



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Físico Matemáticas

Estudio de los cambios conformacionales de fragmentos de
ADN en interacción con cafeína.

Tesis presentada al

Posgrado en ciencias (Física Aplicada)

Como requisito parcial para la obtención del grado de

Maestro en Ciencias (Física Aplicada)

Por

César Morgado Pérez

Asesorado por

Dr. Eduardo González Jiménez (FCFM, BUAP)

Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez (Depto. de Ciencias Químico-Biológicas,
UDLAP)

Puebla Pue.

Diciembre 2020

Título: Estudio de los cambios conformacionales de fragmentos de ADN en interacción con cafeína.

Alumno: César Morgado Pérez

COMITÉ

Dr. Valeri Poltev
Presidente

Dra. Patricia Mendoza Méndez
Secretario

MC. Ana María Cervantes Tavera
Vocal

Dr. Eduardo González Jiménez
Asesor

Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez
Asesor

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento va para los docentes y compañeros del área de Biofísica y Mecánica Estadística de la FCFM de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por sus enseñanzas y consejos en mi formación, en especial al Dr. Eduardo Gonzales que aun sin conocerme, me dio la confianza para trabajar con él.

Gracias al Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez, por compartir su conocimiento y apoyarme en las innumerables dudas que tuve durante el desarrollo del presente, que siempre tan amablemente me ayudo a resolver.

Un reconocimiento a mi familia por soportar mis caras y malos modos durante la realización de este proyecto, siempre creyendo en mí y apoyándome a seguir adelante.

Especialmente agradezco al Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México (LNS), perteneciente al padrón de laboratorios nacionales CONACYT, por los recursos computacionales, el apoyo y la asistencia técnica brindados, a través del proyecto No 202001011C.

Finalmente, y sobre todo agradezco a Paulina Cruz Carreon, mi compañera durante los buenos y sobre todo en los malos momentos, cada paso y cada logro es por el futuro que nos hemos planteado, sin ti nada de esto fuera posible. Te amo y espero algún día merecer todo lo que me has dado.

Contenido

Contenido.....	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.....	viii
Objetivos	1
Objetivo General.....	1
Objetivos Particulares.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	3
Capítulo 1. Marco Teórico	5
1.1 Ácidos nucleicos.....	5
1.1.1 Bases Nitrogenadas.....	6
1.1.2 Estructura primaria de los ácidos nucleicos.....	8
1.1.3 Estructura secundaria de los ácidos nucleicos.....	8
1.1.4 Estructuras alternativas de los ácidos nucleicos: hélices B y A	9
1.2 Parámetros geométricos para el estudio del DNA.....	10
1.2.1 Ángulos de torsión.....	10
1.2.2 Empaquetamiento del azúcar.....	11
1.3 Dodecámero de Drew-Dickerson.....	12
1.3.1 Conformación del Dodecamero de Drew Dickerson.....	12
1.3.2 Geometría de hidratación del dodecamero de Drew Dickerson.....	12
1.4 Efectos del entorno en la estructura y dinámica del DNA.....	13
1.4.1 El agua.....	14
1.4.2 Los iones.....	15
1.4.3 Interacción del DNA con ligandos	15

1.5 Cafeína	17
Capítulo 2. Metodología	19
2.2 Docking Molecular.	19
2.2.1 Algoritmos de búsqueda de mínimos	21
2.2.3 Docking con AutoDock 4.2.	24
2.3 Dinámica Molecular	25
2.3.1 Fundamentos.	26
2.4 Dinámica molecular en un medio acuoso	30
2.4.1 Métodos de cálculo con disolvente explícito	31
2.4.2 Tratamiento del Disolvente Explícito.	31
2.4.3 Metodología de la dinámica molecular.	33
2.5 Campos de Fuerza	34
2.5.1 Estiramiento del enlace	35
2.5.2 Flexión del ángulo.	35
2.5.3 Variación del ángulo de Torsión.....	36
2.5.4 Interacciones no enlazadas.....	37
2.5.5 Interacciones de Van der Waals	37
2.5.6 Tipos de Campos de Fuerza	41
2.6 Software AMBER.....	43
2.7 Metodología de trabajo para realización de los cálculos.....	44
2.7.1 Búsqueda de las estructuras iniciales para el cálculo de Dinámica Molecular.....	44
2.7.2 Uso de AutoDock para el Docking Molecular.	46
2.7.3 Caracterización de la cafeína utilizando el GAFF en antechamber.....	46
2.7.4 Minimización del complejo, previo a la dinámica molecular.	47

