad de aminas en general y en particular para los ligandos serotoninérgicos, aplicable a sistemas aislados y condensados.

IV.2 Metodología

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron métodos *ab initio* HF/3-21g, HF/6-31g(d) [1] y semiempíricos: AM1 (Austin Model 1) [2]; este último utiliza un hamiltoniano del tipo MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap) [3]. Además para describir el efecto de la polaridad del solvente en la estructura electrónica de las especies protonadas y en la función de potencial de transferencia protónica en solución acuosa, se utilizó el modelo de campo de reacción (RF), en la versión de solvente continuo implementado en la metodología CNDO/2 [4] y AMSOL [5]. También utilizamos el modelo PCM [6] implementado el programa Gaussian 98 [7] y AMPAC 2.1 [8]. Una descripción más detallada de estas metodologías se encuentra en el [Apéndice II](#).

IV.3 Propiedades conformacionales de ligandos de receptores serotoninérgicos

IV.3.1 Análisis conformacional de 5-HT

La estructura conformacional de 5-HT, sin considerar la rotación en torno al enlace C-O, se caracteriza por los tres ángulos diedros (θ_1 , θ_2 , θ_3) de la cadena lateral, como se muestra en la [Figura IV.1](#).

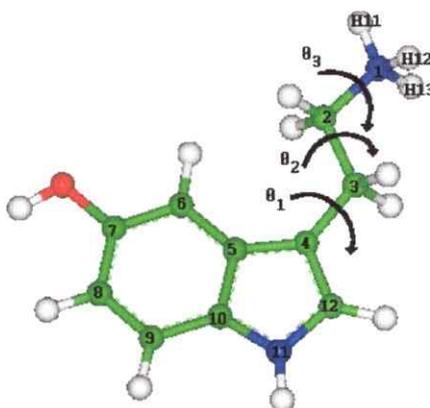


Figura IV.1 Estructura química de 5-HT en su forma protonada y ángulos diedros. θ_1 : C5-C4-C3-C2; θ_2 : C4-C3-C2-N1; θ_3 : C3-C2-N1-H11.

A través de estudios teóricos y experimentales se ha encontrado que 5-HT puede existir en varias conformaciones de baja energía [9-14]. Con el propósito de probar la validez de la metodología AM1 [2] en la descripción de la superficie de energía potencial (SEP) de 5-HT y compuestos relacionados, se calcularon cortes de ella correspondientes a la rotación de la cadena alquilamínica alrededor de los ángulos diedros θ_1 y θ_2 . Los cálculos se realizaron variando cada ángulo en pasos de 10° y optimizando la geometría para cada paso. Los resultados se muestran en la Figura IV.2.

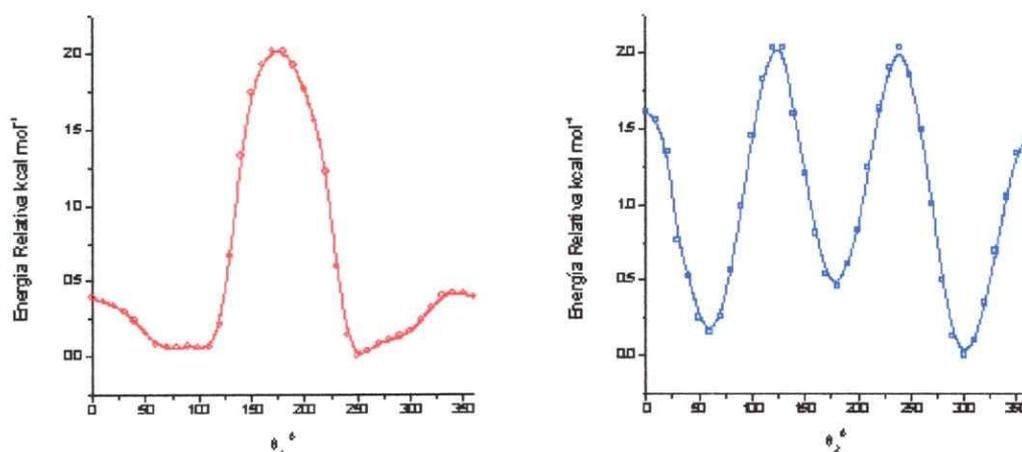


Figura IV.2 a) Función potencial de torsión de 5-HT vs. ángulo diedro θ_1 b) Función potencial de torsión de 5-HT vs ángulo diedro θ_2 .

En la base libre la cadena lateral prefiere orientaciones casi perpendiculares con respecto al plano del anillo heterocíclico, $\theta_1 = 90^\circ$ (Figura IV.2a) con una barrera de rotación que no supera las 2 kcal mol⁻¹. La rotación del ángulo diedro θ_2 deja ligeramente favorecidas las conformaciones que tienen una relación *gauche* ($\theta_2 = 60^\circ, 300^\circ$) entre el átomo de nitrógeno y el anillo heterocíclico respecto de la conformación que tiene el átomo de nitrógeno en posición *trans* a éste anillo. Los resultados muestran acuerdo con estudios anteriores. En efecto, Pullman y col. [11] reportaron que tanto los conformeros anti y *gauche* (θ_2) están presentes en solución acuosa. Partington y col. [12] confirmaron estos informes a través de estudios experimentales de RMN, los cuales

indicaron que la energía de la estructura gauche es sólo $0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ más alta que la energía del conformero anti. Edvarsen y col. [13] estudiaron la estructura conformacional y electrónica de 5-HT en su forma protonada a través de cálculos de mecánica cuántica con base mínima STO-3g y simulaciones de dinámica molecular en el vacío y en solución acuosa. En las simulaciones hechas en solución acuosa ambos conformeros gauche y anti fueron observados pero sólo el conformero gauche fue obtenido en el vacío; sin embargo, minimizaciones posteriores de estas estructuras demostraron que los conformeros gauche eran de menor energía tanto en el vacío como en solución acuosa.

Las conformaciones obtenidas también están de acuerdo con las que observaron Edvarsen y col. [13] en fase acuosa y que han sido postuladas por Nichols y col. [14] en la interacción con los receptores de 5-HT. Las bajas barreras conformacionales indican que a temperaturas fisiológicas 5-HT fluctúa entre diferentes conformaciones a medida que se aproxima al receptor. La flexibilidad de las moléculas de neurotransmisores apoya la hipótesis que sus conformaciones pueden ser influidas por el campo eléctrico local del sitio de unión [14].

IV.3.2 Análisis conformacional de DOB

Andrews y Lloyd [15] estudiaron con metodologías propias de dos décadas atrás, la estructura conformacional y la actividad biológica de moléculas que presentan actividad en el sistema nervioso central (SNC) y coinciden en la flexibilidad presentada por los ángulos de torsión θ_1 y θ_2 de la cadena alquilamínica en derivados metoxilados de fenilisopropilamina. Las tres conformaciones presentadas en la Figura IV.3 serían las más favorecidas.

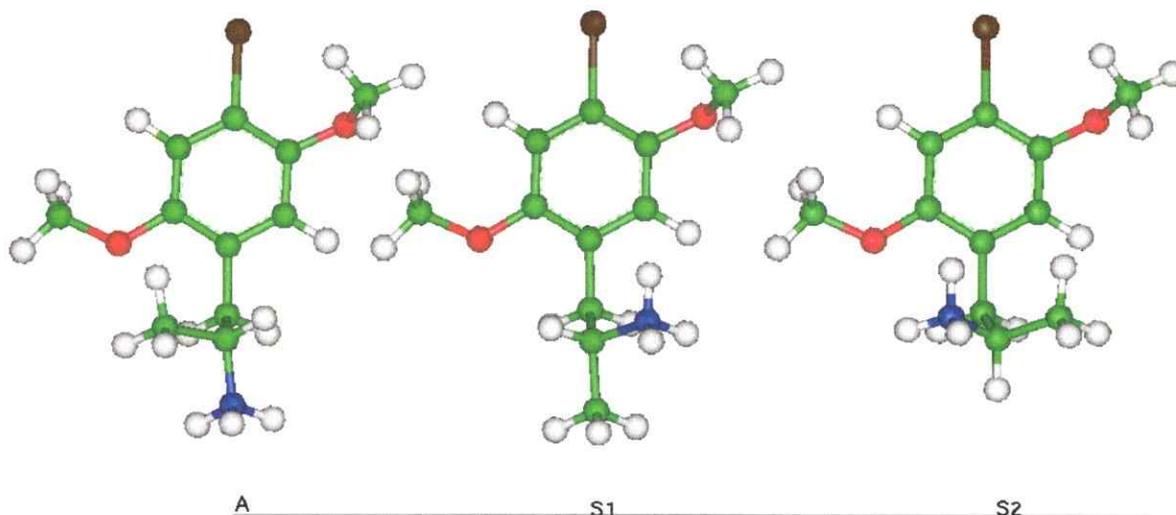


Figura IV.3 Las tres conformaciones estrelladas preferidas en fenilisopropilaminas; A (*anti*), S1 (*gauche*) S2 (*gauche*); molécula DOB.

Siguiendo la metodología anterior, se calcularon cortes a la SEP correspondientes a la rotación de la molécula alrededor de los ángulos θ_1 y θ_2 ; los resultados se muestran en la Figura IV.4a y b; estos muestran una flexibilidad considerable alrededor de los ángulos diedros θ_1 y θ_2 con las conformaciones preferidas mostradas en la Figura IV.3.

Los resultados son acordes con estudios reportados en literatura. Por ejemplo, los datos cristalográficos de rayos X publicados [16,17] junto con cálculos mecano-cuánticos [18-20] favorecen la posición de los dos primeros carbonos de la cadena isopropilamínica perpendicular al plano del anillo aromático ($\theta_1 = \pm 90^\circ$). Tanto las conformaciones antiperiplanar (A Figura IV.3) y gauche (S1 Figura IV.3) han sido observadas en las estructuras cristalinas de anfetamina, y las pequeñas diferencias de energía entre estos rotámeros han sido confirmadas por estudios experimentales de RMN [21-23] y cálculos mecano-cuánticos [18-20]. En el estado sólido, el derivado trimetoxilado 3,4,5-trimetoxifenilisopropilamina (TMA) adopta la conformación gauche [23] (conformación S1 de la Figura IV.3). Los cálculos de energía potencial usando el hamiltoniano AM1 confirman que las conformaciones donde los ángulos diedros toman valores tales como $\theta_1 = \pm 90^\circ$ y $\theta_2 = \pm 60^\circ$ y 180° son conformaciones de mínima energía y que las barreras entre ellas son relativamente bajas (ver Figuras IV.4a y IV.4b), de acuerdo con cálculos INDO

presenta las mismas variables conformacionales en la cadena lateral (θ_1 , θ_2 y θ_3) de 5-HT y las fenilisopropilaminas discutidas más arriba.

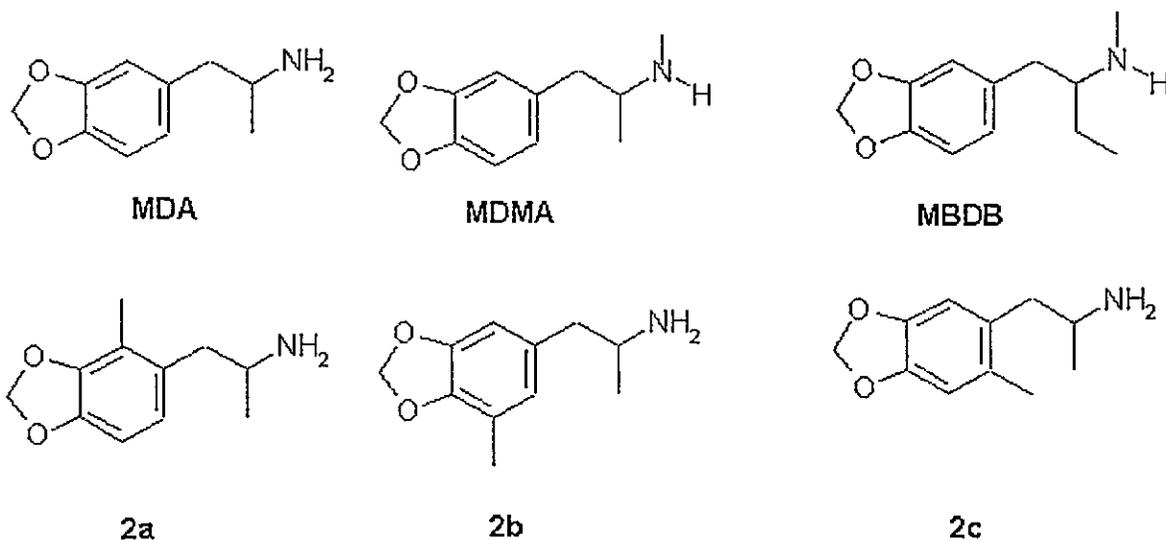


Figura IV.5 Ejemplos de ligandos del transportador de 5-HT estudiados por Nichols y col. con estructuras derivadas de fenilisopropilaminas.

A través de un estudio experimental, se sintetizó y se registró el espectro de RMN de ^1H del clorhidrato de MDMA en D_2O y de su base libre y trifluoroacetato en CDCl_3 (Tabla IV.1). Los resultados obtenidos fueron interpretados sobre la base de cálculos semiempíricos AM1 [2] y AMSOL [5]. Como discutimos anteriormente, en la base libre la cadena lateral prefiere una orientación casi perpendicular al plano del anillo aromático, estando ligeramente favorecida una relación *trans* (A Figura IV.6) entre el átomo de nitrógeno y el anillo con respecto a la conformación que tiene el nitrógeno *gauche* y el metilo *trans* (S1 Figura IV.6), pero la barrera energética que separa estas formas es muy baja. Como se puede apreciar en las Figuras IV.7a y IV.7b.

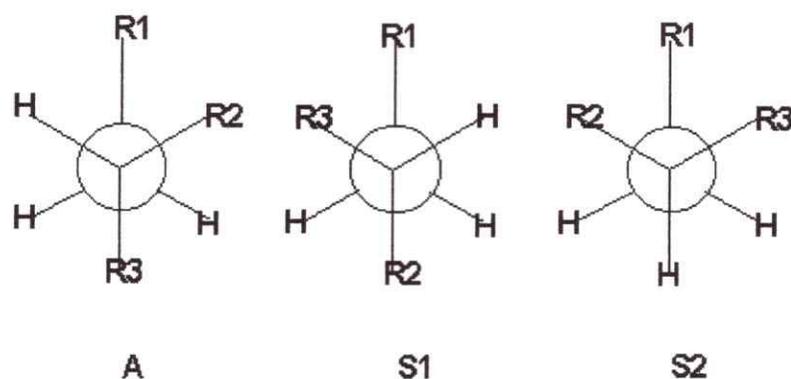


Figura IV.6 Conformaciones preferidas de MDMA. A significa conformación anti, S1 y S2 son ambas conformaciones gauche.

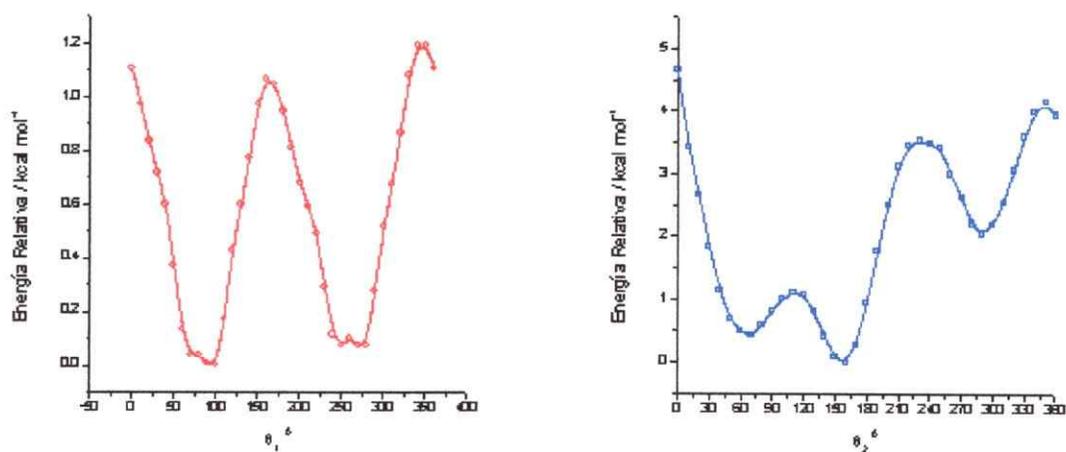


Figura IV.7 a) Función de energía potencial de torsión de MDMA vs ángulo diedro θ_1 b) Función de energía potencial de torsión de MDMA vs ángulo diedro θ_2 .

Tabla IV.1 Desplazamientos químicos de ^1H y constantes de acoplamiento vecinales de protones de la cadena^a y distribución de conformeros^b de MDMA libre y protonado.

Compuesto	solvente	corrimiento químico (ppm) ^b			Constantes de acoplamiento vecinal (Hz) ^c		Distribución de conformeros ^d		
		H _A	H _B	H _C	J _{AB}	J _{BC}	A	S ₁	S ₂
Base libre	CDCl ₃	2.56	2.58	2.72	8.4	6.0	0.59 ^d	0.34 ^d	0.07 ^d
Clorhidrato	D ₂ O	2.83	3.02	3.5	8.4	6.0	0.64 ^e	0.36 ^e	0.00 ^e
Trifluoroacetato	CDCl ₃	2.66	3.14	3.26	11.9	4.2	1.00 ^f	0.00 ^f	0.00 ^f

a) los espectros de RMN de ^1H fueron obtenidos a 300 MHz usando soluciones 0.1 M: T 298 K

b) relativo a TMS (CDCl₃) o sal de sodio de TMSPA-*d*₄ (D₂O)

c) calculados a partir de simulaciones de espectro ABC

d) calculado suponiendo $J_g=2.8$ Hz y $J_t=12.3$ Hz.

e) calculado suponiendo $J_g=2.6$ Hz y $J_t=11.7$ Hz.

f) calculado suponiendo $J_g=2.4$ Hz y $J_t=11.9$ Hz.

IV.4 Basicidad y descriptores moleculares en el vacío

El enlace por hidrógeno y la transferencia protónica han sido objetos de atención creciente debido a su importancia en muchas reacciones químicas y procesos biológicos. Varias metodologías *ab initio* tales como cálculos a nivel Hartree-Fock y cálculos usando la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) han sido reportados en la literatura científica [31-43].

El enlace por hidrógeno y la transferencia protónica tienen especial interés en el sistema serotoninérgico debido a que los datos experimentales demuestran que la interacción vía enlace de hidrógeno está siempre presente. En efecto, éstos señalan que 5-HT y todos los ligandos serotoninérgicos poseen en común un grupo amino, el cual para 5-HT se encuentra protonado a

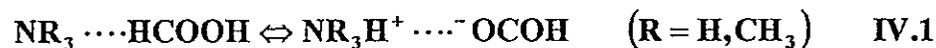
pH fisiológico como fue demostrado por Hiromu y Tadashi en 1976 [44] y que en el sitio de unión de ligandos en ambos receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} existe un residuo Asp (Asp¹⁵⁵ en el receptor 5-HT_{2A} y Asp¹³⁴ en el 5-HT_{2C}) conservado, el cual se supone en su forma básica (desprotonado). más aún, la constante de disociación determinada experimentalmente (K_i , constante de afinidad) es una constante de equilibrio [45] entre el ligando y el receptor, la cual necesariamente contiene al residuo Asp y eventualmente otros residuos que pueden interactuar con el ligando. La interacción más importante es aquella entre el grupo amonio del neurotransmisor y el carboxilato del Asp, como fue demostrado en el Capítulo III.

Desde un punto de vista de la química cuántica, la interacción neurotransmisor-receptor, contiene una cantidad de variables tal, que para ser estudiadas deben controlarse correctamente. En el ámbito de esta tesis nos abocamos a estudiar sólo la interacción neurotransmisor-aspartato.

IV.4.1 Estado gaseoso

En la transferencia protónica, la posición del equilibrio está determinada por la relativa basicidad de las bases que compiten por el protón.

Con el propósito de buscar parámetros que describan y cuantifiquen en escala relativa la basicidad de aminas, se eligió como sistema modelo, el conjunto de las metilaminas y su interacción con el ácido fórmico ilustrada por la ecuación IV.1:



En este sistema, la diferencia de basicidad es controlada por la diferencia de afinidad protónica, ΔPA , entre las bases, la cual está definida como el valor negativo de la entalpía de protonación de la base, B^- , de acuerdo a la ecuación IV.2



En nuestro sistema definimos la diferencia de PA, ΔPA como (ecuación IV.3)

$$\Delta PA = PA(HCOO^-) - PA(NR_3) \quad IV.3$$

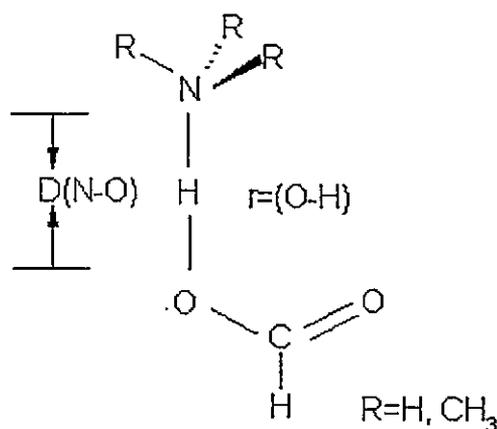


Figura IV.8. Definición de los parámetros geométricos para los complejos $NR_3 \cdots HCOOH$

Los resultados experimentales muestran que, en estado gaseoso, la basicidad de las metilaminas es $NH_3 < NH_2CH_3 < NH(CH_3)_2 < N(CH_3)_3$ [46].

