



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas

Estudio de la interacción de cafeína con fragmentos de
receptores de adenosina, utilizando métodos de Mecánica
Molecular.

Tesis presentada al

Posgrado en ciencias Física Aplicada

como requisito parcial para la obtención del grado de

**Doctor en Ciencias
(Física Aplicada)**

por

M. en C. Efrén Rodríguez Angel

asesorado por

Dr. V. Poltev.

Dr. Eduardo González Jiménez

Puebla Pue.
Junio 2014



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas

Estudio de la interacción de cafeína con fragmentos de receptores de adenosina, utilizando métodos de Mecánica Molecular.

Tesis presentada al

Posgrado en ciencias Física Aplicada

como requisito parcial para la obtención del grado de

**Doctor en Ciencias
(Física Aplicada)**

por

M. en C. Efrén Rodríguez Angel

asesorado por

Dr. V. Poltev.

Dr. Eduardo González Jiménez

Puebla Pue.
Junio 2014

Título: Estudio de la interacción de cafeína con fragmentos de receptores de adenosina, utilizando métodos de Mecánica Molecular.
Estudiante: M. EN C. EFRÉN RODRÍGUEZ ANGEL

COMITÉ

Dra. Honorina Ruíz Estrada
Presidente

Dr. Adrián Apolinar Hernández Santiago
Secretario

Dra. Alexandra Deriabina
Vocal

Dr. Thomas R.F. Scior Jung
Vocal Externo

Dr. Arturo Reyes Lazalde
Vocal Externo

Dr. J. Fernando Rojas Rodríguez
Suplente

Agradecimientos

*Agradezco a mi familia por el apoyo que me han brindado.
También agradezco a mis asesores quienes me han guiado durante el desarrollo de la tesis con observaciones y consejos invaluable, por su comprensión y paciencia. A mi amiga Caro por apoyarme en todo momento durante el transcurso de la tesis, especialmente en los momentos difíciles.*

Índice general

Lista de abreviaturas	XI
Resumen	XIII
Introducción	XV
1. Revisión de los conceptos biológicos	1
1.1. Mecanismos de transducción de señales	1
1.2. Cafeína	3
1.3. Adenosina	5
1.4. Los receptores de adenosina	11
1.4.1. Proteínas	11
1.4.2. Estructura de los receptores de adenosina	19
2. Metodología	29
2.1. Métodos computacionales para estudio de sistemas moleculares	29
2.2. Mecánica molecular	30
2.2.1. Estiramiento del enlace	32
2.2.2. Flexión del ángulo de valencia	34
2.2.3. Variación del ángulo de torsión	35
2.2.4. Interacciones no enlazadas	36
2.2.5. Campo de fuerzas de Amber	40
2.2.6. Carga atómica	41
2.3. Amber: programa de simulación biomolecular	43
3. Discusión de resultados	47
3.1. La estructura molecular y los posibles tipos de interacciones no-valentes de CAF y Adenosina.	47
3.2. Selección de los sitios de los receptores de adenosina para la búsqueda de posibles complejos con cafeína y adenosina.	50
3.3. Formación de complejos de cafeína y adenosina con el segmento de la hélice TM3 del receptor de adenosina A1.	51
3.3.1. Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1.	51
3.3.2. Conformaciones de mínima energía de adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1.	53

3.4.	Formación de complejos de cafeína y adenosina con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1.	56
3.4.1.	Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1	56
3.4.2.	Conformaciones de mínima energía de adenosina con el TM7 del receptor de adenosina A1	57
3.5.	Formación de complejos de teofilina, teobromina con los segmentos TM3 y TM7 del receptor de adenosina A1.	60
3.5.1.	Conformaciones de mínima energía de teobromina y teofilina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1	60
3.5.2.	Conformaciones de mínima energía de teobromina y teofilina con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1	62
3.6.	Formación de complejos de cafeína y adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A2a.	65
3.6.1.	Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento TM3 del receptor de adenosina A2a	65
3.6.2.	Conformaciones de mínima energía de adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A2a	66
3.7.	Formación de complejos de cafeína y adenosina con el segmento TM7 del receptor de adenosina A2a.	69
3.7.1.	Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento TM7 del receptor de adenosina A2a	69
3.7.2.	Conformaciones de mínima energía de adenosina con el segmento TM7 del receptor de Adenosina A2a	70
4.	Conclusiones	73
A.	Complejos adicionales de mínima energía de Teofilina y teobromina	75
A.1.	Conformaciones de mínima energía de teofilina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1	75
A.2.	Conformaciones de mínima energía de teobromina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1	76
A.3.	Conformaciones de mínima energía de teofilina con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1	76
A.4.	Conformaciones de mínima energía de teobromina con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1	77

Índice de figuras

1.1. Diagrama del estado activo e inactivo de los receptores acoplados a proteínas G.	2
1.2. Diagrama de la secuencia de activación de los receptores acoplados a proteínas G	3
1.3. Estructura de las moléculas de cafeína (a), Teofilina (b) y Teobromina (c).	4
1.4. Estructura de la adenosina	6
1.5. Conformaciones <i>syn</i> y <i>anti</i> del nucleosido adenosina.	7
1.6. Esquema de los ángulos de torsión χ y γ	7
1.7. Esquema donde se ilustran los ángulos de torsión del esqueleto azúcar-fosfato.	8
1.8. Diagrama de la estructura de la molécula de la ribosa	10
1.9. Diagrama de las diferentes conformaciones que adopta la molécula del azúcar	10
1.10. Esquema de la estructura general de un aminoácido.	11
1.11. Estructura de los 20 aminoácidos que se combinan para formar a las proteínas.	12
1.12. Formación del enlace peptídico	13
1.13. Planaridad del enlace peptídico.	13
1.14. Configuración <i>trans</i> y <i>cis</i> del enlace peptídico.	14
1.15. Estructura secundaria de las proteínas	15
1.16. Estabilización de la hélice alfa por puentes hidrógenos.	16
1.17. La mioglobina es un ejemplo de la estructura terciaria de las proteínas.	17
1.18. La hemoglobina es un ejemplo de la estructura cuaternaria de las proteínas.	18
1.19. Esquema de la estructura común de un receptor acoplado a proteína G.	20
1.20. Acción de los diferentes tipos de ligandos sobre el estado de activación del receptor	21
1.21. Diagrama que ilustra los sitios de unión de diferentes familias de hormonas	22
1.22. Diversidad de señalización del receptor acoplado a proteína G	23
1.23. Esquema con secuencia de aminoácidos del receptor de adenosina A1.	25
1.24. Estructura cristalográfica del receptor de adenosina A2a reportada por Jaakola [20], Código: "3EML" Protein Data Bank.	26
1.25. Esquema con secuencia de aminoácidos del receptor de adenosina A2a.	27
2.1. Mecánica molecular considera a los átomos como esferas	31
2.2. Los átomos sombreados son los átomos 1,2, 1,3, 1,4	32
2.3. Comparación del potencial armónico (Ley de Hooke) y la curva de Morse.	33
2.4. Cambios en la longitud de enlace.	34
2.5. Desviación del ángulo valente	35

2.6. Ángulo diedro entre semiplanos RST y STU	35
2.7. Potencial no atractivo de esferas duras	37
2.8. El potencial de Lennard Jones	38
2.9. Flujo de la información en Amber	45
3.1. Estructura molecular de cafeína (a) y adenosina (b)	48
3.2. Estructura molecular de la adenosina	50
3.3. Las tres conformaciones de menor energía de interacción	53
3.4. Las tres conformaciones de menor energía de interacción	54
3.5. Conformaciones de menor energía de interacción	56
3.6. Las tres conformaciones de complejos de adenosina	58
3.7. La estructura molecular de la (a) Teofilina, (b) Teobromina	60
3.8. Conformación más negativa de teofilina a) y teobromina b)	61
3.9. Conformación más negativa de teofilina a) y teobromina b)	63
3.10. Conformaciones de mínima energía de cafeína	66
3.11. Conformaciones de mínima energía de adenosina	67
3.12. Conformaciones de mínima energía de cafeína	69
3.13. Conformaciones de mínima energía de adenosina	71
A.1. Conformaciones de mínima energía de teofilina	75
A.2. Conformaciones de mínima energía de teobromina	76
A.3. Conformaciones de mínima energía de teofilina	76
A.4. Conformaciones de mínima energía de teobromina	77

Índice de tablas

1.1. Definición de ángulos de torsión en nucleótidos	9
3.1. Energías de interacción y valores geométricos de los mínimos más profundos	49
3.2. Valores de energía y longitudes de enlaces hidrógeno de los mínimos de energía	53
3.3. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	55
3.4. Valores de energía y longitudes de enlace hidrógeno de los mínimos de energía	57
3.5. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	59
3.6. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	62
3.7. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	62
3.8. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	64
3.9. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	64
3.10. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	66
3.11. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	68
3.12. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	70
3.13. Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía	72

Lista de abreviaturas

A Adenina.

A Adenosina.

ADN Acido desoxirribonucleico.

ADN-Z Familia Z del ácido desoxirribonucleico.

ARN ácido ribonucleico.

ARNm ácido ribonucleico mensajero.

ADP Adenosín difosfato.

AMP Adenosín monofato.

AMPc Adenosín monofato cíclico.

ATP Adenosín trifosfato.

Ala Alanina.

Asn Asparagina.

BCC Bond Cahnge Correction.

C Carbono.

C Citosina.

CAF Cafeína.

Cu Cobre.

ESP Electrostatic Potential.

FT Fragmentos transmembrana.

Phe Fenilalanina.

Fe Fierro.

P Fósforo.

Gly Glicina.

G Guanina.

Gln Glutamina.

H Hidrógeno.

His Histidina.

Ile Isoleucina.

Leu Leucina.

Mg Magnesio.

MC Mecánica cuántica.

MM Mecánica molecular.

N Nitrógeno.

O Oxígeno

RESP Resticted Electrostatic Potential.

Ser Serina.

S Azufre.

T Timina.

TM3 Transmembrana 3.

TM7 Transmembrana 7.

Tyr Tirosina.

Thr Treonina.

Trp Triptófano.

Val Valina.

Y Yodo.

Resumen

El propósito del trabajo fue proponer una explicación para los mecanismos de la acción biológica de la cafeína y de otras metil-xantinas como estimulantes del sistema nervioso. Ya que estos compuestos son bloqueadores de los receptores de adenosina y la adenosina interactúa con los segmentos intra-membránicos de los receptores A1 y A2a, se realizaron cálculos para encontrar los mínimos de energía de interacción de fragmentos de receptores de adenosina con las metil-xantinas, para después hacer una comparación con los mínimos de adenosina. Puesto que la estructura de los sistemas en consideración es compleja, los cálculos se realizaron con el método de Mecánica Molecular utilizando el paquete molecular estándar AMBER y el campo de fuerzas con el mismo nombre. Encontramos docenas de mínimos locales para cada uno de los posibles complejos y para estos se construyeron modelos moleculares a nivel atómico. Los mínimos más profundos corresponden a la formación de varios enlaces de hidrógeno de los residuos polares de aminoácidos de los receptores con los centros hidrofílicos de cada uno de los ligandos.

Los cálculos mostraron que los valores de energía de interacción de las metil-xantinas con fragmentos de receptores en los mínimos más profundos no difieren en más de 1.5 kcal/mol, lo que permite explicar porque la actividad neuro-estimulante de las 3 metil-xantinas es aproximadamente la misma. La molécula de adenosina es el ligando natural de los receptores, la cual tiene 5 centros protón-aceptor y 5 protón-donador y también varios grados de libertad intra-moleculares así que parecería que ella tiene la preferencia al interactuar con fragmentos peptídicos. Sin embargo, los cálculos mostraron que los mínimos más profundos de energía de interacción de adenosina con los receptores tienen valores casi iguales que los mínimos más profundos para cafeína. Como mostraron los cálculos, las conformaciones más favorables de la adenosina corresponden a la formación de 2 enlaces-H intra-moleculares, lo que disminuye la cantidad de los centros hidrofílicos accesibles para interacciones con otras moléculas y a su vez disminuye la movilidad conformacional. Esto permite explicar cualitativamente porque se tiene una energía de interacción con los fragmentos de proteínas, menor del que podría esperar solo del análisis de la estructura molecular de adenosina. Los valores cercanos de la energía de interacción de la cafeína y adenosina con fragmentos de receptores de adenosina permiten explicar la posibilidad de la acción de la cafeína como bloqueador de receptores de adenosina y por consiguiente ser un neuro-estimulador.

Introducción

La cafeína es una de las sustancias biológicamente activas, más consumidas por la población [1]. Ella posee un espectro amplio de efectos biológicos producidos por su interacción con biopolímeros, además de su acción principal como estimulador del sistema nervioso [2], la cafeína influye sobre los sistemas celulares incluyendo los procesos genéticos, así como sobre la permeabilidad de las biomembranas, la formación de complejos de CAF con pares de bases y ligandos sugiere una posible influencia de la cafeína en la interacción del ADN [3]. Existen diferentes opiniones sobre el consumo de cafeína basados en observaciones experimentales como por ejemplo, que la cafeína puede producir un síndrome clínico de dependencia similar al que producen otras sustancias psicotrópicas [4], también hay reportes médicos sobre desórdenes del sueño asociados con el consumo de cafeína [5] y sobre el consumo de bebidas cafeinadas reducen el riesgo de muerte por daño cardiovascular [6]. A pesar de que hay trabajos dedicados al estudio de los efectos biológicos y médicos de la cafeína [7, 8, 9, 10], entre los especialistas no existe una opinión unificada sobre si la cafeína es solamente un estimulador fisiológico útil o tiene efectos secundarios malignos que provocan serias lesiones en el sistema nervioso. En la actualidad se ha incrementado el uso médico de los compuestos de la familia de las xantinas y sus derivados (cafeína). Esto hace que sea actual el estudio de los mecanismos físicos de la acción de la cafeína con el uso de los métodos modernos con cálculos teóricos. En el presente trabajo utilizamos el método de mecánica molecular a través del programa Amber9 [11, 12, 13] para desarrollar cálculos de energía de interacción entre cafeína, adenosina, teofilina y teobromina con receptores de adenosina.

Los modelos de los receptores de adenosina se construyen de acuerdo al modelo reportado por Rivkees [14]. Hasta ese momento no existía ningún estudio computacional relacionado, en el 2010 una contribución importante en esta línea de investigación se ha realizado por el grupo de trabajo del Dr. Poltev [15, 16] donde se presentan las primeras configuraciones de baja energía de fragmentos de receptores de adenosina A1 con cafeína, un trabajo más reciente [17] muestra que los valores de energías de interacción de los receptores de adenosina A1 y A2a con adenosina y cafeína son bastante cercanos para ambos ligandos, por lo tanto las posibilidades para la formación de complejos con fragmentos de los receptores de adenosina A1 y A2a resultan ser similares para ambos ligandos.

La adenosina desempeña un papel importante fisiológicamente, puesto que activa a los receptores de adenosina (A1, A2a, A2b, y A3). Estos cuatro tipos de receptores de adenosina han sido clasificados [18] y clonados de diferentes especies mamíferas [1, 19] incluyendo el ser humano. Los receptores de adenosina son proteínas de las membranas, en la actualidad hay sólo un trabajo de rayos X sobre la estructura tridimensional del receptor humano A2a en complejo con su antagonista ZM241395 [20]; en 2011 utilizando

esta estructura Yuli y colaboradores reportan un estudio de los modos de unión de la cafeína con el receptor de adenosina A2a [21]. En el mismo año nuevas estructuras de complejos del receptor A2a con varios ligandos fueron publicados, incluyendo adenosina [22], cafeína [23] y el agonista con una estructura molecular más compleja que ZM241395 denominado UK-432097 [24]. La estructura tridimensional de empaquetamiento del receptor A2a depende del ligando utilizado para la cristalización, por ejemplo cafeína forma sólo un enlace hidrógeno mientras los otros ligandos forman varios enlaces hidrógeno con residuos de aminoácidos en la región de empaquetamiento, 3, 6 y 10 enlaces hidrógeno son formados con ZM241385, adenosina y UK-432097 respectivamente. Lee y Lyman [25] utilizaron esas estructuras para comparar la unión de adenosina y UK-432097 con el receptor A2a. Simulaciones de dinámica molecular permiten a los autores dar cuenta de la acción más potente de UK-432097 comparado con adenosina mediante la estabilización de la conformación activa de A2a a través de la formación de una red de enlaces hidrógeno mientras que adenosina es capaz de formar varios complejos y migrar entre esas posiciones [25]. Esta conclusión derivada de las trayectorias de dinámica molecular puede ser entendida del análisis de las estructuras moleculares de esos ligandos y sus complejos con el receptor A2a.

La evidencia disponible [26, 27, 28, 29, 30, 31] sugiere que la mayoría de los efectos de la cafeína son explicados por el bloqueo de la cafeína sobre los receptores de adenosina, los cuales se encuentran distribuidos en diferentes partes del cuerpo, por ejemplo, los receptores de adenosina A1 están distribuidos en el cerebro (en el hipocampo, corteza cerebral, en el núcleo del Tálamo) y espina dorsal (sistema nervioso central), mientras que la distribución de los receptores de adenosina A2a es más restringida [32]. Debido a la importancia de los receptores de adenosina, se han sintetizado complejos de agonista y antagonistas [14, 33], todos ellos tienen una estructura más compleja que la cafeína y la adenosina misma, y tienen más posibilidades para la formación de complejos con los receptores. Por tanto, es particularmente interesante entender ¿Por qué una molécula como la cafeína con un conjunto restringido de centros para interacción fuerte puede competir con moléculas más grandes capaces de formar más enlaces de hidrógeno y por tanto formar complejos más estables? Por lo anterior este trabajo de tesis está enfocado a estudiar mecanismos moleculares de las interacciones de la cafeína con receptores de adenosina para tratar de clarificar los posibles mecanismos de competición de cafeína y adenosina por los sitios de unión en los receptores de adenosina A1 y A2a. Para llegar a nuestro objetivo emprendemos las siguientes acciones:

- Realizar cálculos de optimización de complejos de cafeína y adenosina con segmentos de hélice transmembrana de los receptores de adenosina A1 y A2a, utilizando los métodos de mecánica molecular
- Comparar los complejos que forman cafeína y adenosina con segmentos transmembrana de los receptores de adenosina A1 y A2a
- Construir modelos atómico-moleculares de los posibles complejos que forman la cafeína y adenosina con segmentos transmembrana de los receptores de adenosina.
- Realizar cálculos de minimización de complejos de teofilina y teobromina con segmentos transmembrana del receptor de adenosina A1 y compararlos con los complejos de cafeína y adenosina.

Las moléculas involucradas en nuestro estudio son los receptores de adenosina A1 y A2a, y los ligandos: la adenosina (agonista) y la cafeína (antagonista competidor de la adenosina). Como ya mencionamos el efecto farmacológico principal de la cafeína es la estimulación del sistema nervioso central, relacionando su acción como un antagonista sobre los receptores de adenosina A1 y A2a. Como nuestro trabajo aspira a dar un esclarecimiento de los mecanismos moleculares de este efecto a nivel molecular, procederemos en el capítulo 1 a hacer una revisión de los aspectos generales de las proteínas, cómo están constituidas, su estructura y función molecular, así como de examinar aspectos generales de la molécula de adenosina y cafeína.

En el capítulo 2 se aborda la metodología utilizada para el desarrollo de los cálculos computacionales de la tesis. Se describe la aproximación de mecánica molecular (MM) y cómo ésta trabaja con las moléculas. El enfoque de MM es esencial para la representación de las energías conformacionales de sistemas biológicos. En el capítulo 3 se reportan los resultados obtenidos y se da una discusión a los mismos. En el capítulo 4 se dan las conclusiones inferidas de los resultados mostrados en el capítulo anterior.

Capítulo 1

Revisión de los conceptos biológicos

1.1. Mecanismos de transducción de señales

Cada célula humana está rodeada por una membrana plasmática, una bicapa de fosfolípidos. La membrana hace posible que la célula pueda mantener una combinación específica de las especies bioquímicamente activas, mientras que previene la entrada no deseada de otras sustancias del ambiente exterior. Para que el funcionamiento sea adecuado, la maquinaria bioquímica dentro de una célula tiene que ser capaz de recibir instrucciones desde el exterior. Cambios en los niveles hormonales en el exterior de la célula provocan cambios adaptativos en la actividad enzimática en el interior. De hecho, las células humanas están en constante comunicación entre sí y el entorno circundante, esto requiere una estructura y mecanismo molecular para la transmisión de información a través de la membrana plasmática. Además, en el cuerpo, la transmisión de señales puede tener lugar a distancias largas. Para poder responder rápidamente, el cerebro necesita información de los sentidos, de la vista, el olfato, el gusto. De nuevo, esto requiere un mecanismo molecular para la transmisión de información a través de la membrana plasmática.

La comunicación inter e intracelular se lleva a cabo por señales químicas y eléctricas, constituyendo sistemas que requieren de características especiales para asegurar precisión y eficiencia. Independientemente de la naturaleza de la señal, las células blanco responden por medio de receptores, estos son proteínas que se unen específicamente y con gran afinidad a su respectivo ligando e inicia la respuesta celular. En la mayoría de los casos los receptores son proteínas transmembrana que al unirse al ligando activan una cascada de eventos que alteran el comportamiento celular, la respuesta se presenta de milésimas de segundo a minutos. Los receptores localizados en la membrana celular (proteínas transmembrana) se agrupan en tres clases:

- Receptores con canal iónico
- Receptores ligados a proteínas G
- Receptores con actividad enzimática intrínseca o ligados a enzimas

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.1. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

En los receptores que se constituyen en canales iónicos e inmediatamente de su interacción con el ligando, permiten que las señales pasen bajo la forma de movimiento de iones al interior de la célula. Este movimiento de iones da lugar a cambios en el potencial eléctrico de las células que, a su vez, propaga la señal a lo largo de ésta. En el segundo tipo de receptores la transducción de la señal es más compleja e involucra el acoplamiento del ligando y su receptor ocasionando muchos eventos intracelulares. Los receptores acoplados a las proteínas G, también conocidos como receptores de los siete regiones transmembranales, o receptores heptahelicoidales comprenden una gran familia de proteínas de receptores transmembrana que perciben moléculas afuera de la célula (ligandos) y activan las vías de transducción de señales y, finalmente, las respuestas celulares. Los receptores acoplados a las proteínas G sólo se encuentran en eucariotas y están involucrados en muchas enfermedades, también son el blanco de aproximadamente el 50 % de todos los medicamentos modernos [34].

Todos los receptores conocidos de superficie celular se acoplan a proteínas G triméricas es decir se componen de tres subunidades distintas α , β y γ (conocidas como $G\alpha$, $G\beta$, y $G\gamma$, respectivamente). Cuando un ligando se une a los receptores acoplados a proteínas G (inactiva) y una vez que el ligando es reconocido, el receptor cambia de conformación, Fig.1.1 de esta forma activa mecánicamente a la proteína G, que se separa del receptor. El receptor ahora puede activar otra proteína G o volver a su estado inactivo. El resultado eventual es una alteración en actividad celular y un cambio del programa de los genes que se expresan dentro de las células. En la Fig. 1.2 se describe la secuencia del mecanismo de activación de los receptores acoplados a las proteínas G cuando ocurre la unión del ligando al receptor y posteriormente su inactivación

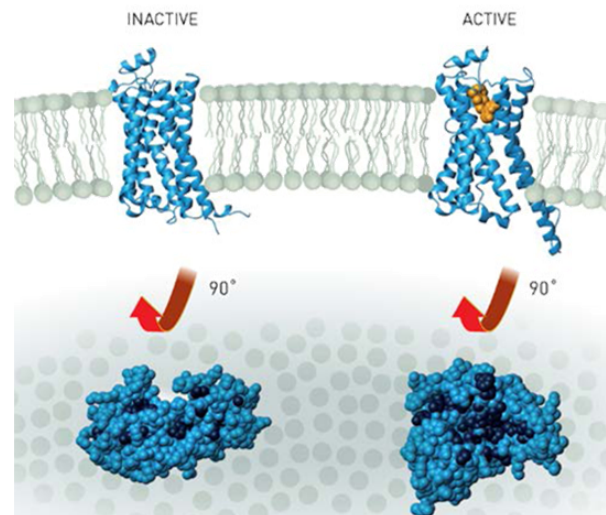


Figura 1.1: Diagrama del estado activo e inactivo de los receptores acoplados a proteínas G. Cuando el ligando se acopla al receptor, éste cambia su conformación permitiendo el acoplamiento de las diferentes subunidades de las proteínas G.

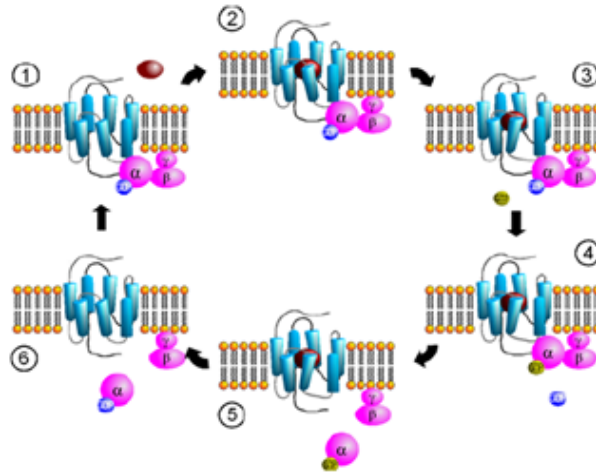


Figura 1.2: Diagrama de la secuencia de activación de los receptores acoplados a proteínas G e inactivación posteriores a la unión del ligando al receptor. 1.- Unión del ligando al receptor. 2.- Activación de la proteína G. 3.- Unión de la guanosin trifosfato a la subunidad alfa. 4.- Desacople de guanosin difosfato de la subunidad alfa. 5.- Separación de las fracciones activas (subunidad alfa unida a guanosin trifosfato y subunidades beta - gamma). 6.- Activación por cada una de estas subunidades de las vías de señalización intracelular.

Se considera que el receptor existe en un equilibrio entre los estados conformacionales biofísicos activos e inactivos y la unión de un ligando en un receptor podría desplazar el equilibrio hacia los estados activos del receptor. Existen tres tipos de ligandos:

- Los agonistas son ligandos que desplazan el equilibrio en favor de los estados activos.
- Los agonistas inversos son ligandos que desplazan el equilibrio en favor de los estados inactivos.
- Los antagonistas neutrales son ligandos que no afectan el equilibrio.

1.2. Cafeína

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas cuyos metabolitos incluye los compuestos de teofilina y teobromina, con estructura química similar y efectos similares (aunque de menor intensidad a las mismas dosis) la cafeína es un sólido cristalino, de sabor amargo, que actúa como una droga psicoactiva, levemente disociativa y estimulante por su acción antagonista no selectiva de los receptores de adenosina. La cafeína fue descubierta en 1819 por el químico alemán Friedrich Ferdinand Runge: fue él quien acuñó el término Koffein, un compuesto químico en el café, el cual pasaría posteriormente al español como cafeína. Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina o bien como 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona y su estructura junto con teofilina y teobromina se muestra en la (Fig 1.3 a). La molécula de cafeína se representa como

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.2. CAFEÍNA

un anillo plano purínico con tres centros protón-aceptores (átomos O2, O6 y N9), tres grupos metilos y ningún grupo protón donador de tal manera que la molécula de la cafeína no puede formar complejos que contenga dos enlaces de hidrógeno con otra molécula de cafeína o alguna de las bases del ADN. Por otro lado, la teofilina y teobromina presentan tres centros protón-aceptores y dos grupos metilos en posiciones diferentes (Fig 1.3 (b, c)).

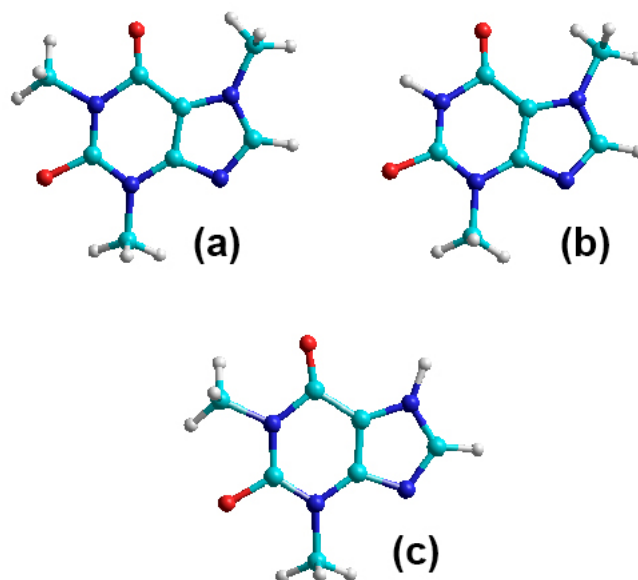


Figura 1.3: Estructura de las moléculas de cafeína (a), Teofilina (b) y Teobromina (c).