2.7.5 Equilibrio inicial y Dinamica Molecuar	47
2.7.6 Análisis de trayectoria y cálculo de RMSD.....	48
Capítulo 3. Resultados	49
3.1 Interacción de cafeína con el dodecamero de Dickerson utilizando Docking Molecular.	49
3.2 Hidratación de dodecamero de Dikerson utilizando el potencial de interacción GAFF de AMBER	51
3.3 Interacción de la cafeína con el dodecamero de Dikerson utilizando diferentes potenciales de interacción AMBER.....	54
3.3.2 Interacción de cafeína con el dodecamero de Dickerson en agua utilizando Dinámica Molecular.....	57
3.3.3 Formación de enlaces de hidrógeno en la interacción Cafeína-dodecamero.	58
3.3.4 Estructura del esqueleto azúcar fosfato de “cafeína-dodecamero” en agua.	64
Conclusiones.....	69
Apéndice A.....	70
Bibliografía	94

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura molecular de la ribosa y la desoxirribosa, se aprecia que en la ausencia del grupo hidroxilo en el carbono 2. (Beige: Carbonos, Rojo: Oxígenos, Blanco: Hidrogenos).....	5
Figura 2. Purinas unidas azucres ribosas para formar los nucleósidos del RNA, a la izquierda la Adenosina y a la derecha la Guanosina, la unión se forma entre los carbonos 1' del azúcar y el nitrógeno 9 de la base nitrogenada. (Beige: Carbonos, Rojo: Oxígenos, Blanco: Hidrógenos, Azul: Nitrogenos)	6
Figura 3. Pirimidinas unidas azucres ribosas y desoxirribosas para formar los nucleósidos del RNA y DNA, de izquierda a derecha Citosina (RNA), Timidina (DNA) y Uridina (RNA), la unión se forma entre los carbonos 1' del azúcar y el nitrógeno 1 de la base nitrogenada. (Beige: Carbonos, Rojo: Oxígenos, Blanco: Hidrógenos, Azul: Nitrogenos).....	6
Figura 4. Izquierda. Enlaces de hidrogeno típicos entre la Guanosina y la Citosina en el ADN. Derecha. Enlaces de hidrogeno típicos entre la Adenina y la Timina en el ADN.....	7
Figura 5. Vistas laterales y superiores que ilustran los rasgos característicos de las estructuras helicoidales regulares A (izquierda) y B (derecha) deducidas a partir de los modelos de difracción de rayos X de fibras representativas.....	9
Figura 6. Designación de los ángulos de torsión de una cada de DNA.....	10
Figura 7. Formas de empaquetamiento más comunes que puede tomar el anillo de azúcar	11
Figura 8. Estructuras de la cafeína (izquierda), Adenina (centro) y Guanina (derecha), se aprecia la similitud entre ellas donde se cambian los sustituyentes de los carbonos 1,3 y 9.	17
Figura 9. Pasos utilizados por el software AutoDock 4.2 para evaluar la unión ligando-receptor.	25
Figura 10. Ejemplo de condiciones de contorno periódicas.	29
Figura 11. Definición del ángulo diedro entre los semiplanos ABC y BCD (derecha), ángulo diedro ABD, el átomo C está detrás del ángulo B (izquierda).....	36
Figura 12. Potencial de Lennard Jones (Rojo).	38