El complejo enlazado que se muestra en la Figura IV.8 fue construido al nivel HF/6-31G(d) de teoría, fijando la distancia internuclear N-O en 3.0 Å. La Figura IV.9 muestra el grado de precisión del cálculo y los resultados experimentales [47] y calculados.

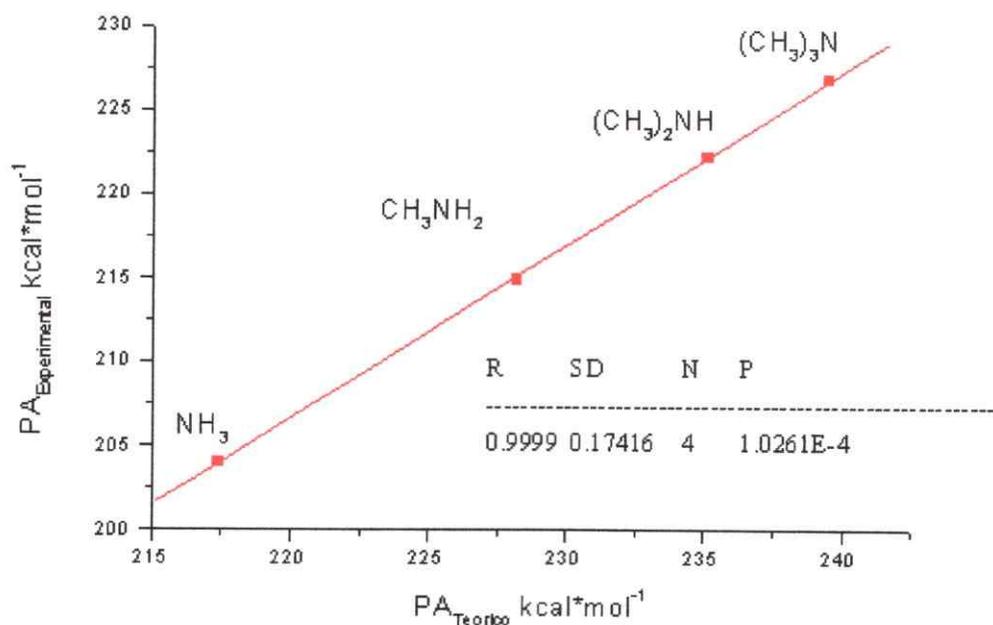


Figura IV.9 Comparación entre la afinidad protónica experimental y teórica [HF/6-31G(d)]. Los datos experimentales han sido tomados desde la referencia [48]; R = coeficiente de regresión, DS = desviación estandar, N = número de puntos, y P = probabilidad que la correlación observada es obtenida al azar.

Los cambios en la diferencia de afinidad protónica son explicados sobre la base de los efectos electrónicos de los sustituyentes.

El efecto de los sustituyentes fue racionalizado utilizando parámetros derivados de la DFT como son la función de Fukui, la dureza y blandura local del centro básico definidas en el Apéndice II; los resultados se muestran en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2 Afinidad protónica (PA), Diferencia en afinidad protónica (ΔPA), transferencia de carga (ΔN). Propiedades de sitio en el átomo de nitrógeno para complejos neutros, función de Fukui f_N , blandura local (eV)⁻¹ y dureza local (eV) para la serie de metilaminas a nivel HF/6-31g(d).

B---H---A	A	ΔPA kcalmol ⁻¹	ΔN (unidades electrónicas)	F_N	s_N (eV) ⁻¹	η_N (eV)	E HOMO
NH ₃ ---H---COH	17.4	146.3	0.8136	0.6178	0.0864	5.8	-0.46087
NH ₂ CH ₃ ---H---COH	25.9	137.9	0.7197	0.4999	0.08	6.3	-0.41356
NH(CH ₃) ₂ ---H---COH	35.2	128.6	0.5832	0.4042	0.0687	7.3	-0.38998
N(CH ₃) ₃ ---H---COH	39.5	124.2	0.4198	0.3631	0.0586	9.8	-0.37266
HCOOH	363.8						

Asociada a la transferencia protónica, se produce una transferencia de carga en la dirección opuesta al movimiento del protón [49]. Mientras que la primera está descrita por PA, la transferencia de carga está representada por ΔN , ambas ilustradas en la Tabla IV.2. Además, a partir de los valores de f_N , se puede observar que un aumento de la afinidad protónica induce una disminución en ΔPA y a su vez resulta en una disminución en la función de Fukui absoluta en el centro básico nitrógeno. Debido a que la magnitud de la función de Fukui es una blandura normalizada, se espera que una disminución en su magnitud conlleve una disminución en la blandura local. Una disminución de la blandura local puede asociarse con un aumento en la dureza local en el sitio básico. Ya que el protón es el ácido más duro, entonces la mayor basicidad debe corresponder a la base que presenta mayor dureza.

Un aspecto relevante a los propósitos de esta tesis es que si bien la función de Fukui nucleofílica aplicada al átomo de nitrógeno está definida en el ámbito de la Teoría de las

Funcionales de la Densidad (DFT), la evaluación de ella se realiza en el HOMO obtenido de la aplicación de la teoría de Hartree-Fock-Roothan y su expresión analítica corresponde a la carga sobre el átomo de nitrógeno en el HOMO (ver Apéndice III). Siguiendo un análisis estrictamente Hartree-Fock (HF), una desestabilización del orbital molecular centrado en el par electrónico libre del átomo de nitrógeno, debería implicar un aumento de su reactividad como base, o de su basicidad. En el caso de las metilaminas/ácido fórmico, este corresponde al HOMO -2 para el amoníaco y al HOMO para el resto de las metilaminas. La última columna de la Tabla IV.2 registra el valor propio de la energía del orbital molecular correspondiente para las metilaminas. Nótese que al aumentar el número de metilos, aumenta la desestabilización del orbital molecular, concomitantemente con la basicidad.

Debido a que la afinidad protónica del formiato es mayor que la de las metilaminas, entonces, mientras menor sea la diferencia entre estas dos afinidades protónicas, mayor es la posibilidad de encontrar un equilibrio entre los dos tautómeros.

En conclusión, la función de onda HF/6-31g(d) muestra un alto grado de precisión, en la predicción de la afinidad protónica en estado gaseoso calculada a nivel HF/6-31g(d), al menos para la serie de metilaminas. Además, los descriptores calculados se muestran como una buena herramienta para predecir basicidades relativas de los sistemas estudiados y para dar cuenta de los cambios electrónicos involucrados en la transferencia protónica.

IV.4.2 Efecto de la polaridad del solvente en la basicidad de los sistemas modelo

Se realizaron cálculos CNDO2/RF [4] y *ab initio* HF/6-31g(d)/PCM [6] en el sistema para explicar la conocida inversión del orden de basicidades de las metilaminas en solución acuosa. Los resultados muestran que el patrón de enlace por hidrógeno se explica por efectos de solvatación electrostática y no electrostática de las especies zwitteriónica y neutra en equilibrio. En este caso la función de Fukui f_N^- utilizada en el vacío no es aplicable en solución, la energía del orbital molecular (OM) centrado en el par electrónico del N si da cuenta del aumento de basicidad como lo muestra la Tabla IV.3.

Tabla IV.3 Energías de OM (E_{OM}) para la formas Neutra y Zwitteriónica para sistema modelo obtenidos para diferentes ctes. dieléctricas (ϵ) a nivel ab initio HF/6-31g(d)/PCM.

ϵ	E_{OM}	
	Neutra	Zwitter
0.00	-0.46123	-0.38062
1.92	-0.45970	-0.39405
8.93	-0.43968	-0.40870
24.5	-0.43637	-0.42598
38.5	-0.43618	-0.42671
78.4	-0.43596	-0.42801

IV.5 Basicidad intrínseca de ligandos serotoninérgicos

Debido a que los resultados de la modelación molecular indicaron que la interacción entre el residuo de Asp y el grupo amino del neurotransmisor era la más importante en la energía de interacción de éste con el receptor y al éxito logrado en los cálculos con el sistema modelo amoniaco/ácido fórmico, calculamos con una función de onda HF/3-21g la afinidad protónica de algunos ligandos serotoninérgicos, ácido aspártico y ácido fórmico en vacío. Las variaciones de afinidad protónica de estas moléculas están dadas respecto del ácido fórmico debido a que éste ha sido tomado como modelo del ácido aspártico en los estudios de esta tesis; sin embargo, los resultados conservan su validez si éstos consideran el ácido aspártico en lugar del ácido fórmico, como se observa en la Tabla IV.4 más adelante.

Para estudiar el efecto de la basicidad de los ligandos en las constantes de afinidad con los receptores, se escogió un conjunto de ligandos cuyas constantes de afinidad hubiesen sido medidas en las mismas condiciones experimentales y que guardaran una estructura similar; esto último para minimizar el efecto de otras interacciones ligando – receptor. El grupo de las fenilisopropilaminas, substituidas en posición -para, cumplían con estos requerimientos [49]. La

importancia del enlace por H queda de manifiesto en las bajísimas constantes de afinidad que presenta la molécula QDOB (1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-2-N,N,N-trimetilamoniopropano) comparado con el DOB (1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenil)-2-aminopropano).

También se calcularon las curvas de transferencia protónica para algunos ligandos y el ácido fórmico a nivel HF/3-21g. Como se esperaba, se obtuvieron curvas con un mínimo global correspondiente a la forma neutra, exhibiendo un hombro en la estructura zwitteriónica; esta última podría ser un mínimo local si se calculara la curva con una mejor función de onda. La Figura IV.9 muestra las curvas de transferencia de protón para las moléculas DOB y LSD respectivamente.

La Tabla IV.4 muestra las diferencias de afinidades protónicas calculadas y las constantes de afinidad descritas en literatura. Se puede apreciar que moléculas como el LSD, DOC, DOI y DOB presentan las más altas afinidades protónicas, son a la vez las moléculas más afines a los receptores dados y 5-HT, la molécula menos afín en esta tabla, presenta la menor PA. Con la excepción del DON, las diferencias en las afinidades protónicas calculadas en sistemas aislados (fase gaseosa) muestran un acuerdo cualitativo con las constantes de afinidad descritas para estos ligandos en sistemas biológicos, destacando la importancia de la interacción ligando – aspartato vía enlace hidrógeno. Nótese que todos los ligandos presentados en la tabla presentan una buena afinidad por los receptores a excepción del QDOB que no presenta enlace por H.

Tabla IV.4 Diferencias en afinidad protónica para ligandos 5-HT; constantes de afinidad de ref. [50] para receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} usando como referencia [¹²⁵I]DOI.

Ligando	PA	ΔPA (HCOOH)	ΔPA (Asp)	K _i (nM) 5-HT _{2A}	K _i (nM) 5-HT _{2C}
DOF	258.1	105.6	111.5	41.7	28.7
DOC	257.3	106.4	112.3	1.4	2
DOB	258.6	105.2	111.0	0.6	1.3
DOI	258.8	104.9	110.7	0.7	2.4
LSD	258.4	105.4	111.2	0.38	5.2
DON	252.4	111.4	117.2	5.5	22.4
5-HT	242.9	120.9	126.7	7.7	15.5
QDOB				2155	6298
HCOOH	363.8				
Asp	369.6				

En los resultados que aparecen en la tabla, $\Delta PA = PA(\text{HCOO}^-) - PA(\text{Ligando})$, mide el cambio de la afinidad protónica entre el formiato y el ligando, correspondiente a la entalpía de la reacción:



Considerando que la constante de afinidad se mide experimentalmente como la constante de disociación del complejo ligando-receptor, entonces la energía de disociación del complejo enlazado por H, constituiría una medida más representativa de la energética del proceso y, por ende, un mejor parámetro para la correlación con la constante de afinidad del complejo receptor-ligando. En la reacción correspondiente a la disociación del complejo:



los productos son las especies neutras, ya que en el vacío éstas son más estables que los iones asociados.

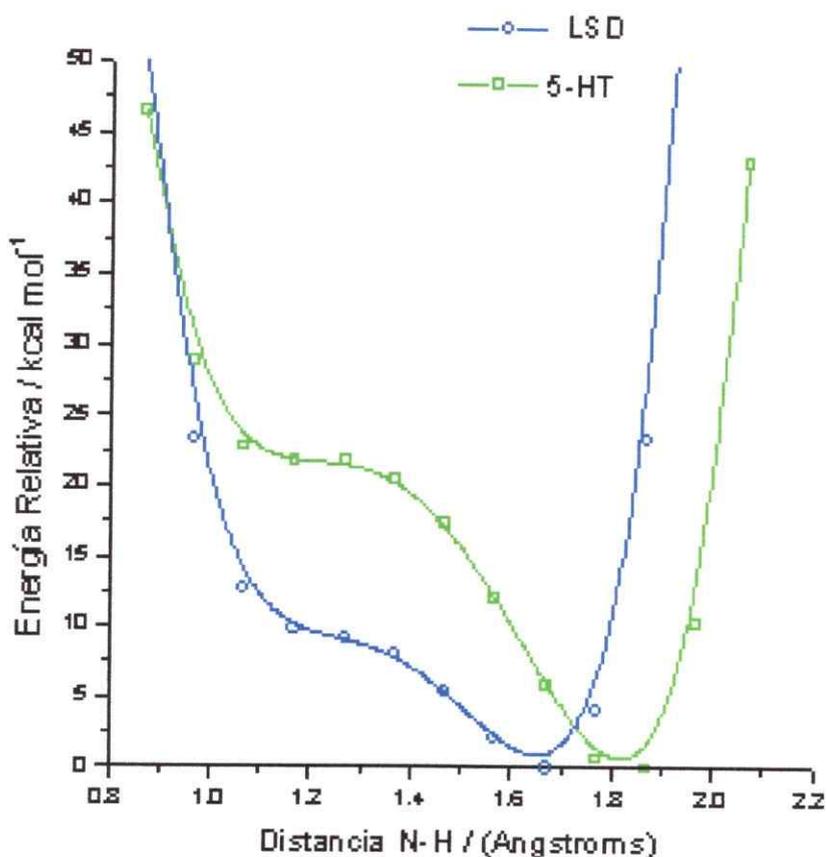


Figura IV.10 Perfiles de transferencia protónica. Ligando-HCOOH: 5-HT (círculos), LSD (cuadrados).

La Tabla IV.5 muestra la energía electrónica total de ligandos 5-HT, HCOOH y del complejo ligando-HCOOH, calculadas a nivel HF/3-21g donde la energía de las especies separadas y neutras fue calculada eliminando los errores de superposición de base. La optimización de la geometría del complejo mostró que el puente por H es lineal para todos los casos, (variando el ángulo N-H-O entre 177° y 180° y una distancia N-O de 2.7 Å).

Tabla IV.5 Energía de enlace obtenida usando error de superposición de base. La segunda columna muestra la energía del complejo (Ligando/HCOOH) en Hartrees. La tercera y cuarta columna son las energías de las moléculas aisladas cada una en presencia de la otra (Hartrees). La quinta columna muestra la energía de enlace (kcal mol^{-1}). Las columnas sexta y séptima muestran las constantes de afinidad medidas para estos ligandos usando como $[^{125}\text{I}]\text{DOI}$ como ligando radioactivo.

Ligando	Complejo (Hartrees)	Ligando Aislado (Hartrees)	Ácido Fórmico (Hartrees)	Energía de Enlace (kcal mol^{-1})	K_i 5-HT _{2A} [nM]	K_i 5-HT _{2C} [nM]
DOF	-913.1	-725.4	-187.7	-17.8	41.7	28.7
DOC	-1271.5	-1083.8	-187.7	-17.7	1.4	2
DOB	-3374.3	-3186.6	-187.7	-20.8	0.6	1.3
DOI	-7702.1	-7514.3	-187.7	-19.7	0.7	2.4

La Tabla IV.5 muestra que para todos los casos, el complejo representa un enlace por H, cuya energía aparece en la quinta columna.

Con el propósito de obtener resultados más confiables de correlación entre la energía de enlace por H y las constantes de afinidad, se muestran los resultados para la familia de moléculas DOX disustituidas con grupos metoxi- en la posición 2,5 del anillo aromático, donde la posición para- del anillo aromático ha sido sustituida con la familia de halógenos F, Cl, Br y I respectivamente, dando los compuestos 1-(4-Fluor-2,5-dimetoxifenil)-2-aminopropano (DOF), 1-(4-Cloro-2,5-dimetoxifenil)-2-aminopropano (DOC), 1-(4-Bromo-2,5-dimetoxifenil)-2-aminopropano (DOB), 1-(4-Yodo-2,5-dimetoxifenil)-3-aminopropano (DOI). Los resultados obtenidos para la familia DOX (X= F, Cl, Br, I) muestran que a medida que aumenta la energía de enlace por H, aumenta la constante de afinidad; en particular los ligandos 5-HT más afines DOB y DOI son los que presentan un enlace por H más fuerte.

IV.6 Descriptores moleculares de la basicidad de agonistas 5-HT

Los resultados de los cálculos de PA y de la energía de enlace por H recién mostrados en la Tabla IV.4 y Tabla IV.5 indican que la basicidad de los compuestos es $DOC < DOF < DOB < DOI$. En concordancia con esto la blandura local medida en el átomo de nitrógeno, s_N , debería disminuir en el mismo orden. Como ya se ha establecido, este parámetro se calcula multiplicando la función de Fukui en el centro de nitrógeno básico, f_N , por la blandura global S . La Tabla IV.6 registra la magnitud de f_N , la blandura global y la blandura local en el átomo de N, S y s_N respectivamente.

Tabla IV.6 *Funciones de Fukui calculadas en los tres últimos orbitales ocupados para la familia DOX (segunda, tercera y cuarta columna), energía del orbital molecular localizado en el átomo N (Hartrees) en la molécula aislada (quinta columna) y cuando está formando un complejo con HCOOH (sexta columna), blandura global de la molécula (séptima columna) y blandura local (octava columna) en eV⁻¹.*

	f_{HOMO}	f_{HOMO-1}	f_{HOMO-2}	E (a.u.) OM localizado sobre N (aislada)	E (a.u.) OM localizado sobre N (complejo)	S (eV) ⁻¹	s_N (eV) ⁻¹
DOF	0.010824	0.248366	0.491163	-0.36338	-0.40068	0.1036389	0.001121788
DOC	0.009998	0.168584	0.563769	-0.36397	-0.40178	0.0923398	0.000921551
DOB	0.004146	0.133498	0.620538	-0.35780	-0.39659	0.0885322	0.000367055
DOI	0.004016	0.038799	0.662277	-0.35381	-0.38896	0.1085623	0.000435986

El acuerdo de la blandura local s_N con la energía de enlace por H calculada (quinta columna Tabla IV.5) y las constantes de afinidad en los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} (sexta y séptima columna de la Tabla IV.5), para la familia DOX es bueno. A continuación se muestra la Tabla IV.7 donde se han incluido otros ligandos. Se puede observar que en general estos resultados correlacionan bien la constante de afinidad con la energía de enlace calculada. Se

observan excepciones especialmente para el DOH; es probable que otras interacciones con fragmentos del sitio den cuenta de la diferencia, ya que esta tesis abarca solo las interacciones vía enlace H.

Tabla IV.7 Ligando (primera columna), energía del complejo formado por ligando-ácido fórmico (segunda columna), considerando el error de superposición de base (BSSE), la energía en Hartrees del ligando en presencia de ácido fórmico (tercera columna), ácido fórmico en presencia del ligando (BSSE) cuarta columna, la energía del enlace en kcal mol⁻¹ (quinta columna), constantes de afinidad de ref. [48] sexta y séptima columna.

Ligando	Complejo (a.u.)	Ligando (a.u.)	Ácido Fórmico (a.u.)	Energía de Enlace (kcal*mol ⁻¹)	K _i 5-HT _{2A} [nM]	K _i 5-HT _{2C} [nM]
5HT	-754.0	-566.2	-187.7	-17.6	7.77	15.5
DOH	-815.0	-627.1	-187.7	-17.9	211	104
DOF	-913.1	-725.4	-187.7	-17.8	41.7	28.7
DOC	-1271.5	-1083.8	-187.7	-17.7	1.4	2
DOB	-3374.3	-3186.6	-187.7	-20.8	0.6	1.3
DOI	-7702.1	-7514.3	-187.7	-19.7	0.7	2.4
DOCN	-906.0	-718.3	-187.7	-17.0	45.7	1011
DON	-1017.1	-829.4	-187.7	-18.7	5.5	22.4

Una inspección de los coeficientes de expansión de la base de orbitales atómicos en los orbitales moleculares más altos ocupados, muestra que el HOMO está localizado en el sistema π , mientras que el HOMO-2 u HOMO-3 está localizado sobre el átomo de nitrógeno, en particular sobre el par electrónico no compartido del nitrógeno. Esto se visualizó por rotación del complejo, ubicando las coordenadas del puente N \cdots H \cdots O sobre el eje Z de coordenadas. Se observó que para este orbital molecular los coeficientes de expansión de la base de orbitales atómicos presentaban sus máximos valores en los orbitales p_z del átomo de N. La [Figura IV.11](#) muestra la superficie de isodensidad para los orbitales HOMO y HOMO-2 de 5-HT, DOB y MDMA.