Históricamente la cafeína ha sido sujeto de extensas investigaciones y estudios a nivel bioquímico, físicoquímico, genético y médico que han conducido a determinar el impacto de la cafeína sobre diversos procesos bioquímicos y psicológicos.

Sin embargo, hasta la fecha, el mecanismo molecular de la acción de este compuesto (bastante simple) se ha investigado poco, siendo aún menos estudiado el efecto de la cafeína sobre el funcionamiento de los ácidos nucleicos. En esta dirección nuestro grupo ha estudiado la interacción de la molécula de cafeína con fragmentos de ácidos nucleicos [3]. El efecto principal de la CAF es la estimulación del sistema nervioso central y periférico [2]. El blanco principal de la acción de la CAF en concentraciones fisiológicamente significativas, son los receptores de adenosina (AR). Generalmente es aceptado que la CAF presenta un comportamiento competitivo antagonístico con la adenosina [28], la cual interactúa con los receptores A1 y A2a [1, 29, 31].

La cafeína inicialmente estimula el sistema nervioso a nivel de la corteza y médula cerebral, después estimula el cordón espinal (a altas dosis). Sus efectos comienzan dentro de 1 hora, y paran de 3-4 horas [35]. La cafeína es rápidamente absorbida en el tubo gastrointestinal y metabolizada en el hígado, su absorción en la región gastrointestinal es

rápida y 99% de los humanos son capaces de absorberla en 45 minutos, después de la ingesta [36]. Las propiedades hidrofóbicas de la cafeína le permiten su paso a través de todas las membranas biológicas.

Diversas hipótesis han sido formuladas concernientes al posible mecanismo de acción de la cafeína a nivel celular.

- Movilización intracelular del calcio [37].
- Inhibición de fosfodiesterasas de nucleótidos [38, 39].
- Enlace de la cafeína a receptores de benzodiazepina [40] [41].
- Antagonismo a nivel de los receptores de adenosina [42].

La hipótesis “Antagonismo a nivel de los receptores de adenosina” viene de estudios de Sattin y Rall [42], bajo diversas condiciones la teofilina reduce la acumulación de AMPc en el cerebro en lugar de incrementarlo como es el esperado por un inhibidor de la fosfodiesterasa. Por lo tanto, ellos sugieren que la teofilina podría bloquear la estimulación de formación de AMPc por adenosina endógena. La posibilidad de que el efecto central de estimulación de las metilxantinas resulte de una competencia antagonista de efectos depresores de adenosina endógena es apelable por diversas razones. Muchos efectos farmacológicos de adenosina en tejido nervioso pueden ser suprimidos por relativa baja concentración de circulación de metilxantinas, es decir, menos que 100 μM lo cual es obtenido después de 1-3 tazas de café. Esta concentración aparentemente no tiene efectos directos sobre el metabolismo de AMPc, ni sobre el cambio de las concentraciones de calcio [43, 44]. Administraciones de adenosina y sus derivados usualmente producen efectos opuestos a aquellos de la cafeína o teofilina [45]. Estos efectos incluyen depresión espontánea de actividad eléctrica de las neuronas [46, 47], inhibición de transmisores sinápticos [48, 49], y relajamiento de neurotransmisores [50, 51]. La relativa eficiencia de varios compuestos de xantinas en estimulación a la actividad locomotora es relacionada a la relativa afinidad de esas sustancias por receptores de adenosina [44, 52]. La cafeína y teofilina también actúan como receptores antagonistas de la adenosina en humanos [53]. Hay dos subclases principales de receptores de adenosina: receptores A1 tienen una alta afinidad por adenosina, y A2 tienen baja afinidad [54, 55, 56]. La adenosina a través de estos dos tipos de receptores regula un número de funciones fisiológicas; cada una por inhibición (A1 receptores), o por estimulación (A2 receptores) de adenilato ciclasa. La cafeína y teofilina ejercen acciones antagonicas sobre estos tipos de receptores [52, 57].

1.3. Adenosina

La adenosina es importante en procesos bioquímicos, tales como la transferencia de energía, en la forma de adenosín trifosfato (ATP) y adenosín difosfato ADP, así como transductor de señal en la forma de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). La adenosina desempeña un papel importante como neuromodulador en el sistema nervioso central, a través de la interacción con sus receptores A1, A2A, A2B y A3, ampliamente distribuidos en los tejidos del cuerpo (como se verá en la siguiente sección) produciendo vasodilatación,

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.3. ADENOSINA

broncoconstricción, inmunosupresión. Como fármaco, se utiliza para revertir la taquicardia supra-ventricular paroxística al bloquear el nódulo aurículo-ventricular.

La adenosina es un nucleósido (Fig. 1.4) formado de la unión de adenina con un anillo de ribosa (también conocido como ribofuranosa) a través de un enlace β -glucosídico (β -N9). La adenosina es una purina endógena sintetizada de la degradación de aminoácidos como metionina, treonina, valina e isoleucina así como de la adenosin monofosfato (AMP).

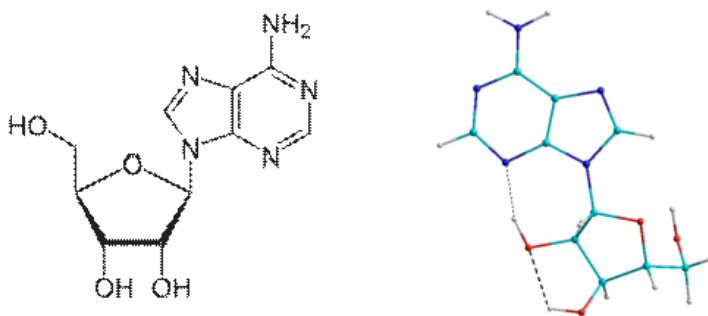


Figura 1.4: Estructura de la adenosina. Diagrama ilustrativo (derecha) y estructura obtenida con cálculos ab initio.

Como mencionamos la adenosina es un nucleósido, siendo un componente de los ácidos nucleicos. En esta sección revisaremos las características estructurales de los nucleosidos y nucleótidos.

Los nucleósidos son moléculas resultantes de la unión de una base nitrogenada y una pentosa. La unión se realiza mediante un enlace N -glucosídico que se establece entre el carbono $C1'$ de la pentosa y un nitrógeno de la base (el $N1$ si es pirimidínica o $N9$ si es púrica) con la pérdida de una molécula de agua.

Los nucleótidos se forman por unión de un nucleósido con una molécula de ácido fosfórico en forma de ión fosfato (PO_4^3), que le confiere un carácter fuertemente ácido al compuesto. El enlace éster se produce entre el grupo alcohol (OH) del carbono $C5'$ de la pentosa y el ácido fosfórico. Se nombra como el nucleósido del que proceden eliminando la letra a final y añadiendo la terminación $5'$ -fosfato, o bien monofosfato; por ejemplo, adenosín- $5'$ -fosfato o adenosín- $5'$ -monofosfato (AMP).

Hay cuatro parámetros conformacionales requeridos para definir la estructura de un nucleótido; éstos se describen a continuación:

1. Ángulo de torsión glucosídico χ determina la disposición *syn* o *anti* de la base relativa a la forma del azúcar, en la (Fig. 1.5) se ilustran las conformaciones *syn* y *anti* para la adenosina.

El enlace glucosídico enlaza una molécula de azúcar (dexosirribosa, ribosa) con una base (A, G, T, C), y se designa mediante los átomos $C1'-N9$ para las purinas y $C1'-N1$ para las pirimidinas. El ángulo χ está definido en términos de cuatro átomos (Ver Tabla 1.1) y puede adoptar un amplio rango de valores, en la Fig. 1.6 se muestra un esquema de éste ángulo y los átomos involucrados para su medición.

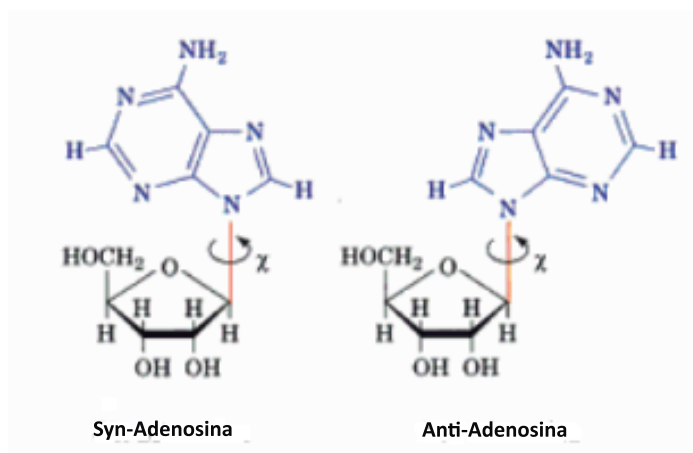


Figura 1.5: Conformaciones *syn* y *anti* del nucleosido adenosina.

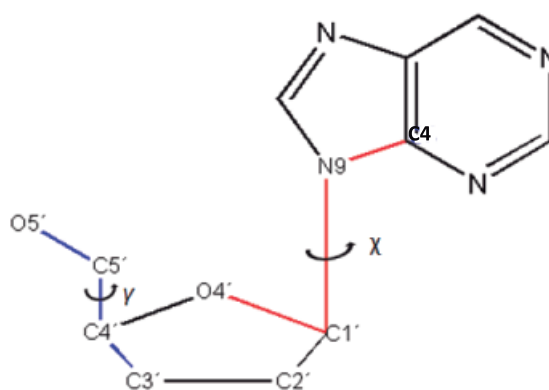


Figura 1.6: Esquema de los ángulos de torsión χ y γ , en color rojo están marcados los átomos involucrados para el ángulo χ y en azul los correspondientes para el ángulo γ .

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.3. ADENOSINA

Los residuos de purina (A, G) tienen dos orientaciones estéricas posibles en relación con el azúcar, conocidas como conformaciones *syn* y *anti*, en el caso de la pirimidinas (C, T) sólo la conformación *anti* se forma fácilmente porque en la conformación *syn* el azúcar interfiere estéricamente sobre el sustituyente del C2 de la pirimidina. En la mayor parte de los ácidos nucleicos de doble hélice todas las bases están en la conformación *anti* [58], la excepción es el ADN-Z en el cual los residuos alternados de pirimidinas y purinas son *anti* y *syn*. Los nucleótidos que se dibujan con la base sobre la pentosa equivalen a la conformación *syn*, mientras que cuando se dibuja la base hacia fuera/derecha del azúcar, se trata de la conformación *anti*.

2. Ángulo de torsión γ determina la orientación del grupo 5'-OH (ó 5'-fosfato), y esta definido por los átomos O5'-C5'-C4'-C3', en la Fig 1.6 se muestra un esquema de este ángulo.

La conformación del esqueleto de azúcar-fosfato sigue una secuencia numérica de átomos P-O5'-C5'-C4'-C3'-O3'-P, y está definida por ángulos de torsión $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \varepsilon, \zeta$, en orden alfabético (Fig. 1.7), cada uno de éstos ángulos está definido por cuatro átomos, en la Tabla 1.1 podemos ver los átomos que definen a cada uno de éstos ángulos de torsión.

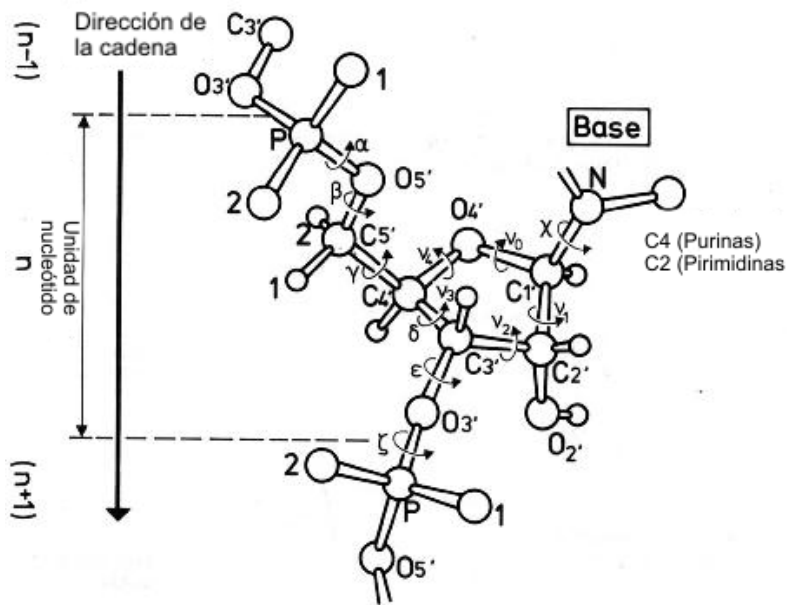


Figura 1.7: Esquema donde se ilustran los ángulos de torsión del esqueleto azúcar-fosfato.

3. Plegamiento del anillo de furanosa descrito por el ángulo de fase de pseudo-rotación $P(0^\circ - 360^\circ)$. Los ángulos de torsión del azúcar son denotados por ν_0, \dots, ν_4 ; la orientación de la base relativa a la molécula de azúcar está dada por el ángulo χ . Los ángulos $\nu_0 - \nu_4, \rho$, y γ siguen la notación de Saenger [59].

Tabla 1.1: Definición de ángulos de torsión en nucleótidos

Ángulos de torsión	Átomos involucrados
α	O3'-P-O5'-C5'
β	P-O5'-C5'-C4'
γ	O5'-C5'-C4'-C3'
δ	C5'-C4'-C3'-O3'
ϵ	C4'-C3'-O3'-P
ζ	C3'-O3'-P-O
χ	O4'-C1'-N1'-C2 (Pirimidinas) O4'-C1'-N9'-C4 (Purinas)
ν_0	C4'-O4'-C1'-C2'
ν_1	O4'-C1'-C2'-C3'
ν_2	C1'-C2'-C3'-C4'
ν_3	C2'-C3'-C4'O4'
ν_4	C3'-C4'O4'-C1'

Las unidades de los ángulos definidos en la tabla anterior son los grados.

Los azúcares en los ácidos nucleicos son moléculas con cinco átomos de carbono, en el ARN se llama ribosa y en el ADN se llama desoxirribosa, en la ribosa el átomo de $C2'$ tiene un grupo OH, mientras que la desoxirribosa el átomo de $C2'$ tiene sólo un átomo de H (Figs. 1.8).

4. El grado de desviación de la planaridad del anillo de la furanosa indicado por el máximo plegamiento fuera del plano ν_{max} .

El ángulo fase de pseudo-rotación P y la amplitud máxima de plegamiento ν_{max} son parámetros calculados de las (Ecs. 1.1 y 1.2) en términos de los ángulos de torsión del azúcar definidos previamente en la tabla 1.1.

Como la función $arctan$ produce ángulos en un rango de -90° a 90° , se suman 180° a la función $arctan(\rho)$ cuando ν_2 es negativo para obtener valores de P en el rango de 90° a 270° ; ó se suman 360° a la función $arctan(\rho)$ cuando ρ es negativo para obtener valores de P en un rango de 270° a 360°

$$\rho = \frac{(\nu_4 - \nu_0) - (\nu_3 - \nu_1)}{2(\nu_2)(\sin 36 + \sin 72)} \quad (1.1)$$

$$P = \begin{cases} \arctan \rho + 180^\circ & \text{si } \nu_2 < 0, \text{ de otro modo} \\ \arctan \rho + 360^\circ & \text{si } \rho < 0, \text{ de otro modo} \\ \arctan \rho & \end{cases}$$

$$\nu_{max} = \text{abs}\left(\frac{\nu_2}{\cos \rho}\right) \quad (1.2)$$

El anillo del azúcar (ribosa y desoxirribosa) generalmente no es plano y puede adoptar múltiples conformaciones frecuentemente con pequeñas diferencias energéticas comparativas: esto debido a que las nubes de electrones se solaparían de estar en el plano, de esta forma, uno o más átomos de carbono siempre quedan por fuera del plano en el que se encuentran los demás. Así, el azúcar puede presentar forma de sobre o forma E (del Inglés

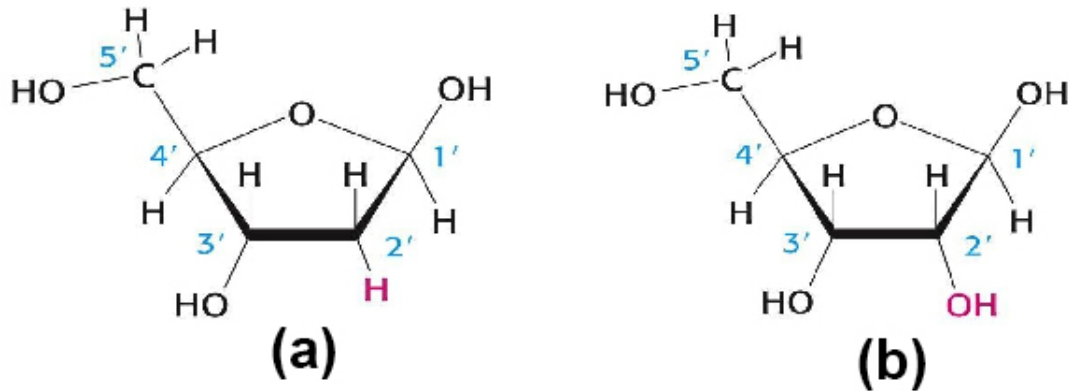


Figura 1.8: Diagrama de la estructura de la molécula de la ribosa (a), dextrirribosa (b) y la numeración de sus átomos.

envelope) cuando uno de los carbonos queda fuera del plano, o bien forma de media silla o forma T (del Inglés twist) cuando dos de los carbonos quedan por fuera del plano y en lados opuestos (Fig. 1.9) Además, para cada uno de estos carbonos la conformación puede ser endo, si el carbono está dirigido hacia donde lo está el carbono $C5'$, o exo, si está dirigido hacia el lado opuesto.

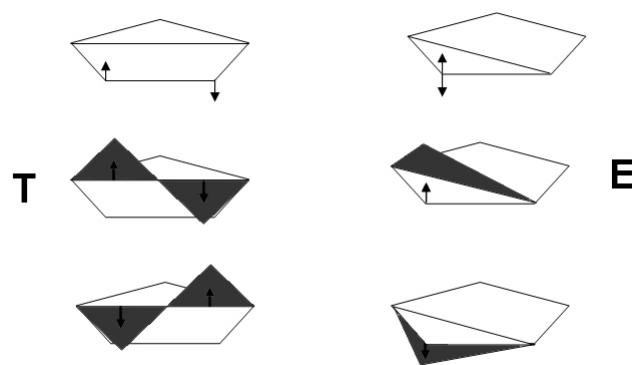


Figura 1.9: Diagrama que muestra las diferentes conformaciones que adopta la molécula del azúcar (ribosa o desoxirribosa). Forma T y E.

1.4. Los receptores de adenosina

El blanco principal de la acción de la cafeína en concentraciones fisiológicamente significativas, son los receptores de adenosina. Como se ha mencionado la CAF es un antagonista competitivo de la adenosina, la cual interactúa con los receptores A1 y A2a [1, 29, 31]. Existen cuatro tipos de receptores de adenosina han sido clasificados [18] y clonados de diferentes especies mamíferas [1, 19] incluyendo el ser humano. El receptor de adenosina A1 es el mejor conocido y más ampliamente estudiado, encontrándose distribuido en el sistema nervioso central y en otros tejidos del organismo (en la parte final de esta sección se describirá esta molécula con más detalle). Estos receptores de adenosina son proteínas de las membranas y podemos imaginarlos como un hilo en el que hemos enhebrado muchas perlas. Cada perla representa un aminoácido, los ladrillos con que se forman nuestras proteínas. Para una comprensión de estas moléculas haremos una revisión de las proteínas, su estructura y los tipos de funciones que desempeñan.

1.4.1. Proteínas

Las proteínas desempeñan un papel fundamental para la vida y son las biomoléculas más versátiles y diversas. Son imprescindibles para el crecimiento del organismo y realizan una enorme cantidad de funciones diferentes. Las proteínas son biopolímeros (macromoléculas orgánicas), constituidas básicamente por carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N); azufre (S) y fósforo (P) y, en menor proporción algunos metales como el hierro (Fe), cobre (Cu), magnesio (Mg), yodo (Y), etcétera. Estos elementos químicos se agrupan para formar unidades estructurales (monómeros) llamados: Aminoácidos, (en la Fig. 1.10, se muestra la representación general de un aminoácido), a los cuales podríamos considerar como los “ladrillos de los edificios moleculares proteicos”. Las proteínas son compuestos complejos formados por cadenas de cientos y miles de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos.

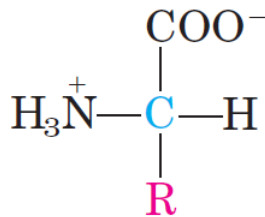


Figura 1.10: Esquema de la estructura general de un aminoácido.

Aunque los aminoácidos solo son 20 (Fig. 1.11), las posibilidades de combinarlos son infinitas. Las propiedades de cada una de las proteínas al igual que su funcionalidad dependen de la secuencia de aminoácidos que la formen.

Los péptidos son cadenas lineales de aminoácidos unidos por enlaces químicos de tipo amídico a los que se denomina enlace peptídico (Fig. 1.12).

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS
1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

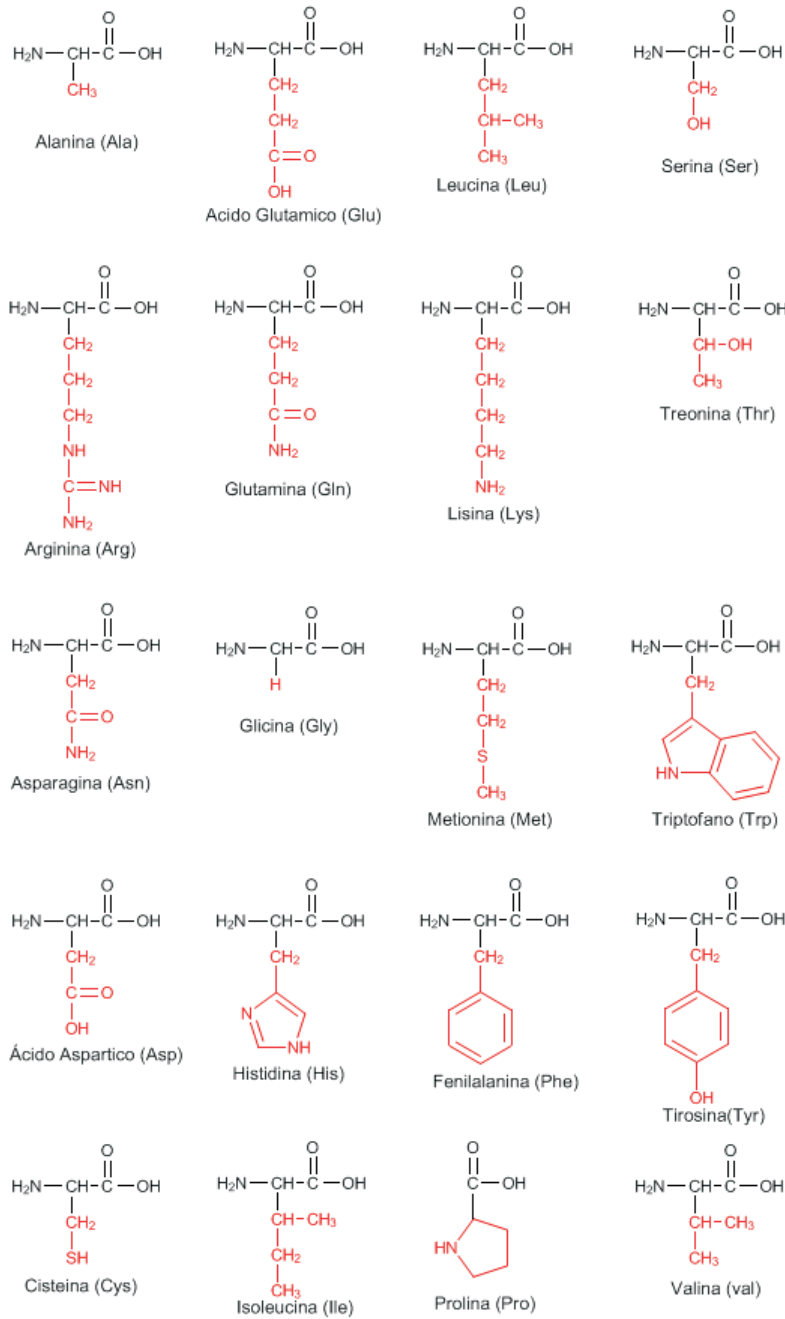


Figura 1.11: Estructura de los 20 aminoácidos que se combinan para formar a las proteínas.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS
1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

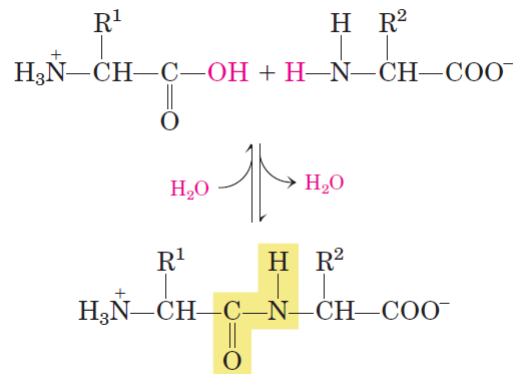


Figura 1.12: El enlace peptídico se forma entre dos aminoácidos contiguos con el respectivo desprendimiento de una molécula de agua.

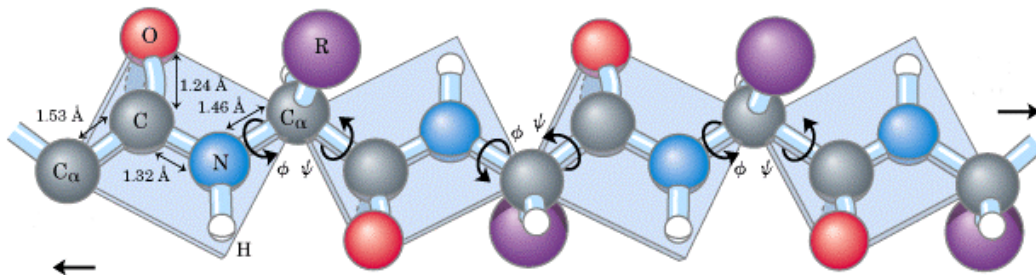


Figura 1.13: Planaridad del enlace peptídico.

El enlace peptídico es un enlace covalente y se establece entre el grupo carboxilo -COOH de un aminoácido y el grupo amino -NH₂ del aminoácido contiguo inmediato, con el consiguiente desprendimiento de una molécula de agua, en la Fig 1.12 se muestra la formación del enlace peptídico a través de la unión de dos aminoácidos contiguos.

El enlace peptídico posee un carácter de doble enlace, lo que significa que es más corto que un enlace sencillo y por consiguiente, es rígido y plano (Fig. 1.13), esto significa que no existe rotación alrededor del enlace. Esta característica previene la libre rotación alrededor del enlace entre el carbono carbonílico y el nitrógeno del enlace peptídico. Aún así, los enlaces entre los C- α y los α -aminos y α -carboxilo, pueden rotar libremente; su única limitación está dada por el tamaño del grupo funcional o radical (R). Es precisamente esta capacidad de rotación la que le permite a las proteínas adoptar un número muy grande de conformaciones.

La distancia de enlace determinada por Pauling y Corey para el enlace peptídico fue de 1.32 Å, intermedia entre los 1.49 Å, de un enlace simple C-N y los 1.27 Å, de un enlace doble C=N

La representación más correcta del grupo peptídico sería un híbrido de resonancia en el cual los electrones están compartidos entre el oxígeno del carbonilo, el carbono del carbonilo y el nitrógeno del grupo amida. Los seis átomos del grupo peptídico se

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

encuentran en el mismo plano debido al carácter parcial de doble enlace que presenta el enlace peptídico.

Dada la rigidez del enlace peptídico, la conformación de las proteínas depende de la rotación de los enlaces $N-C\alpha$ y $C\alpha -C$ que unen dos enlaces peptídicos adyacentes y si ellos pueden girar libremente. El ángulo de rotación del enlace $N-C\alpha$ se denomina ϕ y el del enlace $C\alpha -C$ se denomina ψ . La conformación de la cadena polipeptídica queda perfectamente definida si se definen los ángulos ϕ y ψ de cada uno de sus enlaces (Fig. 1.13).