Figura 13. Estructura del Dodecámero de Drew Dickerson utilizado para la simulación (PDB ID: 4C64).	45
Figura 14. Molécula de cafeína donde se observan las zonas de unión, dos oxígenos unidos a los carbonos 2 y 6, así como el nitrógeno 9, capaces de formar puentes de hidrogeno.	45
Figura 15. Zona de interacción entre el dodecamero y cafeína (cian), la cual involucra a las bases 9 y 10 de la secuencia, C y G respectivamente.	50
Figura 16. Interacciones entre la cafeína y el dodecamero, se observan las diferentes zonas de formación de enlaces de hidrogeno (violeta) de la cafeína (cian) con la cadena, a) Oxígeno del carbono 6, b) Nitrógeno 9, c) Oxígeno del carbono 2.	51
Figura 17. Espina de hidratación encontrada en el proceso de hidratación de las simulaciones realizadas, se aprecian la organización y regularidad que caracteriza a la espina del dodecamero hidratado. Las moléculas de agua están en color cian y en violeta se marcan los puentes de hidrógeno.	53
Figura 18. Distancias entre los oxígenos de diferentes moléculas de agua y el átomo N3 de las adeninas de los pares 7 y 8 (Izquierda) y entre la citosina del par 9 (derecha) en el dodecamero hidratado, las distancias se encuentran entre los 2.2 y los 3.5 Å.	54
Figura 19. Numeración de la cafeína leída por el GAFF, para su caracterización.	55
Figura 20. Posición adquirida por la cafeína (cian) dentro del surco menor en interacción con el dodecamero entre la posición A6 y T7 (el centro del dodecamero).	58
Figura 21. Ejemplo de la formación de un puente de hidrogeno formado entre la cafeína y una base del dodecamero, así como la formación de una unión del tipo CAF-H2O-DNA, de cian la cafeína y de violeta los enlaces de hidrogeno.	60
Figura 22. Ejemplo de la formación de dos puentes de hidrogeno (violeta) formados entre la cafeína (cian) y dos bases del dodecamero, se observa la deformación de la cadena causada por esta interacción.	61
Figura 23. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de	

Drew Dickerson por su surco mayor en rojo los enlaces entre el dodecamero y el átomo O2 de la cafeína, en verde los enlaces entre el dodecamero y el átomo O6 de la cafeína y en azul los enlaces entre el dodecamero y el átomo N9 de la cafeína.

.....	62
Figura 24. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco menor mayor en rojo los enlaces entre el dodecamero y el átomo O2 de la cafeína, en verde los enlaces entre el dodecamero y el átomo O6 de la cafeína y en azul los enlaces entre el dodecamero y el átomo N9 de la cafeína.	63
Figura 25. Formación de puentes de hidrogeno de la forma C-H...O, en el surco menor entre las dos bases del dinucleótido 7, TA.	64
Figura 26. Grafica de los valores de los ángulos de torsión de la base 9G, donde se aprecia los cambios en los valores de los ángulos cuando las bases esta en interacción con cafeína en el surco mayor.	66
Figura 27. Grafica de los valores de los ángulos de torsión de la base 9G, donde se aprecia los cambios en los valores de los ángulos cuando las bases está en interacción con cafeína en el surco menor.	68
Figura 28. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo O2 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco menor.	88
Figura 29. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo O6 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco menor.	89
Figura 30. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo N9 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco menor.	90
Figura 31. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo O2 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco mayor.	91

Figura 32. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo O6 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco mayor..... 92

Figura 33. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo O2 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco mayor..... 93

Índice de Tablas.