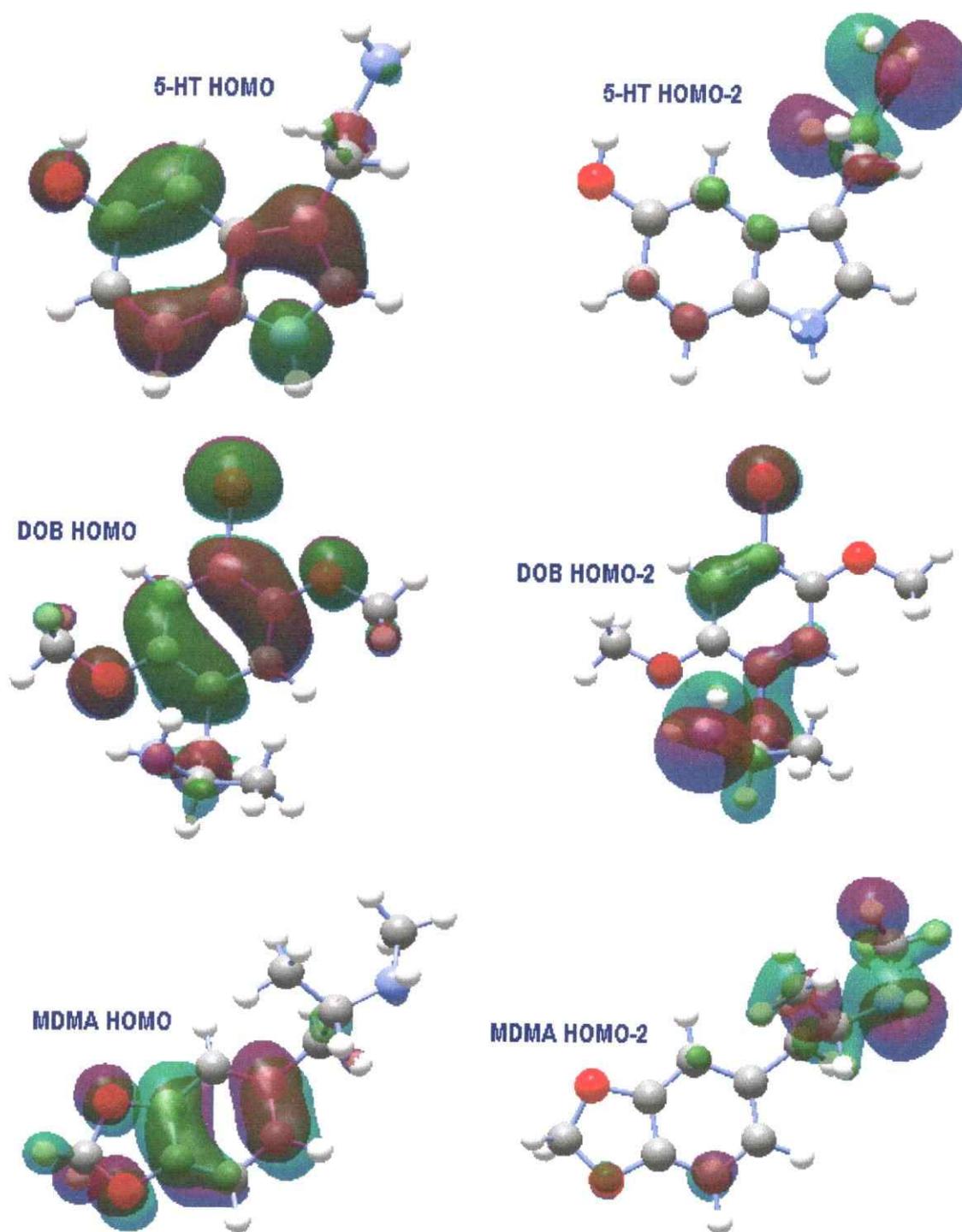


Figura IV.11 Superficies de densidad para HOMO (Izquierda) moléculas 5-HT, DOB y MDMA. A la derecha de la figura se muestran las superficies de densidad para los HOMO-2 en las mismas moléculas.

Con el propósito de analizar las características de los OM en los cuales se localiza en el par electrónico libre del N, se registró la magnitud de f_N para los 3 OM ocupados y la energía para cada orbital. Esta última fue incluida porque, desde el punto de vista de la teoría de orbitales moleculares, un aumento en la afinidad protónica de una base puede ser representada por la desestabilización del orbital molecular que contiene el par electrónico libre del centro básico. La Tabla IV.6 muestra el valor de f_N para los tres últimos orbitales ocupados. La sexta columna muestra la energía del OM centrado en el átomo de nitrógeno calculada para la amina aislada y la séptima el mismo parámetro, pero medido en el complejo con el ácido fórmico. Los resultados se correlacionan perfectamente, ya que a medida que aumenta la basicidad de DOX el orbital molecular se desestabiliza.

Una característica que resalta en los resultados es que a medida que aumenta la reactividad hacia la protonación de la base, descrita por la disminución de la blandura de la base, s_N en el HOMO, aumenta el valor de esta variable en el OM centrado en el átomo de nitrógeno. Este aumento está reflejando la mayor localización del OM en el nitrógeno. Al igual que el caso de las metilaminas, el valor de la función de Fukui f_N^- mayor sobre el HOMO, indica que el orbital molecular fundamentalmente centrado en el par electrónico libre del nitrógeno y es el valor propio de la energía de este, el descriptor de la basicidad de las aminas en el marco de OM de HF. En la próxima sección encontraremos esta característica nuevamente.

En resumen lo que es más destacable es que, al menos para una familia de moléculas, como la DOX, la basicidad puede ser calculada en base a la teoría de funcionales de la densidad (blandura local) y a través de la teoría de orbitales moleculares (energía del OM que contiene al par electrónico libre de la base), f_N^- , calculados en este OM.

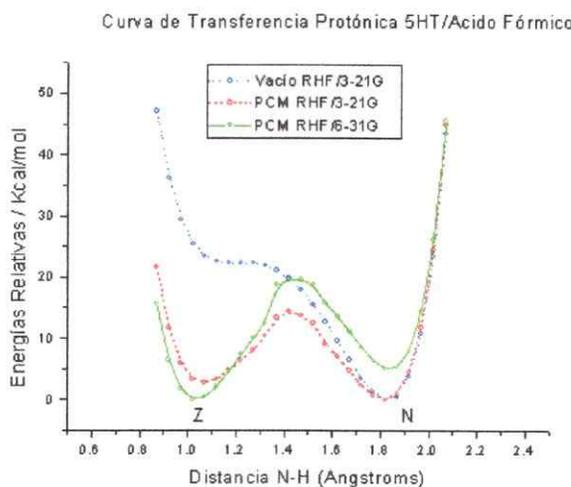
IV.7 Influencia de la polaridad del solvente agua en la transferencia protónica para 5-HT y DOB en presencia de ácido fórmico

En esta sección analizamos el efecto del solvente en el equilibrio tautomérico de los sistemas 5-HT \cdots HCOOH y DOB \cdots HCOOH como modelos de transferencia protónica representada por la ecuación:



En la fase gaseosa se espera que la forma neutra sea la más estable, mientras que la forma zwitteriónica de este complejo ácido-base corresponda al mínimo global en la fase condensada. En este estudio, las geometrías de las formas neutras y zwitteriónica fueron completamente optimizadas en vacío a nivel HF/3-21g y se utilizó esta geometría para los cálculos en solución (aproximación de estructura rígida) usando el modelo de polarización de carga, PCM de Tomasi y col. [50], implementado en el paquete de programas Gaussian 98 [7] al nivel de teoría Hartree-Fock usando bases HF/3-21g y HF/6-31g [1]. En ambos cálculos, el solvente considerado fue agua.

Los resultados de la [Figura IV.12](#) y [Figura IV.13](#) muestran gráficamente las curvas de transferencia protónica para 5-HT \cdots HCOOH y DOB \cdots HCOOH respectivamente. En cada curva de las figuras, se eligió como punto cero de referencia el mínimo global. La influencia de la calidad de la base también se ilustra en las figuras.



[Figura IV.12](#) Perfil de transferencia protónica para 5-HT. (círculos vacío, cuadrado PCM/HF/3-21g, triángulos PCM/HF/6-31G).

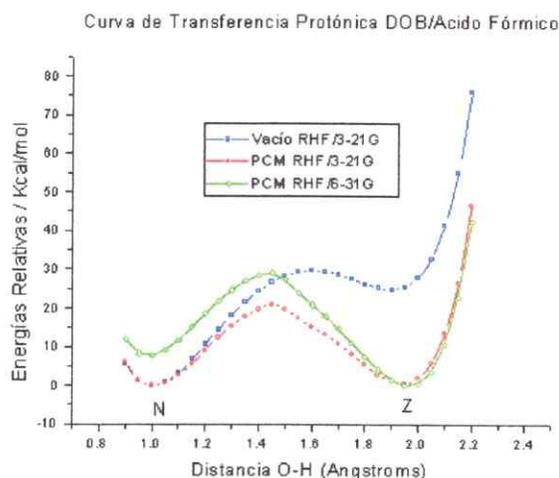


Figura IV.13 Perfil de transferencia protónica para DOB. (círculos vacío, cuadrado PCM/HF/3-21g, triángulos PCM/HF/6-31G).

Los resultados indican que la polaridad del solvente (agua) induce la presencia de un doble pozo de energía de transferencia protónica, alterando notablemente las afinidades protónicas y las energías de enlace por H respecto de la magnitud de estas variables en estado gaseoso. Considerando la mejor concordancia entre dichas variables en estado gaseoso y los valores de las constantes de afinidad, se puede inferir que, si bien el sitio de unión de ligandos con el receptor no está aislado de un campo eléctrico, éste debe ser débil comparado con aquél producido por la polaridad del agua.

IV.8 Influencia de cargas puntales en el enlace hidrógeno de sistemas aminos-ácido fórmico

El sitio de unión en los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} contiene fragmentos moleculares cargados, neutros y moléculas de agua, de acuerdo al desarrollo de los modelos tridimensionales descritos en las secciones anteriores. Como se estableció previamente, entre todas las interacciones que deben ocurrir en el sistema real, los estudios químico-cuánticos han sido

dedicados sólo la interacción ligando-HCOOH, donde el ácido fórmico representa al residuo de ácido aspártico del receptor. Dentro de este marco y debido a que la modelación mostró residuos que se encontraban más lejanos que una distancia de enlace con los ligandos, estas interacciones pueden ser modeladas por un conjunto de puntos carga que crean un campo eléctrico similar al producido por sistemas reales; así la influencia del entorno molecular en el enlace por H puede ser estudiada en el sistema molecular rodeado por puntos carga.

El estudio de la influencia de campos eléctricos en el enlace por H ha recibido mayor atención en los últimos tiempos [51,52]. En particular Helms y col. [53] han reportado la función potencial de transferencia protónica (FPTP) entre imidazol y agua en la presencia de una segunda y una tercera molécula de agua (aguas externas). Luego ubica cargas puntuales en la posiciones correspondientes a los átomos de O y de H de las aguas externas y calcula la FPTP en presencia de dichas cargas. La magnitud de las cargas que representan las aguas externas se logra ajustándolas de modo de recuperar la curva obtenida en la presencia explícita de estas moléculas de aguas.

En esta sección estudiamos la FPTP de sistemas amoníaco-ácido fórmico, en la presencia de un conjunto de cargas puntuales que denominamos campo externo. El propósito de estos cálculos es evaluar la influencia de la intensidad de campo creado por las cargas en la FPTP y buscar descriptores que representen la basicidad relativa de las aminas en la presencia de campos eléctricos.

IV.8.1 Sistema modelo: amoníaco – ácido fórmico

El sistema molecular escogido es nuevamente el sistema amoníaco-ácido fórmico, no sólo por consistencia sino que, además, permite estudiar el comportamiento de los orbitales moleculares, ya que este complejo contiene un sistema π y tres sitios de protonación.

Parra-Mouchet y col. [41,54] en el pasado utilizaron el sistema amoníaco-ácido fórmico, como modelo de enlace por hidrógeno en aminoácidos, en el vacío y en medios condensados, en particular, con el objeto de racionalizar la dependencia de la temperatura que presenta el espectro de IR de algunos aminoácidos N,N-dialquil substituidos en estado cristalino. Los autores reportaron [54] resultados *ab initio* a nivel HF/STO-3g y HF/4-31g de la posición relativa del equilibrio tautomérico del modelo molecular linealmente enlazado por hidrógeno, cuando está

rodeado de dipolos puntuales (campo externo) que simulan el entorno cristalino de dichos aminoácidos. Los resultados mostraron que la forma zwitteriónica se estabiliza en campos donde el fragmento $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ cae sobre un pozo de potencial eléctrico negativo y el fragmento $\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-$ en un pozo de potencial eléctrico positivo. Mientras mayor sea la intensidad de estos campos mayor es la estabilización de la forma zwitteriónica respecto de la neutra.

La Figura IV.14 muestra esquemáticamente la disposición de los dipolos puntos-carga utilizados en el trabajo mencionado.

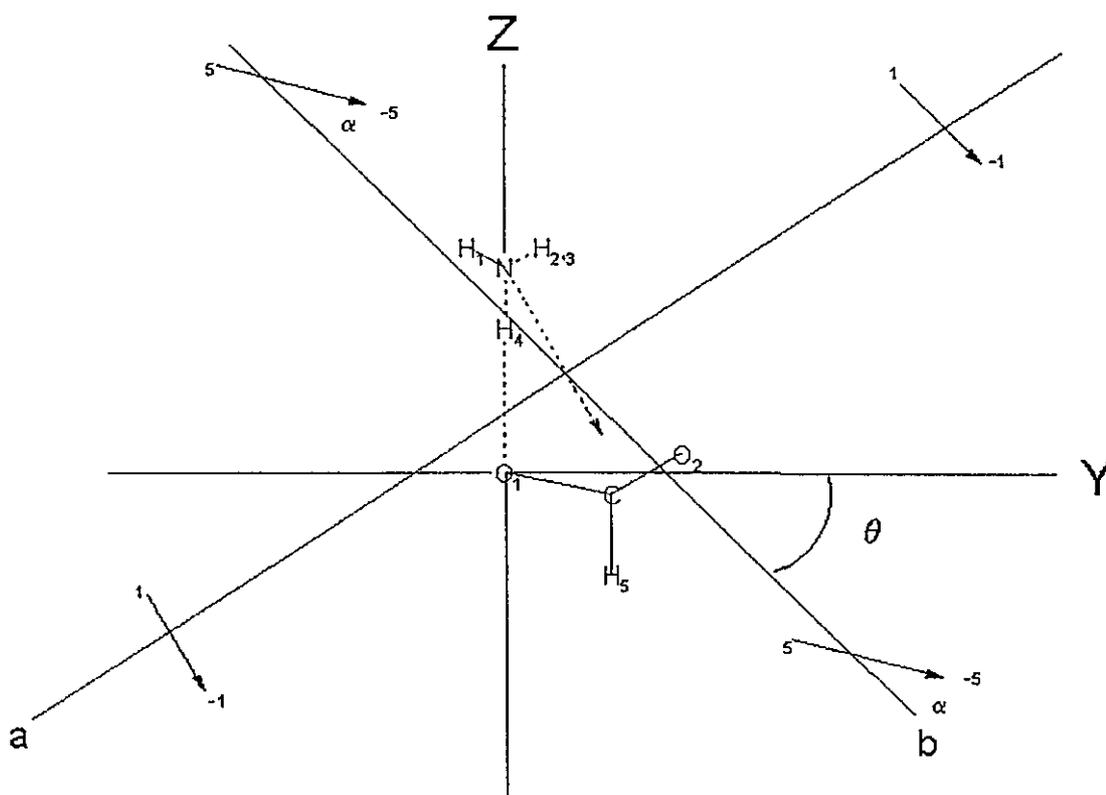


Figura IV.14. Modelo geométrico. La figura muestra el complejo molecular y el campo externo. El fragmento $\text{H}_5\text{-C-O}_1\text{-O}_2\cdots\text{H}_4\cdots\text{NH}_1$ yace sobre el plano yz con el puente de hidrógeno ubicado sobre el eje z .

En la primera parte de esta sección repetimos los cálculos mencionados utilizando funciones de onda HF/6-31g(d) y en la segunda parte se hicieron los análisis de reactividad local utilizando parámetros similares a los utilizados previamente en el vacío.

A: Campo externo

El campo consiste en un arreglo de dipolos puntos-carga alrededor del complejo molecular. Estos dipolos están situados en los ejes cristalinos (ortogonales) **a** y **b** con el origen ubicado en el centro de carga del complejo molecular. Las cargas sobre los dipolos en el eje **b** son cinco veces mayores que los dipolos del eje **a**. Las distancias entre los centros de los dos dipolos en los ejes **a** y **b** son 11.25 Å y 12.0 Å, respectivamente. La longitud de cada dipolo es 1.65 Å.

Se encuentra definido un sistema de coordenadas cartesianas de manera tal que el plano **yz** coincide con el plano **ab**; y el puente de hidrógeno $\text{N}\cdots\text{H}_4\cdots\text{O}_1$ está ubicado sobre el eje **z**, con el oxígeno O_1 del ácido fórmico en el origen a una distancia de 2.8 Å del átomo de nitrógeno. El complejo yace en el plano **yz**, con dos de los átomos de hidrógeno del amoníaco dirigidos dentro y fuera del plano molecular, respectivamente. La posición del campo externo es tal que el eje **y** forma un ángulo $\alpha=53^\circ$ con el eje **b**. El complejo molecular y el campo externo se ilustran en la Figura IV.14.

Se definen las formas para los complejos neutro **N** y zwitteriónico **Z** como aquellas en que las que la distancia O-H es de 1.0 Å y 1.7 Å, respectivamente.

B: FPTP en el campo 5/1

Para obtener la influencia del campo externo sobre el equilibrio tautomérico, se calcularon las FPTP a nivel HF/6-31g(d), en el sistema aislado y en la presencia de campos, construidos manteniendo la geometría optimizada punto a punto en el vacío. La razón 5/1 entre las cargas de los dipolos se mantuvo. Se utilizaron campos donde las cargas variaron desde 2/0.4 hasta 5/1. La Figura IV.15 muestra las PTPF como función del campo externo aplicado. Se observa que a medida que aumenta la magnitud de las cargas se estabiliza la forma zwitteriónica respecto de la forma neutra.

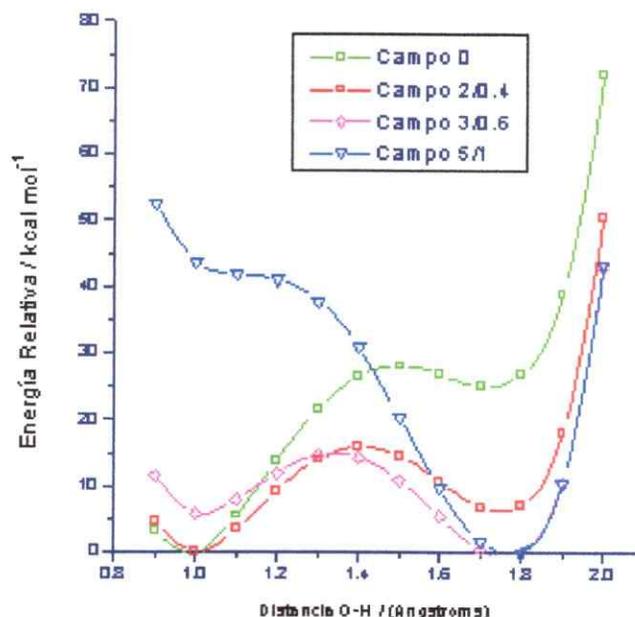


Figura IV.15 Perfil de transferencia protónica para el modelo amoníaco-ácido fórmico en el vacío (cuadrados), intensidad de campo 2/0.4 (círculos), intensidad de campo 3/0.6 (triángulos), intensidad de campo 5/1 (rombos).

Se puede observar en la Figura IV.15, que la PTPF varía desde una curva con un mínimo correspondiente a la forma neutra cuando no hay campo externo, pasando por funciones de doble pozo (campos 2/0.4 y 3/0.6), y terminando con una curva de un pozo único cuyo mínimo ocurre en la forma zwitteriónica para el campo más intenso.

La Tabla IV.8 muestra las diferencias de energía de la forma neutra y la forma zwitteriónica. Así un equilibrio tautomérico entre ambas formas ocurrirá entonces a intensidades débiles de campo. No se discute la altura de la barrera, ya que la distancia N-O se mantuvo fija en 2.8 Å.

Tabla IV.8 Diferencias de energías relativas entre forma neutra y zwitteriónica del complejo ácido-base amoníaco-ácido fórmico.

CAMPO EXTERNO	$\Delta N-Z$ (kcal mol ⁻¹)
0	-25.22
2/0.4	-6.259
3/0.6	6.469
5/1	44.44

Concomitantemente a la estabilización del par iónico, aumenta la carga sobre el fragmento $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ y aumenta la carga negativa sobre el fragmento $\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-$, siendo este efecto mayor en la forma zwitteriónica.

C: Potencial eléctrico creado por los campos.