Los enlaces peptídicos generalmente se encuentran en posición trans en lugar de cis esto se debe en gran parte a la interferencia estérica (de tamaño) de los grupos R cuando se encuentran en posición cis. (Fig. 1.14)

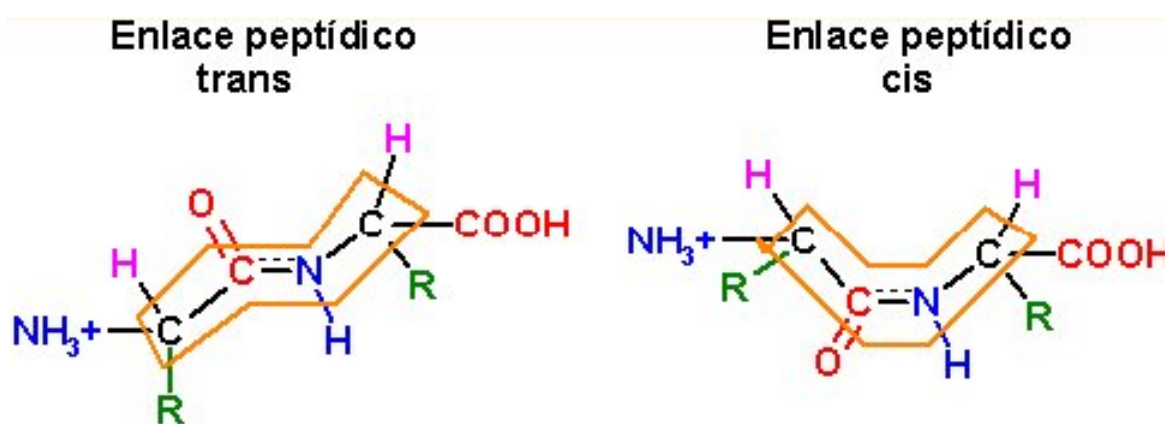


Figura 1.14: Configuración trans y cis del enlace peptídico.

Al igual que los enlaces amida, los grupos $-C=O$ (carbonilo) y $-NH$ (amino), de los enlaces peptídicos, son incapaces de recibir o donar protones en un amplio rango de valores de pH (entre 2 y 12). En las proteínas, los únicos grupos cargados son el N - y C -terminales y cualquier grupo ionizable presente en la cadena lateral de los residuos. Aún así, los grupos $-C=O$ y $-NH$ del enlace peptídico participan en la formación de puentes de hidrógeno en las proteínas para dar origen a la estructura secundaria, particularmente hélices alfa, hojas beta y estructura terciaria.

Estructura tridimensional

La estructura tridimensional de las proteínas es un factor importante para su actividad biológica. Las proteínas son polímeros formados por aminoácidos que se eslabonan mediante enlaces peptídicos covalentes. Puede haber muchas conformaciones distintas de una molécula tan grande como las de las proteínas. De todas ellas, unas pocas estructuras tienen actividad biológica; éstas se denominan conformaciones nativas. Dada la complejidad de las proteínas, se clasifican en cuatro niveles de estructura: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

La Estructura primaria: es el orden en el que se enlazan en forma covalente los aminoácidos, está representada por la sucesión lineal de aminoácidos que forman la cadena peptídica. El ordenamiento de los aminoácidos en cada cadena peptídica, no es arbitrario,

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

sino que obedece a un plan predeterminado en el ADN y es el primer paso unidimensional para especificar la estructura tridimensional de una proteína.

La sucesión de aminoácidos de una proteína determina su estructura tridimensional que a su vez determina sus propiedades. Todas las proteínas requieren la estructura tridimensional correcta para desempeñar debidamente su función. Una de las demostraciones más impresionantes de la importancia de la estructura primaria se observa en la hemoglobina asociada a la anemia drepanocítica (o de células falciformes). En esta enfermedad genética, los glóbulos rojos de la sangre no pueden captar oxígeno en forma eficiente. Además los glóbulos adoptan una forma de hoz característica que es el origen del nombre de la enfermedad. Las células deformes tienden a quedar atrapadas en los vasos sanguíneos pequeños con lo que bloquean la circulación y dañan los órganos. Estas consecuencias son resultado de un cambio en un residuo de aminoácido en la sucesión de la estructura primaria.

La Estructura secundaria: está representada por la disposición espacial que adopta la cadena peptídica (estructura primaria) la cual puede adoptar diferentes arreglos (Fig. 1.15).

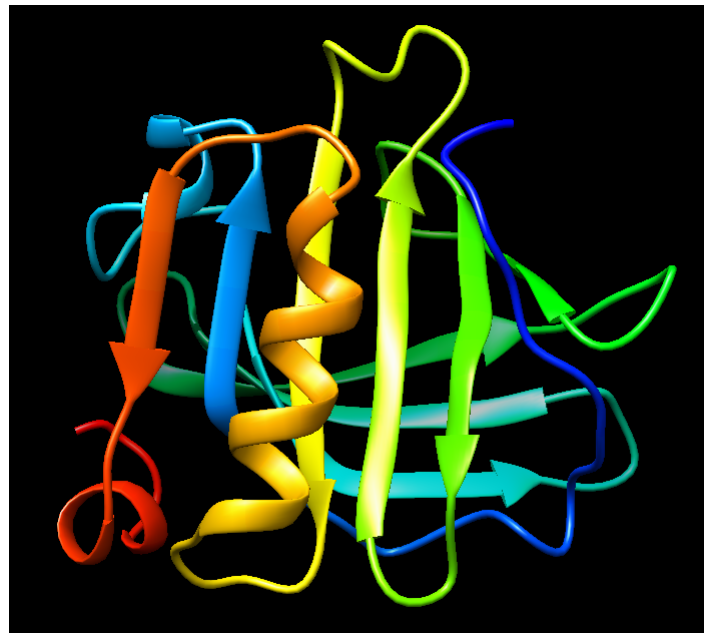


Figura 1.15: La estructura secundaria de las proteínas esta conformada por: láminas beta (flechas), hélices alfa. (Beta-lactoglobulina) “3BLG” del Protein Data Bank.

a) Hélice Alfa.- Esta estructura es una espiral que consiste de residuos de aminoácidos empaquetados formando un núcleo, en donde las cadenas laterales de los residuos se encuentran hacia fuera del eje central para evitar interferencias estéricas (de tamaño). La hélice alfa se estabiliza con puente hidrógeno paralelos al eje de la hélice dentro del esqueleto de una sola cadena polipeptídica. Contando desde el extremo de la terminal N, el grupo $C=O$ de cada residuo de aminoácido forma un puente de hidrógeno con el grupo $N-H$ del aminoácido que está a una distancia de 4 residuos en la sucesión covalente. La conformación helicoidal permite la alineación de los átomos que participan en los puentes hidrógeno, lo que le confiere a los enlaces una fuerza máxima y hace a la conformación

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

helicoidal muy estable. Hay 3.4 residuos por vuelta de la hélice. Una hélice alfa está estabilizada por puentes de hidrógeno entre los oxígenos de los grupos carbonilo del enlace peptídico y los hidrógenos de las amidas que son parte del esqueleto del polipéptido (Fig. 1.16). Los puentes de hidrógeno se forman desde el grupo carbonilo de un enlace peptídico hasta el hidrógeno de la amida del cuarto enlace peptídico siguiente (o anterior en la parte media de la hélice), esto le da a la estructura su carácter helicoidal. De tal forma que todos los residuos que participan en la hélice están unidos por puentes de hidrógeno.

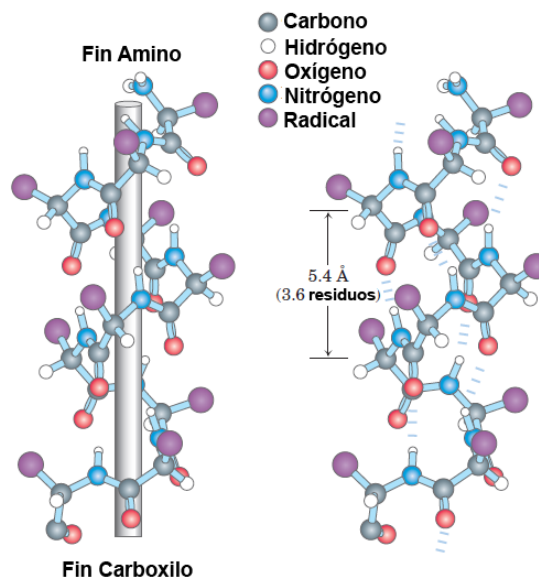


Figura 1.16: Estabilización de la hélice alfa por puentes hidrógenos.

b) Hojas beta.- Es una estructura plana compuesta por alineación de dos o más cadenas beta las cuales son relativamente cortas. Todos los componentes del enlace peptídico están involucrados en la formación de puentes de hidrógeno.

La disposición de átomos en la conformación de lámina beta plegada difiere marcadamente de la observada en la hélice alfa. El esqueleto peptídico de la lámina beta está casi totalmente extendido. Se puede formar puentes hidrógeno entre diferentes partes de una sola cadena que se pliega sobre si misma (enlaces intracadena) o entre diferentes cadenas (enlaces intercadena). Si las cadenas peptídicas corren en la misma dirección (es decir, si todas están alineadas en términos de sus extremos de terminal N y terminal C), se forma una lámina plegada paralela. Si las cadenas se alternan, de modo que cadenas adyacentes corren en direcciones opuestas, se forma una lámina plegada antiparalela. Los puentes de hidrógeno entre cadenas peptídicas en láminas beta plegadas dan pie a una estructura repetida en zigzag, de ahí el nombre de lámina plegada.

c) También existen secuencias en el polipéptido que no alcanzan una estructura secundaria bien definida y se dice que forman enroscamientos aleatorios. Irregularidades en estructuras regulares. Hay otras estructuras helicoidales en las proteínas. Suelen encontrarse en tramos más cortos que la hélice alfa. La más común es la hélice 3_{10} , que tiene tres residuos por vuelta y diez átomos en el anillo que se forma con el puente de hidrógeno.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

Otras hélices comunes se designan 2_7 y $4,4_{16}$. Las estructuras secundarias tienen interacciones repetidas que son resultado de la formación de puentes de hidrógeno N-H entre los grupos amida y carbonilo del esqueleto peptídico.

Dentro de cada residuo de aminoácido hay dos enlaces cuya rotación es libre: El enlace entre el carbono alfa y el nitrógeno amínico del residuo. El enlace entre el carbono alfa y el carbono carboxílico de ese residuo.

La combinación del grupo peptídico plano y los dos enlaces de rotación libre tiene importantes implicaciones para la conformación tridimensional de los péptidos y proteínas, por ejemplo, el aminoácido de prolina no permite la formación de la estructura secundaria porque su grupo amino no es geoméricamente compatible con la espiral derecha de la hélice alfa; por el contrario produce un cambio en la estructura que interrumpe la estructura helicoidal. Un gran número de aminoácidos cargados como glutamato, aspartato, histidina, lisina o arginina, pueden también interrumpir la estructura helicoidal al formar enlaces iónicos o al repelerse electrostáticamente. Finalmente, los aminoácidos con cadenas laterales voluminosas como el triptófano o aquellos que las tienen ramificadas en el carbono beta, es decir, el primer carbono del grupo (R), como la valina o isoleucina pueden, dependiendo del número presente, interferir con la formación de la estructura secundaria.

La Estructura terciaria: está representada por los superplegamientos y enrollamientos de la estructura secundaria. Se mantienen por enlaces fuertes (puentes disulfuro entre dos cisteínas) y otros débiles (puentes de hidrógeno; fuerzas de Van der Waals; interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas), por ejemplo la molécula de la mioglobina la cual se muestra en la (Fig. 1.17).

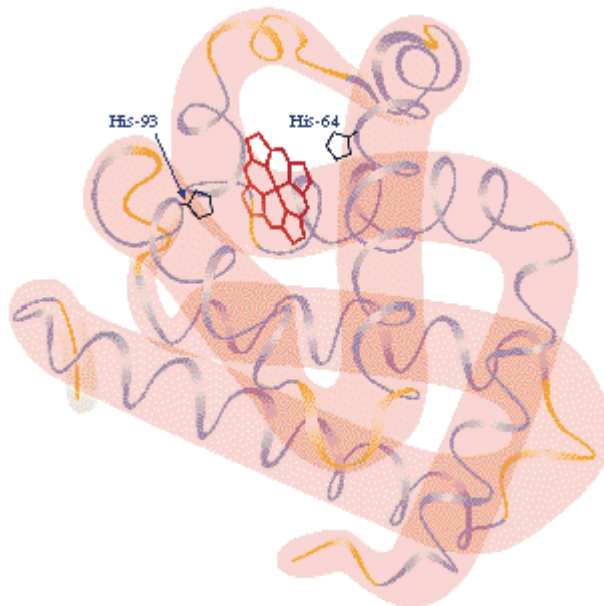


Figura 1.17: La mioglobina es un ejemplo de la estructura terciaria de las proteínas.

La Estructura cuaternaria: está representada por el acoplamiento de varias cadenas polipeptídicas, iguales o diferentes, con estructuras terciarias que quedan auto ensambladas por enlaces débiles no covalentes, por ejemplo, la hemoglobina. La estructura cua-

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

ternaria es una propiedad que consta de más de una cadena polipeptídica. Cada cadena es una subunidad. El número de cadenas puede variar desde dos hasta más de una docena, y las cadenas pueden ser idénticas y distintas. Ejemplos comunes son los dímeros, trímeros, tetrameros, formados por dos, tres y cuatro cadenas polipeptídicas, respectivamente. Las cadenas interactúan entre sí en forma no covalente, mediante atracciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, e interacciones hidrofóbicas. Como resultado de estas interacciones no covalentes, cambios sutiles en la estructura de un punto de una molécula de proteína podrían dar pie a cambios drásticos en las propiedades de un punto distante. Las proteínas que presentan esta propiedad se describen como alostéricas (Alosterismo es la propiedad de algunas proteínas de cambiar la conformación y actividad cuando interactúan específicamente con algunos ligandos). Un ejemplo clásico de la estructura cuaternaria de las proteínas y de su efecto sobre las propiedades es la comparación de la hemoglobina, (Fig. 1.18) una proteína alostérica, y la mioglobina, que consta de una sola cadena polipeptídica.

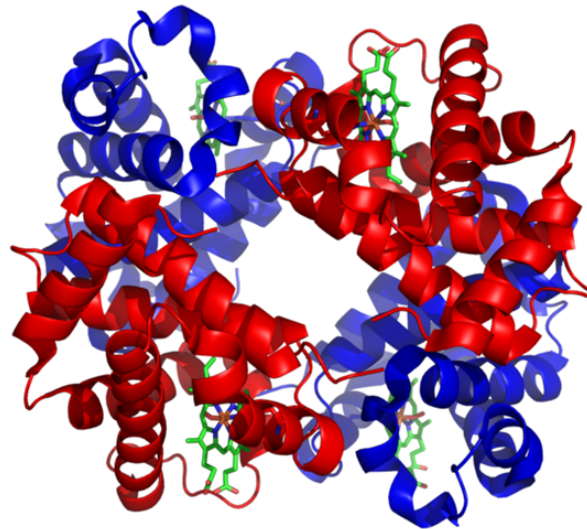


Figura 1.18: La hemoglobina es un ejemplo de la estructura cuaternaria de las proteínas.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

Funciones de las proteínas

Elas poseen un conjunto importante de propiedades y funciones que desempeñan en el organismo, cada célula en el cuerpo humano las contiene. Las funciones de las proteínas son específicas de cada una de ellas y permiten a las células defenderse de agentes externos, así como de mantener su integridad, controlar y regular funciones. Todos los tipos de proteínas realizan su función de la misma forma: Por unión selectiva a moléculas.

Algunas de las propiedades y funciones de las proteínas son:

Defensiva; ya que crean los anticuerpos y regulan factores contra agentes extraños o infecciones.

Reguladoras; puesto que ellas forman los siguientes compuestos: Hemoglobina, proteínas plasmáticas, hormonas, jugos digestivos, enzimas y vitaminas que son causantes de las reacciones químicas que suceden en el organismo. Algunas proteínas como la ciclina sirven para regular la división celular y otras regulan la expresión de ciertos genes.

Enzimática; son las más especializadas y numerosas. Actúan como biocatalizadores acelerando las reacciones químicas del metabolismo.

Moléculas amortiguadoras; manteniendo en diversos medios tanto el pH interno como el equilibrio osmótico.

Estructural; forman tejidos de sostén, confieren elasticidad y resistencia a órganos y tejidos como el colágeno, la elastina de la piel, forman estructuras capaces de soportar gran tensión continuada, como un tendón.

Transporte; ejemplos de ello son la hemoglobina y la mioglobina, proteínas transportadoras del oxígeno en la sangre. Actúan como receptores de las membranas, a las cuales se fijan moléculas capaces de desencadenar una respuesta determinada, por ejemplo los receptores de Adenosina.

1.4.2. Estructura de los receptores de adenosina

Los receptores de adenosina pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) también conocidos como receptores transmembrana de siete regiones. Los GPCR comprenden una gran familia (más de 800 miembros) de proteínas de receptores transmembrana que comparten una estructura común (Fig. 1.19), su cadena polipeptídica atraviesa la membrana plasmática 7 veces formando un motivo llamado región **hepta-helicoidal**. La secuencia polipeptídica comienza en el extremo N-terminal (NH_3^+), el cual se expone hacia el espacio extracelular. Las regiones transmembrana están formadas por secuencias de varios aminoácidos que adquieren la disposición de hélice alfa (marcados como H1-H7 en la Fig. 1.19), las cuales se encuentran conectadas por 6 bucles, 3 intra (I1-I3) y 3 extracelulares (E1-E3) de longitud variable quedando el extremo C-terminal (COO^-) en el interior celular, esta disposición permite que una parte del receptor quede expuesta al lado externo de la membrana plasmática, la cual será responsable de la interacción con el ligando, mientras que otra parte se expone hacia el lado intracelular, siendo ésta responsable de la interacción con las proteínas G. Los GPCRs no sólo comparten esta estructural

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

común, sino también un método intracelular de amplificación de la señal. Este método se basa en la interacción por parte de cada receptor con proteínas G específicas. Para ello es necesario que el extremo C-terminal interactúe con las cavidades formadas por los bucles intracelulares 2 y 3 [60], siendo la secuencia de estas cavidades particularmente importante para el reconocimiento de proteínas G características.

Los GPCR son regulados por muchos agonistas (Fig. 1.21), después de que el agonista se acopla los GPCR exponen los sitios intracelulares involucrados en la interacción con la proteína G heterotrimérica la cual contiene subunidades α , β y γ . Esto cataliza la disociación de GDP unido a la subunidad $G\alpha$ y su remplazo con GTP y conduce a la disociación de $G\alpha$ de las subunidades $G\beta\gamma$. Ambas subunidades α GTP y complejos $G\beta\gamma$ entonces estimulan diversos efectores. Por último la especificidad de la proteína G de acoplamiento de cada receptor determina la naturaleza de los blancos de señalización [61].

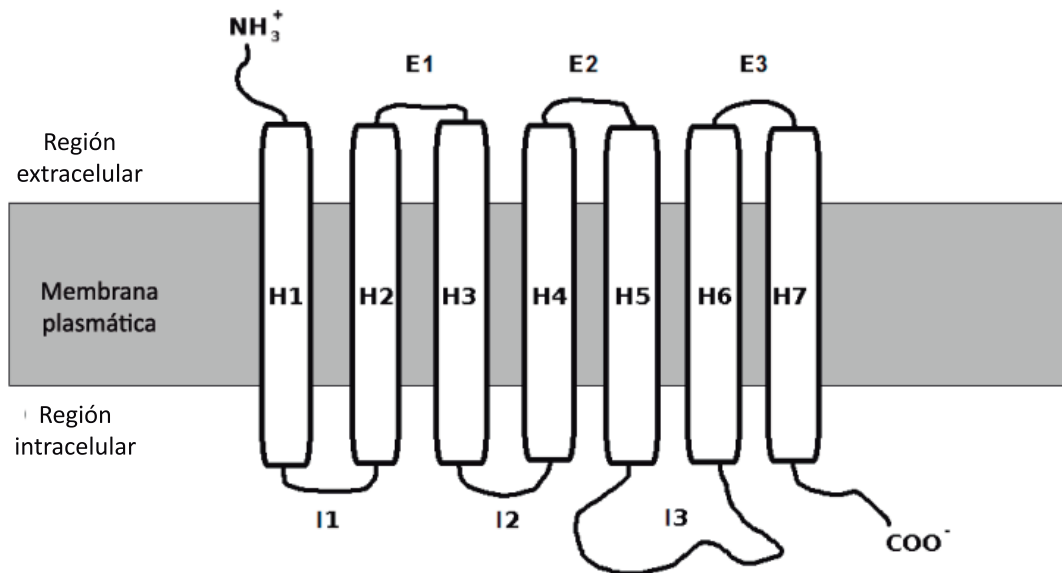


Figura 1.19: Esquema de la estructura común de un receptor acoplado a proteína G.

Los receptores de adenosina (AR) están implicados en múltiples procesos fisiológicos en el organismo. En el Sistema Nervioso Central (SNC) la adenosina, mediante su acción neuromoduladora, controla la excitabilidad neuronal, ejerciendo su efecto a través de los receptores de alta afinidad A1 y A2A. Estos receptores interactúan con receptores de neurotransmisores, neuromoduladores y con sistemas de transporte de adenosina. Al menos dos tipos de receptores median las acciones de la adenosina en el corazón. Los receptores de adenosina A1 disminuyen el consumo de oxígeno disminuyendo la frecuencia cardíaca, y los receptores de la adenosina A2 aumentan el suministro de oxígeno, provocando una vasodilatación coronaria.

Los receptores A1 están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central, también se encuentran en el corazón, en el tejido adiposo inhiben la lipólisis; y en el riñón reducen la presión de la filtración glomerular y producen antidiuresis. Además, de estar presentes en casi todas las áreas del cerebro, pero particularmente en el hipocampo, corteza cerebral, corteza del cerebelo, y en el núcleo del tálamo [62] [63]. El correspon-

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

diente ARNm muestra una distribución diferente [64] [65], indicando que algunos de estos receptores están mejor en las terminales nerviosas que en las células del cuerpo [66].

Los receptores de adenosina son proteínas de la membrana cuya estructura primaria contiene más de 300 residuos de aminoácidos que están acoplados a proteínas G, existen cuatro subtipos designados como: A1, A2a, A2b, A3 [1] [19]. Cada subtipo de receptor tiene un perfil único de unión al ligando y preferencia de unión a la proteína G (Fig. 1.21) e interacciona de forma específica con ellas, cada una de las cuales ejerce un efecto característico en el interior de la célula. La siguiente ilustración trata de exponer la heterogeneidad, tanto a nivel de ligandos como a nivel de efectos biológicos desencadenados. (Fig. 1.22)

Durante años ha sido la prioridad de los farmacólogos dedicados al estudio de los receptores acoplados a proteínas G. El diseño de ligandos potentes y selectivos para cada uno de los receptores. Para ello se diferenciaron a los receptores en función de los agentes farmacológicos que los encendían o apagaban. Estos ligandos se conocen desde el punto de vista clásico como agonistas y antagonistas. En la actualidad se ha demostrado que los receptores se pueden encontrar en distintas conformaciones, cada una de ellas con una particular función biológica, siendo la más favorable para la señalización del receptor aquella estabilizada por un agonista, mientras que el empleo de agonistas inversos estabilizaría la conformación menos activa del receptor. El caso de los antagonistas es especial, ya que estos no intervienen en el equilibrio entre la forma activa e inactiva del receptor y sin embargo, tienen la capacidad de bloquear el efecto tanto de los agonistas como de los agonistas inversos.

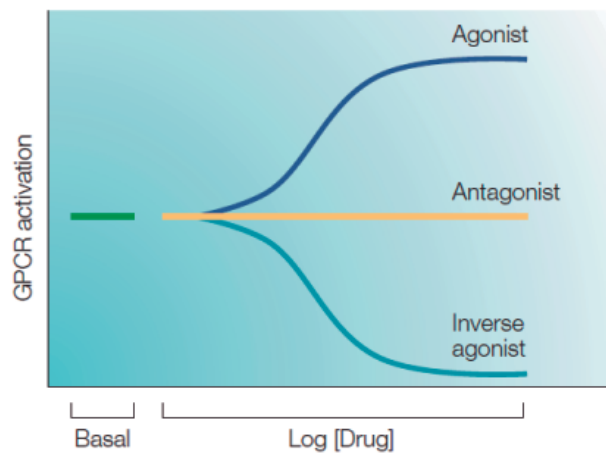


Figura 1.20: Acción de los diferentes tipos de ligandos sobre el estado de activación del receptor. Imagen tomada de: The state of GPCR research in 2004 [67]

La actividad de los receptores de adenosina A1, A2a y A2b es inhibida por metilxantinas de origen natural tales como la cafeína o teofilina. El receptor de adenosina A1 es el mejor conocido y más ampliamente estudiado de los cuatro subtipos de receptores de adenosina. Estos receptores de adenosina han sido clonados de diferentes especies incluyendo la humana. Hasta hace poco, no existían datos experimentales cuantitativos sobre su

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS
1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

estructura espacial y sus modelos moleculares se construyeron en homología a la estructura de la rodopsina bovina. Los receptores de adenosina contienen varias regiones (regiones de la cadena proteínica) tanto extracelulares, intracelulares como transmembrana. Siete regiones transmembrana contienen aproximadamente 20 residuos de aminoácidos cada uno y su configuración es α -helicoidal.

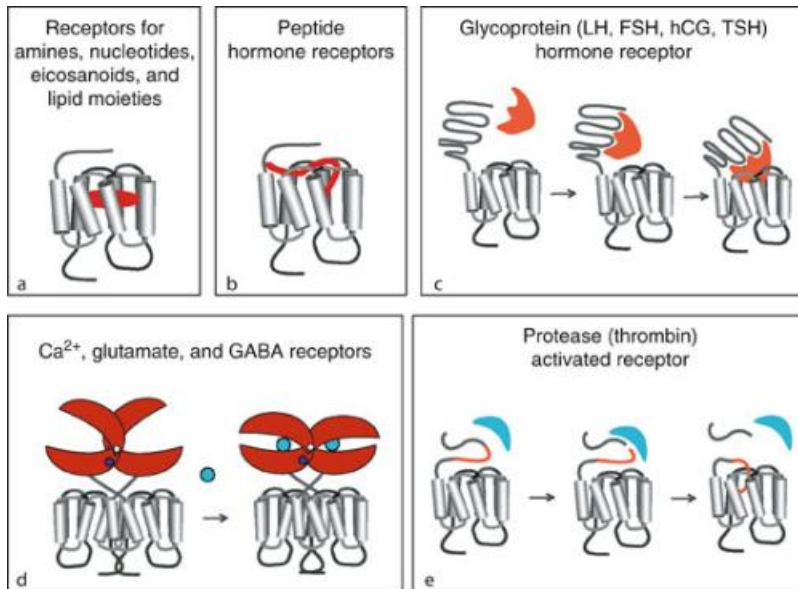


Figura 1.21: Diagrama que ilustra los sitios de unión de diferentes familias de hormonas y neurotransmisores sobre sus receptores.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS
1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

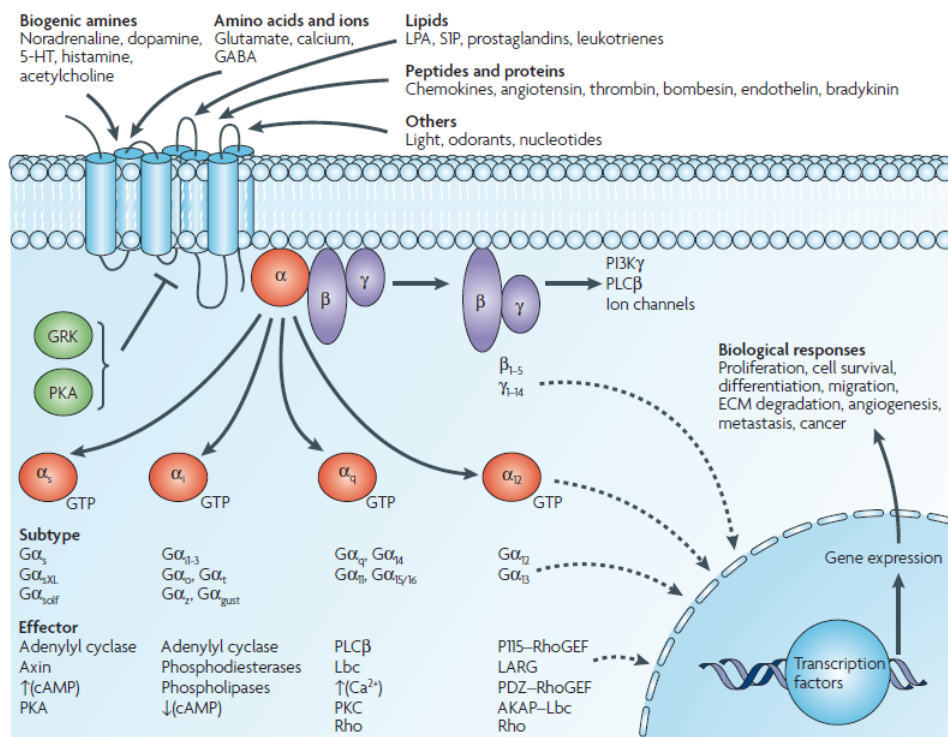


Figura 1.22: Diversidad de señalización del receptor acoplado a la proteína G. Varios ligandos utilizan los receptores acoplados a las proteínas G para estimular la membrana, objetivos citoplasmático y nucleares. Imagen tomada de Dorsam y Gutkind [68]

CAPÍTULO 1. REVISIÓN DE LOS CONCEPTOS BIOLÓGICOS

1.4. LOS RECEPTORES DE ADENOSINA

En las Figs. (1.23-1.25), se ilustran las estructuras de los receptores A1 y A2a. A estos receptores podemos verlos como hilos en el que hemos enhebrado muchas perlas. Cada perla representa un aminoácido, los ladrillos con que se forman nuestras proteínas. Esta larga hebra atraviesa la membrana plasmática en siete ocasiones. Uno de los extremos, el extremo amino terminal de la proteína, queda ubicado en el exterior de la célula; si seguimos la hebra, penetra en la membrana por el primer segmento transmembrana, llega al interior celular y se dirige hacia fuera formándose un nuevo segmento transmembrana, vuelve a entrar, y así sucesivamente hasta formar las siete regiones transmembrana y quedando el extremo final, el carboxilo terminal de la proteína, en el interior de la célula.