Tabla 1. Definición de ángulos de torsión en los nucleótidos.	11
Tabla 2. Ángulos de torsión de cadena principal y glucosídicos del dodecamero de Drew Dickerson obtenidos por cristalografía [18].	13
Tabla 3. Resultados del Docking Molecular entre el dodecamero de Drew Dickerson y la cafeína.	49
Tabla 4. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson, después de una simulación de .8 ns, a 5 K a volumen constante.	52
Tabla 5. Caracterización de los átomos en la molécula de cafeína dentro del campo de fuerzas GAFF.	56
Tabla 6. Puentes de hidrogeno formados en el complejo cafeína-DNA, en las diversas simulaciones de contacto doble.	59
Tabla 7. Puentes de hidrogeno formados en el complejo cafeína-DNA, en las diversas simulaciones de contacto simple.	59
Tabla 8. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con cafeína colocada entre las diversas bases en el surco mayor.	65
Tabla 9. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con cafeína colocada entre las diversas bases en el surco menor.	67
Tabla 10. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 2G y 3C en el surco menor.	70
Tabla 11. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 3C y 4G en el surco menor.	71
Tabla 12. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 4G y 5A en el surco menor.	72
Tabla 13. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 5A y 6A en el surco menor.	73
Tabla 14. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 6A y 7T en el surco menor.	74
Tabla 15. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 7T y 8T en el surco menor.	75

Tabla 16. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 8T y 9C en el surco menor.	76
Tabla 17. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 9C y 10G en el surco menor.	77
Tabla 18. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 10G y 11C en el surco menor.	78
Tabla 19. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 2G y 3C en el surco mayor.....	79
Tabla 20. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 3C y 4G en el surco mayor.....	80
Tabla 21. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 4G y 5A en el surco mayor.....	81
Tabla 22. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 5A y 6A en el surco mayor.	82
Tabla 23. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 6A y 7T en el surco mayor.	83
Tabla 24. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 7T y 8T en el surco mayor.....	84
Tabla 25. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 8T y 9C en el surco mayor.	85
Tabla 26. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 9C y 10G en el surco mayor.....	86
Tabla 27. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 10G y 11C en el surco mayor.....	87

Objetivos

Objetivo General

Obtener y analizar las características conformacionales entre dúplex de ADN y diversos ligandos como cafeína utilizando Mecánica Molecular y Dinámica Molecular que nos permitirán realizar una formulación de las conformaciones que adquiere el ADN por la presencia de diferentes ligandos.

Objetivos Particulares

- Seleccionar dúplex de ADN con geometría optimizada.
- Encontrar regiones favorables para el acoplamiento de diversos ligandos en los diversos dúplex seleccionados.
- Optimizar la geometría de los complejos obtenidos con Mecánica Molecular utilizando diferentes campos de fuerzas (AMBER, POLTEV) y realizar cálculos de Dinámica Molecular con AMBER.
- Obtener las características generales de la interacción de cafeína con dúplex de ADN.

Resumen

La cafeína siempre ha despertado un gran interés en la industria farmacéutica, desde la antigüedad se conocen muchos de sus efectos fisiológicos, actualmente ha vuelto ser una sustancia de interés debido a las pruebas que se han encontrado con respecto a su interacción con fármacos oncológicos y las cadenas de DNA.

Sin embargo, los efectos a nivel molecular de la cafeína sobre el DNA, sigue siendo poco comprendido; para intentar dilucidar la interacción de este complejo, se realizó un estudio de mecánica molecular con el campo de fuerzas BSC1 y una cafeína previamente caracterizada con el Barcelona Supercomputing Center 1 Force Field (BSC1), y una cafeína previamente caracterizada con el General AMBER Force Field (GAFF).

En primer lugar, se utilizó el Docking Molecular, para encontrar los puntos de partida de las simulaciones, para seguir con una dinámica molecular a 5K, con un ensamble NVT durante 0.8 ns, los resultados se evaluaron a partir de los ángulos de torsión de la DNA.

Se encontró que la cafeína tiene predilección a formar puentes de hidrogeno con el dinucleótido C-G, especialmente por su surco mayor, los cambios generador por la interacción Cafeína-Guanina, se observan los ángulos de torsión de la citocina complemento, con un aumento de 9.8° en el ángulo α , una disminución de 18.7° en el ángulo β , un aumento de 12.2° en el ángulo γ , una disminución de 26.5° en el ángulo δ , un aumento de 29.7° en el ángulo ε , una leve disminución de 2.9° en el ángulo ζ y una disminución de 30° en el ángulo χ .