Con el propósito de racionalizar los resultados en función de campo externo, se generaron mapas de contorno del potencial externo creado por el campo. La Figura IV.16 muestra el mapa de contorno de potencial eléctrico creado por el campo externo 5/1. El contorno correspondiente al valor 0 corresponde al potencial externo nulo y está marcado como 0, con incrementos de 0.05 au (2.57×10^{-10} Volt cm⁻¹). Las líneas punteadas corresponden a potenciales negativos y las continuas a potenciales positivos. La inspección de este mapa muestra que a medida que aumenta la carga, el fragmento $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ queda en un pozo más negativo mientras que el fragmento $\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-$ queda en un pozo más positivo, estabilizando así las formas más iónicas respecto de las más covalentes.

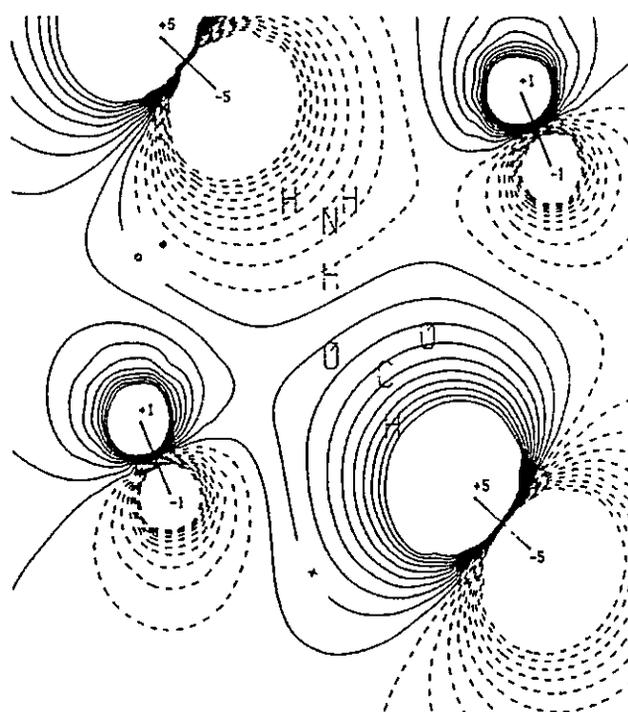


Figura IV.16 Mapa de contornos del campo externo aplicado (obtenido de ref. [54])

IV.8.2 Orbitales moleculares

Para racionalizar los resultados en términos de los orbitales moleculares involucrados en el puente de hidrógeno, se estudió la respuesta de los estos orbitales a la imposición del campo sobre las tres estructuras N, M y Z. Se introduce la tercera forma M, como aquella en que la distancia O-H es de 1.3 Å (el punto medio entre N y O).

El diagrama de orbitales moleculares en el vacío muestra las siguientes características: el HOMO es un orbital π deslocalizado en el fragmento HCOOH/HCOO-. El HOMO-1 es un orbital de simetría σ , que se encuentra deslocalizado entre el O_1 y O_7 con mayores contribuciones en el átomo O_7 . El HOMO-2 cambia de carácter al progresar desde la forma zwitterónica iónica a la media y a la neutra. En la forma Z, puede ser identificado como un segundo par electrónico libre que fácilmente puede ser identificado como un orbital σ muy localizado en el orbital $2p_z$ del átomo de O_1 . La estructura M mantiene esta característica (π). Para la estructura neutra; sin embargo, la

naturaleza del orbital HOMO-2 es un par electrónico σ , localizado en el orbital $2p_z$ del átomo de nitrógeno (que llamaremos $2p_z$ N). Este orbital molecular se mueve de un fragmento al otro y puede ser denominado como el par electrónico involucrado en el receptor del enlace por H. A medida que aumenta la intensidad de campo hay entrecruzamiento de los orbitales moleculares respecto de los descritos en el vacío. Así el orbital HOMO-2 (" $2p_z$ del átomo de nitrógeno") de la forma neutra se desestabiliza pasando a ser el orbital HOMO en la presencia de campos más intensos, como mostraremos más adelante; mientras el HOMO-2 de la forma zwitteriónica (" $2p_z$ del átomo de oxígeno", que más adelante llamaremos $2p_z$ O₁) se estabiliza. La Figura IV.17 muestra el diagrama de orbitales moleculares y las energías relativas de estos orbitales en presencia del campo.

El orbital "x" corresponde al "orbital $2p_z$ " del O₁ y el orbital molecular y corresponde al $2p_z$ del átomo de nitrógeno.

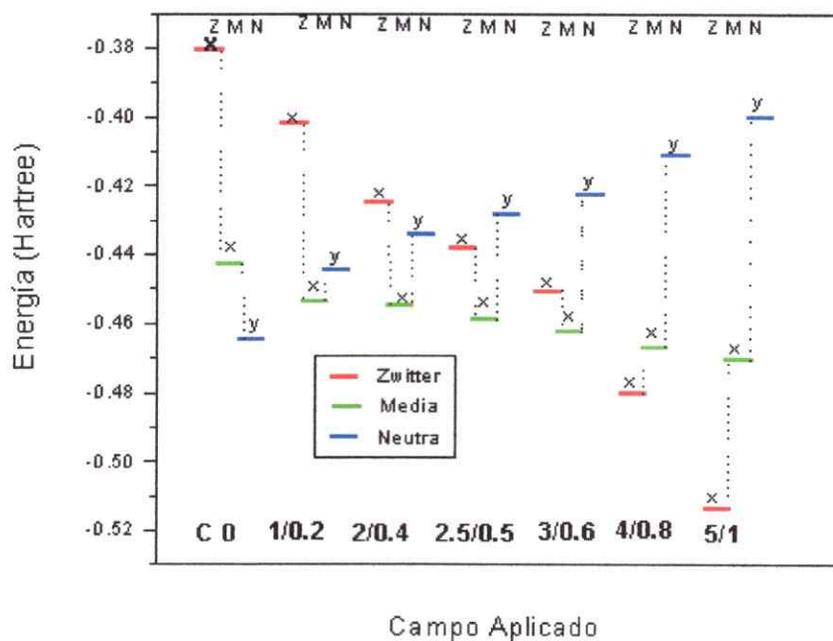


Figura IV.17 Diagrama de niveles de energía de orbitales moleculares implicados en el puente por hidrógeno obtenidos en el vacío y en presencia de campos eléctricos.

Se observa claramente que al aumentar la intensidad del campo se estabiliza el orbital "x" para la estructura zwitteriónica y el orbital "x" para la estructura media. Este orbital corresponde al par electrónico en $2p_z$ del O_1 y se encuentra inmerso en un pozo de potencial positivo, por lo tanto se espera una estabilización del fragmento al aumentar la intensidad del campo. El orbital "y" en la estructura neutra; sin embargo, corresponde al par electrónico libre sobre el átomo de nitrógeno y es desestabilizado con el aumento en la intensidad del campo. Este par electrónico queda inmerso en un pozo de potencial negativo, así, este debería desestabilizarse cuando el potencial llega a ser más negativo.

De esta manera la energía relativa de los OM implicados en el puente de hidrógeno, constituyen (al menos en este caso) buenos descriptores de la relativa reactividad frente a la protonación de ambas bases. Además, los resultados muestran una independencia cualitativa de la calidad de la base de orbitales atómicos utilizados en el cálculo.

IV.8.3 Aplicación de campo externo a la transferencia 5-HT ... HCOOH

Debido a la importancia que presenta el enlace de hidrógeno en las interacciones droga-receptor en los sistemas monoaminérgicos y en particular para el sistema serotoninérgico, hemos estudiado el sistema serotonina/ácido fórmico (este último como modelo del ácido aspártico) en la presencia de una carga negativa a una distancia de 4.0 \AA del átomo de nitrógeno sugerida por la modelación molecular de los receptores 5-HT, (triptofano y moléculas de agua). La Figura IV.18 muestra los resultados obtenidos para las PTPF de este sistema. Los resultados muestran que los campos externos tienen una gran influencia en la transferencia protónica.

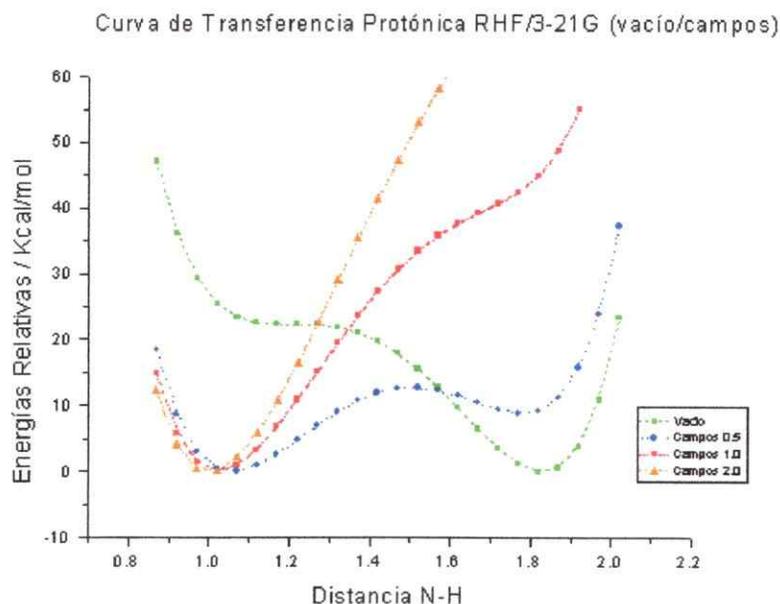


Figura IV.18 Perfil de transferencia protónica 5-HT--ácido fórmico en presencia de cargas puntuales.

Basándonos en estos hechos y en los estudios del sistema amoniaco-ácido fórmico recién descritos, analizamos el comportamiento de los OM frente a distintos campos, con el objeto de estudiar los cambios en la estructura electrónica de los componentes del sistema y la validez de los descriptores de la basicidad frente a la protonación.

Como se expresó previamente el complejo molecular en su formas neutra y zwitteriónica fue calculado usando una función de onda HF/6-31g(d). La distancia O_1-N se mantuvo en 2.8 \AA y los átomos del puente H, O_1-H-N_2 fueron localizados en el eje **Z**, al igual que lo reportado en ref. [54]. Ver Figura IV.14.

IV.8.4 Descriptores moleculares de la basicidad relativa de amoníaco y formiato

El complejo presenta tres sitios de protonación que son el N₂ (Z), O₁ (NO1) y O₇ (NO7).

La Tabla IV.9 muestra la energía total de cada una de las formas en la presencia de los campos 5/1. Se puede observar que en el vacío la estabilidad es NO1 > NO7 > Z y que para todos los campos aplicados NO1 es siempre más estable que NO7. Esto indica que si el sistema se encuentra en la forma NO1, una migración del protón ocurrirá al O₇ y no en al N₂. Las dos últimas columnas presentan las diferencias de energía (kcal mol⁻¹) entre NO1 y NO7 y entre Z y NO1 respectivamente. A medida que aumenta el campo se estabiliza la forma Z respecto de la NO1 (y de la forma NO7).

Tabla IV.9 Campos 5/1. Intensidad de campo (primera columna); energía total (au) de la forma neutra protonada en O1 (segunda columna), forma protonada en O7 (tercera columna), forma Zwitteriónica (cuarta columna). Diferencias de energías en kcal mol⁻¹ entre formas Z y NO1 y formas NO1 y NO7 (quinta y sexta columna) respectivamente.

Campo	NO1 (au)	NO7(au)	Z (au)	Δ (Z-NO1) kcal mol ⁻¹	Δ (NO1-NO7) kcal mol ⁻¹
Vacio	-244.96	-244.94	-244.92	25.22	-16.17
0.2/1.0	-245.64	-245.61	-245.61	16.56	-20.41
0.4/2.0	-247.66	-247.62	-247.65	6.26	-23.53
0.5/2.5	-249.17	-249.13	-249.17	0.26	-24.5
0.6/3.0	-251.01	-250.97	-251.02	-6.47	-24.96
0.8/4.0	-255.71	-255.67	-255.75	-22.83	-23.8
1.0/5.0	-261.75	-261.72	-261.82	-44.45	-18.37

Tabla IV.10 Campo aplicado Forma N (primera columna), energía total (Hartree), energía OM (Hartree), tipo OM, función de Fukui f_N , función de Fukui f_O .

Campo	Energía Total	Neutra	Energía OM	Tipo	N2	O7
0.0/0.0	-244.963797	HOMO	-0.43129	σ O1-O7	0.041761	0.773282
		HOMO-1	-0.45509	π O1-O7	0.000059	0.593839
		HOMO-2	-0.46491	2pzN	0.756586	0.054058
		HOMO-3	-0.56607	π O1-O7	0.108447	0.310843
		HOMO-4	-0.6043	σ O1-O7	0.001693	0.154204
0.2/1.0	-245.641008	HOMO	-0.44427	2pzN	0.753581	0.101406
		HOMO-1	-0.47522	σ O1-O7	0.114147	0.637138
		HOMO-2	-0.48218	π O1-O7	0.000111	0.489324
		HOMO-3	-0.59097	σ O1-O7	0.050388	0.217669
		HOMO-4	-0.63103	π O1-O7	0.019898	0.244131
0.4/2.0	-247.6575154	HOMO	-0.43444	2pzN	0.864072	0.015943
		HOMO-1	-0.50783	σ O1-O7	0.015462	0.715054
		HOMO-2	-0.50929	π O1-O7	0.000228	0.459546
		HOMO-3	-0.61665	σ O1-O7	0.051354	0.190553
		HOMO-4	-0.62947	σ NH3	0.658046	0.004028
0.5/2.5	-249.168116	HOMO	-0.42853	2pzN	0.872548	0.009271
		HOMO-1	-0.52286	π O1-O7	0.000366	0.444966
		HOMO-2	-0.52522	σ O1-O7	0.008406	0.717047
		HOMO-3	-0.62087	σ NH3	0.669054	0.002013
		HOMO-4	-0.62137	σ NH3	0.600999	0.014032
0.6/3.0	-251.0136865	HOMO	-0.42255	2pzN	0.875044	0.0061
		HOMO-1	-0.53647	π O1-O7	0.000661	0.430677
		HOMO-2	-0.54281	s O7	0.00562	0.714498
		HOMO-3	-0.61245	σ NH3	0.676505	0.001693
		HOMO-4	-0.6139	σ NH3	0.642395	0.00002
0.8/4.0	-255.710003	HOMO	-0.41088	2pzN	0.871635	0.003299
		HOMO-1	-0.56382	π O1-O7	0.004304	0.401654
		HOMO-2	-0.57819	σ O1-O7	0.013947	0.693383
		HOMO-3	-0.59658	σ NH3	0.686762	0.003999
		HOMO-4	-0.59919	σ NH3	0.636833	0.010942
1.0/5.0	-261.7471362	HOMO	-0.40019	2pzN	0.861221	0.002152
		HOMO-1	-0.58143	σ NH3	0.658032	0.022449
		HOMO-2	-0.58526	σ NH3	0.646285	0.007301
		HOMO-3	-0.59273	π O1-O7	0.046593	0.359685
		HOMO-4	-0.61478	σ O1-O7	0.006009	0.679805

Tabla IV.11 Campo aplicado Forma Z (primera columna), energía total (Hartree), energía OM (Hartree), tipo OM, función de Fukui f_N , función de Fukui f_O .

Campo	Energía Total	zwitteriónica	Energía OM	Tipo	O1	O7
0.0/0.0	-244.9236025	HOMO	-0.36066	π O1-O7	0.463697	0.511011
		HOMO-1	-0.36636	σ O1-O7	0.122224	0.785409
		HOMO-2	-0.38071	2pz O1	0.71071	0.094156
		HOMO-3	-0.52151	π O1-O7	0.405146	0.281436
		HOMO-4	-0.56187	σ O1-O7	0.303983	0.465967
0.2/1.0	-245.6146229	HOMO	-0.3799	π O1-O7	0.49431	0.48593
		HOMO-1	-0.39337	σ O1-O7	0.143073	0.582954
		HOMO-2	-0.40175	2pz O1	0.667596	0.23577
		HOMO-3	-0.54449	π O1-O7	0.344516	0.322123
		HOMO-4	-0.58274	σ O1-O7	0.358591	0.429209
0.4/2.0	-247.6475392	HOMO	-0.40181	π O1-O7	0.500802	0.479239
		HOMO-1	-0.42202	σ O1-O7	0.090353	0.677479
		HOMO-2	-0.42515	2pz O1	0.724696	0.13587
		HOMO-3	-0.57013	π O1-O7	0.331983	0.323354
		HOMO-4	-0.60572	σ O1-O7	0.356719	0.423845
0.5/2.5	-249.167695	HOMO	-0.41406	π O1-O7	0.503519	0.476378
		HOMO-1	-0.43674	σ O1-O7	0.161357	0.728232
		HOMO-2	-0.4383	2pz O1	0.652431	0.080264
		HOMO-3	-0.58414	π O1-O7	0.326468	0.32363
		HOMO-4	-0.61814	σ O1-O7	0.353548	0.421213
0.6/3.0	-251.0239946	HOMO	-0.42737	π O1-O7	0.505893	0.473838
		HOMO-1	-0.45074	2pz O1	0.484108	0.455178
		HOMO-2	-0.45362	σ O1-O7	0.325539	0.346659
		HOMO-3	-0.59906	π O1-O7	0.321517	0.323756
		HOMO-4	-0.63124	σ O1-O7	0.34791	0.418252
0.8/4.0	-255.7463854	HOMO	-0.4578	π O1-O7	0.508045	0.471295
		HOMO-1	-0.48034	2pz O1	0.568374	0.35302
		HOMO-2	-0.48733	σ O1-O7	0.220604	0.429905
		HOMO-3	-0.63191	π O1-O7	0.314979	0.322509
		HOMO-4	-0.65933	σ O1-O7	0.317804	0.410011
1.0/5.0	-261.8179652	HOMO	-0.49507	π O1-O7	0.509732	0.469219
		HOMO-1	-0.51377	2pz O1	0.601828	0.291228
		HOMO-2	-0.52504	σ O1-O7	0.147286	0.46033
		HOMO-3	-0.66977	π O1-O7	0.310714	0.321357
		HOMO-4	-0.68862	σ O1-O7	0.220657	0.34746

Las Tablas IV.10 y IV.11 presentan los resultados obtenidos para las formas neutra con el O₁ protonado, neutra con el O₇ protonado y zwitteriónica, donde el átomo de nitrógeno se encuentra protonado. La primera columna muestra el campo externo aplicado, la segunda columna muestra la energía total del sistema (a.u.), la tercera columna lista los últimos cinco orbitales moleculares ocupados, la columna cuatro entrega la energía de los orbitales moleculares correspondientes (a.u.), la columna cinco describe el carácter del orbital molecular, las columnas seis, siete y ocho muestran la función de Fukui nucleofílica [55] de los átomos O₁, O₇ y N₂ respectivamente.

Forma Neutra NO1

En el vacío el HOMO pertenece al sistema π , mientras que a medida que aumenta la intensidad del campo éste se estabiliza dejando como HOMO al orbital $2p_z$ N. Concomitantemente, la energía del $2p_z$ N aumenta. La desestabilización de este orbital refleja un aumento de la labilidad del átomo de nitrógeno frente a la protonación. Por otra parte, se observa que la función de Fukui medida sobre el $2p_z$ N aumenta a medida que aumenta la intensidad del campo, en acuerdo con la estabilización relativa de la forma zwitteriónica mostrada en la Tabla IV.8. A intensidades altas esta regularidad se ve interrumpida, sugiriendo que la carga se distribuye sobre todo el grupo amino.

Otro aspecto relevante es que en el vacío la función de Fukui es más alta en el O₇ y muestra que en el vacío el protón tiene mayor probabilidad de migrar de O₁ a O₇.

Para la Forma NO1 la protonación ocurre donde la función de Fukui presenta un valor mayor en el HOMO.

Forma Zwitteriónica

La Tabla muestra que a medida que aumenta la intensidad del campo, junto con estabilizarse esta forma se estabiliza también el orbital molecular localizado en el OM $2p_z$ O₁. Respecto de la función de Fukui, la protonación ocurrirá en el átomo cuyo valor es mayor en el HOMO nuevamente.

En conclusión, para el sistema estudiado, la energía relativa de los orbitales moleculares involucrados en el puente de hidrógeno se presenta como un excelente índice de reactividad de la transferencia protónica.

Respecto de la función de Fukui, en este sistema donde ambas bases están presentes, la reactividad de transferencia parece estar regida por el valor de la función de Fukui mayor.

IV.9 Inversión del campo externo

De acuerdo con el análisis de los resultados obtenidos para la descripción del enlace por H en la presencia de campos del tipo 5/1, se puede predecir que la inversión de las cargas debería producir una mayor estabilización de la forma neutra respecto de la forma zwitteriónica. Para probar esta inferencia se realizaron cálculos HF/6-31g(d) en las formas N y Z. La Tabla IV.12 muestra los resultados esperados. Nótese que a medida que aumenta la intensidad del campo invertido, aumenta también la estabilización de la forma N sobre la Z.