Estas regiones juegan un rol importante en la interacción con adenosina, con sus agonistas y antagonistas [14]. La única estructura espacial de la AR, se encuentra con una resolución de 2.6 Å en cristales del complejo del receptor humano A2a con el antagonista de ADO [20] Fig. 1.24, confirmando los modelos previamente construidos para los receptores. Antes de conocer este trabajo, tratamos de imaginar cómo y qué complejos suficientemente estables se pueden formar de CAF con AR [15] [16]. En vista de que aún para secciones de los fragmentos pequeños transmembrana de AR la estructura es muy compleja para los cálculos de mecánica cuántica, el único método de cálculo para los estudios teóricos de sus complejos con CAF sigue siendo el método de la mecánica molecular, MM. Hemos demostrado, usando dos diferentes campo de fuerza de MM y dos diferentes paquetes computacionales que tales complejos con fragmentos del receptor A1 humano son posibles. Y que al interactuar CAF con AR bloquea el acceso de ADO a los sitios de interacción no solo con los residuos de aminoácidos que forman enlaces-H con CAF, sino también con una serie de sus vecinos [15] [16]. En este trabajo se considera la posibilidad de la formación de complejos de CAF y ADO con segmentos más extensos de las secciones intramembrana y se demostró que la CAF puede formar un complejo con energía de interacción no menor que la de los complejos formados con ADO.

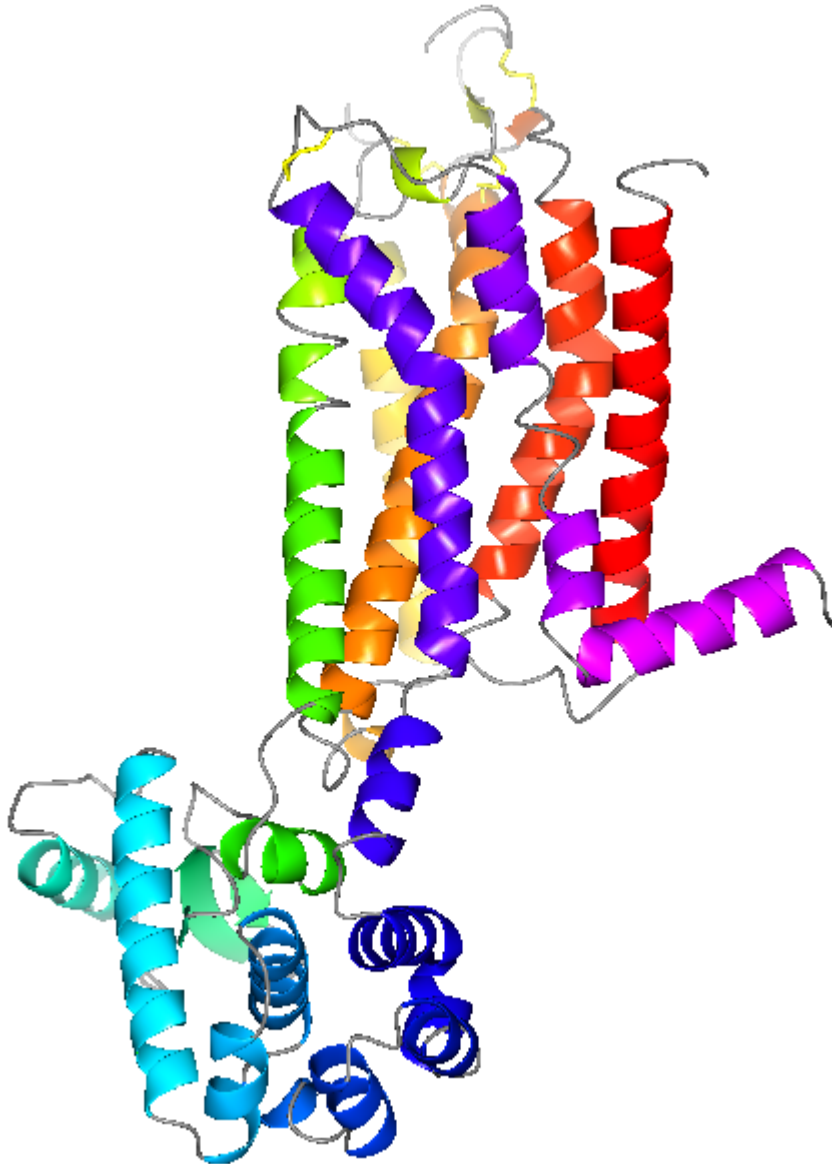


Figura 1.24: Estructura cristalográfica del receptor de adenosina A2a reportada por Jaakola [20], Código: "3EML" Protein Data Bank.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Métodos computacionales para estudio de sistemas moleculares

La modelación computacional simula estructuras y reacciones químicas basadas total o parcialmente sobre las leyes fundamentales de la Física y Química. Ello permite estudiar fenómenos químicos y físicos a través de cálculos realizados en computadoras antes de examinar las reacciones y compuestos experimentalmente.

Hay dos amplias áreas dentro de la modelación computacional dedicadas al estudio de las estructuras de las moléculas y sus reacciones: MM y MC. Ambas desarrollan el mismo tipo básico de cálculos.

- Calculan la energía de una estructura molecular particular (arreglo espacial de átomos o núcleos y electrones).
- Desarrollo de la geometría optimizada, la cual localiza la más baja energía de la estructura molecular en una proximidad cercana a la estructura inicial especificada. La optimización geométrica depende primeramente del gradiente de la energía, la primera derivada de la energía con respecto a la posición atómica.
- Cálculo de frecuencias vibracionales de las moléculas resultado del movimiento interatómico en las moléculas. Las frecuencias dependen de las segundas derivadas de la energía con respecto a la estructura electrónica y el cálculo de la frecuencia puede también predecir otras propiedades las cuales dependen de las segundas derivadas.

Las simulaciones de MM usan las leyes de la Física clásica para predecir la estructura y propiedades de moléculas. Los métodos de MM están disponibles en muchos programas computacionales, incluidos MM3, HyperChem [69], Quanta, Sybyl, etc. Hay muchos métodos diferentes de MM, cada uno es caracterizado por su campo de fuerzas particular. Un campo de fuerzas tiene los siguientes componentes:

- Un conjunto de ecuaciones que determinan cómo la energía potencial de una molécula varía con la posición de sus átomos.

- Una conjunto de tipos de átomos que definen las características de un elemento dentro de un contexto químico específico. Los tipos de átomos describen diferentes características y comportamientos de un elemento, dependiendo de su entorno, por ejemplo, un átomo de carbono en un carbonil es tratado diferente que uno enlazado a tres hidrógenos. Los tipos de átomos dependen de la hibridación, carga atómica, y el tipo de otros átomos enlazados a él.
- Uno o más conjuntos de parámetros que adecúan las ecuaciones y tipos de átomos a los datos experimentales, el conjunto de parámetros define constantes de fuerza, los cuales son valores en la ecuación para relacionar características atómicas a componentes de energía y datos estructurales, tales como, longitudes de enlace y ángulos.

Esta aproximación hace que los cálculos computacionales de MM sean totalmente baratos y permiten ser usados para un sistema grande que contenga cientos de átomos. Sin embargo, también tiene diversas limitaciones, entre las más importantes son:

- Cada campo de fuerzas logra buenos resultados sólo para un limitado conjunto de moléculas (átomos) para las cuales fue parametrizado. Ningún campo de fuerzas puede ser usado generalmente para todos los sistemas moleculares.
- Desprecia el efecto de los electrones donde predominan efectos electrónicos, por ejemplo, no puede describir procesos en los cuales se involucran formaciones de enlaces o rompimiento de enlaces. Las propiedades moleculares que dependen sutilmente de detalles electrónicos no son reproducidos por los métodos de MM.

2.2. Mecánica molecular

La MM es un método frecuentemente utilizado para calcular conformaciones en sistemas orgánicos complejos, sus ideas y principios básicos surgieron desde los años 30s del siglo pasado, sin embargo su desarrollo fue hasta los años 50s. Uno de los primeros cálculos que han mostrado la utilidad del método fue realizado por Westheimer, Hendrickson, Wiber, Allinger, Warshel y colaboradores, dicho método es aplicable a estados electrónicos fundamentales.

MM se basa en la idea que una molécula puede ser representada por el conjunto de los núcleos de sus átomos los cuales se encuentran distribuidos sobre una superficie de energía potencial. De esta manera la energía de la molécula en el estado base esta en función de las posiciones de los núcleos. El método de MM no es un método semiempírico en el sentido como se acostumbra en MC, pues no trata con un hamiltoniano, con una función de onda o con densidad electrónica; en lugar de ello usa un modelo de una molécula compuesta por átomos que se mantienen unidos por enlaces químicos (resortes) (Fig. 2.1).

Para realizar cálculos en mecánica molecular se emplean un conjunto de ecuaciones para describir la superficie de la energía potencial y cuya forma matemática se toma de la mecánica clásica, este conjunto de ecuaciones del potencial son llamadas campo de fuerzas, los cuales contienen parámetros ajustados para reproducir los resultados experimentales existentes para obtener la mejor concordancia de lo calculado y las propiedades experimentales de las moléculas. Los modelos de MM son útiles en el estudio de estructuras,

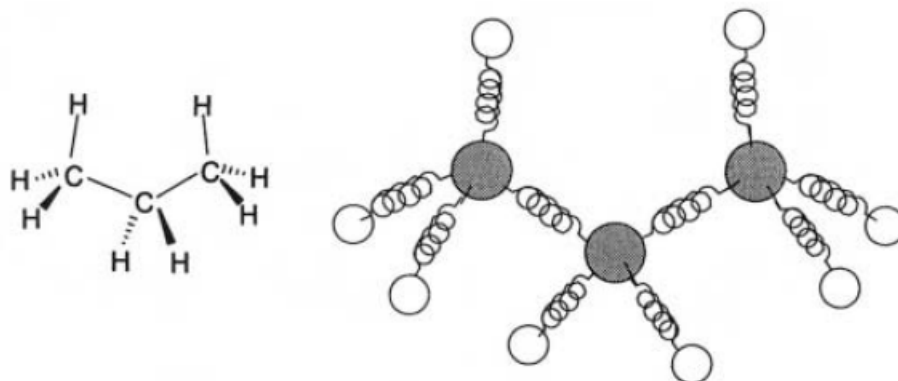


Figura 2.1: Mecánica molecular considera a los átomos como esferas y a los enlaces los considera como resortes

energías conformacionales, y otras propiedades moleculares incluyendo frecuencias vibracionales, entropías conformacionales, y momentos dipolares, etc [12, 13] [70] - [76]. Dentro de este esquema a los átomos se les considera como partículas de radio r con una carga atómica. Las cargas atómicas son generalmente calculadas con mecánica cuántica.

En comparación con la aproximación de primeros principios, los modelos de mecánica molecular son mucho más rápidos y simples debido al hecho de que los electrones son tratados implícitamente.

El método MM a veces se le llama método del campo de fuerza empírico. Un campo de fuerza en MM asigna a cada átomo de una molécula un número de posibles tipos de átomos, dependiendo del número atómico y del entorno molecular se debe especificar no solamente las coordenadas atómicas iniciales, sino también qué átomos están ligados a qué átomos, de forma que se pueda construir apropiadamente la expresión del potencial V . Cuando un campo de fuerzas está bien parametrizado puede lograr una precisión que es comparable con modelos de mecánica cuántica de alto nivel en el cálculo de las energías conformacionales relativas de una molécula [70]. Para grandes sistemas (proteínas, ADN, ARN, etc.) MM es casi la única opción práctica dado el hecho de que los cálculos sobre grandes sistemas biológicos necesitan grandes recursos computacionales y consumen mucho tiempo.

MM determina los cambios energéticos de la molécula debidos al estiramiento del enlace (V_{ten}), flexión del ángulo de valencia (V_{flex}), rotación interna (torsión) en torno a los enlaces (V_{tor}), atracciones y repulsiones de Van der Waals entre pares de átomos no ligados (V_{vdw}) e interacciones electrostáticas entre pares de átomos (V_{el}). La suma de estas contribuciones da la energía potencial V (Ec 2.1) para el movimiento de los átomos en la molécula o moléculas si el sistema que se está calculando tiene más de una molécula. De forma general el potencial en mecánica molecular se representa por medio de la aditividad de términos:

$$V = V_{ten} + V_{flex} + V_{tor} + V_{vdw} + V_{el} \quad (2.1)$$

Es útil la siguiente terminología en MM (Fig. 2.2): los átomos $1,2$ son los átomos

ligados entre sí: los átomos 1,3 están separados por dos enlaces covalentes: los átomos 1,4 están separados por tres enlaces covalentes y así sucesivamente.

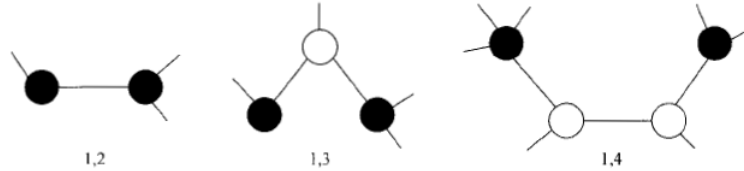


Figura 2.2: Los átomos sombreados son los átomos 1,2, 1,3, 1,4

2.2.1. Estiramiento del enlace

La función de energía para el estiramiento de enlace entre dos átomos A y B puede ser tratada a través del potencial de Morse (Fig. 2.3). El potencial de Morse tiene la forma:

$$v(l) = D_e(1 - e^{-\alpha(l-l_0)})^2 \quad (2.2)$$

donde D_e es la profundidad del potencial de mínima energía, l_0 es el valor de equilibrio del enlace, α controla la amplitud del potencial y puede ser definida como:

$$\alpha = \omega \sqrt{\frac{\mu}{2D_e}} \quad (2.3)$$

donde μ es la masa reducida y ω es la relación con la constante de estiramiento del enlace k a través:

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.4)$$

El potencial de Morse usualmente no es utilizado en mecánica molecular porque computacionalmente es costoso, además para cada enlace se necesita especificar tres parámetros. Otra forma es utilizar una expansión de Taylor alrededor de una longitud de enlace de "equilibrio", l_0 . La expansión se corta en el término de segundo orden.

$$V_b(l_{ij} - l_{ij}^0) = V(0) + \frac{dV}{dl}(l_{ij} - l_{ij}^0) + \frac{1}{2} \frac{d^2V}{dl^2}(l_{ij} - l_{ij}^0)^2 \quad (2.5)$$

Las derivadas son evaluadas en $l = l^0$ y el término de energía $V(0)$ es normalmente cero. El segundo término es cero conforme la expansión está alrededor del valor de equilibrio.

$$V_b(l_{ij} - l_{ij}^0) = K_{ij}(l_{ij} - l_{ij}^0)^2 = K_{ij}(\Delta l_{ij})^2 \quad (2.6)$$

Aquí K_{ij} es la constante de fuerza para el enlace i - j . Esta es la forma de un oscilador armónico y es la forma más simple y suficiente para determinar la mayoría de las geometrías de equilibrio. Hay ciertos sistemas donde los resultados de la aproximación armónica son

significativamente diferentes de los valores experimentales, para mejorar la aproximación se deben de tomar en cuenta más términos en la expansión de Taylor.

$$V(\Delta l_{ij}) = K_{ij}^2(\Delta l_{ij})^2 + K_{ij}^3(\Delta l_{ij})^3 + K_{ij}^4(\Delta l_{ij})^4 + \dots \quad (2.7)$$

Esto por supuesto tiene un precio, más parámetros deben ser asignados. Consecuentemente expresiones simples son utilizadas para éste potencial de esta manera la aproximación más elemental es utilizar la ley de Hooke en la cual la energía varía con el cuadrado del desplazamiento de la longitud de enlace de referencia (Fig. 2.4) Los modernos campos de fuerza siempre incluyen términos cuadráticos para tratar con moléculas ordinarias; la expansión de la energía potencial se puede presentar de la siguiente forma:

$$V_{ten}(l_{ij}) = \frac{1}{2}[k_{ij} + k_{ij}^{(3)}(l_{ij} - l_{ij}^0)](l_{ij} - l_{ij}^0)^2 \quad (2.8)$$

donde hemos incluido el superíndice (3) para la constante de fuerza cúbica (también llamada constante de fuerza inarmónica) para enfatizar que es diferente a la constante de fuerza del término cuadrático. La energía potencial total V_{ten} (Ec. 2.9) de la tensión del enlace se toma como la suma de las energías potenciales $V_{ten}(l_{ij})$ para la tensión de cada enlace de la molécula:

$$V_{ten} = \sum_{1,2} V_{ten}(l_{ij}) \quad (2.9)$$

donde la suma se extiende a todos los pares de átomos enlazados entre sí, aquí $V_{ten}(l_{ij})$, se tomar como una función cuadrática que depende del desplazamiento de la longitud de enlace l_{ij} , con respecto a su longitud de referencia l_{ij}^0 ; esto es (Ec. 2.10):

$$V_{ten}(l_{ij}) = \frac{1}{2}k_{ij}(l_{ij} - l_{ij}^0)^2 \quad (2.10)$$

k_{ij} es la constante de fuerza y l_{ij}^0 la longitud de referencia, estos parámetros dependen de los tipos de átomos que forman el enlace.

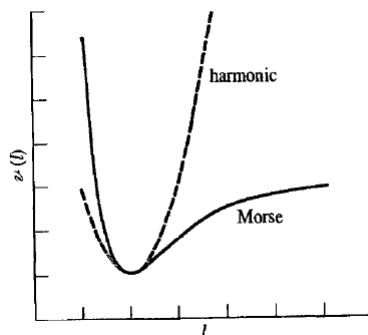


Figura 2.3: Comparación del potencial armónico (Ley de Hooke) y la curva de Morse.

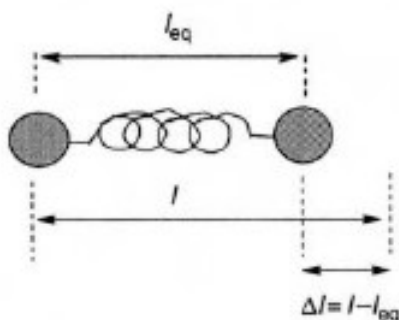


Figura 2.4: Cambios en la longitud de enlace.

2.2.2. Flexión del ángulo de valencia

En espectroscopia vibracional se observa que para pequeños desplazamientos del punto de equilibrio, (Fig. 2.5) la variación de la energía asociada con las deformaciones del ángulo de enlace son bien modeladas por expansiones de polinomios, de esta manera la función del campo de fuerzas para un ángulo de flexión es (Ec. 2.11):

$$V_{fle} = \frac{1}{2} \left[k_{ijk} + k_{ijk}^{(3)}(\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0) + k_{ijk}^{(4)}(\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 + \dots \right] (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^0)^2 \quad (2.11)$$

donde θ es el valor del ángulo entre los enlaces ij y jk (note que en un campo de fuerzas, un enlace es definido como un vector que conecta dos átomos) y las constantes de fuerza ahora en subíndices ijk es para enfatizar que dependen de los tres átomos. Si la ecuación (Ec. 2.11) es truncada en el término cuadrático o si más términos se incluyen en la expansión depende enteramente del equilibrio entre la simplicidad computacional y generalidad que cualquier campo de fuerza elige. Por ejemplo, el campo de fuerzas MM3 continua la expansión a través del término sexto para algunas combinaciones ijk mientras el campo de fuerzas biomolecular de Cornell et al. se limita al término cuadrático en todos los casos. Primero, observe que ninguna expansión de potencias de la forma de la ecuación (Ec. 2.11) mostrará el comportamiento químico apropiado del ángulo de valencia si éste llega a ser lineal, es decir $\theta = \pi$. Otra falla es que para sistemas inorgánicos es posible tener múltiples valores de equilibrio, por ejemplo, en el sistema bipiramidal trigonal PCL_5 hay ángulos estables $Cl - P - Cl$ de $\pi/2$, $\pi/3$, π para combinaciones axial/ecuatorial, ecuatorial/ecuatorial, y axial/axial de átomos de cloro.

La energía potencial total V_{flex} (Ec. 2.12) de flexión del enlace se toma como la suma de las energías potenciales $V_{flex}(\theta_{ijk})$, para la flexión de cada ángulo de enlace de la molécula. La opción más simple es tomar $V_{flex}(\theta_{ijk})$ como una función cuadrática:

$$V_{flex}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2} k_{ijk} (\theta_{ijk} - \theta_{IJK}^0)^2 \quad (2.12)$$

Donde θ_{ijk}^0 es el valor de referencia para el ángulo de enlace tipo ijk .

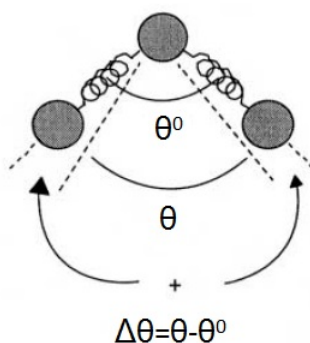


Figura 2.5: Desviación del ángulo valente

2.2.3. Variación del ángulo de torsión

El ángulo diedro $\omega = D(RSTU)$ (Fig. 2.6a), se define como el ángulo entre el semiplano RST y el semiplano STU . Más precisamente, el ángulo diedro está definido por RSX , donde las líneas RS y SX son ambas perpendiculares a la línea ST . Tratando con un ángulo diedro molecular (ángulo de torsión) $D(ABCD)$ que implica a los cuatro átomos A, B, C, D , los enlaces AB y CD probablemente no son perpendiculares al enlace BC , de forma que se debe proyectar AB y CD en un plano perpendicular a la línea BC . Esto se hace dibujando una proyección de Newman con una línea BC perpendicular al plano del papel (Fig. 2.6b). Se escoge el intervalo de los ángulos diedros como: $0 \leq \omega < 360^\circ$. Por definición una rotación a favor de las agujas del reloj del enlace AB proyectado de frente, para unirse al átomo D , corresponde a un ángulo diedro positivo.

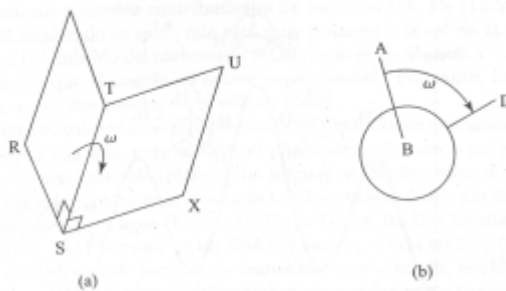


Figura 2.6: Ángulo diedro entre semiplanos RST y STU . (b) el ángulo diedro $D(ABCD)$. El átomo C está detrás de B .

Los ángulos de torsión (diedros) son periódicos, sin embargo la energía mínima para muchas torsiones es para el arreglo antiperiplanar, es decir, $\omega = \pi$. Por lo tanto, la convención $-\pi < \omega < \pi$ ($-180^\circ \leq \omega \leq 180^\circ$) también es considerada. Como la torsión misma es periódica, también la energía potencial de torsión lo es, de tal manera que la función de energía potencial como una expansión de la función periódica en series de Fourier tiene una forma general de campo de fuerza:

$$V_{tor}(\omega_{ijkl}) = \frac{1}{2} \sum_{(n,ijkl)} V_{(n,ijkl)} [1 + (-1)^{n+1} \cos(n\omega_{ijkl} + \psi_{n,ijkl})] \quad (2.13)$$

donde V_n son los valores de los términos de amplitud y n es el conjunto de valores de periodicidad incluidos en la suma son específicos de los enlaces de torsión $ijkl$ (note que borramos un valor particular de n del conjunto evaluado equivalente al término de amplitud para el valor de n igual a cero). El factor $(-1)^{n+1}$ es incluido para que la función entre paréntesis dentro de la suma sea igual a cero para todo n cuando $\omega = \pi$, si los ángulos fase ψ son todos un conjunto de ceros. Esta elección es por la observación empírica que la mayoría de las energías de torsión son minimizadas para las geometrías antiperiplanar.

La energía potencial de torsión total V_{tor} (Ec. 2.14) se toma como suma de términos $V_{tor}(\omega_{ijkl})$ para todos los pares de átomos 1, 4:

$$V_{tor}(\omega) = \sum_{1,4} V_{tor}(\omega_{ijkl}) \quad (2.14)$$

2.2.4. Interacciones no enlazadas

Las moléculas interactúan a través de fuerzas, las cuales juegan un papel importante en la determinación de su estructura molecular. Las interacciones que no depende de un enlace específico entre átomos se les llama interacciones no enlazantes y usualmente son modeladas como el inverso de la distancia entre los átomos, este tipo de interacciones en un campo de fuerzas generalmente son divididas en dos grupos, el primero comprende las interacciones de Van der Waals que incluyen fuerzas repulsivas (estericas), atractivas (London). La interacciones repulsivas dominan en rangos de distancias pequeñas donde los átomos se aproximan demasiado uno al otro, mientras que las interacciones atractivas son importantes a distancias ligeramente más grandes. El segundo grupo son las interacciones electrostáticas. Los efectos de dipolos inducidos aunque incluidos en algunos estudios [77], generalmente tienen una influencia pequeña sobre la energía total no enlazante. Aunque no hay una justificación al siguiente procedimiento, la aproximación clásica ignora las interacciones de muchos cuerpos y asume que el potencial total es la suma de las interacciones por pares, es decir, sólo se incluyen contribuciones para pares de átomos o grupos i y j cuyas distancias de separación r_{ij} varia con la elección de las variables estructurales. La suma generalmente excluye todos los pares 1,2 y 1,3 (separados por uno o dos enlaces químicos respectivamente) los cuales presumiblemente contribuyen a los términos de estiramiento de enlace y ángulos de valencia. La energía total no enlazante puede reflejar contribuciones de pares 1,4 a menos que esos efectos sean incluidos en los términos que dependen explícitamente de ϕ .

Interacciones de Van der Waals

Considere la aproximación mutua de dos átomos de gas noble. A una separación infinita, no hay interacción entre ellos y esto define la energía potencial cero. Los átomos aislados son simétricamente esféricos, carentes de momentos multipolares eléctricos. No hay fuerzas atractivas entre ellos cuando se acercan uno al otro. Cuando no hay fuerzas

disipativas, la relación entre fuerza F en una dirección dada de coordenadas q y energía potencial V es:

$$F_q = -\frac{\partial V}{\partial q} \quad (2.15)$$

En este problema de una dimensión mencionar que no hay fuerza es equivalente a decir que la pendiente de la curva de energía con respecto a la coordenada de longitud de enlace es cero, por lo que la energía potencial permanece cero como los dos átomos se aproximan uno al otro. Asociar tamaño distintos de cero con nuestros átomos clásicos de gases nobles, debemos asignar a ellos esferas duras de radios r_{vdw} . En este caso cuando la longitud de enlace alcanza dos veces los radios, los dos átomos no se pueden aproximar más, lo cual quiere decir que la energía potencial se vuelve discontinua llegando a infinito para $r < 2r_{vdw}$. Esta curva de energía potencial es ilustrada en la (Fig. 2.7)

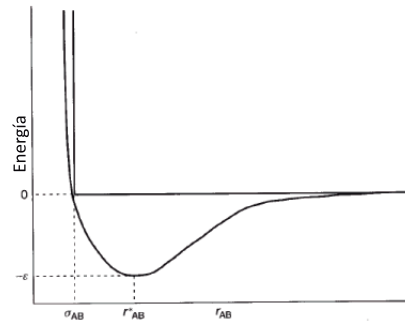


Figura 2.7: Potencial no atractivo de esferas duras (línea recta) y potencial de Lennard Jones (Curva)

Una de las más profundas manifestaciones de mecánica cuántica es que esta curva no describe con precisión la realidad debido a que los movimientos de los electrones son correlacionados, los dos átomos simultáneamente desarrollan momentos eléctricos que son orientados con el fin de ser mutuamente atractivos. La fuerza asociada con esta interacción se conoce indistintamente como dispersión, fuerza de London, o fuerza atractiva de Van der Waals.