Introducción.

La cafeína es un compuesto que pertenece al grupo de las xantinas, las cuales son purinas, y se encuentra naturalmente en muchos productos vegetales de consumo cotidiano tales como el café, el té y el cacao [1], así como en bebidas energéticas y gaseosas [2]. La cafeína tiene una gran variedad de efectos fisiológicos tales como aumento de la presión arterial [3], efectos psicotrópicos [4] llegando a causar síndrome de abstinencia al suspender el consumo [5]; estas características le ha concedido un lugar especial en las investigaciones farmacéuticas con lo cual se ha llegado a nuevos descubrimientos de las propiedades de esta familia de moléculas.

Por su estructura la cafeína es capaz de interactuar con los ácidos nucleicos causando la supresión de la proliferación celular que puede vincularse con una disminución de la carcinogénesis *in vivo* [6], sin embargo también se ha observado la atenuación de diversos agentes antitumorales en presencia de cafeína [7], los efectos directos sobre el ADN que se han observado es la inhibición de los puntos de control activados por el daño [8] y una transducción reducida del HIV-1 en células humanas [9].

Sin embargo, debido a la propia naturaleza de los dúplex de DNA y RNA, el estudio de las interacciones intermoleculares de éstos y cualquier ligando conlleva una gran dificultad técnica y es necesario el uso de técnicas de cristalografía cuya uso en sí mismo pueden alterar los resultados experimentales [10]. En el campo de la química computacional se han realizado varios estudios con diversos ligandos dirigidos al ADN [11, 12] y a pesar de que se tiene evidencia experimental de que la cafeína y sus derivados se pueden intercalar en el ADN [13], se han realizado pocos estudios de simulación computacional de los complejos cafeína-ADN[14, 15] .

En el presente se obtuvieron y analizaron las características conformacionales entre el dúplex de ADN y la cafeína utilizando Mecánica y Dinámica Molecular que nos permitirán realizar una formulación de las conformaciones que adquiere el ADN por la presencia de diferentes ligandos.

Se realizaron simulaciones tanto de Docking como de dinámica molecular, para el docking molecular se utiliza el software Autodock Vina, y para la dinámica se utiliza AMBER. Los resultados obtenidos por éstos se analizaron manualmente con el programa de visualización molecular VMD.

Fue necesario realizar una caracterización viable de la cafeína para utilizar con Amber, y el campo de fuerzas donde se realizó dicha caracterización fue el General Amber Force Field, el cual es compatible con el campo BSC1 utilizado para simulación.

Se realizó un recuento de los enlaces de hidrógenos que se formaron directamente entre la cafeína y las bases nitrogenadas del dodecamero, donde se hizo notable que existían zonas donde a la cafeína se le facilita la formación de complejos, y otras donde le era prácticamente imposible este tipo de interacciones, Sin embargo la cafeína forma complejos del tipo Cafeína-Agua-ADN lo cual permitía que la cafeína encontrara un punto de mínima energía y era capaz de ejercer un efecto deformante en la doble hélice.

Se obtuvieron los ángulos de torsión en presencia de la cafeína y se compararon con los que existen en el dodecamero de Drew Dickerson hidratado, donde se hizo evidente que la cafeína induce un tipo de deformación en la doble hélice, así mismo se evalúa el empaquetamiento en los azúcares que se encontraban próximos a la molécula de cafeína en las diversas posiciones evaluadas.

Capítulo 1. Marco Teórico

1.1 Ácidos nucleicos.

En cierto modo los ácidos nucleicos son el componente más fundamental de la vida, actúan como depositarios y transmisores de la información genética de cada célula, tejido y organismo, pero su más importante cualidad es la de autorreplicación, la cual puede verse afectada por una gran cantidad de fenómenos físicos y químicos, que podrían causar mutaciones que en la mayoría de los casos marcarían el inicio de un sin número de enfermedades en los seres vivos.