Tabla IV.12 *Inversión del campo*

CAMPO	Forma N (au)	Forma Z (au)	Δ (Z-N) kcal mol ⁻¹
0.0/0.0	-244.96	-244.92	25.92
0.2/1.0	-245.63	-245.57	36.56
0.4/2.0	-247.64	-247.56	46.63
0.5/2.5	-249.14	-249.06	51.48
0.6/3.0	-250.98	-250.89	56.22
0.8/4.0	-255.67	-255.56	65.31
1.0/5.0	-261.69	-261.57	73.67

Se utilizó una serie de arreglos punto carga en lugar de la inicial tipo del 5/1 y los resultados fueron consecuentes. Cuando el fragmento fórmico/formiato yace en el pozo de potencial eléctrico positivo creado por el campo externo y el fragmento amoníaco/amonio en un pozo negativo, la forma Z se estabiliza respecto de la N y viceversa. Los primeros campos estudiados fueron denominados EZ, mientras que los campos que estabilizan la forma N fueron denominados EN. El comportamiento de los orbitales moleculares 2p_z N y 2p_z O1, nuevamente indica la reactividad relativa a la transferencia protónica, como se examinó en el caso de los

campos del tipo 5/1. También se construyeron campos a una y dos cargas, obteniéndose los mismos resultados.

IV.9.1 Influencia de campos externos en la transferencia protónica de sistemas DOX – ácido fórmico y descriptores moleculares de la basicidad de los ligandos DOX

La aplicación a los ligandos de la familia DOX se realizó a nivel HF/3-21G, con varios campos externos, que a continuación describimos:

Campo EZ (-1/1) la carga -1 fue ubicada a 4 Å del átomo de nitrógeno, previendo que la distancia entre ésta y cualquier átomo del complejo fuese superior a 5 Å. Análogamente la carga +1 fue localizada a 4 Å del átomo O₁ con las mismas precauciones descritas.

Campo EZ (-2/2) mantiene las coordenadas del campo anterior, pero la magnitud de las cargas es 2 en lugar de 1.

Campo EN (1/-1) corresponde a las coordenadas de los campos anteriores, pero la magnitud de las cargas ha sido invertida respecto del EZ (-1/1).

Campo EN (2/-2) mantiene las coordenadas del campo anterior, pero la magnitud de las cargas es 2 en lugar de 1.

Campo EZ (x), la única carga de magnitud x está localizada a 4 Å del átomo de nitrógeno, previendo que la distancia entre ésta y cualquier átomo del complejo fuese superior a 5 Å.

Campo EN (y), mantiene la definición de campo anterior, donde $y = -x$. Los resultados se muestran en la Tabla IV.13 y Tabla IV.14, donde la segunda corresponde al campo invertido de la primera. En cada tabla aparece, por columna, el campo aplicado, la energía de las formas neutra y zwitteriónica, la diferencia de energía entre las formas Z y N en kcal mol⁻¹, la energía del orbital molecular 2p_z N de la forma neutra y la energía del 2p_z O1 de la forma zwitteriónica.

Tabla IV.13 Campos aplicados (primera columna), energía total (Hartree) forma Neutra y Zwitteriónica (segunda y tercera columna), ΔE diferencia de energía total entre ambas formas (cuarta columna), valor propio OM sobre par electrónico libre del nitrógeno (2pz) de la forma neutra, valor propio OM sobre par electrónico libre del O1 (2pz) de la forma zwitteriónica (quinta y sexta columna).

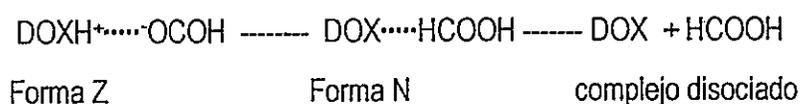
DOF	Neutra	Zwitteriónica	ΔE (kcal/mol)	MO (2pz N)	MO (1)
Vacio	-913.1355	-913.1042	19.7	-0.38671	-0.30472
EZ(-1/1)	-913.2472	-913.2989	-32.4	-0.32921	-0.39931
EZ(-2/2)	-913.6087	-913.7560	-92.4	-0.28357	-0.43587
EZ(-0.5)	-913.1421	-913.1295	7.9	-0.29902	-0.41655
EZ(-1)	-913.1549	-913.1780	-8.2	-0.23108	-0.51249
DOC	Neutra	Zwitteriónica	ΔE (Kcal/mol)	MO (2pz N)	MO (1)
Vacio	-1271.500	-1271.4691	19.4	-0.39224	-0.3098
EZ(-1/1)	-1271.6033	-1271.6528	-31.1	-0.33856	-0.39921
EZ(-2/2)	-1271.9465	-1272.0885	-89.1	-0.27704	-0.40087
EZ(-0.5)	-1271.5039	-1271.4930	6.8	-0.30859	-0.41931
EZ(-1)	-1271.5137	-1271.5288	-9.4	-0.23715	-0.50739
DOB	Neutra	Zwitteriónica	ΔE (Kcal/mol)	MO (2pz N)	MO (1)
Vacio	-3374.2992	-3374.2734	16.2	-0.3885	-0.30232
EZ(-1/1)	-3374.4074	-3374.4589	-32.3	-0.32741	-0.39824
EZ(-2/2)	-3374.7685	-3374.9155	-92.3	-0.28181	-0.4
EZ(-0.5)	-3374.3025	-3374.2902	7.8	-0.31221	-0.41663
EZ(-1)	-3374.3151	-3374.3289	-8.7	-0.23193	-0.49816
DOI	Neutra	Zwitteriónica	ΔE (Kcal/mol)	MO (2pz N)	MO (1)
Vacio	-7702.0773	-7702.0493	17.6	-0.37969	-0.30651
EZ(-1/1)	-7702.1805	-7702.2317	-32.1	-0.32442	-0.37823
EZ(-2/2)	-7702.5226	-7702.6663	-90.2	-0.27638	-0.38606
EZ(-0.5)	-7702.0810	-7702.0742	4.2	-0.30867	-0.41386
EZ(-1)	-7702.0892	-7702.1109	-13.5	-0.23061	-0.4757

Tabla IV.14 Campos inversos aplicados (primera columna), energía total (Hartree) forma Neutra y Zwitteriónica (segunda y tercera columna), ΔE diferencia de energía total entre ambas formas (cuarta columna), valor propio OM sobre par electrónico libre del nitrógeno (2pz) de la forma neutra, valor propio OM sobre par electrónico libre del O1 (2pz) de la forma zwitteriónica (quinta y sexta columna).

DOF	Neutra	Zwitteriónica	ΔE (Kcal/mol)	MO (2pz N)	MO (1)
Vacio	-913.1355	-913.1042	19.7	-0.38671	-0.30472
EN(1/-1)	-913.2481	-913.1462	63.9	-0.44226	-0.25074
EN(2/-2)	-913.5755	-913.4224	96.1	-0.45455	-0.20417
EN(0.5)	-913.1352	-913.0899	28.4	-0.45989	-0.22952
EN(1)	-913.1412	-913.0850	35.2	-0.52859	-0.14014
DOC	Neutra	Zwitteriónica	ΔE (Kcal/mol)	MO (2pz N)	MO (1)
Vacio	-1271.5001	-1271.4691	19.4	-0.39224	-0.3098
EN(1/-1)	-1271.6169	-1271.5167	62.9	-0.44696	-0.25928
EN(2/-2)	-1271.9461	-1271.7940	95.5	-0.45721	-0.21338
EN(0.5)	-1271.5024	-1271.4553	29.6	-0.46406	-0.23701
EN(1)	-1271.5110	-1271.4503	38.1	-0.53094	-0.14934
DOB	Neutra	Zwitteriónica	ΔE (Kcal/mol)	MO (2pz N)	MO (1)
Vacio	-3374.2992	-3374.2734	16.2	-0.3885	-0.30232
EN(1/-1)	-3374.4093	-3374.3076	63.8	-0.43884	-0.24423
EN(2/-2)	-3374.7378	-3374.5448	96.0	-0.44261	-0.20342
EN(0.5)	3374.2961	-3374.2503	28.7	-0.45441	0.22935
EN(1)	-3374.3027	-3374.2455	35.9	-0.51337	-0.15947
DOI	Neutra	Zwitteriónica	ΔE (Kcal/mol)	MO (2pz N)	MO (1)
Vacio	-7702.0773	-7702.0493	17.6	-0.37969	-0.30651
EN(1/-1)	-7702.1972	-7702.0984	62.0	-0.39319	-0.25617
EN(2/-2)	-7702.5279	-7702.3769	94.8	-0.42747	-0.20923
EN(0.5)	-7702.0827	-7702.0346	30.2	-0.46116	-0.23359
EN(1)	-7702.0930	-7702.0287	40.4	-0.52981	-0.14593

Una inspección de las tablas muestra la bondad de estos dos últimos parámetros como descriptores de la dirección de la transferencia protónica. Nótese que a medida que aumenta la intensidad de los campos EZ se estabiliza la forma Z y se desestabiliza el orbital molecular $2p_z$ N de la forma N. De la misma manera, a medida que aumenta la intensidad del campo EN se estabiliza la forma N y se desestabiliza el $2p_z$ O1 de la forma zwitteriónica.

Los resultados muestran que a medida que aumenta la intensidad del campo invertido se estabiliza la forma N respecto de Z. Sin embargo, es necesario considerar la disociación del complejo en algunos de estos campos, ilustrada por las ecuaciones:



Finalmente, con el objeto de estudiar este esquema, se realizó el cálculo de la energía del ligando y del ácido fórmico en los campos invertidos, eliminando el error de superposición de bases, y se la comparó con la energía de la forma Z correspondiente, como lo muestra la Tabla IV.15.

Tabla IV.15 Campos inversos aplicados, EC energía total complejo (Hartree), energía total moléculas aisladas (cuarta y quinta columna), sexta columna equivale a la suma de las energías de las moléculas aisladas, ΔE diferencia de energía total entre EC y la suma de las energías totales de complejos aislados.

CAMPO	Ligando	E C (au)	E L aislado (au)	HCOOH (au)	Σ Lig + HCOOH (au)	ΔE kcal mol ⁻¹
1/-1	DOF	-913.25	-725.5	-187.801	-913.3	34.2
1/-1	DOC	-1271.64	-1083.9	-187.801	-1271.7	34.2
1/-1	DOB	-3374.38	-3186.66	-187.802	-3374.46	31.4
1/-1	DOI	-7702.19	-7514.44	-187.802	-7702.25	30.6
CAMPO	Ligando	E C (au)	E L aislado (au)	HCOOH (au)	Σ Lig + HCOOH (au)	ΔE kcal mol ⁻¹
0.1/-0.1	DOF	-913.15	-725.417	-187.697	-913.11	-23.
0.1/-0.1	DOC	-1271.55	-1083.811	-187.697	-1271.51	-23.9
0.1/-0.1	DOB	-3374.34	-3186.576	-187.698	-3374.30	-25.1
0.1/-0.1	DOI	-7702.13	-7514.359	-187.698	-7702.09	-26.1

El resultado es sorprendente, pues muestra que a campos invertidos bajos, se produce la disociación del complejo. Este último aspecto es relevante en los procesos de interacción ligando-receptor, pues el cambio de polaridad en el entorno del complejo podría inducir a la disociación de éste. El cambio de polaridad puede ocurrir ante cualquier un cambio conformacional del receptor. Entonces, los resultados recién planteados, podrían constituir parte del mecanismo de activación o de desactivación del receptor en lo que respecta a la unión y la disociación del ligando.

IV.10 Conclusiones

En este capítulo mostramos que las metodologías desarrolladas en el marco de la aproximación Hartree-Fock-Roothan proveen de una buena descripción de la superficie de energía potencial y de las estructuras electrónicas de ligandos serotoninérgicos. En particular el hamiltoniano AM1 recupera los resultados experimentales de espectros RMN de ^1H .

Las interacciones ligando - ácido fórmico, estudiadas en sistemas aislados y en solventes polares, mostraron acuerdo con los datos experimentales. La inclusión de cargas puntuales, como modelos de campos eléctricos creados por residuos y/o moléculas de agua estructurales, nos permitieron obtener una mayor comprensión de la interacción ligando - aspartato, incluyendo un posible mecanismo de activación o desactivación del receptor en lo que respecta a la unión o disociación del ligando.

Los aspectos más relevantes del trabajo químico cuántico tiene relación con los descriptores moleculares de la basicidad, al menos, de aminas frente a la protonación. El primero de ellos es que el HOMO, utilizado profusamente en la literatura actual, no es siempre el orbital molecular donde deben medirse los descriptores moleculares de reactividad, sino en los orbitales moleculares que participen directamente en la interacción. En el caso de la interacción amina - ácido fórmico, es indudable que el orbital molecular que representa al par electrónico libre es aquel que debe ser considerado, con el objeto de medir algún índice de reactividad como base de estos compuestos; lo mismo ocurre con el formiato correspondiente. Este orbital puede ser fácilmente ubicado, como aquel que exhibe carga más alta sobre el átomo de N entre los orbitales moleculares ocupados de más alta energía, la cual formalmente mide la función de

Fukui nucleofílica [55]. El segundo aspecto relevante de este trabajo es que el valor propio de la energía de este orbital molecular, constituye un descriptor molecular de la basicidad de las aminas, aplicable a sistemas aislados, en solución o en la presencia de campos eléctricos.

IV.11 Referencias

1. W. J. Hehre, L. Ramdon, P. R. Schleyer, J. A. Pople, "Ab Initio Molecular Orbital Theory", Wiley: New York, (1986).
2. M.J.S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3902-3912, (1985).
3. M.J.S. Dewar, W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.*, **99** 4988 (1997).
4. R. Constanciel, R. Contreras, *Theor. Chim. Acta*, **61**, 1 (1984).
5. C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *QCPE Bull.*, **11**, 57 (1991).
6. S. Miertus; J. Tomasi, *J. Chem. Phys.*, **55**, 117-129 (1982).
7. M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, P. Salvador, J. J. Dannenberg, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, A. G. Baboul, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople. Gaussian98; Gaussian Inc; Pittsburgh, PA, (1998).
8. D. L. Liotard, E. F. Healy, J. M. Ruiz, M.J.S. Dewar, *QCPE Bull.*, **9**, 123-127 (1989).
9. S.Kang, M.H. Cho, *Theor. Chim. Acta*, **22**, 176-183 (1971).
10. M. Kumbar, D.V. Siva Sankar, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 7411-7416 (1975).
11. B. Pullman, P. Courrière, H. Berthod, *J. Med. Chem.*, **17**, 439-447 (1974).
12. P. Partington, R.R. Ison, G.C.K. Roberts, *J. Phar. Pharmacol.*, **24**, 82-85 (1972).
13. O. Edvardsen, S.G. Dahl, *Mol. Brain Res.*, **9**, 31-37 (1991).
14. D.E. Nichols, D.H. Lloyd, M.P. Johnson, A.J. Hoffman, *J. Med. Chem.*, **31**, 1406-1412 (1988).
15. P.R. Andrews, E.J. Lloyd, *Med. Res. Reviews*, **2**, 355-393 (1982).
16. R.W. Baker, C.Chothia, P. Pauling, H.P. Weber, *Mol. Pharmacol.*, **9**, 23-27 (1973).

17. R. Bergin, D. Calström, *Acta Cryst.*, **B27**, 2146-2147 (1971).
18. B. Pullman, J.L. Coubeils, P. Courriere, J.P. Gervois, *J. Med. Chem.*, **17**, 15-24 (1972).
19. B. Pullman, P. Courrière, H. Berthod, *Int. J. Quan. Chem. Quant. Biol. Symp.*, **1**, 93-97 (1974).
20. G.G. Hall, C.J. Miller, G.W. Schnuelle, *J. Theoret. Biol.*, **53**, 475-479 (1975).
21. G.A. Neville, R. Deslauriers, B.J. Blackburn, I.C.P. Smith, *J. Med. Chem.*, **14**, 717-721 (1971).
22. K. Bailey, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 1232-1238 (1971).
23. G.E. Wright, *Tetrahedron Lett.*, 1097-1099 (1973).
24. S. Kang, S.L. Johnson, J.P. Green, *Mol. Pharmacol.*, **9**, 640-646 (1973).
25. A.S. Horn, M.L. Post, O. Kennard, L. Riva di Sanseverino, *J. Pharm. Pharmac.*, **27**, 13-19 (1975).
26. E. Gouzoulis-Mayfrank, M.D. Hermle, *The Heffter Review of Psychedelic Research*, **1**, 46-51 (1998).
27. D. E. Nichols, *J. Psychoactive Drugs*, **18**, 305-313 (1986).
28. D.E. Nichols, D.H. Lloyd, A.J. Hoffman, M.B. Nichols, G.K.W. Yim, *J. Med. Chem.*, **25**, 530-533 (1982).
29. B. Sadzot, J.M. Baraban, R.A. Glennon, R.A. Lyon, S. Leonhardt, C.R. Jan, M. Titeler, *Psychopharmacol.*, **98**, 495-499. (1989).
30. R.A. Lyon, R.A. Glennon, M. Titeler, *Psychopharmacol.*, **88**, 525-526 (1986).
31. R.G. Parr, R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 7512-7516 (1983).
32. R.G. Parr, W. Yang, "*Density Functional Theory of Atoms and Molecules*", Oxford University Press, Oxford (1989).
33. R. Contreras, P. Fuentealba, M. Galván, P. Pérez, *Chem. Phys. Lett.*, **304**, 405-413 (1999).
34. P. Pérez, R. Contreras, *Chem. Phys. Lett.* **293**, 239-245 (1998).
35. J. Graton, M. Berthelot, C. Laurence, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 2130-2135 (2001).
36. G. A. Jeffrey, "*An Introduction to Hydrogen Bonding*"; Oxford University Press: New York and Oxford (1997).
37. S. Simon, M. Duran, J.J. Dannenberg, *J. Chem. Phys.*, **105**, 11024-11027 (1998).

38. U. C. Singh, P. A. Kollman, *J. Chem. Phys.*, **85**, 364-366 (1993).
39. K. Morokuma, K. Kitaura, "*Molecular interactions*", H. Ratajczak, W. J. Orville-Thomas, Eds.; Wiley: New York, 1, 2-7 (1980).
40. P. Schuster, "*The Hydrogen Bond*". Recent Development in Theory and Experiments, Ed. North-Holland, Amsterdam (1976).
41. J. Parra-Mouchet, R. Contreras, A. Aizman, *Int. J. Quant. Chem.*, **33**, 41-52 (1988).
42. P. Pérez, G. Zapata-Torres, J. Parra-Mouchet, R. Contreras, *Int. J. Quant. Chem.*, **74**, 387-394 (1999).
43. P. Jaque, A. Toro-Labbé, *J. Phys. Chem.*, **104**, 995-1003 (2000).
44. S. Hiromu, I. Tadashi, *Chem. Abstr.*, **84**, 79647g (1976).
45. S.K. Burt, C.W. Hutchins, J. Greer, *Curr. Op. In Struc. Biol.*, **1**, 213-218 (1991).
46. D. H. Aue, H.M. Webb, M.T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 318-325 (1976).
47. S. G. Lias, J. E. Bartmess, J. F. Liebman, J. L. Holmes, R. D. Levin, W. G. Mallard, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **17**, Suppl. I. (1988).
48. D.L. Nelson, V.L. Lucaites, D.B. Waincott, R.A. Glennon, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **359**, 1-6 (1999).
49. P. Desmuelles; L. C. Allen, *J. Chem. Phys.*, **72**, 4371-4379 (1980).
50. V. Barone, J. Tomasi, M. Cossi, *J. Compt. Chem.*, **19**, 404-417 (1998).
51. J. J. Danneberg, L. Haskaps, A. Masunov, *J. Phys. Chem. A*, **103**, 7083-7086 (1999).
52. J. Yin, M. Green, *J. Chem. Phys. A*, **102**, 7181-7190 (1998).
53. M. A. Lill, M. Hutter, V. Helms, *J. Chem. Phys. A*, **104**, 8283-8289 (2000).
54. J. Parra-Mouchet, W.H. Fink, C.P. Nash, *J. Phys. Chem.*, **89**, 524-532 (1985).
55. R. Contreras, P. Fuentealba, M. Galván, P. Pérez, *Chem. Phys. Lett.*, **304**, 405-413 (1999).

Capítulo V. Conclusiones generales

Debido a las dificultades para obtener estructuras cristalinas de proteínas insertas en membrana, entre las que se encuentran los receptores de 5-HT, así como las graves limitaciones de los modelos existentes [referencias], un aspecto fundamental de esta tesis se enfocó en la búsqueda de nuevas metodologías para contrarrestar el problema. En este sentido aplicamos una metodología que llamamos Fold-Fit, usando el campo de fuerzas *Valence Force Field* desarrollado por el grupo de Dauber-Osguthorpe y col. [1], la que nos permitió la construcción de las estructuras tridimensionales de los receptores de serotonina 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} a partir de la información sobre las estructuras primaria y secundaria disponible en literatura. Creemos que esta metodología, que combina el conocimiento acumulado en la literatura acerca de proteínas de membrana, produce estructuras tridimensionales hipotéticas más fidedignas para receptores acoplados a proteínas G.

Una limitación de la mayor parte de los modelos publicados consiste en que no han tomado en cuenta los lazos conectivos. Nosotros incorporamos estas secuencias de péptido exitosamente. La inclusión de moléculas de agua al interior del sitio de unión para recrear el ambiente de los ligandos también nos permitió una representación más realista de los receptores. Hay que señalar que en las simulaciones la incorporación de moléculas de agua es de gran importancia, ya que desde nuestra perspectiva estas moléculas pueden considerarse como residuos "introducidos" en el sentido que mantienen la integridad del sitio de unión, además de aportar a la energía de unión ligando-receptor como cualquier otro residuo.