En ausencia de una carga permanente la interacción más fuerte es la interacción dipolo-dipolo, tal interacción tiene una potencia sexta que depende de la distancia entre dos átomos. Así la energía potencial llega a incrementarse negativamente como los dos átomos de gas noble se aproximan desde el infinito. Sin embargo como los dos átomos continúan aproximándose su densidad electrónica circundante comienzan a interpenetrarse. En ausencia de oportunidades para interacciones de enlace, la repulsión de Pauli causa que la energía del sistema se incremente rápidamente con la disminución de la longitud de enlace. La suma de éstos dos efectos esta representado en la (Fig. 2.7), el contraste con el modelo de la esfera dura clásica es que: una región atractiva de la curva de energía potencial existe y la pared repulsiva no es infinitamente grande. Note que en $r = 0$ la energía potencial para un átomo aislado que tiene un número atómico igual a la suma de los números atómicos de los átomos separados.

Las interacciones de dispersión e intercambio entre átomos y moléculas pueden ser

calculadas usando mecánica cuántica, aunque estos cálculos están lejos de ser triviales, puesto que requieren de correlación de electrones y grandes conjuntos de bases. Para un campo de fuerza necesitamos un medio para modelar la curva de potenciales interatómicos con gran precisión mediante una simple expresión matemática que pueda ser calculada rápidamente, esto como consecuencia del gran número de interacciones de van der Waals que debemos calcular en el sistema a modelar.

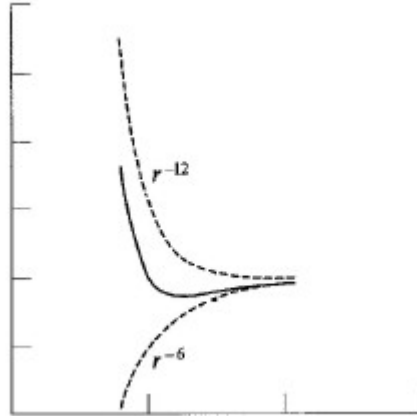


Figura 2.8: El potencial de Lennard Jones está constituido de una parte repulsiva (r^{-12}) y una componente atractiva (r^{-6})

Las contribuciones de Van der Waals pueden ser estimadas por varios procedimientos, el más común es a través del potencial de Lennard Jones:

$$V_{vdw}(r_{ij}) = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (2.16)$$

y la ecuación de Buckingham

$$V_{vdw}(r_{ij}) = a_{ij} \exp(-b_{ij} r_{ij}) - \frac{c_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (2.17)$$

La última función con los tres parámetros ajustables (a_{ij}, b_{ij}, c_{ij}) es más útil que la primera para el ajuste de la teoría con los datos experimentales. Debido a que el término atractivo del potencial de Buckingham domina más a distancias cortas, la ecuación de Lennard Jones es más utilizada.

La dependencia inversa de la sexta potencia para la atracción de London es aceptada universalmente, el exponente del término repulsivo ha sido ajustado en algunos estudios de conformación de ácidos nucleicos. La dependencia inversa duodécima (12) del término repulsivo en el potencial de Lennard Jones fue originalmente elegido por motivos de conveniencia [78]. Algunas veces es razonable considerar el exponente de r_{ij} en el término repulsivo en la ec. 2.16 sea un parámetro ajustable que puede ser variado para estar de acuerdo con datos experimentales [79, 12, 80, 81]. Los factores de escala B_{ij} y c_{ij} en los términos atractivos de las ecs. 2.16 y 2.17 son usualmente estimadas a partir de

polarizabilidades atómicas o de grupos de átomos usando expresiones que describan aproximadamente la energía de dispersión de London de dos átomos o grupos de átomos. Una forma común es la ecuación de Slater-Kirkwood

$$B_{ij} = \frac{365\alpha_i\alpha_j}{\left[\left(\frac{\alpha_i}{N_i}\right)^{\frac{1}{2}} + \left(\frac{\alpha_j}{N_j}\right)^{\frac{1}{2}}\right]} \quad (2.18)$$

El factor numérico es elegido de forma que la energía este en kcal/mol cuando la polarizabilidad α esta expresada en \AA^3 y N es el número de efectivo de electrones en la capa exterior. Aún no hay bases teóricas firmes para establecer los valores de los parámetros A_{ij} a_{ij} b_{ij} de los términos repulsivos. Estos factores son simplemente escalados para producir el mínimo en $V_{vdw}(r_{ij})$ en un valor de r_{ij} cercano a la suma de los radios de Van der Waals de los grupos i y j .

Evaluando r_{ij} cuando la derivada de la ec. 2.16 es igual a cero

$$\frac{\partial V_{vdw}}{\partial r_{ij}} = 6\left(\frac{-2A_{ij}}{r_{ij}^{13}} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^7}\right) \quad (2.19)$$

A_{ij} esta relacionado con B_{ij} a través:

$$A_{ij} = \frac{B_{ij}r_{min}^6}{2} \quad (2.20)$$

En esta expresión r_{min} es el valor de r_{ij} en el mínimo de la energía potencial. Debido a esta simple relación entre A_{ij} y B_{ij} , el potencial 6-12 es frecuentemente expresado en términos de r_{min} y V_{min} , que corresponde al mínimo de energía de interacción a pares. Específicamente:

$$V_{vdw}(r_{ij}) = -V_{min}\left[\left(\frac{r_{min}}{r_{ij}}\right)^{12} - 2\left(\frac{r_{min}}{r_{ij}}\right)^6\right] \quad (2.21)$$

En ocasiones se necesitan pequeños ajustes al radio de Van der Waals de moléculas individuales para contrarrestar efectos de compresion de moléculas, asociados con grandes ensambles de pares mutuamente atractivos [77] [82].

La mejor función conocida para el potencial Van der waals es la función de Lennard Jones (Fig. 2.8)

Las interacciones entre átomos que no están enlazados uno al otro o a átomos comunes son generalmente referidas como interacciones de Van der Waals. Estas moléculas habitualmente son muy complicadas, pues muestran muchos grados de libertad en el cual las moléculas se relajan.

El término total de interacción de Van der Waals (Ec. 2.22) se toma como la suma de todas las interacciones posibles de pares de átomos 1,4, 1,5, 1,6,..:

$$V_{vdw} = \sum_{1,\geq 4} V_{vdw}(r_{ij}) \quad (2.22)$$

donde los átomos i y j están en una relación 1,4 o mayor. Las interacciones de van der Waals 1,2 y 1,3 y las interacciones electrostáticas se consideran incluidas implícitamente en los parámetros de tensión de enlace y de flexión de enlace. Cada término de Van der Waals de un par V_{vdw} , ij es la suma de una atracción debida a fuerzas de dispersión de

London y un término de repulsión debido principalmente a la repulsión de Pauli. Algunos campos de fuerzas toman a $V_{vdw,ij}$ como un potencial de Lennard-Jones (Ec. 2.23) que se puede escribir de dos formas equivalentes:

$$V_{vdw}(r_{ij}) = \varepsilon_{IJ} \left[\left(\frac{R_{IJ}^*}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{IJ}^*}{R_{ij}} \right)^6 \right] = 4\varepsilon_{IJ} \left[\left(\frac{\sigma_{IJ}}{R_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{IJ}}{R_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.23)$$

donde R_{ij} es la distancia entre los átomos i y j , el parámetro de profundidad del pozo ε_{IJ} es el valor de $V_{vdw}(r_{ij})$ en el mínimo de la curva de interacción, el parámetro R_{IJ}^* da el valor de R_{ij} en el mínimo de $V_{vdw}(r_{ij})$, y el parámetro alternativo σ_{IJ} es la distancia a la que $V_{vdw}(r_{ij})$ es cero.

Interacción electrostática

Las contribuciones electrostáticas a la energía no enlazante son generalmente expresadas en términos del potencial Coulombico de la forma:

$$V_{ele}(r_{ij}) = \frac{332\delta_i\delta_j}{\varepsilon r_{ij}} \quad (2.24)$$

Aquí ε es la constante dieléctrica y δ es la carga eléctrica específica del átomo o grupos de átomos. El factor numérico es elegido para que la energía este en *kcal/mol* cuando la distancia es expresada en Å y la carga en fracciones de una carga eléctrica. Las cargas atómicas parciales son estimadas por numerosos métodos.

El término electrostático V_{el} (Ec. 2.25) se toma comúnmente como la suma de interacciones electrostáticas incluyendo todos los pares de átomos excepto los pares 1,2 y 1,3:

$$V_{el} = \sum_{1 \geq 4} V_{el}(r_{ij}) \quad (2.25)$$

donde los átomos i y j tienen una relación 1,4 o mayor. Para cálculos que modelan moléculas en fase gaseosa, ε toma un valor en el intervalo de 1 - 1.5. Una ε mayor que 1 permite tener en cuenta interacciones de apantallamiento debido a la polarización de partes de una molécula entre los átomos i y j . Se utilizan varios métodos para asignar cargas atómicas parciales. En Amber, las cargas se obtienen usando cargas ajustadas a potenciales electrostáticos HF/6-31g* (ESP) de moléculas relacionadas más pequeñas.

2.2.5. Campo de fuerzas de Amber

El campo de fuerzas son la forma funcional (Ec. 2.26) y el conjunto de parámetros que son utilizados para describir la energía potencial de un sistema de átomos. La forma básica del campo de fuerzas incluye términos unidos, lo cual se refiere a átomos que están unidos por enlaces covalentes, mientras que los términos no enlazantes describen las fuerzas electrostáticas y de Van der Waals. La composición específica de los términos depende de cada campo de fuerzas. Un campo de fuerzas también se define como el conjunto de parámetros para cada átomo. El conjunto de parámetros incluye variables para la masa atómica, carga atómica parcial para cada átomo y longitudes de enlace de equilibrio, ángulos, ángulos diedros. El conjunto de parámetros son obtenidos de estudios de pequeñas

moléculas orgánicas las cuales son más manejables para estudios experimentales y cálculos de mecánica cuántica.

La forma funcional del campo de fuerzas [12] de Amber se puede escribir como:

$$E_{\text{Total}} = \sum_{\text{Enlace}} K_R [R - R_0]^2 + \sum_{\text{Ángulos}} K_\theta [\theta - \theta_0]^2 + \sum_{\text{Diedros}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (2.26)$$

donde el primer término representa la energía entre átomos covalentemente unidos. El segundo término representa la energía debido a la geometría de los orbitales electrónicos involucrados en el enlace covalente. El tercer término representa la energía de torsión de un enlace. El cuarto término representa la energía entre pares de átomos no enlazados (Van der Waals, interacción electrostática). El último término es para describir los enlaces hidrógeno.

En el campo de fuerzas anterior los coeficientes 10-12 de C y D fueron fijados a cero para las interacciones de átomo de hidrógeno-aceptor de hidrógeno siguiendo los resultados de Hagler et al. Primero para fuertes enlaces hidrógeno, es claro que algunos términos de repulsión son requeridos para evitar la ocurrencia de contactos cortos no realistas de enlaces hidrógeno. Segundo, tales función 10-12 permite una muy buena concordancia de las distancias de enlace hidrógeno y energías a los valores deseados. Las funciones de enlace son cuadráticas, las cuales permiten una descripción adecuada de la estructura y energías para proteínas y ácidos nucleicos naturales. Una aproximación de series de Fourier para la energía de torsión, (es decir, para más de un valor de n, puede ser usado para ángulos diedros), permite la simulación precisa de las preferencias conformacionales en moléculas simples y complejas. Para la velocidad de cómputo una función 6-12 es utilizada para los parámetros no enlazados, aunque el exponencial 6 es probable una mejor forma funcional simple. Mientras la distancia interatómica no está por debajo del radio de Van der Waals, la forma 6-12 resulta ser adecuada. Todos los parámetros se tomaron de la referencia [13]

2.2.6. Carga atómica

Dado el amplio uso del modelo de carga atómica parcial, es importante considerar cómo son obtenidas éstas cargas. Un método sencillo para obtener cargas atómicas es reproducir los momentos eléctricos, éstos pueden ser calculados de la geometría si ésta es conocida. Por ejemplo el momento dipolar experimental determinado para la molécula de HF es (1.82D), que puede ser reproducida colocando cargas iguales y opuestas de $0.413e$ sobre dos núcleos atómicos (suponiendo que la longitud de enlace es de 0.917 \AA). En algunos casos las cargas atómicas son elegidas para reproducir propiedades termodinámicas calculadas a través simulación de dinámica molecular o método de Monte Carlo. Una serie de simulaciones son desarrolladas y el modelo de carga es modificado hasta obtener resultados concordantes con datos experimentales, esta aproximación puede ser totalmente útil a pesar de su aparente simplicidad, pero ellos es realmente práctico para pequeñas moléculas o modelos simples.

Las propiedades electrostáticas de una molécula son una consecuencia de la distribución de los electrones y el núcleo por lo tanto es razonable suponer que uno debe ser capaz de obtener un conjunto de cargas atómicas parciales utilizando mecánica cuántica. Desafortunadamente la carga atómica parcial no es una cantidad experimental observable y

puede ser ambiguamente calculada de la función de onda. Esto explica por qué numerosas formas de determinar las cargas atómicas parciales han sido propuestas y por qué aún hay debates sobre la mejor manera para determinarlas. Comparaciones indirectas de varios métodos es posible, usualmente por el cálculo de cantidades apropiadas del modelo de carga y entonces comparando los resultados con datos experimentales o potenciales electrostáticos alrededor de la molécula.

Cargas derivadas del potencial electrostático.

El potencial electrostático en un punto es la fuerza que actúa sobre una unidad de carga positiva localizada en un punto. El núcleo da una fuerza positiva mientras los electrones dan un potencial negativo. El potencial electrostático en una cantidad observable que puede ser determinada de una función de onda.

El potencial electrostático en una propiedad continua y no fácilmente representable por una función analítica. Consecuentemente es necesariamente derivable de una representación discreta para utilizar análisis numérico. El objetivo es derivar el conjunto de cargas parciales que mejor reproduzcan el potencial electrostático cuántico en una serie de puntos alrededor de la molécula. Una solución a este problema fue sugerida por Cox y Williams (1981). El potencial electrostático en cada punto elegido es calculado de la función de onda. Un procedimiento de mínimos cuadrados es entonces empleado para determinar el conjunto de cargas atómicas parciales que mejor reproduzcan el potencial electrostático en esos puntos, sujeto a la restricción que la suma de las cargas debe ser igual a la carga neta de la molécula. Condiciones de simetría pueden también ser impuestas para asegurar que las cargas sobre la simetría en átomos equivalentes sean iguales. Es posible también requerir que las cargas atómicas reproduzcan otras propiedades electrostáticas de la molécula tales como momentos dipolares.

Las cargas atómicas son la parte fundamental en el cálculo de las interacciones electrostáticas, el programa AMBER9 puede trabajar con diferentes tipos de carga, entre ellos están las cargas RESP y cargas AM1-BCC, éstas últimas son la que utilizamos en este trabajo.

El método AM1-BCC [83, 84] genera de forma rápida y eficiente cargas atómicas de alta calidad para su uso en simulaciones de fase condensada. El objetivo del modelo de carga AM1-BCC es producir cargas atómicas que emulan el potencial electrostático (ESP) de una molécula a nivel HF/6-31G *. Características de estructura electrónica, incluyendo carga formal y deslocalización electrónica. El esquema AM1-BCC primero calcula las cargas de Mulliken a nivel semiempírico AM1 y entonces realiza la corrección a la carga de enlace (BCC) para generar cargas AM1-BCC tipo RESP

En la mayoría de los casos AM1-BCC producen un conjunto de cargas de comparable calidad a las cargas derivadas con (ESP) HF/6-31G * en menor tiempo además de reducir las inestabilidades en la carga atómica comparado con métodos directos de ajuste de (ESP) por lo tanto es un buen sustituto para las cargas RESP en modelación molecular. La parametrización de las cargas (BCC) fue realizado por ajuste al potencial electrostático (ESP) HF/6-31G * para un conjunto de más de 2700 moléculas. La mayoría de los grupos orgánicos funcionales y sus combinaciones se muestrearon, así como una extensiva variedad de sistemas heteroarilos cíclicos y bicíclicos fusionados. El resultado de los parámetros (BCC) permite al esquema de cargas AM1-BCC manejar prácticamente todos los tipos de

compuestos orgánicos enumerados en el índice de Merk y en la base de datos NSI.

Las cargas obtenidas mediante BCC (Bond Charge Corrección) [83] provienen de dos términos:

$$q_j = q_j^{pre} + q_j^{corr} \quad (2.27)$$

El primero q_j^{pre} proviene de un rápido procedimiento de precarga, no muy adecuado para cálculos con simulación en fase condensada. Las cargas AM1 se promedian de acuerdo a la simetría de los enlaces, con lo que se corrige este valor.

El segundo término q_j^{corr} , es otra corrección que modifica las cargas atómicas para reproducir resultados obtenidos con ESP (HF/6-31G), ello es definido como:

$$q_j^{corr} = \sum_{\alpha=1}^{\gamma} T_{j\alpha} p_{\alpha} \quad (2.28)$$

Donde la sumatoria corre sobre el número total de tipos de enlaces γ en una molécula y p_{α} es la corrección a la carga del enlace para el tipo de enlace α . el tipo de enlace α es determinado por los tipos de átomos J e I de los átomos j e i y el orden del enlace de conexión de los dos átomos.

2.3. Amber: programa de simulación biomolecular

La simulación de dinámica molecular de proteínas comenzó hace más de 30 años atrás, en la actualidad es ampliamente utilizada como una herramienta para investigar estructuras bajo una gran variedad de condiciones, estos van desde estudios de unión de ligandos y mecanismos de reacción enzimática a problemas de desnaturalización y repaquetamiento de proteínas para el análisis de datos experimentales y refinamiento de estructuras. Amber es un nombre colectivo para un conjunto de programas que permiten al usuario desarrollar y analizar simulaciones de dinámica molecular, particularmente para proteínas, ácidos nucleicos, y carbohidratos así como un conjunto de campos de fuerza de mecánica molecular. Ninguno de los programas particulares lleva este nombre, pero las diferentes partes trabajan de forma conjunta razonablemente bien, proporcionando un marco muy completo y de gran alcance para muchos cálculos comunes.

El término amber algunas veces es referido al campo de fuerzas empírico que está implementado aquí. Debe señalarse que el código y el campo de fuerzas son separados, algunos otros programas computacionales han implementado el campo de fuerzas amber y otros campos de fuerzas pueden ser utilizados dentro de la plataforma del programa Amber. El paquete de programas de Amber [11] fue contruido a finales de 1970 y es un acrónimo para Modelo Asistido de Construcción y Refinamiento de Energía. Originalmente desarrollado por el grupo de Peter Kollman de la universidad de California, San Francisco. Es mantenido por una colaboración entre David Case en *The Scripps Research Institute*, Tom Cheatham en *The University of Utah*, Tom Darden en *NIEHS*, Ken Merz en Florida, Carlos Simmerling en *Stony Brook University*, Ray Luo en *UC Irvine*, y Junmei Wang en *Encysive*.

Hay tres pasos principales para la simulación de dinámica molecular en Amber, llamados preparación, simulación y análisis, y diferentes programas que desarrollan estos pasos. Durante la preparación cada átomo en la molécula le es asignado tipo de átomo.

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.3. AMBER: PROGRAMA DE SIMULACIÓN BIOMOLECULAR

Un archivo de coordenadas (prmcrd), el cual contiene las coordenadas cartesianas de todos los átomos, y un archivo de topología y parámetros (prmtop), el cual contiene toda la información restante (nombre de átomos, masa, parámetros del campo de fuerza, lista de enlaces covalentes, ángulos, ángulos diedros, etc) necesaria para el cálculo de energías y fuerzas. Los principales programas de preparación en Amber son ANTECHAMBER, y LEaP cuya función incluye el ensamblaje de campo de fuerzas para residuos o moléculas que no están definidas de otra manera.

En la (Fig 2.9) se muestra un diagrama de la información necesaria para desarrollar cálculos con Amber.

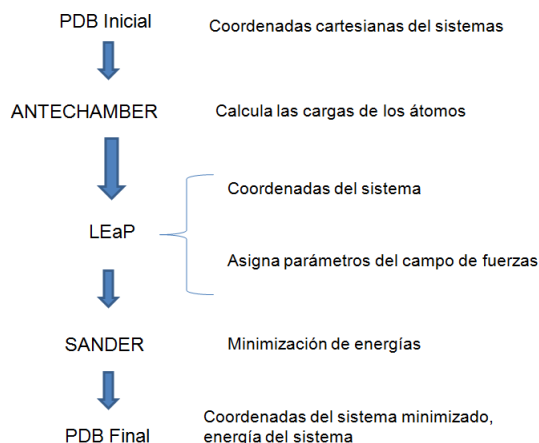


Figura 2.9: Flujo de la información en Amber

El trabajo realizado es una primera aproximación de cálculos de la interacción entre cafeína con receptores de proteínas. Los cálculos son desarrollados con métodos de mecánica molecular. No se consideran efectos de solvente porque los segmentos de proteínas con los cuales trabajamos se encuentran en la región transmembrana, la cual está formada por una doble capa lipídica (hidrofóbica) por consiguiente, la interacción con moléculas de agua es casi nula pues sólo existe algunas de ellas en esta región, además de la experiencia que se tiene de trabajos anteriores donde se considera la interacción de ADN con solvente [85], [86] podemos inferir que las posiciones de mínima energía no cambian significativamente. Las conformaciones optimizadas de dímeros y fragmentos peptídicos no se obtienen a través de una trayectoria que sigan las moléculas, en lugar de ello se busca la conformación de mínima energía en la vecindad cercana a su posición, por lo tanto, no tienen una energía cinética, lo cual les daría una temperatura.

En el presente trabajo suponemos que el bloqueo de los receptores de adenosina por cafeína, pasa a través de la formación de sus complejos con segmentos transmembrana de la cadena polipeptídica del receptor, con base en esto, investigamos sistemáticamente las posibilidades de la interacción de la molécula de cafeína con fragmentos transmembrana del receptor A1 y A2a.

Capítulo 3

Discusión de resultados

3.1. La estructura molecular y los posibles tipos de interacciones no-valentes de CAF y Adenosina.

Como ya se ha mencionado la molécula de cafeína tiene una estructura química relativamente simple (1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina), es una molécula prácticamente rígida que tiene tres centros aceptores de protones (O2, O6 y N9) y que no tiene centros donadores de protones. Todos los átomos de la molécula CAF excepto los hidrógenos de los grupos metilos, se encuentran en un plano (Figura 3.1a). Las posibilidades de formación de complejos de CAF con proteínas se limitan a la formación de enlaces de hidrógeno con los residuos de aminoácidos, que contienen los centros donadores de protones como son: Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, His y Trp. y a las interacciones de apilamiento con los anillos aromáticos de los aminoácidos involucrados.

Por otro lado la adenosina es un nucleósido que tiene tres grupos aceptores de protones (N1, N3 y N7) y un grupo donador de protones (NH2) en la base, y un grupo aceptor O4' del anillo de la ribosa y sus tres grupos OH, cada uno de los cuales puede ser un donante y un aceptor de enlaces-H (Figura 3.1b).

La molécula de adenosina tiene amplias posibilidades conformacionales entre ellas la relacionada con la rotación alrededor del enlace glucosídico, respecto a la flexibilidad de anillo de ribosa (en cristales de monómeros se encontraron empaquetamientos del anillo de ribosa tanto C3'-endo como C2'-endo) y también con la rotación sobre enlaces simples. Como se mostró en estudios de difracción de neutrones en cristales de adenosina [87], todos los centros hidrófilos de cada molécula de adenosina, excepto O4', se unen por enlaces-H con los centros hidrófilos de cada una de las moléculas circundantes. Mientras que el empaquetamiento del anillo de ribosa corresponde a la conformación C3'-endo, y la orientación mutua de la base con la ribosa corresponde a la conformación anti. En la literatura también existen datos cristalográficos de dos diferentes estructuras del monohidrato de adenosina-5'-monofosfato. Ambas estructuras corresponden a las conformaciones anti del nucleósido, pero uno de ellos tiene empaquetamiento del anillo de la ribosa C3'-endo [88], y en la otra C2'-endo [89]. La estructura de la parte del nucleósido 5'-AMP de este cristal y la estructura de la adenosina obtenida de difracción de neutrones las utilizamos para construir las configuraciones iniciales de la molécula de adenosina para realizar la búsqueda de sus mínimos de energía con los métodos teóricos de mecánica cuántica.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. LA ESTRUCTURA MOLECULAR Y LOS POSIBLES TIPOS DE INTERACCIONES NO-VALENTES DE CAF Y ADENOSINA.

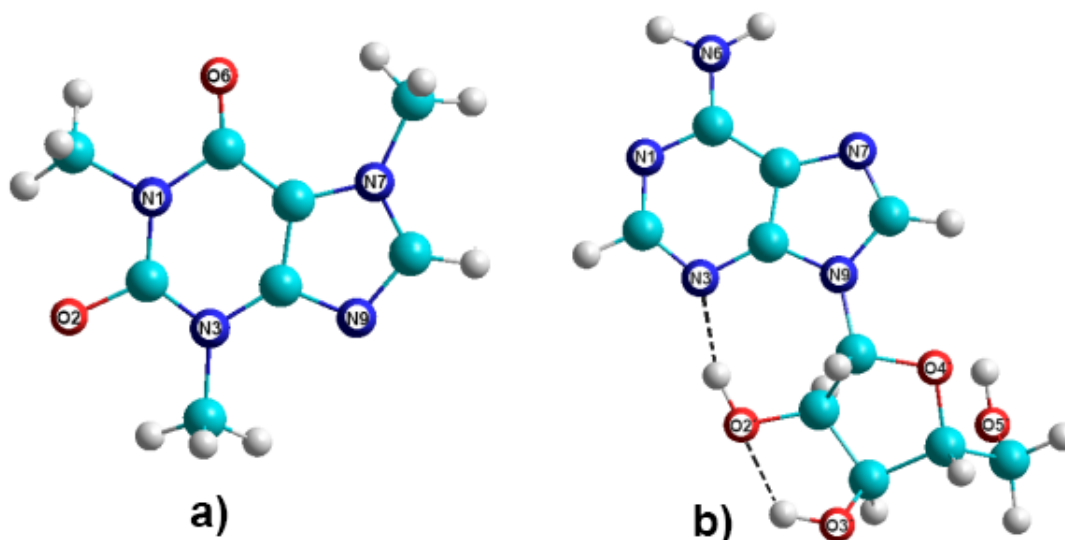


Figura 3.1: Estructura molecular de cafeína (a) y adenosina (b) con orientación anti de la ribosa respecto a la base. Se muestra la numeración de los átomos de nitrógeno y oxígeno en ambas moléculas. Las líneas punteadas representan los enlaces de hidrógeno.

Sin proponernos encontrar todos los mínimos locales de la energía de la interacción intramolecular de adenosina, hallamos varios mínimos con formación de dos enlaces de hidrógeno, cuya energía es de 8-10 kcal/mol menor que en los mínimos con un enlace-H. La conformación de la molécula en cristales de Adenosina y conformaciones de partes de nucleósidos de 5'-AMP, no tienen enlaces de hidrógeno intramoleculares, y están muy lejos de las configuraciones que corresponden a los mínimos locales de la energía de las interacciones intramoleculares. Estos se forman por la acción de las interacciones intermoleculares, debido principalmente a la red de enlaces-H.

Los valores de energía de las interacciones intramoleculares de las estructuras correspondientes a los tres mínimos locales más profundos calculados por MM están bastante cerca uno del otro y son de -150.5, -150.0 y -150.3 kcal/mol (en la Figura 3.2 se presentan las dos primeras de estas estructuras). En la Tabla 3.1 se detallan las características de los mínimos encontrados para adenosina. Podemos observar que el mínimo más profundo de adenosina corresponde a la conformación *syn* sin embargo, la diferencia en energía potencial respecto a la conformación *anti* es de 0.5 Kcal/mol.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS
3.1. LA ESTRUCTURA MOLECULAR Y LOS POSIBLES TIPOS DE INTERACCIONES NO-VALENTES DE CAF Y ADENOSINA.

Tabla 3.1: Energías de interacción y valores geométricos de los mínimos más profundos para la molécula de adenosina.