Existen dos tipos de ácidos nucleicos, el ácido ribonucleico (RNA) y el ácido desoxirribonucleico (DNA), en cada caso existe una unidad monomérica de estos ácidos. Contiene un azúcar pentosa, las cuales son la ribosa en el RNA y la 2'-desoxiribosa en el DNA la cual se muestra en la Figura 1.

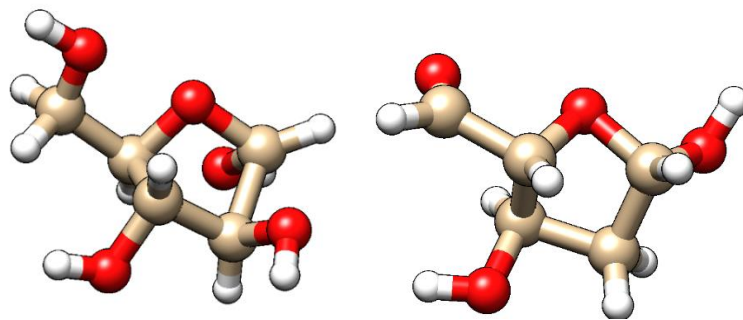


Figura 1. Estructura molecular de la ribosa y la desoxirribosa, se aprecia que en la ausencia del grupo hidroxilo en el carbono 2. (Beige: Carbonos, Rojo: Oxígenos, Blanco: Hidrogenos)

La numeración de los átomos de carbono de los azúcares se designa con números primados (1', 2', etc.) y la diferencia fundamental entre ambas moléculas radica en el grupo hidroxilo 2' de la ribosa en el RNA el cual se encuentra sustituido por un átomo de hidrogeno en el DNA.

En las cadenas de ácidos nucleicos, las conexiones entre estos se forman mediante un residuo fosfato unido al grupo hidroxilo del carbono 5' de una unidad y al hidroxilo 3' de la siguiente, lo cual forma un enlace fosfodiéster entre los dos residuos de azúcar y de esta manera se construyen cadenas largas de ácidos nucleicos, que muchas veces contienen centenares de millones de unidades.

Los residuos de azúcar descritos unidos mediante los enlaces fosfodiéster construyen el armazón de la molécula de ácido nucleico, el cual es un polímero repetitivo sin la capacidad de codificar información; la capacidad de almacenamiento y transmisión de la información deriva del hecho de que la molécula completa es un heteropolímero, cada monómero contiene una base heterocíclica, la cual se une al carbono 1' de los azúcares.

1.1.1 Bases Nitrogenadas

Existen dos tipos de bases heterocíclicas, que se denominan purinas y pirimidinas. El DNA tiene dos purinas, adenina (A) y guanina (G), Figura 2, y dos pirimidinas, citosina (C) y timina (T). El RNA posee las mismas bases, excepto que la timina está sustituida por uracilo (U), Figura 3, estas bases heterocíclicas se unen a los azúcares ribosa y desoxirribosa en los carbonos 1' con el nitrógeno 9 de las purinas y el nitrógeno 1 de las pirimidinas, este enlace se denomina enlace glucosídico y estos monómeros se denominan nucleótidos.

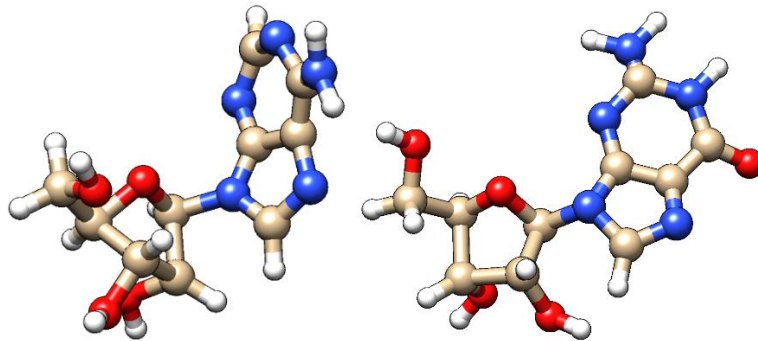


Figura 2. Purinas unidas azúcares ribosas para formar los nucleótidos del RNA, a la izquierda la Adenosina y a la derecha la Guanosina, la unión se forma entre los carbonos 1' del azúcar y el nitrógeno 9 de la base nitrogenada. (Beige: Carbonos, Rojo: Oxígenos, Blanco: Hidrógenos, Azul: Nitrogenos)