Claramente la combinación de los datos experimentales con el conocimiento de la dinámica de proteínas y su plegamiento es un punto de partida. Otros modelos publicados han basado la construcción del modelo en dinámica molecular clásica para verificar los mismos. Sin embargo, la dinámica molecular clásica no es una metodología suficientemente poderosa como para permitir una búsqueda exhaustiva de nuevas conformaciones. Nosotros usamos además de la dinámica molecular clásica una nueva metodología [2] denominada dinámica molecular selectivamente aumentada (SEMD) que nos permitió encontrar conformaciones de los receptores distintas de las de partida sin incurrir en una inversión inaceptable de tiempo computacional.

En el proceso de "docking" de ligandos agonistas en los modelos obtenidos para los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, los ligandos escogidos pertenecen a las tres clases más importantes, i.e. derivados de triptamina, fenilisopropilaminas y ergolinas. El "docking" de estos ligandos fue guiado usando la información experimental obtenida de receptores con mutaciones sitio dirigidas. En ambos modelos de receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, los agonistas interactúan con distintos tipos de residuos en varias hélices. Sin embargo, los ligandos no presentan afinidades muy distintas por ambos receptores, y según nuestros modelos, estos sitios de enlace difieren muy poco para los agonistas estudiados, conservándose principalmente las interacciones descritas en la literatura. Cabe destacar que, a pesar de que ambos receptores de 5-HT tienen residuos conservados en las mismas posiciones, la contribución a la energía de interacción de éstos no es la misma, lo que podría dar cuenta de las diferencias en las afinidades presentadas por los ligandos, las cuales a pesar de ser distintas se correlacionan en ambos receptores. También, la mayor afinidad que presentan los ligandos por los receptores 5-HT_{2A} respecto de los 5-HT_{2C} puede ser interpretada a la luz de los resultados obtenidos en este estudio.

La interacción con mayor relevancia observada en esta tesis es de carácter electrostático y se establece entre el grupo amonio de los ligandos y el residuo de Asp¹⁵⁵ del receptor 5-HT_{2A} (Asp¹³⁴ del receptor 5-HT_{2C}). Para los demás residuos que interactúan con los ligandos en el sitio de unión también existe un buen acuerdo, aunque éstos contribuyen menos a la energía. Las interacciones de largo alcance predominan en la energía de interacción de los residuos vecinos al anillo indólico de 5-HT, al anillo bencénico de los 1-(2,5-dimetoxi-4-X-fenil)-2-aminopropanos (X = -Br, -NO₂, -CN) o el anillo de la ergolina en el caso del LSD o 2-Br-LSD. El análisis de las energías involucradas en las estructuras minimizadas obtenidas a través del proceso de "docking" muestra un buen acuerdo con los resultados experimentales descritos en la literatura.

A pesar de las limitaciones en los procedimientos de construcción, los modelos para receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} entregan resultados que están de acuerdo en líneas generales con los datos experimentales disponibles de afinidad y selectividad para agonistas. Estos modelos integran y evalúan la información obtenida de varios modelos postulados anteriormente, y por lo tanto constituyen una extensión y refinamiento de los mismos. Muestran que en el enlace de agonistas, a pesar de ser estructuralmente parecidos, a veces basta con el reemplazo de un grupo (i.e un átomo de halógeno por un grupo polar) para cambiar la afinidad. Por tanto, el

"docking" de ligandos no debe tomar en consideración sólo la estructura sino también las características funcionales de los ligandos.

El trabajo químico cuántico se centró en la descripción de la superficie de energía potencial de ligandos serotoninérgicos y en un estudio sistemático de la interacción ligando-aspartato a través de un enlace por hidrógeno. Elegimos un sistema modelo, amoniaco/amoniocácido fórmico/formiato, para estudiar la posición relativa del equilibrio tautomérico en el vacío y en la presencia de campos eléctricos. Los resultados aplicados a una familia de ligandos serotoninérgicos dio como resultado un mejor entendimiento de la influencia de los cambios estructurales de éstos.

Demostramos también que las metodologías desarrolladas en el marco de la aproximación Hartree-Fock-Roothan proveen una buena descripción de la superficie de energía potencial y de las estructuras electrónicas de ligandos serotoninérgicos. En particular el hamiltoniano AM1 recupera los resultados experimentales de espectros RMN de ^1H .

Los aspectos más relevantes del trabajo químico cuántico tienen relación con los descriptores moleculares de la basicidad, al menos de aminas, frente a la protonación. La primera conclusión es que el HOMO, utilizado profusamente en la literatura actual, no es siempre el orbital molecular donde deben medirse los descriptores moleculares de reactividad, sino en los orbitales moleculares que participan directamente en la interacción. En el caso de la interacción amina - ácido fórmico, es indudable que el orbital molecular que representa al par electrónico libre es aquél que debe ser considerado, con el objeto de medir algún índice de reactividad como base de estos compuestos; lo mismo ocurre con el formiato correspondiente. Este orbital puede ser fácilmente ubicado, como aquél que exhibe la carga más alta sobre el átomo de N entre los orbitales moleculares ocupados de más alta energía, la cual formalmente está dada por la función de Fukui nucleofílica [3].

En resumen, examinamos descriptores moleculares de la basicidad de aminas y demostramos que la aproximación de core rígido no es aplicable a sistemas cuyo HOMO pertenezca al sistema π y el grupo amino al sistema σ .

En esta tesis proponemos:

a). que dichos descriptores sean medidos en el orbital molecular que representa el par electrónico libre sobre el átomo de nitrógeno del grupo amino.

b) que el valor propio de la energía del orbital molecular anteriormente mencionado constituye un descriptor molecular de la basicidad de aminas en general y, en particular, para los ligandos serotoninérgicos, y es aplicable tanto a sistemas aislados como condensados o en la presencia de campos eléctricos.

Finalmente, en esta tesis hemos logrado un mejor entendimiento de la interacción ligando-Asp como sistema aislado, tanto como en la presencia de campos eléctricos que pueden ser creados por los fragmentos moleculares, por moléculas de agua, etc, que existen en el sitio de unión del ligando. Las interacciones ligando – ácido fórmico, estudiadas en sistemas aislados y en solventes polares, mostraron acuerdo con los datos experimentales. La inclusión de cargas puntuales, como modelos de campos eléctricos creados por residuos y/o moléculas de agua estructurales, nos permitieron obtener una mayor comprensión de la interacción ligando – aspartato, incluyendo un posible mecanismo de activación o desactivación del receptor en lo que respecta a la unión o disociación del ligando.

Las proyecciones de esta tesis son varias. Entre ellas se destaca la posibilidad de usar los modelos estructurales obtenidos en estudios más rigurosos de análisis de cambios conformacionales en estos receptores para analizar posibles mecanismos de activación de proteínas G, estudiar interacciones del tipo proteína-proteína, y además proveer una estructura para el estudio y racionalización de la interacción con otros ligandos, el diseño de nuevos ligandos serotoninérgicos, la propuesta de estudios experimentales de mutación, etc.

En lo que respecta a los nuevos parámetros de reactividad obtenidos, éstos permitirán analizar la reactividad de nuevos ligandos serotoninérgicos y de aminas en general tanto en medios condensados como en el vacío. Además, nuestro modelo de cargas puntuales puede ser aplicado a sistemas reales en los que existen muchas otras interacciones provenientes de otros residuos, los que pueden ser convenientemente representados por este modelo.

V.1 Referencias

1. P. Dauber-Osguthorpe, V.A. Roberts, D. J. Osguthorpe, J. Wolf, M. Genest, A. T. Hagler, *Prot. Struc. Func. Gen.*, **4**, 31-40 (1988).
2. P. Dauber-Osguthorpe, D. J. Osguthorpe, P. S. Stern, J. Moulton, *J. Comp. Phys.*, **151**, 169-189 (1999).
3. R. Contreras, P. Fuentealba, M. Galván, P. Pérez, *Chem. Phys. Lett.*, **304**, 405-413 (1999).

Apéndice II. Metodología

A II.1 Métodos Mecano-cuánticos

En este capítulo se hará un breve resumen de la metodología mecano-cuántica [1,2], así como de sus principales ventajas e inconvenientes. Hablaremos de las técnicas que usan la teoría de orbitales moleculares, ya que son las más ampliamente utilizadas. De modo general no existe un método cuántico que permita resolver o pueda ser aplicable a todo el abanico de problemas químicos.

Dado que las propiedades de una superficie de energía potencial (SEP) (topografía, naturaleza y posición de los puntos estacionarios) pueden depender del método de cálculo utilizado, las conclusiones que se pueden extraer acerca del mecanismo de una reacción química por ejemplo pueden diferir dependiendo del tipo de aproximación utilizada. Para el cálculo de una SEP [3] un método debe satisfacer ciertos requisitos; este debe reproducir:

- Energías relativas de reactivos.
- La curvatura de SEP en las zonas de los puntos estacionarios.
- Las características geométricas de dichos puntos.

Los métodos semiempíricos, por ejemplo, se desarrollaron con el objeto de calcular algunas propiedades moleculares y satisfacer adecuadamente sólo algunos de los requisitos mencionados; por ende las conclusiones que se extraigan deben tratarse con precaución.

A grandes rasgos, podemos hacer una clasificación de los métodos cuánticos en tres clases:

- *ab initio*
- Funcionales de la densidad
- Semiempíricos

Muchas de las características de los dos primeros métodos son similares, siendo la principal diferencia la forma de tratar los términos que aparecen en las diferentes ecuaciones. Los

métodos *ab initio* calculan todos los términos usando técnicas numéricas y/o analíticas con una precisión limitada solo por el programa o el computador; mientras que los métodos semiempíricos utilizan parámetros experimentales u otros criterios para asignar o descartar ciertos términos en las fórmulas.

A II 1.1 Métodos *ab initio*

Los métodos *ab initio* [4,5] buscan la solución de la ecuación de Schrödinger con el mínimo de aproximaciones posibles, sin el uso de datos semiempíricos. Lo que los distingue del resto de los métodos de cálculo es que son potencialmente exactos. Es posible, además, mejorar un resultado elevando de modo adecuado el nivel de cálculo, cosa que no sucede en los métodos semiempíricos, cuyas mejoras dependen de las aproximaciones usadas y datos experimentales usados por el autor del programa. Los métodos *ab initio* son capaces, en principio, de describir cualquier estado de una molécula, aunque en la práctica la potencia del computador sigue constituyendo un límite. Además, todos los programas deberían dar la misma respuesta a un problema dado, siempre y cuando sea capaz de realizar dicho cálculo. La principal desventaja de este tipo de métodos sigue siendo la gran cantidad de tiempo calculado que requieren.

La ecuación de Schrödinger independiente del tiempo para una molécula poliatómica viene dada por:

$$\hat{H}\Psi(q_i, q_\alpha) = E\Psi(q_i, q_\alpha)$$

1

$$\hat{H} = \left(-\frac{\hbar^2}{2} \sum_{\alpha} \frac{1}{m_{\alpha}} \nabla_{\alpha}^2 - \frac{\hbar^2}{2m} \sum_i \nabla_i^2 + \hat{V}(q_i, q_{\alpha}) \right)$$

Donde el término correspondiente a la energía potencial es:

$$\hat{V}(q_i, q_\alpha) = \sum_{\alpha} \sum_{\beta} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta} e^2}{r_{\alpha\beta}} - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e^2}{r_{\alpha i}} + \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{e^2}{r_{ij}} \quad \boxed{2}$$

En este punto se introduce la aproximación de Born-Oppenheimer, mencionada anteriormente, en la que se suponen a los núcleos como masas puntuales e infinitamente pesadas, y dado que los electrones se mueven mucho más rápidos que éstos, en una buena aproximación podemos considerar los núcleos estáticos. En el hamiltoniano del sistema esto se traduce en la separación de la función de onda nuclear y la electrónica (3).

$$\hat{H}_{el} \Psi_{el} = \left(-\frac{\hbar^2}{2m} \sum_i \nabla_i^2 - \sum_{\alpha} \sum_i \frac{Z_{\alpha} e^2}{r_{i\alpha}} + \sum_i \sum_{j \neq i} \frac{e^2}{r_{ij}} \right) \Psi_{el} = E_{el} \Psi_{el} \quad \boxed{3}$$

Siendo ahora Ψ_{el} así como E_{el} dependientes de las coordenadas de los núcleos, pero de modo paramétrico.

Aún habiendo despreciado el movimiento de los núcleos (aproximación que en la mayoría de los casos proporciona buenos resultados), la ecuación de valores propios () no se puede resolver exactamente de modo analítico, ya que la presencia del término de interacción electrón-electrón en la energía potencial hace imposible llevar a cabo una separación de variables de modo que pudiéramos expresar Ψ como un producto de funciones de onda para cada uno de los electrones.

La solución a este problema la proporcionó D. Hartree y fue posteriormente modificada por J. Slater y V. Hock de modo que se cumpliera del principio de exclusión de Pauli. Inicialmente esta metodología se aplicó para la resolución de átomos poli electrónicos, en donde también aparece el término de repulsión electrónica, y la única diferencia es que el hamiltoniano completo es el correspondiente a la ecuación (), al no existir el término de repulsión nuclear. La idea básica es que cada electrón se mueve bajo la influencia de un campo creado por los núcleos y el resto de los electrones.

Los coeficientes de esta expansión para los distintos estados del sistema con sus correspondientes energías, se obtienen al resolver la ecuación de Rotan, resultante de aplicar el método variacional lineal a Ψ_{OM} :

$$\sum_{j=1}^n (F_{ij} - \epsilon_i S_{ij}) c_j = 0 \quad i = 1, \dots, n \quad 7$$

en donde F_{ij} es la integral $\langle \phi_i | F | \phi_j \rangle$ correspondiente al operador de Fock que, referido a un electrón determinado, está formado por el operador de la energía cinética de dicho electrón, el operador energía potencial para las atracciones entre el electrón y los núcleos, el operador de Coulomb correspondiente a la energía potencial de repulsión generada por el resto de los electrones; mientras S_{ij} corresponde a la integral de solapamiento entre los orbitales i, j .

La ventaja de este método reside en la simplificación del cálculo SCF, ya que ahora las funciones son fijas y no varían en el proceso iterativo, siendo los coeficientes lo único que se va optimizando.

Entre los distintos tipos de bases que se pueden usar, las que mejores resultados dan son las formadas por un factor exponencial u orbitales tipo Slater (STO):

$$\phi_k = r^n e^{-\alpha r} Y_{lm}(\theta, \phi)$$

8

El problema de estas funciones reside en que son poco apropiadas para el cálculo integral ya que consumen mucho tiempo de CPU. El segundo tipo de orbitales son los representados por gaussianas (GTO), introducidos por Boys, que representan peor los orbitales atómicos que los STO, pero tienen la ventaja de que todas las integrales de los cálculos pueden evaluarse analíticamente sin necesidad de realizar una integración numérica. Generalmente, se opta por usar una combinación lineal de funciones gaussianas para obtener las funciones de

base. En este caso las funciones obtenidas se llaman gaussianas contraídas (ϕ_k) y a las funciones que se emplean para hacer la combinación lineal se denominan gaussianas primitivas (χ_i):

$$\Psi_{OM} = \sum_k c_k \phi_k = \sum_k c_k \sum_i d_{ki} \chi_i$$

9

Se obtienen mejores resultados cuantas más funciones de base escojamos, pero obviamente el tiempo necesario para el cálculo será mayor. Este criterio nos permite clasificar los distintos tipos funciones base existentes en los programas de cálculo.

A II 1.1.1 Base Mínima

En este caso se usan únicamente las funciones necesarias para distribuir los electrones de los átomos que forman las moléculas. Por ejemplo, el grupo [B,C,N,O,F,Ne] usarían cinco gaussianas ϕ_k correspondientes a los orbitales 1s 2s 2p_x 2p_y 2p_z. Nótese como en el caso de los orbitales p se añaden los tres aunque no estén ocupados. La experiencia, sin embargo, aconseja expandir esta base para algunos casos. La base mínima comúnmente utilizada es la STO-3G, en la que cada orbital atómico se representa mediante una combinación lineal de 3 gaussianas primitivas (χ_i), que se eligen de modo que simulen un orbital de Slater.

La ventaja de este tipo de base es que los cálculos son rápidos, pero los resultados no son muy precisos, sobretodo en lo que se refiere a vibración y ángulos de enlace.

A II 1.1.2 Conjunto de funciones de base de partición de la capa de valencia

Conocidas también por su nombre de Split-Valence, en estos conjuntos se duplica el número de gaussianas contraídas que representan orbitales de valencia. En el caso de los elementos del segundo periodo, el número de gaussianas contraídas es 9 1s 2s 2s' 2p_x 2p_y 2p_z 2p_x' 2p_y' 2p_z'. Un ejemplo es el conjunto 3-21G en el que se usan tres funciones gaussianas para describir el core (1s), 2 para los conjuntos 2s y 2p, y una para los 2s' 2p'.

A II 1.1.3 Conjuntos de bases extendidos

- Conjunto de base Doble Z

Se duplica el número de gaussianas contraídas de todos los orbitales (no sólo los de valencia). Así los elementos del segundo periodo estarán representados por 10 ϕ_k : $1s$ $1s'$ $2s$ $2s'$ $2p_x$ $2p_y$ $2p_z$ $2p_x'$ $2p_y'$ $2p_z'$.

- Conjunto de funciones de base con polarización

Consiste en introducir funciones gaussianas contraídas de mayor número cuántico angular a las necesarias (generalmente en la capa de valencia), de modo que el efecto resultante sea una expansión del volumen donde está situado el electrón. Se indica con un asterisco cuando se añaden funciones de tipo *d* para todos excepto para el hidrógeno; y se utilizan dos asteriscos cuando se utilizan, además, funciones de tipo *p* para los átomos de hidrógeno. Ejemplos son los conjuntos 6-31G* y 6-31G**. Dichas funciones continúan estando centradas en los núcleos, pero obtenemos funciones más flexibles para describir sistemas polares, etc.

- Conjunto de funciones de base difusas

En este caso se añaden más funciones de tipo *sp* al conjunto de número principal cuántico mayor, con lo que ganamos electronegatividad en el átomo. Este tipo de funciones se emplea para describir sistemas cargados negativamente. Se emplea un signo (+) cuando se introduce un juego de funciones difusas consistente en un orbital del tipo *sp* para todos excepto el átomo de hidrógeno, o dos signos (++) en el caso de introducir dos juegos *sp* para todos los átomos. Un ejemplo es el conjunto 6-31++G**.

Respecto al tipo de función de onda SCF, existen casos -como los de capa abierta- en los que el uso de una función de onda correspondiente a un estado singlete no resulta adecuado, por no ser capaz de describir al sistema, y habría que realizar una combinación lineal de determinantes de Slater con todas las posibles combinaciones de electrones desapareados. Sin

embargo, para los estados energéticos más bajos de sistemas radicalarios podemos seguir usando una aproximación monodeterminantal.

Los tipos de funciones de onda SCF son:

- Restricted Hartree-Fock (RHF) o de capa cerrada, todos los orbitales están doblemente ocupados. Cada par de spin-orbitales tiene la misma función espacial.

$$\Psi_{\text{RHF}} = \left| \phi_1^2 \phi_2^2 \phi_3^2 \phi_4^2 \dots \phi_n^2 \right| \quad \boxed{10}$$

- Unrestricted Hartree-Fock (UHF) o de capa abierta: los orbitales están ocupados por un sólo electrón. Este tipo de funciones permiten obtener generalmente mejores valores de energía, pero las funciones de onda que se obtienen no siempre son funciones propias del operador de spin, por lo que no son estados electrónicos puros (se describe una mezcla de estados electrónicos). En este caso los pares spin-orbital no tienen necesariamente la misma parte espacial.

$$\Psi_{\text{UHF}} = \left| \phi_1^\alpha \phi_1^\beta \phi_2^\alpha \phi_2^\beta \phi_3^\alpha \phi_3^\beta \dots \phi_n^\alpha \right| \quad \boxed{11}$$

- Restricted Open Hartree-Fock (ROHF) o de capa abierta de spin alto: algunos de los orbitales están doblemente ocupados, y algunos sólo por un electrón, pero siempre con el mismo spin.

$$\Psi_{\text{ROHF}} = \left| \phi_1^2 \phi_2^2 \dots \phi_m^2 \phi_{m+1}^\alpha \dots \phi_n^\alpha \right| \quad \boxed{12}$$

En función con el problema que encontramos deberemos, obviamente, utilizar el tipo de función de onda que mejor describa el sistema. La siguiente Figura AII.1 esquematiza esta clasificación en función del spin.