Conformación	Anti	Anti	Anti	Syn	Syn
E_{int}	-149.99	-146.32	-140.87	-150.46	-150.31
ρ	133.07	128.28	5.09	29.49	156.41
ν	38.75	39.79	34.36	34.98	34.62
χ	172.28	173.62	-169.46	41.46	52.97
γ	61.45	-166.98	49.05	48.48	53
Tipo	C1' - exo	C1' - exo	C3' - endo	C3' - endo	C2' - endo
1	O2'H - N3 1.76	O2'H - N3 1.78		O2'H - O3' 1.98	O3'H - O2' 2.01
2	O3'H - O2' 1.93	O3'H - O2' 1.92	O3'H - O2' 1.99	O5'H - N3 1.87	O5'H - N3 1.83

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de Adenosina con el fragmento del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

Una de las conformaciones de menor energía mantiene la orientación anti de la ribosa respecto a la base y tiene empaquetamiento C2'-endo del anillo de ribosa. Las otras dos se presentan con orientación syn, el anillo de ribosa de la primera de ellas tiene empaquetamiento C3'-endo, y de la segunda C2'-endo. Estas conformaciones tienen dos enlaces-H intramoleculares, uno formado dentro de la ribosa entre los grupos O2'-H y O3'-H, y el otro entre N3 de adenina y O2'-H de ribosa (en la conformación anti del nucleósido), o O5'-H (para la conformación syn). Estos tres mínimos de energía los utilizamos más adelante como las estructuras iniciales para realizar los cálculos ab initio de MC en la aproximación de MP2/6-31G(d,p), las estructuras encontradas en esta aproximación, se han optimizado posteriormente a nivel MP2/aug-cc-pVDZ. Los cálculos de MC permitieron mostrar la proximidad de las características geométricas de las conformaciones más favorables de Adenosina, obtenidos por los métodos de MM y MC. No se pudo construir configuraciones de complejos con mayor número de enlaces de hidrógeno intermoleculares que las estructuras encontradas con las tres conformaciones iniciales de Adenosina mencionadas. Por lo tanto, otros mínimos locales de la molécula Adenosina no se consideran aquí.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.2. SELECCIÓN DE LOS SITIOS DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA PARA LA BÚSQUEDA DE POSIBLES COMPLEJOS CON CAFEÍNA Y ADENOSINA.

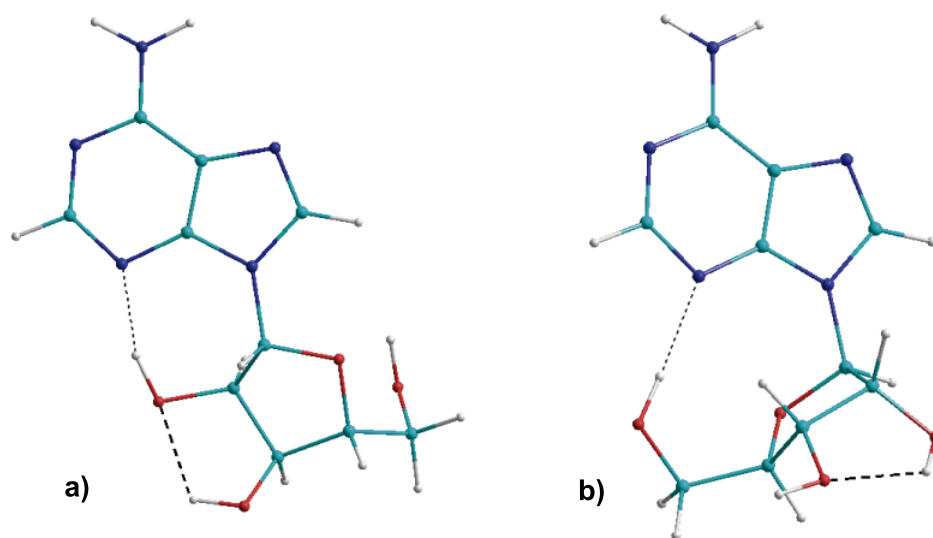


Figura 3.2: Estructura molecular de la adenosina. Se presentan las conformaciones correspondientes a los mínimos de energía más profundos con orientación de la ribosa respecto a la base: anti- (a) y syn-(b).

3.2. Selección de los sitios de los receptores de adenosina para la búsqueda de posibles complejos con cafeína y adenosina.

Las regiones de los receptores de adenosina más importantes para la interacción con adenosina (agonistas y antagonistas) son las hélices transmembrana que tienen conformación α -helicoidal. Nuestros cálculos anteriores [15] [16] demostraron que, como se esperaba, los mínimos más profundos de energía de complejos CAF con segmentos de hélices transmembrana corresponden a la formación de al menos dos enlaces-H con los residuos de aminoácidos adyacentes o residuos alternados. Una contribución a la formación de esos mínimos lo pueden hacer las interacciones de apilamiento con los aminoácidos aromáticos, pero la energía de las interacciones intermoleculares en los mínimos con un enlace-H es mucho menos negativa que en mínimos con dos o tres enlaces-H [16]. Teniendo en cuenta que la posibilidad de formar complejos con más enlaces hidrogeno es mayor con adenosina que con cafeína, para comparar la estabilidad de los complejos fue necesario seleccionar segmentos de hélices que contienen no menos de cuatro aminoácidos hidrofílicos. Cada par de estos aminoácidos puede ser separado por no más de dos residuos no polares. Un análisis de la estructura primaria de las hélices transmembrana del receptor de adenosina A1 [15] mostró que la mayoría de los residuos de aminoácidos de estas hélices son alifáticos hidrofóbicos, los cuales no son capaces de formar enlaces-H. Sólo dos segmentos de hélice transmembrana contienen regiones que cumplen este requisito, éste es la tercera hélice transmembrana con la secuencia de aminoácidos

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.3. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO DE LA HÉLICE TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

Cys-Pro-Val-Leu-Ile-Leu-**Thr-Gln-Ser¹-Ser²**-Ile-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Ile-Ala
y la séptima hélice transmembrana con la secuencia de aminoácidos
Tyr-Ile-Ala-Ile-Phe-Leu-Thr-His-Gly-Asn-Ser-Ala-Met-Asn-Pro-Ile-Val-Tyr.

Un análisis similar se realizó para la estructura primaria de las hélices transmembrana del receptor de adenosina A2a, de las siete hélices transmembrana aquí señalamos dos segmentos de secuencias de péptidos, las cuales enlistamos a continuación:

la tercera hélice transmembrana con la secuencia de aminoácidos
Leu-Phe-Ile-Ala-Cys-Phe-Val-Leu-Val-Leu-**Thr-Gln-Ser¹-Ser²-Ile-Phe-Ser³**-Leu-
Leu-Ala-Ile-Ala-Ile
y la séptima hélice transmembrana con la secuencia de aminoácidos
Leu-Trp-Leu-Met-**Tyr-Leu-Ala-Ile-Val-Leu-Ser-His-Thr-Asn-Ser-Val**-Val-Asn-Pro-
Phe-Ile-Tyr-Ala

En estas secuencias, se subrayaron las partes, para las cuales se realizaron los cálculos de la energía de interacción con CAF y Adenosina, en éstos segmentos de las hélices se resaltan los residuos de aminoácidos capaces de formar enlaces-H. Ambos segmentos contienen residuos con un grupo amida (glutamina en el tercera hélice y asparagina en la séptima hélice), que puede formar dos enlaces-H con adenosina, por lo que es de suponer la presencia de mínimos profundos con Adenosina. Las secuencias de péptidos se construyeron con ayuda del software HyperChem, estos segmentos de los receptores de adenosina se encuentran en una región transmembrana, donde la cafeína interacciona con el fragmento inhibiendo la acción de la adenosina.

3.3. Formación de complejos de cafeína y adenosina con el segmento de la hélice TM3 del receptor de adenosina A1.

3.3.1. Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1.

La búsqueda de los mínimos de energía de los sistemas que contienen CAF o adenosina con una parte del péptido revelaron varios mínimos locales con dos enlaces de H para CAF y dos o tres enlaces de hidrógeno para adenosina, tanto en conformación *syn* como en *anti*. La posición de los centros hidrófilos de los residuos de aminoácidos de este segmento (así como del séptimo segmento) no permite formar un mayor número de enlaces-H con adenosina en las configuraciones más favorables. Puesto que las configuraciones de adenosina sin el enlace-H entre la ribosa y la base son energéticamente menos favorables en 10 kcal/ mol o más (tabla 3.1), la formación de complejos de adenosina en este tipo de configuraciones es menos favorable que con las configuraciones más favorables de adenosina. Estas configuraciones más favorables de adenosina casi no cambian al formarse los complejos con el segmento de la hélice TM3 sin embargo, se modifican ligeramente: el empaquetamiento de anillo de la ribosa (el ángulo de pseudorotación P cambia en menos de un grado, y la amplitud de la pseudorotación ν_{max} en sólo unas pocas décimas de grado), el

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.3. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO DE LA HÉLICE TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

ángulo de torsión glicosídico (hasta 2 grados) y en unas pocas centésimas de Å la longitud de los enlaces de hidrógeno intramoleculares. Los modelos moleculares de los complejos de CAF y adenosina son energéticamente más favorables en regiones del tercer fragmento transmembrana como se muestran en las Figs. (3.3 y 3.4), y sus características cuantitativas están en las Tablas (3.2 y 3.3). En ambos de estos complejos, adenosina forma todos los tres enlaces-H con grupos hidrofílicos de la base, es decir dos enlaces de hidrógeno con el grupo amida de la glutamina (N6-H62... O y N7...H-N), y el tercer enlace-H a través de N1 de adenosina con el grupo O-H de treonina. La CAF forma enlaces de hidrógeno con los grupos O-H de ambos residuos de serina. Otros mínimos para los complejos con adenosina y CAF tienen una energía menos negativa. Los cálculos muestran que los valores de la energía de las interacciones intermoleculares de CAF y de adenosina con éste segmento (TM3) son bastante cercanos. La diferencia es igual a 0.48 kcal/mol, esta se puede considerar insignificante, dada la precisión de los cálculos de MM y el modelo aproximado.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.3. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO DE LA HÉLICE TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

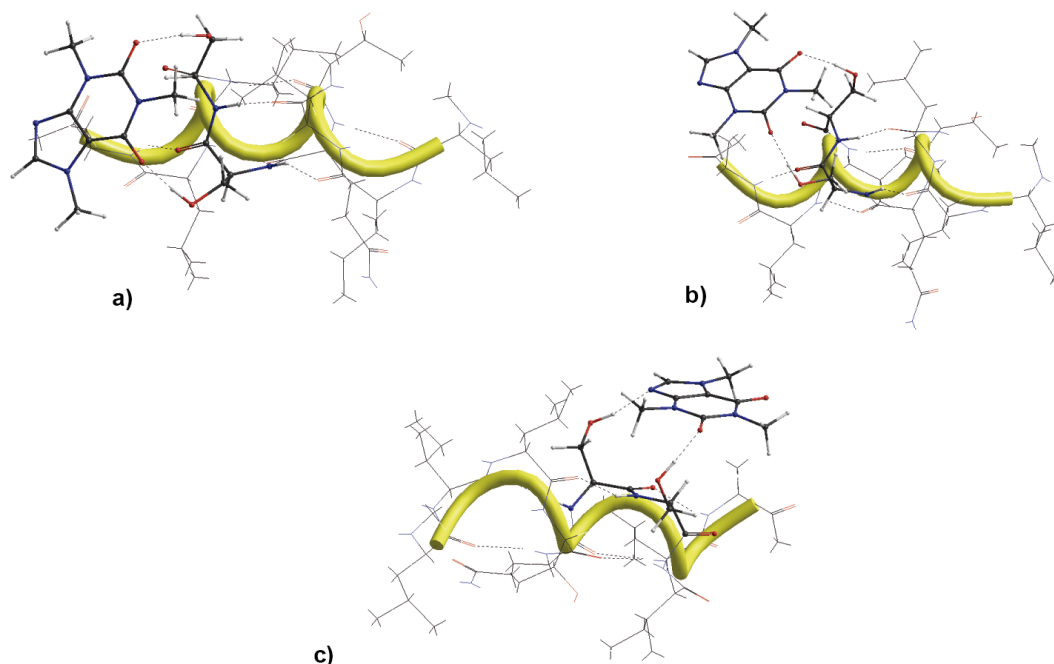


Figura 3.3: Las tres conformaciones de menor energía de interacción de los complejos del segmento TM3 del receptor A1 con la adenosina.

Tabla 3.2: Valores de energía y longitudes de enlaces hidrógeno de los mínimos de energía de los complejos cafeína con el segmento TM3 del receptor A1.

No	1	2	3	4	5
E_{int}	-30.97	-29.84	-27.09	-26.15	-19.59
1	O6 - Ser1 1.63	O6 - Ser2 1.7	N9 - Ser1 1.8	O2 - Gln 1.86	
2	O2 - Ser2 1.72	O2 - Ser1 1.65	O2 - Ser2 1.7	N9 - Ser1 1.81	O2 - Ser1 1.69

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de Adenosina con el fragmento del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

3.3.2. Conformaciones de mínima energía de adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1.

En esta sección mostramos los mínimos más energéticos encontrados entre adenosina (*syn*) con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1, Fig. 3.4. Las estructuras *anti* y *syn* (tabla 3.3) exhiben energías muy cercanas siendo las más profundas las conformaciones *syn* a pesar de que la estructura *anti* se encuentra en la mayor parte de los ácidos nucleicos de la doble hélice.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.3. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO DE LA HÉLICE TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

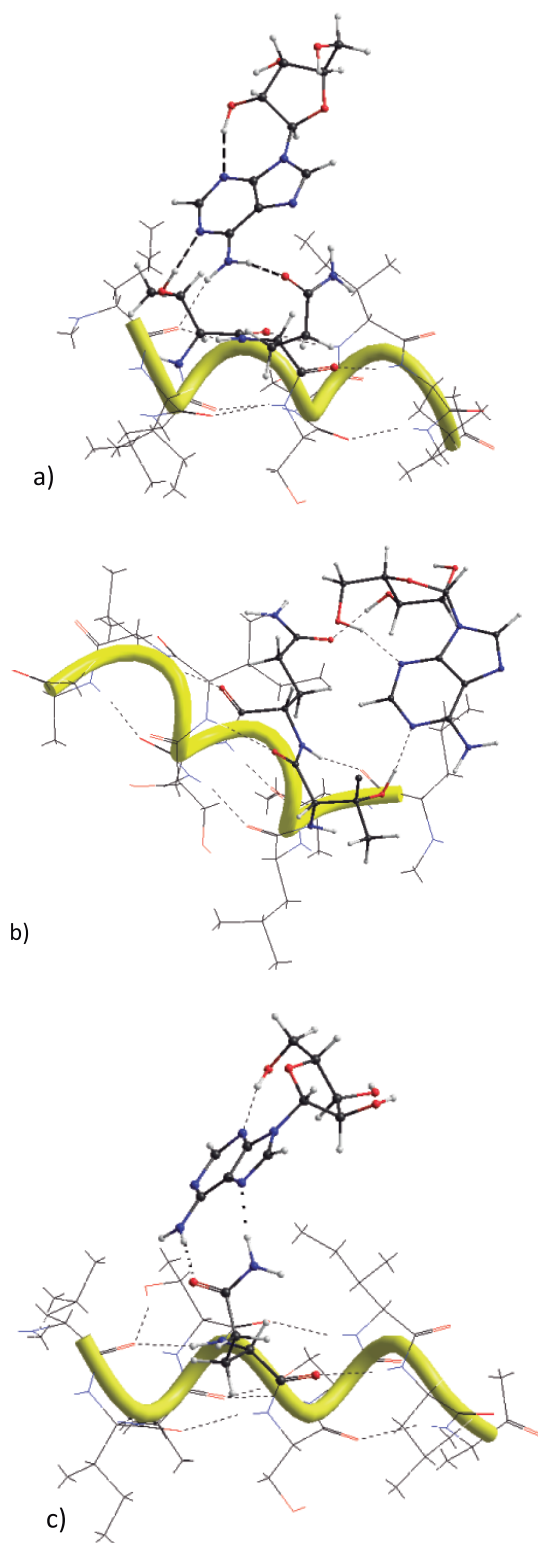


Figura 3.4: Las tres conformaciones de menor energía de interacción de los complejos del segmento TM3 del receptor A1 con adenosina.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.3. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO DE LA HÉLICE TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

Tabla 3.3: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de los complejos de adenosina con el segmento TM3 receptor A1

No	Syn				Anti			
	1	2	3	4	1	2	3	4
E_{int}	-31.45	-31.07	-22.67	-21.68	-31.26	-27.27	-24.76	-21.62
1	NH2-Gln 1.8	N1-Thr 1.82	N1-Ser1 1.84	NH2-Ser1 2.0	N1-Thr 1.77	O5'-Thr 2.03	N3-Gln 2.07	NH2-Thr 2.15
2	N7-Gln 2.25	O3'-H-Gln 1.66	NH2-Ser2 1.88	NH2-Ser2 2.02	NH2-Gln 1.79	NH2-Gln 1.83	HO3'-Ser1 2.08	NH2-Gln 1.83
3	N1-Thr 1.77				N7-Ser2 1.86	N7-Gln 2.25		N7-Gln 1.98
Enlaces Hidrógeno con átomos que pertenecen a la pentosa								
4	O3'-H-O2' 1.96	O2'-H-O3 1.93	O2'-H-O3' 1.96	O2'-H-O3' 1.93	O3'-H-O2' 1.96	O2'-H-O3' 2.01	O2'-H-O3' 1.99	O3'-H-O2' 1.97
5	O2'-H-N3 1.77	O5'-H-N3 1.86	O5'-H-N3 1.91	O5'-H-N3 1.88	O2'-H-N3 1.77	O5'-H-O4' 2.26	O5'-H-O4' 2.25	O2'-H-N3 1.77

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

3.4. Formación de complejos de cafeína y adenosina con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1.

3.4.1. Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1

En la formación del complejo de más baja energía de CAF (Fig. 3.5 a)) con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1 participan los tres centros protón-aceptor de CAF. Igual que para el segmento TM3 las diferencias en la energía de las conformaciones de menor energía de los complejos con adenosina y CAF son pequeñas, de menos de 1 kcal/mol (tablas 3.4 y 3.5), lo que permite explicar cualitativamente la posibilidad de competencia entre CAF y adenosina por los lugares de la unión en el receptor.

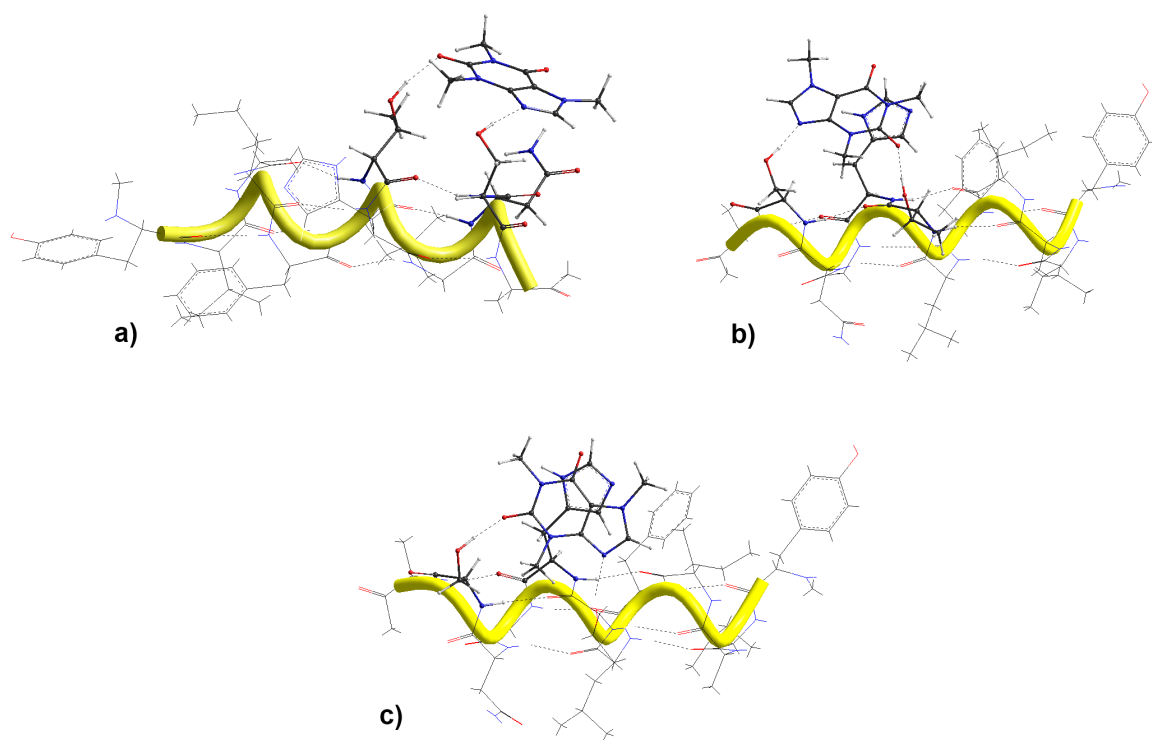


Figura 3.5: Conformaciones de menor energía de interacción de los complejos cafeína con el segmento TM7 del receptor A1.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

Tabla 3.4: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de cafeína con el segmento TM7 del receptor A1

No	1	2	3	4	5	6	7
E_{int}	-34.75	-31.63	-30.41	-29.05	-28.48	-26.33	-25.99
1	N9-Ser 1.8	O2-Thr 1.73	N9-Thr 1.93	N9-Asn 2.21	O6-Ser 1.7	O6-Ser 2.28	O6-Ser 1.69
2	O6-Asn 2.35	Apil-His	Apil-His	O6-Thr 1.69	Apil-His	O2-His 1.83	O2-Asn 2.02
3	O2-Thr 1.69	N9-Ser 1.79	O2-Ser 1.69	O2-Ser 1.67		N9-Thr 1.95	N9-Thr 1.92

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de cafeína con el segmento TM7 del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å). *Apil - His* indica que la cafeína esta en una posición de apilamiento con la Histidina

3.4.2. Conformaciones de mínima energía de adenosina con el TM7 del receptor de adenosina A1

Para este segmento los mínimos de energía de interacción más profundos con adenosina en conformación *syn* poseen energías significativamente más negativas que el mínimo más profundo correspondiente a la conformación *anti*. En la tabla 3.5, reportamos los mínimo más profundos de cada conformación de adenosina. En estos complejos, dos centros hidrófilos de adenosina (N7 y el grupo amino *NH2*) forman dos enlaces-H con el péptido, y el tercer enlace-H se forma por un grupo O-H de la ribosa (Fig. 3.6 a)). No encontramos ningún mínimo con energía más baja formado por adenosina en conformación *anti*. El mínimo mostrado aquí es diferente de la mayoría de otros mínimos en que, al formarse el complejo, la conformación interna de adenosina se cambia respecto a su conformación *anti*- de más baja energía, tanto en el empaquetamiento de ribosa como en el ángulo de torsión glicosídico (más de 20°).

En la Fig.3.6 se muestran las conformaciones más energéticas de los complejos de adenosina con fragmentos del segmento TM7 del receptor de adenosina A1.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS
3.4. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL
SEGMENTO TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

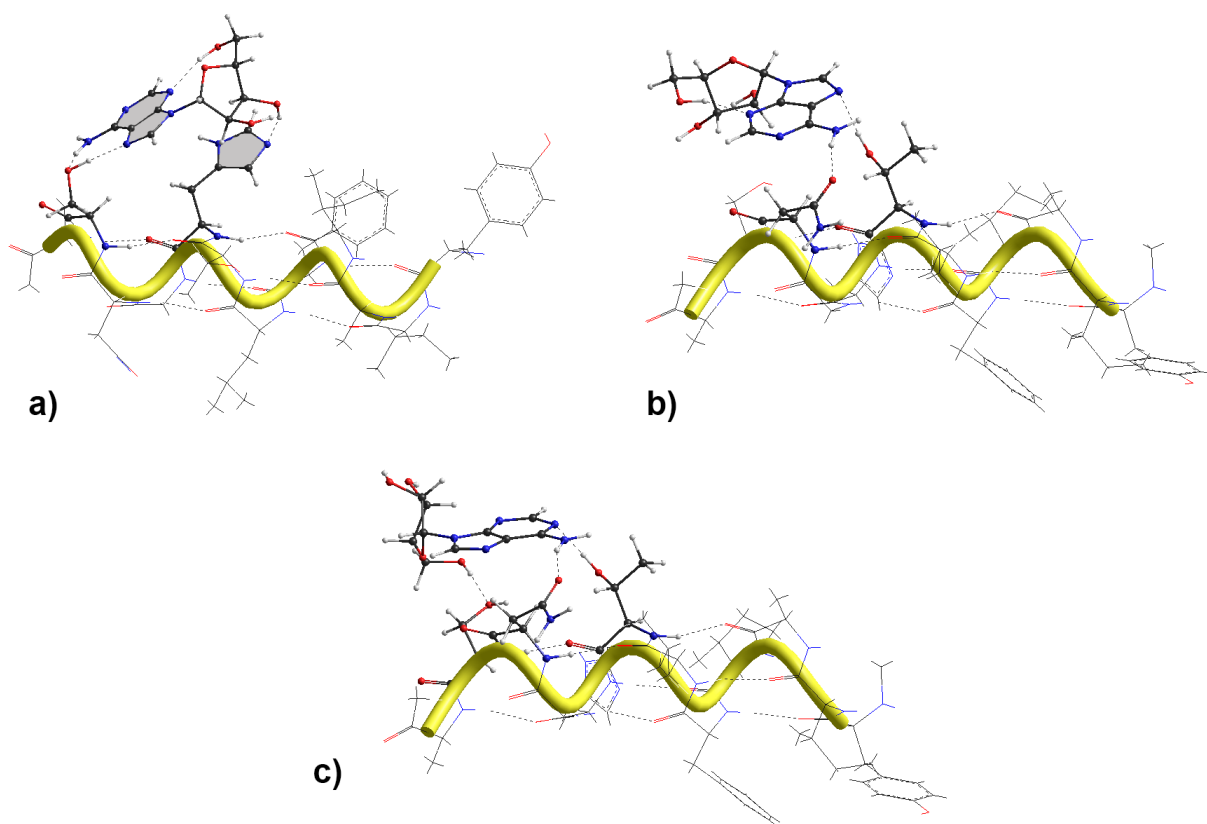


Figura 3.6: Las tres conformaciones de menor energía de interacción de los complejos de adenosina (syn) con el segmento TM7 del receptor A1.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.5. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE TEOFILINA, TEOBROMINA CON LOS SEGMENTOS TM3 Y TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

3.5. Formación de complejos de teofilina, teobromina con los segmentos TM3 y TM7 del receptor de adenosina A1.

Teofilina y teobromina Fig. 3.7 son moléculas que pertenecen a la familia de las metilxantinas al igual que la cafeína. La estructura molecular de estas dos moléculas es muy parecida a la de la molécula de cafeína. Teofilina y teobromina tienen tres centros aceptores de protones (O2, O6, N9) y un centro donador de protón, (N7H, N1H) respectivamente. Todos los átomos de ambas moléculas se encuentran en el plano excepto los hidrógenos de los grupos metilos (CH_3). Al igual que la cafeína las posibilidades de formación de complejos con proteínas está limitado a la formación de enlaces hidrógeno con los residuos de aminoácidos que contienen centros donadores o aceptores de protones (Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, His, Trp) además de las interacciones de apilamiento con los anillos aromáticos.

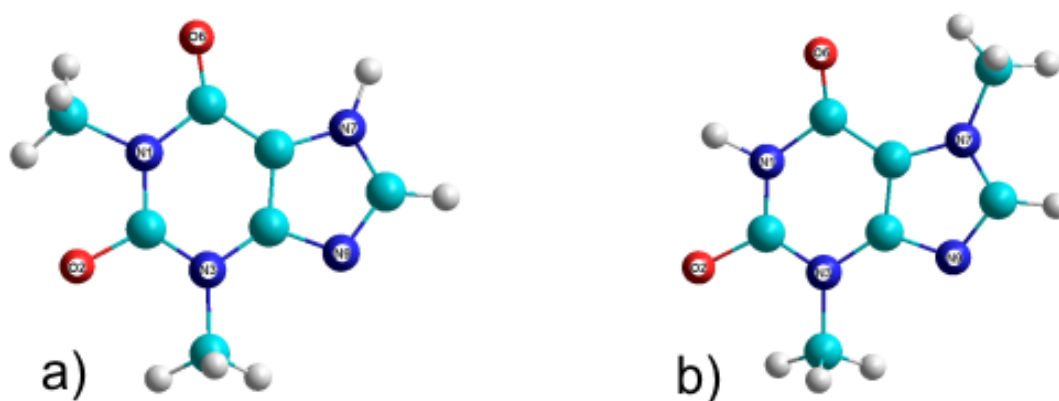


Figura 3.7: La estructura molecular de la (a) Teofilina, (b) Teobromina. Se muestra la numeración de los átomos de nitrógeno y oxígeno en dichas moléculas.

3.5.1. Conformaciones de mínima energía de teobromina y teofilina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1

La búsqueda de los mínimos de energía de los sistemas que contienen teofilina y teobromina con fragmentos del péptido muestran varios mínimos locales con dos enlaces hidrógeno para teofilina y con tres o dos enlaces hidrógeno para teobromina. Los cálculos de la energía de las interacciones intermoleculares de teofilina y teobromina con el segmento TM3 muestran valores de energías muy similares. Comparando los mínimos más profundos de ambos complejos observamos que a pesar de que la conformación con teofilina tiene un enlace hidrógeno menos respecto a la de teobromina, éste es ligeramente más negativo, ver tablas (3.6 y 3.7). La diferencia en energía es de 0.4 Kcal/mol Teofilina forma dos enlaces hidrógeno entre O2 y O6 con los grupos OH de los dos residuos de serina y un tercer enlace hidrógeno a través de N1H con el grupo OH de la segunda serina, ver Fig. (3.8a), mientras que teobromina solo forma dos enlaces hidrógeno entre O2 y O6 con los grupos OH de los dos residuos de serina, ver Fig. (3.8b). En la tabla (3.6 y 3.7)

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.5. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE TEOFILINA, TEOBROMINA CON LOS SEGMENTOS TM3 Y TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

mostramos las características energéticas y estructurales de las conformaciones de mínima energía obtenidas para los complejos de teofilina y teobromina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1.