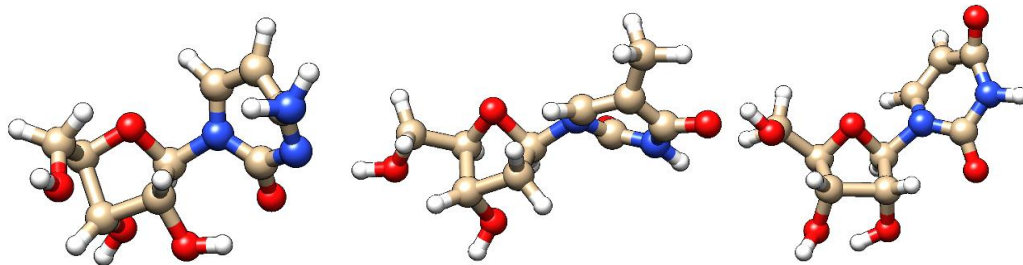


Figura 3. Pirimidinas unidas azúcares ribosas y desoxirribosas para formar los nucleótidos del RNA y DNA, de izquierda a derecha Citosina (RNA), Timidina (DNA) y Uridina (RNA), la unión se forma entre los carbonos 1' del azúcar y el nitrógeno 1 de la base nitrogenada. (Beige: Carbonos, Rojo: Oxígenos, Blanco: Hidrógenos, Azul: Nitrogenos)

La nomenclatura para la Timina es 2, 4-dioxo, 5-metilpirimidina. Es un derivado pirimidínico con un grupo oxo en las posiciones 2 y 4, y un grupo metilo en la posición 5. En el DNA, la timina siempre forma se enlaza con la adenina de la cadena complementaria mediante 2 puentes de hidrógeno, $T = A$.

La Citosina tiene nomenclatura de 2-oxo, 4-aminopirimidina, y se representa en el código genético con la letra C. Es un derivado pirimidínico, con un grupo amino en posición 4 y un grupo oxo en posición 2. La citosina siempre se empareja en el DNA con la guanina de la cadena complementaria mediante tres enlaces de hidrogeno $C \equiv G$.

Para la Adenina su nomenclatura es 6-aminopurina, y en el código genético se con la letra A. Es un derivado de la purina con un grupo amino en la posición 6. En el DNA siempre se empareja con la timina de la cadena complementaria mediante 2 puentes de hidrógeno, $A = T$.

Y finalmente la nomenclatura de la Guanina es 6-oxo, 2-aminopurina. Es un derivado púrico con un grupo oxo en la posición 6 y un grupo amino en la posición 2. La guanina siempre se empareja en el DNA con la citosina de la cadena complementaria mediante tres enlaces de hidrogeno $C \equiv G$.