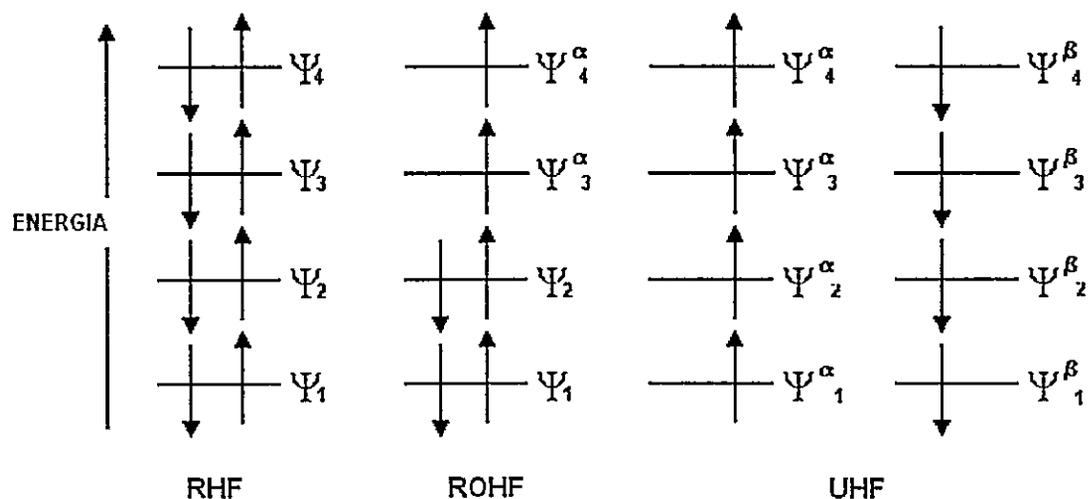


Figura A II.1 Representación de las distintas funciones de onda, en función al tratamiento que se le da al spin electrónico

Los cálculos SCF, aunque permiten una descripción sencilla de las moléculas, solo ofrecen soluciones relativamente precisas para estructuras próximas al equilibrio, y no siempre. Mientras que las distancias de enlace para estados fundamentales son bastante aceptables (el error cometido es inferior al 1%), pocas propiedades más pueden calcularse con un error por debajo del 10% (frecuencias de vibración, distribuciones de carga o momentos dipolares). Una función de onda SCF Hartree-Fock tiene en cuenta las interacciones entre los electrones de forma promediada, debiéndose considerar las interacciones instantáneas entre los electrones, ya que realmente los electrones se repelen apartándose unos con otros. Debido a esta interacción se habla de hueco de Coulomb como la región que rodea a un electrón en un átomo, en la que la probabilidad de encontrar un electrón distinto de éste es bastante pequeña.

La mejora de un cálculo SCF puede realizarse de dos modos. Si la descripción SCF del sistema es cualitativamente correcta se pueden aplicar métodos perturbativos tales como los métodos Möller-Plesset de orden n (MP n). Si el tratamiento SCF no es aceptable para el problema que tratamos será necesario introducir en la función de onda del sistema más de un determinante de Slater. A este tipo de métodos pertenecen el de interacción de configuraciones (CI) o los multiconfiguracionales (MCSCF).

Obviamente cabe mencionar que si un cálculo SCF no resuelve un problema particular, los métodos semiempíricos tampoco serán adecuados dado que son métodos SCF parametrizados.

A II 2 Métodos DFT

Un tratamiento alternativo al SCF es la *Teoría de Funcionales de Densidad* (DFT) [6,7] En ésta, se reescribe el hamiltoniano electrónico de la ecuación de Schrödinger en función de la densidad electrónica, $\rho(r)$, evitando así el cálculo de la función de onda electrónica. Además, una vez conocida la expresión exacta de $\rho(r)$, de los extremos correspondientes a máximos se puede obtener la posición de los núcleos, e incluso a partir del gradiente en dichos puntos, $|\nabla\rho(r)|$, podrían obtenerse las cargas.

Para un sistema formado por N electrones, la densidad electrónica se define como:

$$\rho(r) = N \int \dots \int |\Psi|^2 ds_1 dx_2 \dots dx_n \quad \boxed{13}$$

$$\int \rho(r) d_r = N \quad \boxed{14}$$

Donde $\Psi(x_1, \dots, x_N)$ correspondería a la función de onda electrónica de la molécula.

Hohenberg y Kohn [8] demostraron que existe una relación directa de isomorfismo entre la densidad electrónica $\rho(r)$ y el potencial externo, de modo que uno determina al otro. Esto nos permite expresar la energía en función de la densidad.

$$E(\rho) = V_{ne}(\rho) + T(\rho) + V_{ee}(\rho)$$

$$E(\rho) = \int v(r)\rho(r)dr + T(\rho) + V_{ee}(\rho)$$

15

16

Donde $T(\rho)$ es la energía cinética, $V_{ne}(\rho)$ es la energía de interacción núcleo-electrón y $V_{ee}(\rho)$ es la energía de interacción electrón-electrón que contiene la interacción coulombica $J(\rho)$:

$$J(\rho) = \frac{1}{2} \iint \frac{1}{r_{12}} \rho(r_1) \rho(r_2) dr_1 dr_2$$

17

Los dos términos, T y V_{ee} son una función universal de la densidad, ρ , y al no depender del potencial externo, $v(r)$, son idénticos para los dos sistemas.

El segundo teorema de Hohenberg y Kohn nos permite introducir el principio variacional, aunque nos restrinja a estados fundamentales: cualquier densidad aproximada ρ determina su propio hamiltoniano y su propia función de onda Ψ .

$$\langle \hat{\Psi} | \hat{H} | \hat{\Psi} \rangle = E(\hat{\rho}) = \int v(r)\hat{\rho}(r)dr + T(\hat{\rho}) + V_{ee}(\hat{\rho}) \geq E(\rho)$$

18

La importancia de este teorema radica en su practicidad, i.e., si poseemos una buena representación de la función densidad, podemos minimizarla para obtener los mejores orbitales y la energía.

Kohn y Sham [9] introdujeron la idea de considerar la función de onda determinantal para N electrones *no-interaccionantes* en N orbitales (ϕ_i). Para dicho sistema la energía cinética y la densidad electrónica viene dada exactamente por:

$$T_s(\rho) = \sum_i^N \langle \phi_i | -\frac{1}{2} \nabla^2 | \phi_i \rangle \quad \boxed{19}$$

$$\rho(r) = \sum_i^N |\phi_i(r)|^2 \quad \boxed{20}$$

Siendo la energía del sistema:

$$E(\rho) = T_s(\rho) + \int v_s(r) \rho(r) dr \quad \boxed{21}$$

Para nuestro sistema en el si interaccionan los electrones, podemos expresar la energía como:

$$E(\rho) = \int v(r) \rho(r) dr + T_s(\rho) + J(\rho) + [T(\rho) - T_s(\rho)] + [V_{cc}(\rho) - J(\rho)] \quad \boxed{22}$$

Si definimos ahora la energía de intercambio y correlación, E_{xc} , como:

$$E_{xc}(\rho) = [T(\rho) - T_s(\rho)] + [V_{cc}(\rho) - J(\rho)] \quad \boxed{23}$$

siendo:

$$v_{xc}(\rho) = \frac{\partial}{\partial \rho(r)} E_{xc}(\rho) \quad \boxed{24}$$

Transformamos el problema de N electrones interaccionantes en uno en el que éstos no interactúan, cuya ecuación de valores propios es:

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 + v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + v_{xc}(r) \right] \phi_i = \varepsilon_i \phi_i \quad \boxed{25}$$

Dado que $\rho(r)$ queda determinada por la ecuación (22), lo único que resta es obtener la expresión de $E_{xc}(\rho)$.

En la parte concerniente a los algoritmos utilizados en el cálculo, las ecuaciones de Kohn y Sham son similares a las SCF, de modo que se expresan los orbitales ϕ_i en forma de expansión lineal de gaussianas, reduciendo la ecuación de Schrödinger a un determinante secular:

$$\phi_i = \sum_{\alpha} c_{i\alpha} \eta_{\alpha} \quad \boxed{26}$$

$$\sum_{\beta} c_{i\beta} \langle \eta_{\alpha} \left| -\frac{1}{2}\nabla^2 + v(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + v_{xc}(r) - \varepsilon_i \right| \eta_{\beta} \rangle = 0 \quad \boxed{27}$$

Aquí cabe recordar que el potencial de intercambio HF no es local ni multiplicativo, mientras que en DFT, si la energía de intercambio-correlación se expresa en términos de ρ y $\nabla\rho$, entonces dicho potencial de correlación es local y multiplicativo.

Otro aspecto interesante es que el procedimiento **SCF** se puede hacer sólo en el caso que la función de onda sea **RHF** o **UHF**. El método **ROHF** no es apropiado dado que la teoría DFT es formalmente exacta, y debe ser capaz de predecir el exceso de densidad β -spin en algunos núcleos. Además, dado que la función de onda DFT no observa el spin, no se puede

calcular la cantidad $\langle \psi | S^2 | \psi \rangle$, que proporciona una medida de la contaminación debida al spin en los cálculos SCF no restringidos.

Actualmente el problema de estos métodos reside en la dependencia exacta de Exc respecto a la densidad, siendo la más utilizada la aproximación B3LYP. Ésta se caracteriza por ser una modificación de la expresión de Exc que se obtiene para el gas de electrones uniforme[†] (*Local Density Aproximation*), introduciendo el gradiente de la densidad (Becke) como corrección al intercambio electrónico (rompiendo así la homogeneidad del modelo LDA), y términos de correlación (Lee-Yang-Parr) obtenidos en las aproximaciones para la energía de correlación del helio.

Desde este punto de vista, la DFT puede ser sólo una teoría semiempírica, ya que es posible que nunca se encuentre la expresión exacta para el funcional de intercambio y correlación; sin embargo, sería el mejor ya que los parámetros introducidos no dependen del sistema molecular.

Finalmente comentar que al contrario de los métodos basados en la teoría de Hartree-Fock, no hay manera de mejorar sistemáticamente la calidad de las energías DFT, ya que se producen modificaciones en el Hamiltoniano, en lugar de aproximar la función de onda como se hace en los cálculos *ab initio*.

A II.3 Métodos Semiempíricos

En este tipo de métodos [1,2,4] se busca reducir el tiempo necesario para realizar el cálculo *Ab initio*, del cual cerca del 70% de la CPU se destina al cálculo de integrales de interacción electrónica del tipo:

$$\iint f_r^*(i) f_s(i) \frac{1}{r_{ij}} f_t^*(j) f_u(j) dv_i dv_j \equiv (rs|tu)$$

28

De entre las distintas posibilidades, la que trataremos se basa en reemplazar la mayoría de estas integrales por parámetros experimentales (como pueden ser potenciales de ionización,

calores de formación, etc.) y el uso de varias expresiones aproximadas que emplean dichos parámetros para evaluar las integrales; y de éstos, aquellos métodos que son autoconsistentes SCF, donde se resuelven iterativamente las ecuaciones de Roothaan.

Prácticamente todos los métodos semiempíricos son métodos de aproximación de valencia, es decir, se toma en cuenta únicamente los electrones de valencia y las capas de orbitales atómicos de valencia. La influencia de los electrones del core se incluye en los parámetros empíricos. El hamiltoniano del electrón de valencia, para un sistema de n electrones de valencia, tiene la forma:

$$\hat{H}_{\text{val}} = \sum_{i=1}^n \left(-\frac{1}{2} \nabla_i^2 + V_i \right) + \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad \boxed{29}$$

donde V_i es la energía potencial del electrón de valencia i en el campo de los núcleos y electrones de capas internas, y la cantidad entre paréntesis es el \hat{H}_{core} .

Cuando se expresa cada OM como una combinación lineal de OA, las integrales de Coulomb y de intercambio que aparecen en la resolución de las integrales de la ecuación de Roothaan se transforman en combinaciones lineales de repulsión de dos electrones ($rs | tu$) para los orbitales atómicos.

Los diferentes métodos semiempíricos difieren en los procedimientos de parametrización, así como en el carácter y número de integrales cuyo cálculo es despreciado.

El método CNDO (Complete Neglect Differential Overlap) [10] emplea una base mínima de orbitales atómicos de valencia de Slater con exponentes orbitales fijos para cada átomo. Dicho método se basa en la aproximación ZDO (Zero Differential Overlap), la cual desprecia el solapamiento producido entre los distintos orbitales de un mismo átomo:

$$S_{rs} = \int f_r(\mathbf{1}) f_s(\mathbf{1}) d\mathbf{v}_1 = 0 \quad r \neq s \quad \boxed{30}$$

Teniendo en cuenta la ecuación anterior, podemos expresar las integrales de repulsión electrónica como:

$$(rs|tu) = \delta_{rs} \delta_{tu} (rr|tt) = \delta_{rs} \delta_{tu} \gamma_{rr}$$

31

Así pues, el método ignora muchas, pero no todas las integrales de este tipo, aunque solo se aplica a integrales mono y bicéntricas, despreciando las de tres y cuatro centros. Usualmente dichas integrales γ_{rr} se tratan como parámetros empíricos en lugar de evaluarlas.

Por otro lado, las integrales del hamiltoniano del core se pueden aproximar usando datos experimentales como pueden ser potenciales de ionización atómica y afinidades electrónicas, o tomando algunos de ellos como parámetros ajustables de modo que los resultados se ajusten a los proporcionados por los métodos *Ab initio* de base mínima.

$$\beta_{rs}^{\text{core}} = \langle f_r(i) | \hat{H}_{\text{core}}(i) | f_s(i) \rangle$$

$$\alpha_r^{\text{core}} = \langle f_r(i) | \hat{H}_{\text{core}}(i) | f_r(i) \rangle$$

32-33

En el método INDO [11], que se supone una mejora respecto del método CNDO, no se desprecia el solapamiento diferencial entre los OA de un mismo átomo en las integrales de repulsión electrónica -como en el caso anterior- de un centro, pero sí en las de dos centros. Este método proporciona mejores resultados que el anterior, sobretodo cuando es importante la distribución del spin electrónico (como puede ser en el cálculos de espectros ESR). En lo que se refiere a resultados ambos dan generalmente ángulos de enlace molecular precisos, así como longitudes de enlace, pero energías de disociación inexactas.

A finales de los sesenta, aparecieron dos nuevas aproximaciones: la teoría PNDO (Partial Neglect Differential Overlap) por Dewar y Klopman [12], y el MINDO/1 (primera versión del INDO modificado) por Dewar y Baird [13,14]

Ambas coinciden en la elección de los parámetros, de modo que los valores de formación calculados se ajusten lo más posible a datos experimentales. Por otro lado el hecho de aplicar esta condición de contorno tiene como consecuencia una pérdida de precisión en el cálculo de

geometrías moleculares, así como la sobreestimación en la estabilidad de pequeños ciclos y mala descripción de los enlaces de hidrógeno.

El método MNDO, basado en la aproximación NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap), no emplea parametrización para las integrales de resonancia β_{rs} (3.51), y aunque el número de integrales de interacción interelectrónica aumenta de modo considerable (los tiempos de CPU son 1.5 veces más largos que los requeridos por el método MNDO/3), el número de parámetros se ve reducido considerablemente y ofrece por norma general mejores resultados.

Dentro de ésta misma aproximación (NNDO), se encuentran los métodos AM1 (Austin Model 1, desarrollado por Dewar) [15] y PM3 (desarrollado por Stewart) [16], cuya principal diferencia consiste en la parametrización, y que introduce mejoras notables en la descripción de enlaces por hidrógeno, energías de activación, etc., respecto al método MNDO, aproximándose más a los resultados Ab initio.

En general dado que los métodos semiempíricos intentan reproducir los resultados de los cálculos OM SCF ab initio con menor esfuerzo, los resultados también tendrán lo bueno y lo malo de las funciones SCF: buenas geometrías, pero energías de enlace deficientes. No obstante la elección adecuada de los parámetros puede dar lugar a la obtención de resultados mejores que los obtenidos vía SCF ab initio, ya que a través de estos parámetros puede compensarse, en cierta manera, la falta de correlación electrónica.

A II.4 Efecto del medio

A II.4.1 Modelos de Continúo

La introducción de los efectos del medio se hace necesario debido a que es posible observar como los caminos de reacción en solución o en medios enzimáticos suelen diferir de aquellos análogos en fase gas o solventes no polares incluso en aquellos casos en que el agua no juega un papel estructural o catalítico en la reacción.

Entre las distintas teorías se pueden distinguir dos líneas de trabajo; la teoría de la solvatación, que pretende obtener cantidades observables del sistema, como energías de solvatación, y suelen estar basados en los métodos clásicos, y la teoría del efecto solvente la

cual se base en determinar como afecta el medio a la función de onda del soluto. En esta apartado nos centraremos en la teoría del efecto del solvente, intentando dar en todo momento una visión general del método. Un tratamiento de este efecto con mayor profundidad se encuentra en las referencias [17-20].

Una de las formas más sencillas actualmente de estimar el efecto del solvente sobre la función de onda del soluto es el empleo de modelos de continuo. Estos modelos se basan en aproximar el solvente a un medio continuo dieléctrico e infinito en el cual se genera una cavidad donde irá alojado el soluto. Es importante resaltar que la forma de dicha cavidad influirá de modo determinante en las propiedades termodinámicas que se calculen. De hecho la forma de dicha cavidad así como el modo de calcular su distribución de carga superficial son actualmente la principal diferencia entre los diversos métodos, aunque como veremos más adelante el cálculo de la energía de solvatación no depende únicamente de estos factores.

El proceso empleado para calcular la variación de energía libre que se produce al solvatar una molécula consta de tres pasos:

1. Partimos de un sistema formado por un solvente puro y una molécula de soluto aislada.
2. Se genera una cavidad en el solvente donde se introducirá el soluto posteriormente. La variación de energía libre de esta etapa se denomina energía de cavitación : ΔG_{cav} . Éste último sólo depende del solvente y de las propiedades geométricas de la cavidad y siempre es una cantidad positiva.
3. Se posiciona una molécula en la cavidad. La variación de energía libre correspondiente a este paso puede descomponerse a su vez en otras contribuciones:
 - 3.1 Si consideramos a la molécula como un cuerpo rígido con las misma estructura electrónica y nuclear que la correspondiente en fase gas, el campo electrónico generado en los alrededores de la molécula polariza el continuo. Como consecuencia aparece un término de potencial electrostático en la cavidad. Este potencial de reacción interaccionará nuevamente con la molécula.
 - 3.2 Otra consecuencia del potencial de reacción aparece al relajar el soluto. Dicho potencial produce una perturbación induciendo a una variación en la estructura electrónica y nuclear de partida. Obviamente este nuevo cambio en el soluto provoca una nueva polarización en la cavidad del solvente. En la práctica se considera usualmente la suma

de las dos variaciones de energía libre como la contribución electrostática, ΔG_{el} , cuyo valor es siempre negativo.

3.3 Finalmente está el término correspondiente a la energía libre de dispersión-repulsión soluto-solvente de corto alcance, ΔG_{disp} .

La variación de energía libre del proceso de solvatación la expresamos, por tanto, como:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{cav} + \Delta G_{el} + \Delta G_{disp}$$

34

Si analizamos la variación de energía libre correspondiente al término electrostático, que es el que va a ejercer mayor influencia sobre la función de onda del soluto, esta se calcula como la diferencia de energía entre el sistema definido por el hamiltoniano del soluto en fase gas al que se le ha añadido el término correspondiente al potencial electrostático de la reacción, V_r , y la del soluto en fase gas.

El cálculo de dicho potencial V_r no es tarea fácil, ya que como se ha indicado anteriormente depende de la función de onda del soluto (lo que plantea un sistema doblemente iterativo), y de la aproximación que se emplee para determinar el potencial de polarización que adquiere la cavidad (lo que se traduce en el modo de generar dicha cavidad). Habitualmente dicho potencial se puede expresar como un conjunto de cargas distribuidas sobre la superficie de la cavidad o como la suma de momentos multipolares del soluto. La cavidad puede aproximarse mediante geometrías sencillas (esferas, elipsoides) no siempre ajustadas a la forma de la molécula del soluto, o mediante un conjunto de esferas centradas en los átomos.

A II.5 Métodos Clásicos

Los métodos clásicos son denominados generalmente como *Mecánica Molecular* (MM) [1,2], estos métodos provienen de una aproximación clásica al cálculo de las energías y geometrías moleculares. En estos las moléculas se describen principalmente a través de osciladores armónicos, y se plantean las interacciones con el resto del sistema empleando

potenciales de carácter electrostático y otros tipos de interacciones no enlazantes, que dependen de la distribución de carga eléctrica presente en los núcleos de la molécula. El sistema viene entonces representado por una función de energía potencial que hay que minimizar para obtener la energía de equilibrio. Dichas funciones son susceptibles de parametrización a partir de datos experimentales, como pueden ser los espectros de vibración -de los que se sacan las constantes de fuerzas de los enlaces- difractogramas de Rayos X- obtención de distancias de enlace- o de cálculos ab initio de sistemas similares, aunque de dimensiones más reducidas.

Por ejemplo, en el caso del método del campo de fuerzas VFF (Valence Force Field) [21], la energía potencial del sistema está representada por una función analítica de las coordenadas internas y las distancias interatómicas expresando los cuatro grupos de interacciones, tensión, flexión, torsión y no-enlazantes. Los parámetros para esta función fueron refinados para reproducir datos experimentales de un conjunto de compuestos modelos donde se incluyen los grupos funcionales que están presentes en los aminoácidos [22-24].