En el apéndice A se muestran otras conformaciones de mínima energía para los complejos de Teofilina, Teobromina con los segmentos TM3 y TM7 del receptor A1.

Por otra parte si tomamos el mínimo más profundo de teofilina dado que es más negativo que el de teobromina y hacemos una comparación con sus similares de cafeína y adenosina, podemos decir que:

- El complejo de teofilina al igual que el de cafeína forman dos enlaces hidrógeno a través de O2 y O6 con los grupos OH de los residuos de serina, sin embargo el mínimo formado con cafeína es más negativo siendo la diferencia en energía de 1.74 Kcal/mol.
- El complejo de adenosina forma tres enlaces hidrógeno con sus grupos hidrofílicos de la base, dos enlaces de hidrógeno los forma con el grupo amida de la glutamina (N6H62-O y N7-HN) y un tercer enlace de hidrógeno se forma a través de N1 de adenosina con el grupo OH de treonina, mientras que el complejo de teofilina solo forma dos enlaces hidrógeno. Para este caso la diferencia en energía de interacción intermolecular es de 2.26 Kcal/mol.

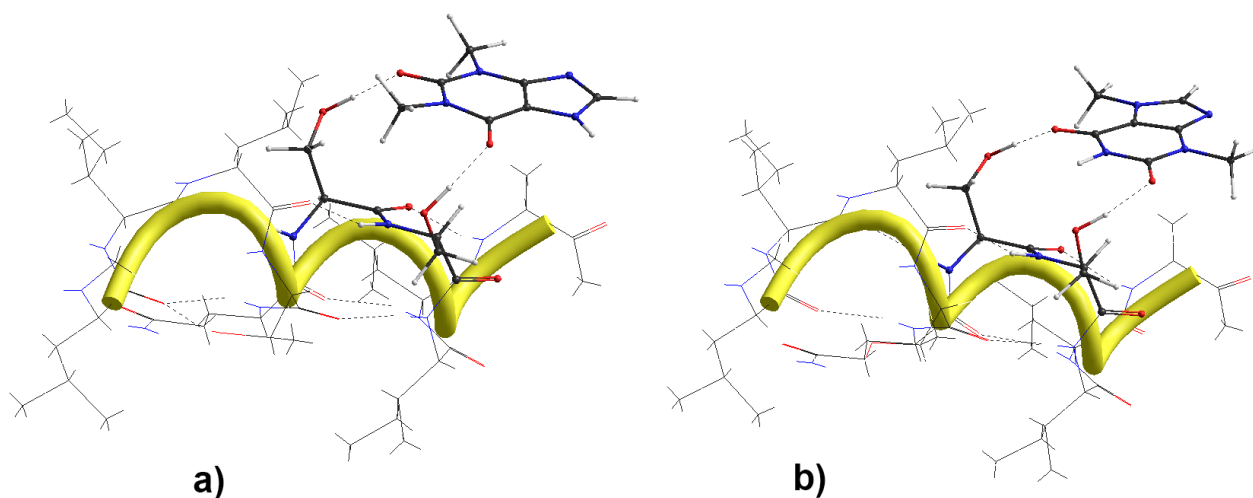


Figura 3.8: Conformación más negativa de teofilina a) y teobromina b) con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.5. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE TEOFILINA, TEOBROMINA CON LOS SEGMENTOS TM3 Y TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

Tabla 3.6: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de Teofilina con el segmento TM3 del receptor A1.

No	1	2	3	4	5	6
Eint	-29.23	-29.22	-27.19	-25.63	-25.61	-25.03
1	O2 - Ser1 1.65	O6 - Ser1 1.65	O2 - Ser2 1.74	NH7 - Gln 2.02	O6 - Ser1 2.36	O2 - Gln 1.92
2	O6 - Ser2 1.7	O2 - Ser2 1.7	N9 - Ser1 1.8	O6 - Ser1 1.66	NH7 - Ser2 2.21	O6 - Ser1 1.66

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de Adenosina con el fragmento del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

Tabla 3.7: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de Teobromina con el segmento TM3 del receptor A1.

No	1	2	3	4	5	6
Eint	-28.83	-28.16	-25.88	-24.68	-20.16	-11.83
1	O6 - Ser1 1.62	O2 - Ser1 1.65	O2 - Ser2 1.72	O2 - Gln 1.87	N9 - Gln 2.29	NH1 - Gln 1.88
2	O2 - Ser2 1.76	O6 - Ser2 1.74	N9 - Ser1 1.81	N9 - Ser1 1.8	O2 - Ser1 1.8	O2 - Gln 2.04
3	NH1 - Ser2 2.36					

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

3.5.2. Conformaciones de mínima energía de teobromina y teofilina con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1

De forma análoga al segmento TM3, para el segmento TM7 se realizó una búsqueda de los mínimos de energía de los sistemas que contienen teofilina y teobromina con fragmentos del péptido. Los resultados obtenidos muestran varios mínimos locales hasta con cuatro y tres enlaces hidrógeno para teobromina y con tres y dos enlaces hidrógeno para teofilina. Los cálculos de la energía de las interacciones intermoleculares de teofilina y teobromina con el fragmento muestran valores de energías muy similares. Comparando los mínimos más profundos de ambos complejos observamos que a pesar de que la conformación con teobromina tiene un enlace hidrógeno menos respecto a la de teofilina, éste es más negativo. La diferencia en energía es de 2 Kcal/mol. El mínimo más profundo para teofilina forma tres enlaces hidrógeno, dos de ellos los forma entre O6 y O2 de teofilina con los grupos OH de treonina y serina respectivamente, y un tercer enlace lo forma entre N9 de teofilina con el grupo NH2 de ASN, ver Fig. (3.9a). El mínimo más profundo para teobromina forma dos enlaces hidrógeno, el primero entre O2 con NH de histidina y el segundo enlace hidrógeno se forma entre O6 con el grupo OH de serina, ver Fig. (3.9b).

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.5. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE TEOFILINA, TEOBROMINA CON LOS SEGMENTOS TM3 Y TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

En las tablas (3.8 y 3.9) mostramos las conformaciones de mínima energía obtenidas para los complejos de teofilina y teobromina con fragmentos del péptido del segmento TM3 del receptor de adenosina A1.

Por otra parte si tomamos el mínimo más profundo de teobromina dado que es más negativo que el de teofilina y hacemos una comparación con sus similares de cafeína y adenosina, podemos decir que:

- El complejo de teobromina forma solo dos enlaces hidrógeno y es menos negativo comparado con el complejo de cafeína, además de que el de cafeína cuenta con tres enlaces hidrógeno. La diferencia en energía es de 5 Kcal/mol.
- El complejo de adenosina forma dos enlaces hidrógeno, sin embargo también es más negativo que el de teobromina. Para este caso la diferencia en energía de interacción intermolecular es de 5.8 Kcal/mol.

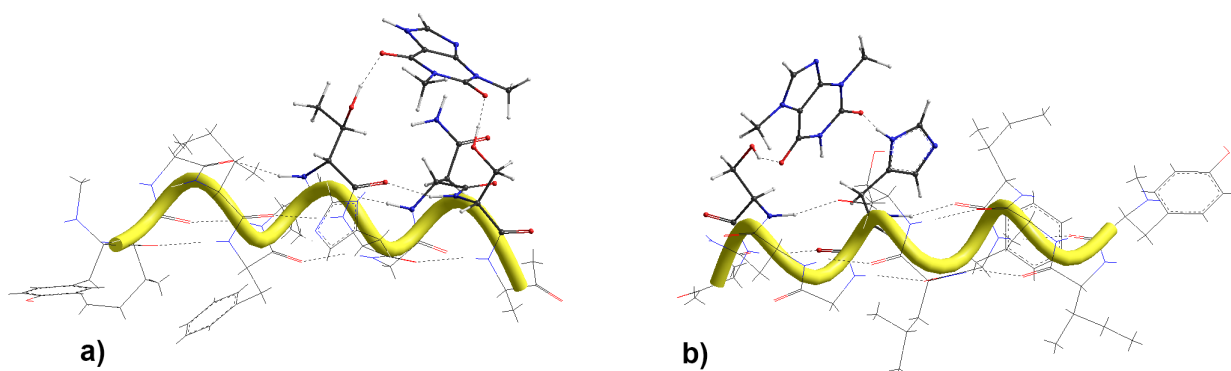


Figura 3.9: Conformación más negativa de teofilina a) y teobromina b) con el segmento TM7 del receptor de adenosina A1.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.5. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE TEOFILINA, TEOBROMINA CON LOS SEGMENTOS TM3 Y TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1.

Tabla 3.8: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de interacción de teofilina con el segmento TM7 del receptor A1.

No	1	2	3	4	5	6
E_{int}	-27.9	-27.75	-27.24	-26.42	-25.43	-23.65
1	O6 - Thr 1.72	O2 - Asn 2.12	O6 - His 1.86	O2 - His 1.84	O2 -His 1.85	O6 -Ser 1.69
2	O2 - Ser 1.67	O6 - Ser 1.68	N9 - Ser 2.31	O6 - Ser 2.21	N9 - Thr 1.81	
3	N9 - Asn 2.22	NH7 - Ser 2.14		N9 - Thr 1.94		
4		N9 - Thr 1.84				
Enlaces Hidrógeno con átomos que pertenecen a la estructura de la hélice alfa						
5				O10 - Asn 1.88	O10 - Asn 1.92	O10 - Asn 1.89
6						O7 - Thr 1.83

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de adenosina con el segmento TM7 del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

Tabla 3.9: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de interacción de teobromina con el segmento TM7 del receptor A1.

No	1	2	3	4	5	6
E_{int}	-29.8	-28.13	-27.56	-26.22	-25.29	-23.15
1	O2 - His 1.84	O6 - Thr 1.71	O6 - Ser 1.73	NH1 - Asn 1.91	O2 -His 1.84	O6 -Thr 1.76
2	O6 - Ser 1.82	O2 - His 1.9		O6 - Ser 1.83	O6 - Ser 2.32	O2 - Asn 2.0
3		NH7 - Ser 2.14			N9 - Thr 1.99	N9 - Ser 1.97
Enlaces Hidrógeno con átomos que pertenecen a la estructura de la hélice alfa						
4	NH1 - O7 1.91		O7 - Thr 1.86	O7 - Thr 1.98		
5	O10 - Asn 1.89	O10 - Asn 1.89	O10 - Asn 1.91	O6 - Asn 2.56	O10 - Asn 1.88	

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de adenosina con el segmento TM7 del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.6. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A.

3.6. Formación de complejos de cafeína y adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A2a.

Estudios recientes muestran que no solamente la cafeína es un competidor antagónico del receptor de adenosina A1, sino también tiene efectos antagónicos sobre los receptores de adenosina A2a, en este sentido se realizó una búsqueda de posibles conformaciones de mínima energía entre la molécula de adenosina y cafeína con segmentos de las hélices TM3 y TM7 del receptor de adenosina A2a.

Un análisis de la estructura primaria del receptor de adenosina A2a muestra gran similitud al receptor de adenosina A1 en los segmentos TM3 y TM7. La secuencia de aminoácidos de estos segmentos para el receptor A2a de adenosina es la siguiente:

para el segmento de la hélice TM3 tenemos:

Leu-Phe-Ile-Ala-Cys-Phe-**Val-Leu-Val-Leu-Thr-Gln-Ser-Ser-Ile-Phe-Ser-Leu-Leu-Ala-Ile-Ala-Ile**

para el segmento de la hélice TM7 tenemos la secuencia de aminoácidos

Leu-Trp-Leu-Met-**Tyr-Leu-Ala-Ile-Val-Leu-Ser-His-Thr-Asn-Ser-Val-Val-Asn-Pro-Phe-Ile-Tyr-Ala**

3.6.1. Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento TM3 del receptor de adenosina A2a

La búsqueda de los mínimos de energía de los sistemas que contienen CAF con una parte de la hélice TM3 reveló varios mínimos locales hasta con tres enlaces de H, además de la formación de posiciones de apilamiento de CAF con el residuo de aminoácido fenil.

Los mínimos más profundos forman tres enlaces hidrógeno, en estas conformaciones cafeína involucra sus tres centros aceptores de protones (O2, O6, N9). Estos enlaces se forman con los tres residuos de serina del segmento. Otros mínimos con energías menos negativas forman posiciones de apilamiento entre cafeína y el residuo de fenilalanina.

En la Fig. 3.10 mostramos los dos mínimos más energéticos formados por cafeína con el segmento TM3 del receptor de adenosina Aa2, y sus características cuantitativas están en la tabla 3.10

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.6. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A.

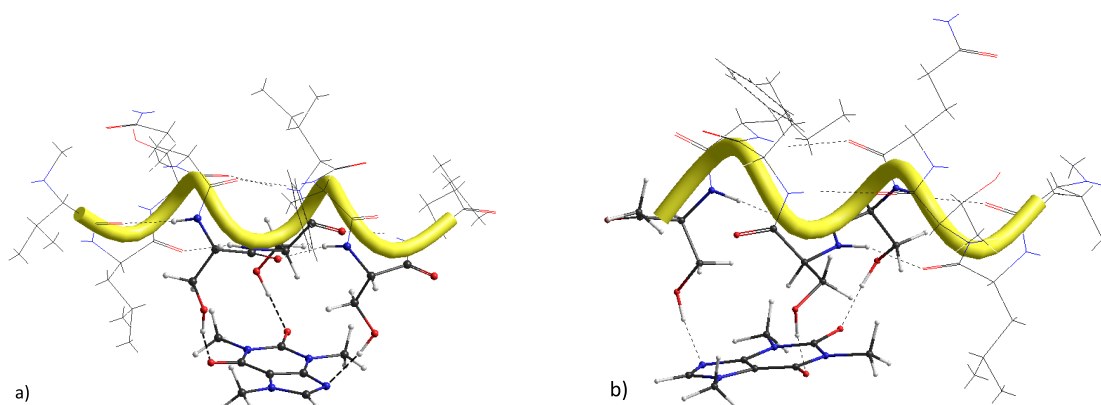


Figura 3.10: Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento de hélice del receptor de adenosina A2a.

Tabla 3.10: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de interacción de cafeína con el segmento TM3 del receptor A2a.

No	1	2	3	4	5
E_{int}	-37.84	-37.03	-29.8	-26.54	-22.28
1	O6 - Ser1 1.68	O2 - Ser1 1.67	O2 - Gln 1.92	N9 - Ser1 1.82	N9 - Gln 2.2
2	O2 - Ser2 1.7	O6 - Ser2 1.72	N9 - Ser1 1.84	O2 - Ser2 1.73	O2 - Ser1 1.72
3	N9 - Ser3 1.79	N9 - Ser3 1.8	Apil- Phe	O6 - Ser3 1.7	
Enlaces Hidrógeno con átomos que pertenecen a la estructura de la hélice alfa					
4			O2 - Ser1 1.79	O9 - Ser3 2.28	O2 - Ser1 1.8

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de cafeína con el segmento TM3 del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

3.6.2. Conformaciones de mínima energía de adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A2a

En esta sección mostramos los mínimos más energéticos encontrados entre adenosina con el segmento de la hélice TM3 del receptor de adenosina A2a. El mínimo más profundos forma tres enlaces hidrógeno, los residuos de aminoácidos involucrados en estos enlaces son los mismos que interaccionan con cafeína. Los cálculos mostraron que los valores de energías de la interacción intermolecular de cafeína y adenosina con este fragmento peptídico son muy similares. La diferencia en energía es de 1.3 Kcal/mol siendo los complejos que se forman con cafeína los más negativos.

En la Fig. 3.11 mostramos los mínimos más energéticos formados por adenosina con

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.6. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A.

el segmento TM3 del receptor de adenosina Aa2, y sus características cuantitativas están detalladas en la Tabla 3.11

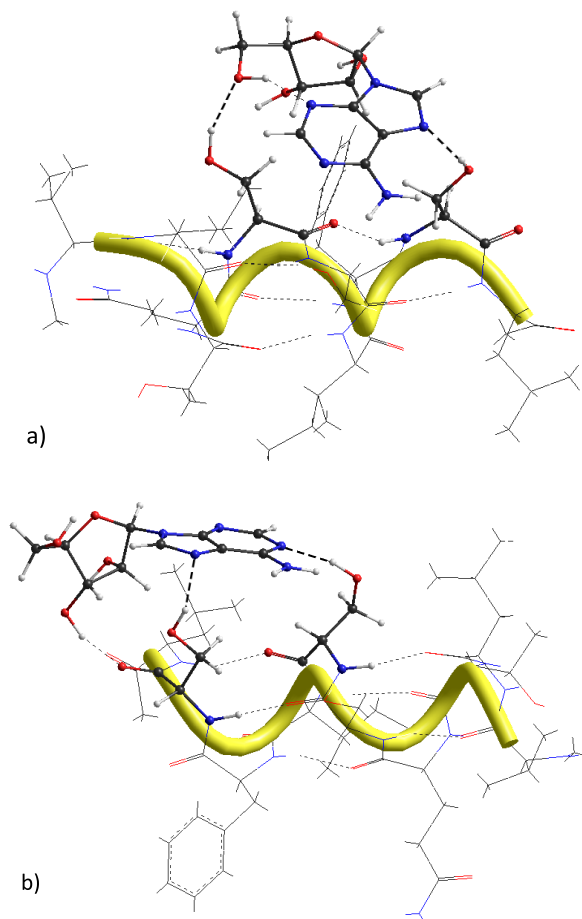


Figura 3.11: Conformaciones de mínima energía de adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A2a, a) adenosina *Syn*, b) adenosina *Anti*.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.6. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A.

Tabla 3.11: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de interacción de adenosina con el segmento TM3 del receptor A2a.

No	Syn				Anti			
	1	2	3	4	5	6	7	8
E_{int}	-29.35	-27.08	-26.23	-25.41	-43.84	-36.45	-29.95	-22.54
1	NH2-Ser2 2.21	NH2-Gln 1.85	N1-Ser1 1.85	N1-Thr 1.82	N1-Ser2 1.81	N1-Ser2 1.81	N1-Ser1 1.75	N3-Gln 2.03
2	N7-Ser3 1.97	O4'-Thr 2.12	NH2-Ser1 2.24	NH2-Gln 1.89	NH2-Ser2 2.29	NH2-Ser2 2.36	NH2-Gln 1.89	Ser1 1.82
3	O5'-N3 1.87		NH2-Ser2 1.91		N7-Ser3 1.98		N7-Ser3 2.04	
Enlaces Hidrógeno con átomos que pertenecen a la pentosa								
4	O2'H-O3'	O2'H-O3'	O2'H-O3'	O2'H-O3'	O2'H-O3'	O2'H-O3'	O2'H-O3'	O2'H-O3'
	1.97	1.96	1.92	1.96	2.07	2.01	1.98	2.03
5	O5'H-N3	O5'H-N3	O5'H-N3	O5'H-N3	O5'-O4'	O5'H-N3	O5'H-O4'	
	1.87	1.83	1.89	1.88	2.18	1.92	2.21	
Enlaces Hidrógeno con átomos que pertenecen a la estructura de la hélice alfa								
6	O2-Ser2			O2-Ser2	O3'H-O10	O3'H-O10		
	1.83			1.78	1.68	1.72		

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de adenosina con el segmento TM3 del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.7. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A.

3.7. Formación de complejos de cafeína y adenosina con el segmento TM7 del receptor de adenosina A2a.

3.7.1. Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento TM7 del receptor de adenosina A2a

En esta sección mostramos los mínimos más energéticos encontrados entre cafeína con el segmento TM7 del receptor de adenosina A2a. El mínimo más negativos forman dos enlaces hidrógeno entre O6 y O2 de cafeína con serina1 y serina2 respectivamente. En la Fig. 3.12 mostramos dos de los mínimos más negativos que se forman entre cafeína y el segmento TM7 del receptor de adenosina, en la tabla 3.12 se muestran sus características cuantitativas.

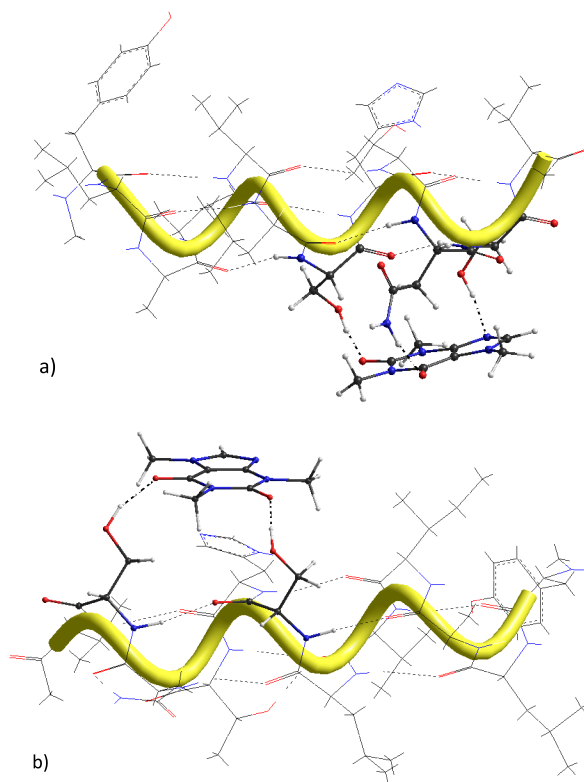


Figura 3.12: Conformaciones de mínima energía de cafeína con el segmento TM7 del receptor de adenosina A2a.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.7. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A.

Tabla 3.12: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de adenosina con el segmento TM7 del receptor A2a.

No	1	2	3	4
E_{int}	-40.88	-37.05	-36.26	-27.17
1	O2-Ser1 1.69	O6-Ser2 1.7	N9-Ser1 1.82	
2	N9-Ser2 1.9	O2-Ser1 1.66	O2-His 1.86	O6-Ser1 1.76
3	O6-Asn 1.9		O6-Ser2 1.7	N9-Ser2 2.11
Enlaces Hidrógeno con átomos que pertenecen a la estructura de la hélice alfa				
4		O10-Asn 1.89		O10-Asn 1.88
5		O5-Thr 1.72	O5-Thr 1.68	O5-Thr 1.72
6				O8-His 1.99

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de Cafeína con el segmento TM7 del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

3.7.2. Conformaciones de mínima energía de adenosina con el segmento TM7 del receptor de Adenosina A2a

En esta sección mostramos los mínimos más energéticos encontrados entre adenosina con el segmento TM7 del receptor de adenosina A2a. El mínimo más negativo forma un enlace hidrógeno entre N7 de adenosina con serina, además de formar una posición de apilamiento entre adenosina con el residuo de aminoácido de histidina. Los cálculos de energía de interacción intermolecular de cafeína y adenosina con este fragmento mostraron que dichos valores son bastante cercanos entre sí. La diferencia es de 1.07 Kcal/mol siendo la conformación que se forma con adenosina la más negativa respecto a la de cafeína. En la Fig. 3.13 mostramos dos de los mínimos más negativos que se forman entre adenosina y el segmento TM7 del receptor de adenosina A2a, en la tabla 3.13 se muestran sus características.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS
3.7. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL
SEGMENTO TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A.

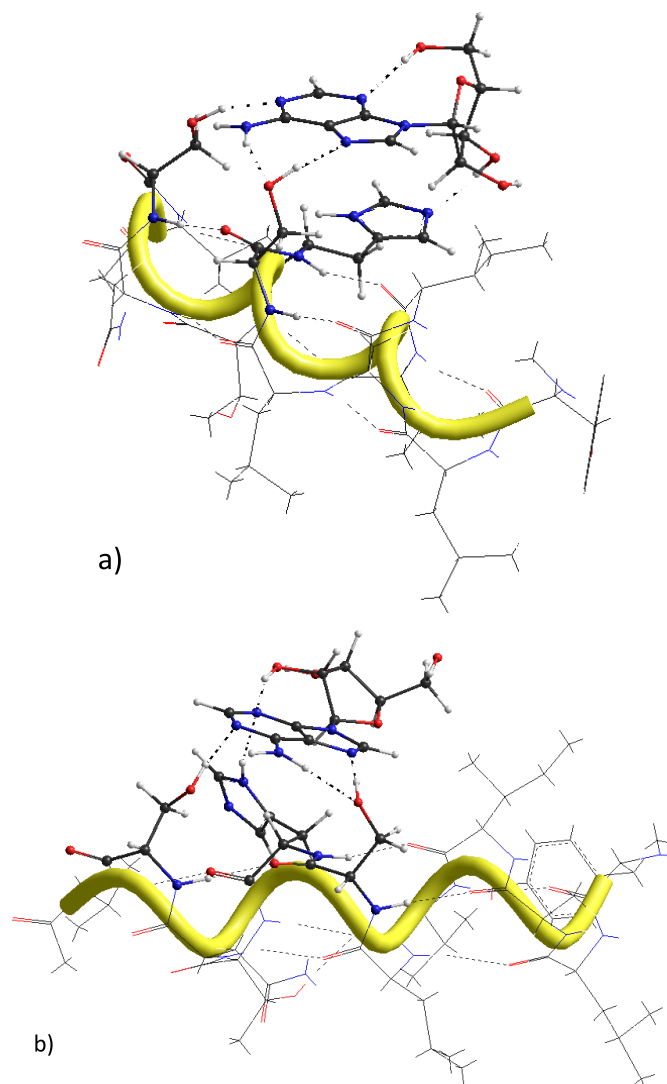


Figura 3.13: Conformaciones de mínima energía de adenosina con el segmento TM7 del receptor de adenosina, a) adenosina *syn*, b) adenosina *anti*

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.7. FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE CAFEÍNA Y ADENOSINA CON EL SEGMENTO TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A2A.

Tabla 3.13: Valores de energía y longitudes de enlace de hidrógeno de los mínimos de energía de interacción de adenosina con el segmento TM7 del receptor A2a.

No	Syn							Anti
	1	2	3	4	5	6	7	
E_{int}	-41.95	-38.8	-34.59	-32.69	-28.58	-25.55	-25.46	8
	N1-Ser2 1.76	N1-Ser1 1.82	N7-Ser2 1.79	NH2-Ser2 2.31	N7-Ser1 1.88	N7-Ser1 1.95	N7-Ser2 2.15	N7-Ser1 1.74
2	NH2-Ser2 1.99				NH2-His 2.2	NH2-Asn 1.85	Apil His	NH2-Ser1 1.97
3	N7-Ser1 1.8	Apil His		O5'-Ser1 1.94	O5'-Ser2 1.86			N1-Ser2 1.77
Enlaces Hidrógeno con átomos que pertenecen a la pentosa								
4	O2'H-O3' 1.88	O2'H-O3' 2.03	O2'H-O3' 1.9	O2'H-O3' 2.05	O2'H-O3' 1.89	O2'H-O3' 1.88	O2'H-O3' 1.92	O2'H-O3' 1.94
5	O3'H-His 1.95	O5'H-N3 1.88	O5'H-N3 1.94	O5'H-N3 1.78	O5'H-N3 2.33	O5'H-N3 1.91	O5'H-N3 1.81	O3'H-N3 1.81
6		O3'H-Ser2 2.26	O3'H-His 1.92					
Enlaces Hidrógeno con átomos que pertenecen a la estructura de la hélice alfa								
7	O5'H-N3 1.92	O5'-Thr 1.74	O5'-Thr 1.71	O3-O3'H 1.69	O10-Asn 1.89	O8-His 2.04	O5'-Thr 1.73	N3-His 2.11
8		O10-Asn 1.89	O10-Asn 1.89	O5'-Thr 1.72	NH9-Thr 1.94	O5'-Thr 1.71	O10-Asn 1.89	O5'-Thr 1.72
9				O8-His 2.05		O7-Ser2 1.7		
10				O10-Asn 1.91		O10-Asn 1.87		

Notas: E_{int} representa la energía de interacción de adenosina con el segmento TM7 del receptor de adenosina (kcal/mol). La primera fila indica los átomos involucrados en el enlace hidrógeno. La segunda fila indica las distancias del enlace (Å).

Capítulo 4

Conclusiones

Una de las sustancias biológicamente activas más amplia y regularmente consumidas por la población es la cafeína, la cual actúa como antagonista de los receptores de adenosina A1 y A2a. Tratamos de clarificar los posibles mecanismos de competición de cafeína y adenosina por los sitios de unión en los receptores de adenosina A1, y A2a y contestar la pregunta, ¿Cómo puede la cafeína siendo comparativamente pequeña y casi rígida con limitaciones para interacciones inter moleculares suficientemente fuertes, competir con la molécula de adenosina la cual tiene más centros para formación de enlaces hidrógeno y con una movilidad conformacional significativa? Recientes datos estructurales [20], [21], [22], [23] sobre complejos del receptor de adenosina A2a con adenosina, agonistas y antagonistas así como simulaciones computacionales para tales complejos no pueden clarificar sobre la acción de la cafeína.