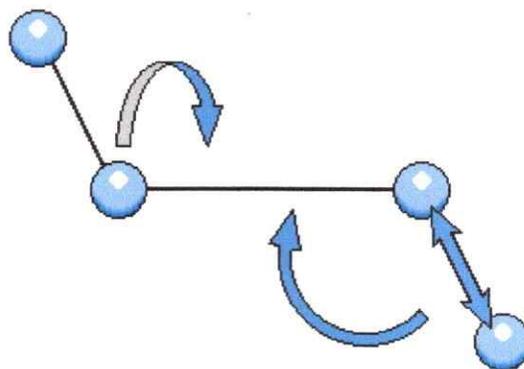


Figura A II.5.1

$$E_{\text{VFF}} = E_{\text{Tensión}} + E_{\text{Flexión}} + E_{\text{Torsión}} + E_{\text{No Enlazante}}$$

35

donde $E_{\text{Tensión}}$ corresponde a la energía de vibración de tensión entre dos átomos unidos por un enlace. Dicha vibración se supone de modo general como armónica, por lo que su forma será similar a la que proporciona la ley de Hooke. Para este caso concreto, se entiende como una

sumatoria a todas las coordenadas internas correspondientes a distancias de enlace de nuestro sistema:

$$E_{\text{Tensión}} = \Omega \sum_{\text{Enlaces}} K_s (r - r_0)^2$$

36

En la ecuación (3.33) K_s es la constante de fuerza del enlace, r_0 es la distancia de equilibrio entre los dos átomos que forman el enlace, r es la distancia propia de nuestro sistema, y es Ω una constante numérica cuyo valor depende del sistema de unidades adaptado para expresar K_s , r y r_0 . En el caso concreto de emplear $[\text{Kg/S}^2]$ para K_s y $[\text{Å}]$ para las distancias, habría que sustituir Ω por 0.7194 para que las unidades de energía fueran en $[\text{kcal mol}^{-1}]$. Tanto K_s como r_0 son parámetros tabulados, que se obtienen a partir de parámetros estadísticos para dicho enlace bajo un entorno similar. Hay que señalar que el empleo de una parábola no es lo más adecuado para describir la curva de energía potencial de un enlace, ya que es incapaz de simular el comportamiento real del sistema en todo rango de distancias, y sobre todo en aquellas próximas al punto de disociación. Una aproximación más realista sería emplear potenciales de Morse, pero nos encontramos con un aumento del tiempo necesario para realizar el cálculo; una opción alternativa es aumentar la expresión polinómica hasta el cuarto grado.

En el caso de $E_{\text{Flexión}}$, correspondiente a la vibración de flexión entre tres átomos enlazados, también se emplea una suma de términos cuadráticos en la que aparecen la variación del ángulo y una constante K_B :

$$E_{\text{Flexión}} = \Omega \sum_{\text{Ángulos}} K_B (\theta - \theta_0)^2$$

37

al igual que en el caso anterior, es Ω una constante numérica que asegura que las unidades de energía sean coherentes (generalmente $[\text{kcal mol}^{-1}]$).

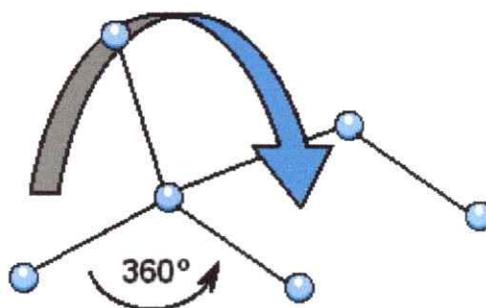
La energía asociada al movimiento de torsión, $E_{\text{Torsión}}$, viene dada por:

$$E_{\text{Torsión}} = \sum_{\text{Torsiones}} \sum_n \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi)]$$

38

en este caso, n , marca el ángulo para el que se realiza el muestreo con la consecuente parametrización. Es decir, sobre un arco de giro de $360/n$ se realiza una estimación del valor de la constante de fuerza de torsión V_n :

Figura A II.5.2



El último término de la expresión de energía, $E_{\text{no Enlazante}}$, engloba las distintas fuerzas de repulsión que experimentan los átomos no sujetos a enlace químico:

- Fuerzas de van der Waals
- Fuerzas de carácter electrostático

En el caso de las fuerzas de dispersión o van der Waals, introducidas por London en 1930, la expresión de la energía, para este caso de campo de fuerzas moleculares, se trunca con una ecuación aproximada. Con esto se gana tiempo de cálculo al simplificar las ecuaciones; ya que pasamos de una expresión cuya dependencia con la distancia relativa, x , de los átomos que están interaccionando, es una forma exponencial de la inversa de dicha distancia, $e^{(-1/x)}$, y de la

inversa de su sexta potencia, x^{-6} , a una función dependiente exclusivamente de la inversa del cuadrado de la distancia, x^{-2} . Dicha distancia relativa x corresponde a la inversa del paréntesis de la siguiente ecuación:

$$E_{\text{van der Waals}} = \Omega \sum_i \sum_j \varepsilon \left(\frac{R_i^* + R_j^*}{r_{ij}} \right)^2$$

39

donde R_i^* es el radio de van der Waals del átomo i , r_{ij} es la distancia que separa a los átomos no enlazados que están interactuando y Ω es la energía de interacción de van der Waals de la pareja de átomos. La desventaja es que se limita el radio de acción efectivo a una determinada distancia de unos pocos Ångstroms (generalmente distancias relativas no inferiores a 3.3 Å).

En lo que se refiere a las interacciones del tipo electrostático, éstas se pueden dividir en tres grupos:

-Interacciones entre cargas

$$E = \Omega \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{D_q r_{ij}}$$

40

siendo q_i la carga del átomo i , r_{ij} la distancia entre ambos átomos, y D_q es un factor dieléctrico que representa la atenuación que producen los alrededores sobre el campo electrostático (como puede ser la presencia de un solvente o debido a la propia molécula).

-Interacciones dipolo-dipolo

$$E = \Omega \sum_i \sum_j \frac{\mu_i \mu_j}{D_\mu r_{ij}^3} (\cos \chi - 3 \cos \alpha_i \cos \alpha_j)$$

41

Des del ángulo entre los dipolos μ_i y μ_j , α_i y α_j son los ángulos que forman los dipolos con el vector r_{ij} que los une por su centro, D_μ es la constante dieléctrica efectiva.

-Interacciones carga-dipolo

$$E = \Omega \sum_i \sum_j \frac{q_i \mu_j}{r_{ij}^2 \sqrt{D_\mu D_q}} (\cos \alpha_j)$$

42

Además de todas estas expresiones, existen otras que describen, por ejemplo, la energía asociada a vibraciones de sistemas trigonales (vibraciones fuera del plano como puede ser el caso de aminas), términos de acoplamiento entre torsiones y flexiones, sistemas π , anillos, etc.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, y de modo general, resulta difícil realizar una parametrización adecuada que permita obtener valores de energía con cierto grado de precisión. En lo que respecta a la obtención de geometrías, hay que resaltar que son muy importantes, así como frecuentes, los problemas de convergencia.

La principal, y única ventaja de estos métodos reside en el escaso tiempo de cálculo necesario. Estos métodos siguen siendo necesarios en aquellos sistemas formados por una gran cantidad de átomos como son los medios en solución o enzimáticos.

En esta línea de aproximación se cuentan también con los que se denominan *Dinámicas Moleculares* (MD) [25-26], que se aplican a la simulación de fases en solución o enzimáticas. Basadas en la mecánica estadística, se resuelven de modo numérico las ecuaciones de movimiento para el sistema, teniendo en cuenta que la propagación de las trayectorias de tipo "clásico" de un sistema de átomos corresponde a un valor determinado de la energía, a su vez marcado por las condiciones iniciales.

$$m_k \ddot{r}_k = F_k = -\frac{\partial U}{\partial r_k}$$

43

Este tipo de cálculos permite obtener magnitudes macroscópicas a partir de promedios.

A II.6 Simulaciones SEMD

Este tipo de simulaciones involucra la reasignación de las velocidades atómicas para que se correspondan con aquellos modos en un rango de frecuencia seleccionado, i.e., una función que filtra en el dominio temporal se aplica a las velocidades atómicas.

$$v_i'(t_n) = \sum_{k=0}^M C_k v_i(t_{n-k})$$

44

donde $v_i'(t_n)$ es la velocidad del átomo i filtrada a tiempo t_n . Estas velocidades son obtenidas en los M pasos previos. Los valores de C_k definen la función de filtrado. Para el propósito de aumentar la búsqueda conformacional un filtro de bajo paso se usa donde todos los C_k son iguales a 1. El número de los M pasos previos incluidos en el filtrado, M , determinan la frecuencia de corte. Un filtro similar ha sido previamente usado para filtro interactivo de las coordenadas de trayectorias de MD [27].

A II.7 Referencias

1. A. Hinchliffe, *Computational Quantum Chemistry*; Wiley & Sons:Chichester (1989). M. Hanna, *Mecánica Cuántica para Químicos*; Fondo Educativo internacional:México (1985).
2. W. Smith, *Introduction to Theoretical Organic Chemistry and Molecular Modeling*; VHC Publishers: New York, (1996).
3. D. Heidrich, *The Reaction Path in Chemistry: Current Approaches and Perspectives*; Kluwer Academic Publishers: Netherlands, (1995).
4. I. N. Levine, *Quantum Chemistry*, 5th Edition, Prentice Hall. (1991).
5. J. Sakurai, *Modern Quantum Chemistry*; Addison-Wesley: USA, (1994).
6. J. Seminario, P. Politzer, *Modern Density Functional Theory. A Tool for Chemistry*; Elsevier: Netherlands, (1995).
7. N. Handy, *Density Functional Theory*; European Summerschool in Quantum Chemistry; (1997).
8. P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.*, **136**, B864 (1964).
9. W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.*, **140**, A1133 (1965).
10. J. Pople, D. Snatry, G. Segal, *J. Chem. Phys.*, **43**, 129- (1965).
11. J. Pople, D. Beveridge, P. Dobosh, *J. Chem. Phys.*, **47**, 2026 (1967).
12. M. Dewar, G. Klopman, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3089 (1967).
13. N. Baird, M. Dewar, *J. Chem. Phys.*, **50**, 1262 (1969).
14. N. Baird, M. Dewar, R. Sustmann, *J. Chem. Phys.*, **50**, 1275 (1969).
15. M. Dewar, R. Bingham, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1285 (1975).
16. J. Stewart, *J. Comp. Chem.*, **10**, 210- (1989).
17. J. Tomasi, M. Persico, *Chem. Rev.*, **94**, 2027- (1994).
18. J. Rivail, D. Rinaldi, *J. Mol. Struct.*, **120**, 387- (1985).
19. J. Tomasi., *Int. J. Quantum Chem. Quant. Biol. Symp.*, **18** (1991).
20. J. Storer, *Structure and Reactivity in Aqueous Solution*; American Chemical Society, Chapter 3 (1994).
21. A P. Dauber, M. Goodman, A. T. Hagler, D. J. Osguthorpe, R. Sharon, P. S. Stern, *J. Proceedins of the ACS Symposium on Supercomputers in Chemistry*, **161** (1981).

22. P. Dauber-Osguthorpe, V. A. Roberts, D. J. Osguthorpe, J. Wolff, M. Genest, A.T. Hagler, *Proteins: Structure, Function and Genetics*, **4**, 31-47 (1988).
23. A.T. Hagler, E. Huler, S. Lifson, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 5319-5326 (1974).
24. S. Lifson, A.T. Hagler, P. Dauber, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5111-5121 (1979).
25. J.A. McCammon, S.C. Harvey, *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge (1987).
26. M. P. Allen, D. J. Tildesley, *Computer Simulation of Liquids*, Clarendon, Oxford (1987).
27. M. Levitt, *J. Mol. Biol.*, **220**, 1-4 (1991).

Apéndice III

A III.1 Función de Fukui

Dentro de la teoría de Kohn-Sham (KS), Senet [1] reportó una definición exacta de la función de Fukui:

$$f_s^\alpha(r) = \left| \phi_f^\alpha(r) \right|^2 \quad (1)$$

donde $\alpha = -$ ($\Delta N < 0$, ataques electrofílicos) y donde $\alpha = +$ ($\Delta N > 0$, ataques nucleofílicos). El subíndice f en la ecuación 1 si se está considerando el orbital molecular HOMO o LUMO, respectivamente. La ecuación 1 es obtenida con la condición de que el potencial de KS se mantiene constante. Esta condición implica que no solamente el potencial externo es mantenido fijo, sino que también la repulsión electrónica, i.e., el potencial de Hartree y el potencial de intercambio y correlación, son mantenidos fijos en el proceso de derivatización de la densidad electrónica respecto del número de partículas. Sin embargo, la ecuación 1 es un resultado muy útil cuando se interpreta bajo la formulación PPY/DFT, bajo la aproximación de orbital rígido.

Si consideramos la densidad electrónica $\rho(r)$ para un sistema molecular arbitrario que contiene N electrones, bajo un potencial externo fijo $v(r)$:

$$\rho(r) = \sum_i n(i) |\phi_i(r)|^2 \quad (2)$$

donde $n(i)$ es el número de ocupación del i -ésimo OM $\phi_i(r)$, que obedece a la condición de normalización:

$$\sum_i n(i) = N \quad (3)$$

Es posible aislar un OM de Fukui particular, $\phi^\alpha(r)$, de la ecuación 2 y describir la densidad electrónica molecular como sigue:

$$\rho(r) = n(\alpha) |\phi^\alpha(r)|^2 + \sum_{i \neq \alpha} n(i) |\phi_i(r)|^2 \quad (4)$$

Haciendo la derivada con respecto a N , a potencial externo constante, podemos escribir la siguiente expresión para la función de Fukui:

$$f(r) = |\phi^\alpha(r)|^2 \left[\frac{\partial n(\alpha)}{\partial N} \right]_{v(r)} + n(\alpha) \left[\frac{\partial |\phi^\alpha(r)|^2}{\partial N} \right]_{v(r)} + \sum_{i \neq \alpha} \left[\frac{\partial n(i)}{\partial N} \right]_{v(r)} |\phi^i(r)|^2 + \sum_{i \neq \alpha} \left[\frac{\partial |\phi^i(r)|^2}{\partial N} \right]_{v(r)} \quad 5$$

Cuando se remueve o se adiciona un electrón al estado basal de un sistema molecular, los FMO los cambios más importantes es su estructura electrónica (i.e., el número de ocupación y la forma). Este conocido argumento fue introducido por Fukui [2] como la aproximación de orbital rígido (FOA), resulta en el desprecio de el tercer término debido a que la variación en el número de ocupación $dn(i)$, inducido por el cambio del número total de electrones en el sistema dN , no tiene contribución a la función $f(r)$, dentro del regimen FOA. Por otra parte, el cuarto término puede ser analizado dentro de FOA como sigue: vamos a introducir el factor forma en la densidad electrónica $\sigma(r)$ [3] como sigue:

$$\rho(r) = N\sigma(r) \quad 6$$

Tomando la derivada respecto a N se obtiene:

$$\left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} = \sigma(r) + N \left[\frac{\partial \sigma(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} \quad 7$$

después de reordenar se obtiene:

$$\left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} = \frac{1}{N} \left[\rho(r) - \frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right] \quad 8$$

Si nosotros asumimos, de acuerdo a FOA que todos los OM están igualmente formados, entonces la ecuación de Fukui puede ser escrita como $f(r) = \rho(r)/N$, y por lo tanto:

$$\left[\frac{\partial \sigma(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} = 0 \quad 9$$

En otras palabras, el FOA hace que el cuarto término de la ecuación 5 desaparezca también, y en estas circunstancias, la función Senet-Fukui se aproxima a la función de Fukui definida en el contexto PPY / DFT con restricciones solamente en el potencial externo,

$$f^\alpha(\mathbf{r}) \approx f_s^\alpha(\mathbf{r}) + n(\alpha) \left. \frac{\partial f_s^\alpha(\mathbf{r})}{\partial N} \right|_{v(\mathbf{r})} \quad 10$$

Sin embargo, la derivada que aparece en el segundo término de la ecuación 10, representa variaciones de segundo orden en la densidad electrónica (y por lo tanto variaciones de tercer orden en la energía electrónica). Esta contribución se espera que haga pequeñas contribuciones a $f^\alpha(\mathbf{r})$, y puede ser despreciada para dejar la relación aproximada:

$$f^\alpha(\mathbf{r}) \approx f_s^\alpha(\mathbf{r}) = |\phi_f^\alpha(\mathbf{r})|^2 \quad 11$$

La ecuación 11 es el punto de partida para desarrollar un esquema simple de cálculo de la función de Fukui, la cual involucra cálculos con geometría fija de la estructura electrónica, sin cálculos adicionales que involucren especies iónicas de diferente multiplicidad de spin. Se expande los FMO denominados α en la ecuación 11 en términos de las funciones bases atómicas se obtiene:

$$f^\alpha(\mathbf{r}) = \sum_{\mu} \sum_{\nu} c_{\mu\alpha} c_{\nu\alpha}^* \chi_{\mu}(\mathbf{r}) \chi_{\nu}^*(\mathbf{r}) \quad 12$$

La ecuación 12 puede ser integrada a través del espacio de coordenadas para dejar la condición de normalización correcta para $f^\alpha(\mathbf{r})$,

$$\int d\mathbf{r} f^\alpha(\mathbf{r}) = \sum_{\mu} \sum_{\nu} c_{\mu\alpha} c_{\nu\alpha}^* S_{\mu\nu} = \sum_{\mu} |c_{\mu\alpha}|^2 + \sum_{\nu \neq \mu} c_{\mu\alpha} c_{\nu\alpha}^* S_{\mu\nu} = 1 \quad 13$$

Donde el conjunto de bases se ha considerado real y normalizado, pero no necesariamente ortogonal. $S_{\mu\nu}$ es la integral de solapamiento entre las funciones base $\chi_{\mu}(\mathbf{r})$ y $\chi_{\nu}(\mathbf{r})$. La ecuación 13 permite la definición de una componente orbital de la función de Fukui,

$$f^\alpha(\mathbf{r}) = |c_{\mu\alpha}|^2 + c_{\mu\alpha} \sum_{\nu \neq \mu} c_{\nu\alpha} S_{\mu\nu} \quad 14$$

A partir de la ecuación 14, se define la función de Fukui atómica o condensada-al-sitio k como sigue:

$$f_k^\alpha(r) = \sum_{\mu \in k} f_\mu^\alpha(r) \quad 15$$

La función f_k^α conserva la condición de normalización:

$$\sum_k f_k^\alpha(r) = \sum_k \sum_{\mu \in k} \left| c_{\mu\alpha} \right|^2 + \sum_{u \neq \mu} c_{\mu\alpha} c_{u\alpha} S_{\mu u} = 1 \quad 16$$

La ecuación 15 entrega directamente la función de Fukui electrofílica ($\alpha = -$) y nucleofílica ($\alpha = +$), los que incluyen en cada caso los coeficientes del HOMO y LUMO, respectivamente.

A III.2 Referencias

1. P. Senet, *J. Chem. Phys.* 107 2516- (1997).
2. K. Fukui, *Theory of Orientation and Stereoselection*, Springer, Berlin, (1973).
3. R. G. Parr, W. Yang, en: R. Breslow, J. B. Goodenough, J. Halpern, J. S. Rowlinson, (Eds.), *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, The International Series of Monographs on Chemistry, Oxford Science Publications, Oxford (1989).

Apéndice IV

Publicaciones generadas por la tesis

Basicity and Solvent Effects on Hydrogen Bonding in NR₃ HCOOH (R=H,CH₃) Model Systems.

Patricia Pérez, Gerald Zapata-Torres, Julia Parra-Mouchet, Renato Contreras
Departamento de Química, División Química, Teórica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

International Journal of Quantum Chemistry, Vol. 74, 387-394 (1999).

Parameterizing Simplified Potential Models for Membrane Protein Folding

Zapata-Torres G, Adams G, Osguthorpe DJ

Department of Chemistry, University of Bath, Claverton Down BA2 7AY United Kingdom.

JOURNAL OF MOLECULAR GRAPHICS & MODELLING 16 (4-6): 288-289 (1998).

Otras publicaciones

¹³C-NMR and Theoretical Studies of Internal rotation in methylated anilines

Gerald Zapata-Torres, Julia Parra-Mouchet, Bruce K. Cassels

Departamento de Química Facultad de Ciencias Universidad de Chile.

Bol. Soc. Chil. Quím., 43, 13-26 (1998).

Metallomacrocyclic Complex Bridged Polymers: Electronic Structures of -[MacM(L)]_n
F. Mendizabal, C. Olea-Azar, G. Zapata-Torres, F. Eisner

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas, Universidad de Chile

Journal of Molecular Structure (Theochem) 543, 23 (2001).

Presentaciones a congresos

MDMA, un análisis de RMN de ^{13}C y ^1H , Químico Cuántico y Cristalográfico

XV Conferencia de Química

Santiago de Cuba,

27-29 de Noviembre 1996- **Cuba**

Receptor Modelling Using Combined Novel Folding and SEMD Techniques

XXII Jornadas Chilenas de Química

Puyehue,

12-15 de Noviembre 1997- **Chile**

Parameterising Simplified Potential Models for Membrane Protein Folding

Molecular Graphics and Modelling Society of the Americas

San Diego,

6-10 de Diciembre 1998- **USA**

A novel Method for the generation of G-protein coupled receptors. All-atom models
Efectos en la Basicidad y de Solvente sobre el enlace de Hidrógeno en sistemas $\text{NR}_3\text{---}$

HCCOH ($\text{R}=\text{H}, \text{CH}_3$)

XXIII Jornadas Chilenas de Química,

Valdivia

24-27 Noviembre 1999- **Chile**

Estudio Teórico de la Transferencia Protónica entre el Acido Fórmico y Derivados

Metilados de 3,4-(metilendioxi)anfetamina.

XXIV Congreso Latinoamericano de Química

Lima,

15-18 de Octubre 2000- **Perú**

Enlace de Hidrógeno en el Sistema Amoniaco Acido Fórmico en la Presencia de Campos
Eléctricos

XXIV Jornadas Chilenas de Química,

Temuco

28-30 de Noviembre 2001- Chile