Para responder esta pregunta, en este trabajo hemos desarrollado una búsqueda de los mínimos de energía de interacción de cafeína y adenosina con fragmentos transmembrana de los receptores A1 y A2a, los cuales son capaces de formar varios enlaces hidrógeno con esos ligandos. Los cálculos fueron realizados por el método de mecánica molecular utilizando el campo de fuerzas y el paquete computacional AMBER 9. Un análisis conformacional de la molécula de adenosina reveló que los mínimos de energía interacción intramolecular más profundos corresponden a la formación de dos enlaces hidrógeno intramoleculares. La formación de esos enlaces hidrógeno restringen las interacciones de adenosina con los fragmentos del receptor. Con la búsqueda de los mínimos de energía de interacción entre el receptor y los dos ligandos (Adenosina y Cafeína) se encontró un conjunto de complejos de mínimos de energía; el mínimo más profundo para adenosina resulta en la formación de enlaces hidrógeno con no más de tres residuos de aminoácidos. Los valores de la energía de interacción en esos mínimos son bastante cercanos para ambos ligandos. Por lo tanto las moléculas de cafeína y adenosina, que son sustancialmente diferentes en el número de centro hidrofílicos y en las posibilidades conformacionales resultan ser similares desde el punto de vista de la formación de complejos con los fragmentos receptores de adenosina A1 y A2a. Adicionalmente se realizó la búsqueda de los mínimos de energía de interacción de los fragmentos intramembrana del receptores de adenosina A1 con teofilina, teobromina. Los cálculos mostraron que los mínimos más profundos corresponden a la formación de varios enlaces-H entre los residuos de aminoácidos de los receptores y átomos hidrofílicos de ligandos. Estos resultados permitieron explicar por qué teofilina y teobromina no poseen

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

mayor actividad que la cafeína a pesar de la presencia en estos de un centro hidrofílico adicional en comparación con cafeína.

El conjunto de todos los resultados ayuda a entender los mecanismos de competencia de las metil xantinas, en especial de la cafeína con adenosina por los sitios de unión en los receptores de adenosina como la fuente del efecto farmacológico de la cafeína.

Apéndice A

Complejos adicionales de mínima energía de Teofilina y teobromina con los segmentos TM3 y TM7 del receptor de adenosina A1

A.1. Conformaciones de mínima energía de teofilina con el segmento TM3 del receptor de adenosina A1

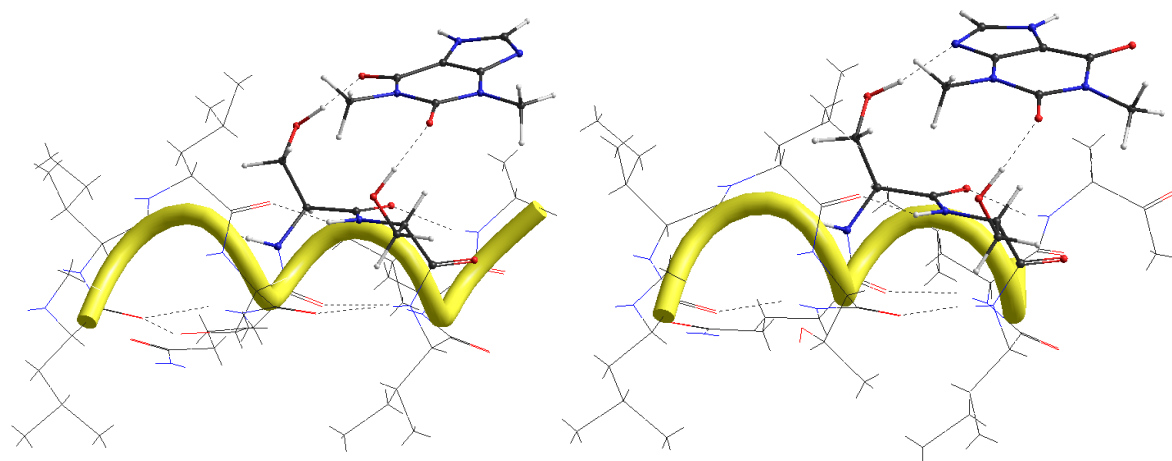


Figura A.1: Conformaciones de mínima energía de interacción de teofilina con el segmento TM3 del receptor de adenosina. Ver Tabla 3.6

**APÉNDICE A. COMPLEJOS ADICIONALES DE MÍNIMA ENERGÍA
DE TEOFILINA Y TEOBROMINA**

**A.2. CONFORMACIONES DE MÍNIMA ENERGÍA DE TEOBROMINA CON EL
SEGMENTO TM3 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1**

**A.2. Conformaciones de mínima energía de teobromina con
el segmento TM3 del receptor de adenosina A1**

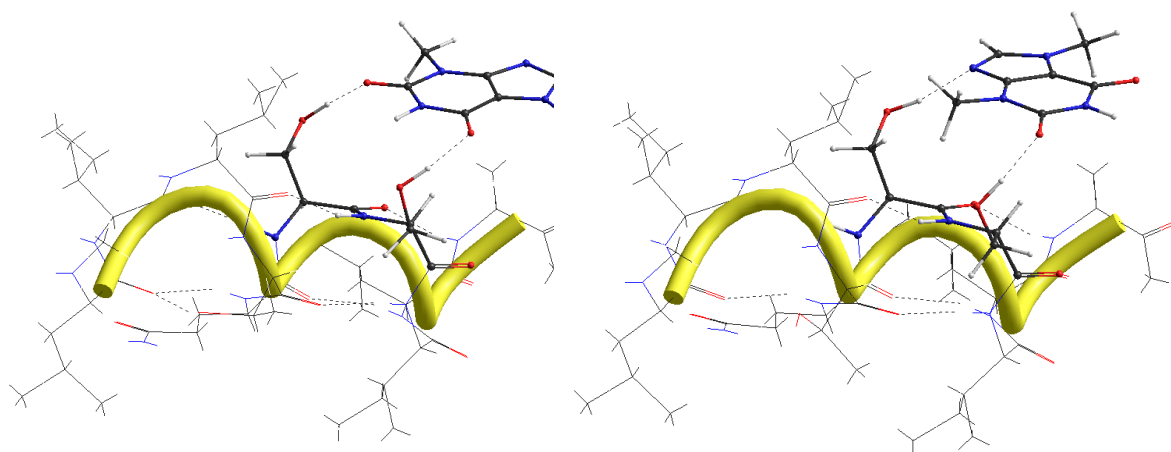


Figura A.2: Conformaciones de mínima energía de interacción de teobromina con el segmento TM3 del receptor de adenosina. Ver Tabla 3.7

**A.3. Conformaciones de mínima energía de teofilina con el
segmento TM7 del receptor de adenosina A1**

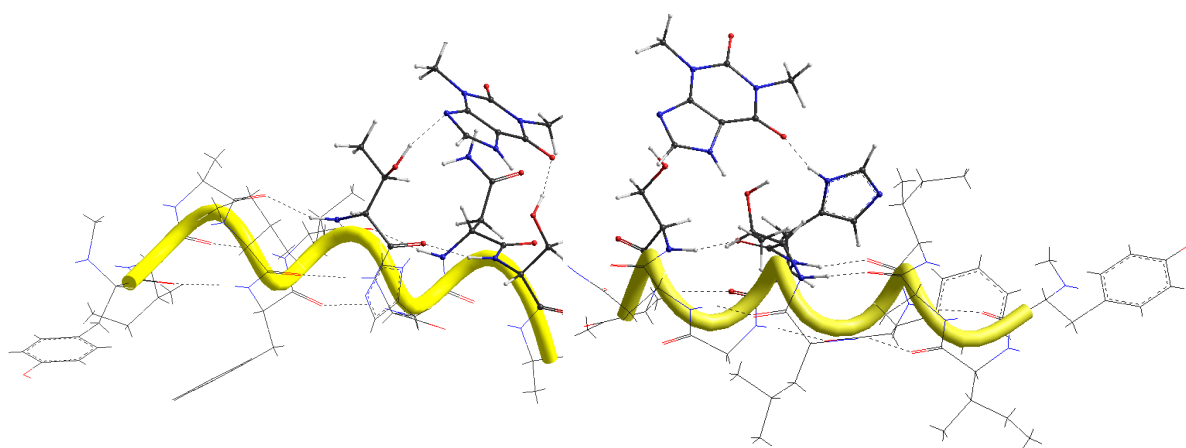


Figura A.3: Conformaciones de mínima energía de interacción de teofilina con el segmento TM7 del receptor de adenosina. Ver Tabla 3.8

APÉNDICE A. COMPLEJOS ADICIONALES DE MÍNIMA ENERGÍA
DE TEOFILINA Y TEOBROMINA

A.4. CONFORMACIONES DE MÍNIMA ENERGÍA DE TEOBROMINA CON EL
SEGMENTO TM7 DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A1

**A.4. Conformaciones de mínima energía de teobromina con
el segmento TM7 del receptor de adenosina A1**

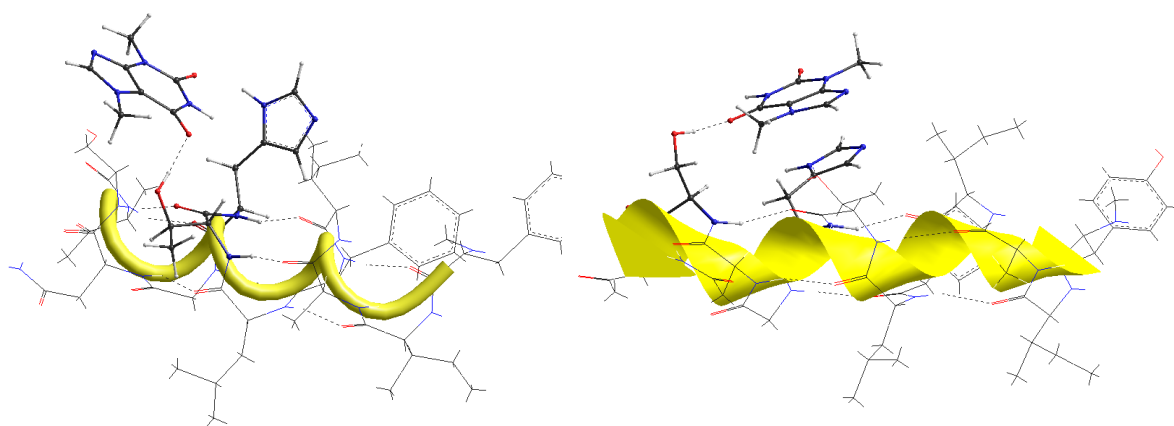


Figura A.4: Conformaciones de mínima energía de interacción de teobromina con el segmento TM7 del receptor de adenosina. Ver Tabla 3.9

Computational Study of Possible Complexes of Caffeine and Adenosine with Adenosine Receptor Fragments.

Valeri Poltev^{a,b,*}, Efren Rodrigues^a, Alexandra Deriabina^a, Eduardo Gonzalez^a, Nina Polteva^b

^a*Autonomous University of Puebla, Puebla, Av. San Claudio y Rio Verde, Mexico, 72570*

^b*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Moscow Region, Russia, 142240*

Abstract

Caffeine (CAF) is a biologically active substance with the broad function spectrum well-known from ancient times and widely used nowadays. The main pharmacological effect of CAF, stimulation of central nervous system, is due to its acting as a concurrent antagonist of Adenosine (Ado) on membrane proteins, namely, adenosine receptors A1 and A2a. In this work we study the atomic level mechanism of this effect. The main question that we try to answer using computer modeling is «How can comparatively small and practically rigid CAF molecule, with its limited possibilities to take part in sufficiently strong inter-molecular interactions, compete for binding sites with Ado molecule, which has more hydrogen bonding centers and significant conformational flexibility? » To approach this question we have calculated, using molecular mechanics (MM) method, the minima of interaction energy of CAF and Ado molecules with the fragments of transmembrane receptor domains participating in Ado binding. The MM computations revealed that the most probable conformations of separate Ado molecule correspond to the formation of two intra-molecular H bonds. This conclusion was confirmed at MP2/6-31G(d,p) and MP2/6-311++G(d,p) levels of the ab initio theory. It restricts the possibility of Ado interactions with hydrophilic amino acids of the receptor fragments. Thus, at the deepest minima of the interaction energy, both Ado and CAF form H bonds with no more than three amino-acid residues. The energy values at these minima are rather close to each other. Therefore, two molecules that are substantially different in the number of hydrophilic centers and in conformational possibilities turn out to be similar from the point of view of the energy of complex formation with adenosine receptor fragments.

Key words:

Caffeine; Adenosine; Adenosine receptors; Complex formation; Molecular mechanics; Ab Initio calculations

Bibliografía

- [1] Fredholm B., Battig K., Holmen, J., Nehlig A., Zvartau E.; Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use, *Pharmacol Rev.*, 51, 83-133, 1999.
- [2] Brauer, L. H., Buican, B., De Wit, H. *Behav. Pharmacol.*, 5, 111, 2002.
- [3] Deriabina A. , Cruz A. , González E. , Grokhlina T.I. , Poltev V.I. ., *Rev.Mex.Ing.Bioméd.*, v.25, N1, 34-43, 2004.
- [4] Ogawa, N., Ueki, H. *Psychiatry Clin Neurosci.*, 61, 263, 2007.
- [5] Roehrs, T.; Roth, T. *Sleep Medicine Rev.*, 12, 153, 2008.
- [6] Greenberg, J.A.; Dunbar, C.C.; Schnoll, R.; Kokolis, R.; Kokolis, S.; Kassotis, J. *Am J Clin Nutr.*, 85, 392, 2007.
- [7] Reville, W . Caffeine risk interview may be a storm in a teacup. *Irish Times* 2000.
- [8] Anonymous, L. Coffee and the heart. *Harvard Heart Lett.*, 12(10), 3-4, 2002.
- [9] James, J. E. Critical review of dietary caffeine and blood pressure: a relationship that should be taken seriously. *Psychosom Med.*, 66, 63-71, 2004.
- [10] Ziegelstein, R. C. Wake up and smell the caffeine. *Am. J Cardiol.*, 94, 981-982, 2004.
- [11] D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, K. M. Merz, D. A. Pearlman, M. Crowley, R.C. Wlker, W. Zhang, B. Wang, S. Hayik, A. Roithberg, G. Seabra, K. F. Wong, F. Paesani, X. Wu, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, L. Yang, C. Tan, J. Mongan, V. Hornal, G. Cui, P. Beroza, D. H. Mathews, C. Schafmeister, W. S. Ross, and P. A. Kollman (2006), AMBER 9, University of California, San Francisco.
- [12] Scott J. Weiner, Peter A. Kollman, David A. Case, U. Chandra Singh, Caterina Ghio, Giuliano Alagona, Salvatore Profete, Jr., and Paul Weiner., A new Force Field for Molecular Mechanical Simulation pf Nucleic Acids and Proteins., *J. Am. Chem. Soc.*, 106:765-784, 1984.
- [13] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, Jr., D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, and P. A. Kollman, A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 19, pp. 5179-5197, May 1995.

- [14] S. A. Rivkees, H. Barbhuiya, and A. P. Ijzerman, Identification of the Adenine Binding Site of Human A1 Adenosine Receptor *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 6, pp. 3617-3621, Feb. 1999.
- [15] V. I. Poltev, E. Rodríguez, T.I. Grokhlina, A. Deriabina, E. Gonzalez, *Int J Quantum Chem.*, 110, 681-688, 2009
- [16] V. I. Poltev, E. Rodriguez, T. I. Grokhlina, A. V. Teplukhin, A. Deriabina, and E. Gonzalez., Computational study of molecular mechanics of caffeine actions., Proceedings of the International Conference on Applied Computer Science Malta 51-55
- [17] V. Poltev, E. Rodriguez, A. Deriabina, E. Gonzalez, N. Polteva; Computational Study of Possible Complexes of Caffeine and Adenosine with Adenosine Receptor Fragments., *Computational and Theoretical Chemistry.*, 2014.
- [18] Müller CE, Scior T., Adenosine receptors and their modulators. *Pharm Acta Helv.*; 68(2):77-111, 1993.
- [19] Fredholm B. B., Ijzerman A. P., Jacobson K. A., Klotz K. N., Linden J. *Pharmacol Rev.*, 53 527, 2001.
- [20] V.-P. Jaakola, M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. T. Chien, J. R. Lane, A. P. Ijzerman, and R. C. Stevens. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A2A Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science*, vol. 322, no. 5905, pp. 1211-1217, Nov. 2008.
- [21] Yuli Liu, Steven K. Burger, Paul W. Ayers, Computational Study of the binding modes of caffeine to the Adenosine A2a receptor, *J. Phys Chem. B.* 115, 13880-13890, 2011.
- [22] G. Lebon, T. Warne, P.C. Edwards, K. Bennett, C.J. Langmead, A.G.W. Leslie, C.G. Tate, Agonist-bound adenosine A2a receptor structures reveal common features of GPCR activation, *Nature* 474, 521-525, 2011.
- [23] A.S. Doré, N. Robertson, J.C. Errey, I. Ng, K. Hollenstein, B. Tehan, E. Hurrell, K. Bennett, M. Congreve, F. Magnani, C.G. Tate, M. Weir, F.H. Marshall, Structure of the adenosine A2a receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine, *Structure* 19, 1283-1293, 2011.
- [24]] F. Xu, H. Wu, V. Katritch, G.W. Han, K.A. Jacobson, Z.-G. Gao, V. Cherezov, R.C. Stevens, Structure of an agonist-bound human A2a adenosine receptor, *Science* 332, 322-327, 2011.
- [25] J.Y. Lee, E. Lyman, Agonist Dynamics and Conformational Selection during Microsecond Simulations of the A2A Adenosine Receptor, *Bioph. J.* 102, 2114-2120, 2012.
- [26] D. Elmenhorst, P.T. Meyer, A. Matusch, O.H. Winz, A. Bauer, Caffeine occupancy of A1 adenosine receptors, *J. Nucl. Med.* 53 (2012) 1723-1729

- [27] D.L. Buscariollo, G.A. Breuer, C.C. Wendler, S.A. Rivkees, Caffeine acts via A1 adenosine receptors to disrupt embryonic cardiac function, *PLoS One*. 2011;6(12):e28296. doi: 10.1371/journal.pone.0028296. Epub 2011 Dec 2.
- [28] P. Smits, P. Boekema, R. Abreu, T. Thien, A. Van 't Laar, Evidence for an antagonism between caffeine and adenosine in the human cardiovascular system. *J. of Cardiovasc Pharmacol.*, Vol 10, 2, 1987
- [29] Fisone G.G., Borgkvist A., Usiello A.; Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action, *Cell. Mol. Life Sci.*, 61 857-872, 2004.
- [30] J.A. Ribeiro, A.M. Sebastiao. Caffeine and adenosine. *Journal of Alzheimer's and Disease* 20 S3-S15, 2010.
- [31] Nurminen M.L., Niittynen L., Korpela R., Vapaatalo H.; Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 53, 831-839, 1999.
- [32] Daly J. W., Fredholm B. B., *Nutrition, Brain and Behavior*; Nehlig, A., Ed. CRC Press: Boca Raton, FL, p. 1-11, 2004.
- [33] J. Linden, *FASEB J.*, vol. 5, no. 12, pp. 2668-2676, Sept. 1991,.
- [34] Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov.* 5(12):993-6, 2006 Dec.
- [35] Baker W., Theologus G. C., Effects of caffeine on visual monitoring. *Journal of Applied Psychology*, 56, 422-427, 1972
- [36] Bonati M., Latini R., Galletti F, Young J.F., Tognoni G and Garattini S., Caffeine disposition after oral doses. *Clin. Pharmacol Ther.*, 32:98-106, 1982
- [37] Mc Pherson PS, Kim YK, Valdivia H, Knudson CM, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Coronado R, Campbell KP, The brain ryanodine receptor: A Caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* 7:17-25, 1991
- [38] Smellie FW, Davis CW, Daly JW, Wells JN., Alkylxanthines: Inhibition of adenosine-elicited accumulation of cyclic AMP in brain slices and of brain phosphodiesterase activity. *Life Sci.* 24:2475-2482, 1979
- [39] Fredholm BB. Are methylxanthine effects due to antagonism of endogenous adenosine? *Trends Pharmacol Sci.* 1:129-132, 1980.
- [40] Boulenger, J.P., Patel, J. and Marangos, P.J., Effects of caffeine and theophylline on adenosine and benzodiazepine receptors in human brain, *Neurosci. Lett.*, 30, 161-166, 1982.
- [41] Marangos, P.J., Paul, S.M., Parma, A.M., Goodwin, F.K., Syapin, P. and Skolnick, P., Purinergic inhibition of diazepam binding to rat brain (in vitro), *life Sci.*, 24 163-210, 1964.

- [42] Sattin A., Rall T. W., The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'] phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. *Mol Pharmacol* 6, 13-23, 1970.
- [43] Daly J.W., Bruns, R. F., Snyder, S. H., Adenosine receptors in the central nervous system: relationship to the central action of methylxanthines, *Life Sci.*, 2083-2097, 1981.
- [44] Snyder, S.H. Katims, J.J. Annau, Z., Bruns, R.F. and Daly, J.W., Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 3260-3264, 1981.
- [45] Neims, A. H. and Von Borstel, R.W., Caffeine: metabolism and biochemical mechanism of action. In R.J.Wurtman and J. J. Wurtman (Eds.), *Nutrition and Brain*, Raven Press, New York. pp. 1-30, 1983.
- [46] Marley, E. and Nistico. G., Effects of catecholamines and adenosine derivatives given into the brain of fowls, *Br. J. Pharmacol.*, 46 619-636, 1972.
- [47] Phillis, J.W. and Wu, J.H., The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission, *Prog. Neurobiol.*, 16 187-239, 1983.
- [48] Okada, Y. and Kuroda, Y., Inhibitory action of adenosine analogs on neurotransmission in the olfactory cortex slice of guinea pig: structure-activity relationships, *Eur. J. Pharmacol.*, 61 137-146, 1980.
- [49] Smellie, F.W., Daly, J.W., Dunwiddie, T.V. and Hoffer, B.J., The dextro and levorotatory isomer of N6-phenyllisopropyladenosine: stereospecific effects on cyclic AMP formation and evoked synaptic responses in brain slice, *Life Sci.*, 25 1739-1745, 1979.
- [50] Fredholm, B.B. and Hedqvist, P., Modulation of neurotransmission by purine nucleotides, *Biochem. Pharmacol.*, 29 1635-1643, 1980.
- [51] Hirs, K.R., Forde, J., and Chou, D.T. Demonstration of caffeine tolerance in reticular formation neurons (Abstract), *Fed. Proc.*, 42 882, 1983.
- [52] Snyder, S.H., Adenosine as a mediator of the behavioral effects of xanthines. In P.B. Dews (Ed.), *Caffeine: Perspectives from Recent Research*, Springer, Berlin pp. 129-141, 1984.
- [53] Biaggioni. I., Saul, S., Puckett, A. and Arzubiaga, C., Caffeine and theophylline an adenosine receptors antagonists in humans, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258 588-593, 1991.
- [54] Londos, C., Cooper, D.M.F. and Wolff, J., Subclasses of external adenosine receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 2551-2554, 1980.
- [55] Morgan KJ, Stults VJ and Zabik ME. Amount and dietary sources of caffeine and saccharin intake by individuals ages 5 to 18 years. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1982

- [56] Van Calker, D., Muller, M. and Hamprecht, B., Adenosine regulates, via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured cells, *J. Neurochem.*, 33 999 1005, 1979.
- [57] Daly, J.W., Ukeda, D. and Jacobson, K.A., Analogues of adenosine, theophylline, and caffeine: selective interactions with A1 and A2 adenosine receptors. In E. Gerlach and B.F. Becker (Eds.), *Topics and Perspectives in Adenosine Research*, Springer, Berlin, pp. 23-36, 1987.
- [58] Donald Voet, Judith G., and Charlotte W. Pratt, *Fundamentos de Bioquímica. Segunda Edición* Ed. Panamericana 2007.
- [59] Saenger W. *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York Inc. 1984.
- [60] Bourne HR., How receptors talk to trimeric G proteins., 9(2):134-42, 1997.
- [61] Neves S. R., Ram P. T., Iyengar R., G protein pathways. *Science* 296, 1636 1639, 2002.
- [62] Goodman RR and Snyder SH. Autoradiographic localization of adenosine receptors in rat brain using [3H]cyclohexyladenosine. *J Neurosci.*, 2:1230-1241, 1982.
- [63] Fastbom J, Pazos A and Palacios JM. The distribution of adenosine A1 receptors and 59-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals. *Neuroscience*, 22:813-826, 1987.
- [64] Mahan LC, McVittie LD, Smyk-Randall EM, Nakata H, Monsma Jr FJ, Gerfen CR and Sibley DR. Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. *Mol Pharmacol.*, 40:1-7, 1991.
- [65] Reppert SM, Weaver DR, Stehle JH and Rivkees SA. Molecular cloning and characterization of a rat A1- adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. *Mol Endocrinol*, 5:1037-1048, 1991.
- [66] Johansson B, Ahlberg S, van der Ploeg I, Brene´ S, Lindfors N, Persson H and Fredholm BB. Effect of long term caffeine treatment on A1 and A2 adenosine receptor binding and on mRNA levels in rat brain. *Arch Pharmacol.*, 347:407-414, 1993a.
- [67] The state of GPCR research in 2004. *Nat Rev Drug Discov.*, 3, 575, 577-626, 2004.
- [68] Robert T. Dorsam, J. Silvio Gutkind, G-protein-coupled receptors and cancer, *Nature Reviews Cancer.*, 7, 79-94, February 2007.
- [69] Hypercube, Inc. 2002.
- [70] J. Wang, P. Cieplak, P.A. Kollman. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.*, 21, 1049 1074, 2000.
- [71] J. Wang, R.M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, *J. Comput. Chem.*, 25, 1157 1174, 2004.

- [72] N.L. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 8127, 1977.
- [73] N.L. Allinger, Y.H. Yuh, J.-H. Lii, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 8551 8566, 1989.
- [74] W.L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.*, 110 1657 1666, 1988.
- [75] S. Lifson, A.T. Hagler, P. Dauber, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 5111 5121, 1979.
- [76] M.J. Hwang, T.P. Stockfish, A.T. Halgler, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 2515 2525, 1994.
- [77] Olson, W. K., Flory, P. J., Spatial configuration of polynucleotide chains. II. Conformational energies and the average dimensions of polyribonucleotides. *Biopolymers*, 11, 25-66, 1972.
- [78] Hirschfelder, J. O., Curtiss, C. F., Bird, R. B., *Molecular Theory of Gases and Liquids*, Wiley, New York, Ch. 13, 1964.
- [79] Miller, K. J., *Biopolymers*, 8, 475-488, 1979.
- [80] Weiner, S. J., Kollman, P. A., Nguyen, D. T., Case, D. A., An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *J. Comp. Chem.*, 7, 230-252, 1986.
- [81] Nilsson, L., Kaplus, M., Empirical energy functions for energy minimization and dynamics of nucleic acids. *J. Comp. Chem.*, 7, 591-616, 1986.
- [82] Brant, D. A., Miller, W. G., Flory, P. J., Conformational energy estimates for statistically coiling polypeptide chains. *J. Mol. Biol.*, 23, 47-65, 1967.
- [83] Jakalian A, Bush L., Jack D. B., Bayly C. I., Fast, Efficient Generation of High Quality Atomic Charges. AM1 BCC Model: I. Method, *J. Comput. Chem.*, Vol. 21, No. 2, pp.132 146, 2000.
- [84] Jakalian A, Jack DB, Bayly CI., Fast, Efficient Generation of High Quality Atomic Charges. AM1 BCC model: II. Parameterization and validation. *J. Comput. Chem.*, 23(16):1623 41, 2002.
- [85] E. Gonzalez, A. Deriabina, A. Teplukhin, A. Hernández, V.I. Poltev, Monte Carlo Study of Three-Dimensional Organization of Water Molecules around DNA Fragments. *Theo.Chem.Acc.*, v.110, N6, 460 465, 2003.
- [86] Tanja van Mourik, Victor I Danilov, Valery I Poltev, Alexandra S Deryabina, Eduardo Gonzalez; " An electronic structure study of the hydration shell, of adenine and cytosine"; *Journal of Biomolecular Structure Dynamics*;24(6):653 654, 2007
- [87] Klooster W.T, Ruble J.R., Craven B.M., McMullan R.K.; Structure and thermal vibrations of adenosine from neutron diffraction data at 123 K, *Acta Cryst.*, B47, 376-383, 1991.
- [88] Kraut J., Jensen L.H.; Refinement of the crystal structure of adenosine-5'-phosphate, *Acta Cryst.*, 16, 79-88,1963.
- [89] Neidle S., Kuhlbrandt W., Achari A.; The crystal structure of an orthorhombic form of adenosine-5'-monophosphate, *Acta Cryst.*, B32, 1850-1855, 1976.