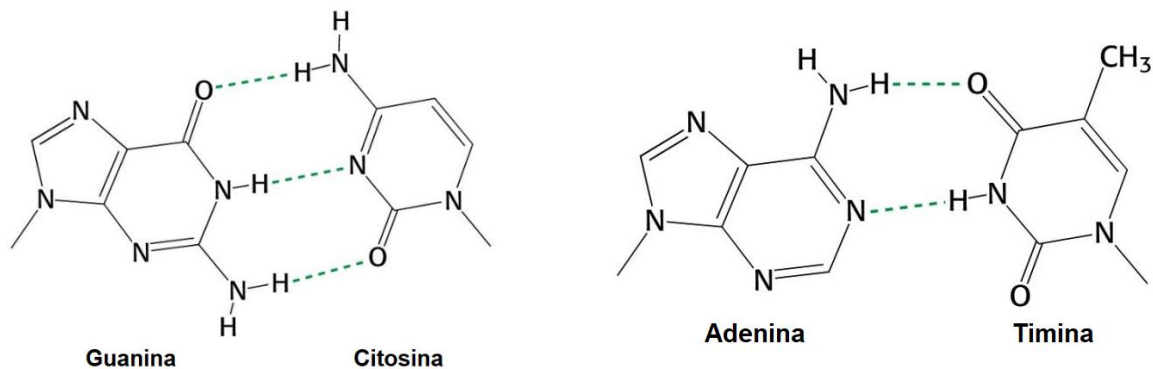


Figura 4. Izquierda. Enlaces de hidrogeno típicos entre la Guanosina y la Citosina en el ADN. Derecha. Enlaces de hidrogeno típicos entre la Adenina y la Timina en el ADN.

1.1.2 Estructura primaria de los ácidos nucleicos.

Debido a que los ácidos nucleicos pueden considerarse polímeros de nucleótidos, se les puede llamar polinucleótidos, cuyas principales características son:

- La cadena polinucleotídica posee una direccionalidad, el enlace fosfodiéster entre los monómeros se produce entre el carbono 3' de un monómero y el carbono 5' del siguiente, por lo que los dos extremos de una cadena polinucleotídica lineal son diferenciables, un extremo lleva normalmente un fosfato 5' sin reaccionar, y el otro extremo un grupo hidroxilo 3' sin reaccionar.
- Una cadena polinucleotídica posee individualidad, determinada por la secuencia de sus bases, es decir, la secuencia de nucleótidos. Esta secuencia se denomina estructura primaria de ese ácido nucleico concreto.

La importancia principal de la estructura primaria es que la información genética se almacena en la estructura primaria del DNA. Un gen no es más que una secuencia concreta de DNA, que codifica la información mediante un lenguaje de cuatro letras, en el que cada "letra" es una de las bases.

1.1.3 Estructura secundaria de los ácidos nucleicos.

En el año 1953 James Watson y Francis Crick, observaron unos patrones de difracción de rayos X de DNA fotografiados por Rosalind Franklin, una investigadora del laboratorio de Maurice Wilkins en el King's College de Londres. En ellas se observaba claramente que el DNA de las fibras debía tener algún tipo de estructura tridimensional repetitiva regular [16].

Las observaciones más importantes de Watson y Crick fueron que, como el espaciamiento de la línea de capa era de una décima parte de la repetición del patrón, debía haber 10 residuos por vuelta. Los datos relativos a la densidad de la fibra sugirieron que debía haber dos cadenas de DNA en cada molécula helicoidal. Se dieron cuenta de que una hélice de doble cadena podía estabilizarse mediante enlaces de hidrógeno entre las bases de las cadenas opuestas si las bases se apareaban de una manera concreta: los pares A-T y G-C que se muestran en la Figura 4. Con este apareamiento, se forman enlaces de hidrógeno fuertes entre las

bases. Además, las distancias entre los carbonos 1' de las porciones de desoxirribosa de A-T y G-C son las mismas.

El modelo de Watson y Crick no sólo explicaba la estructura del DNA y la regla de Chargaff, nombrada así por su descubridor bioquímico Erwin Chargaff, que había determinado las cantidades relativas de A, T, G y C en los DNA de muchos organismos, había observado el hecho de que A y T estaban presentes casi siempre en cantidades aproximadamente iguales, y que lo mismo sucedía con G y C. Dado que A se aparea siempre con T, y G se aparea siempre con C, las dos cadenas son complementarias[17].

1.1.4 Estructuras alternativas de los ácidos nucleicos: hélices B y A

En el momento en el que Watson y Crick propusieron su modelo, se habían obtenido ya para el DNA dos patrones de difracción de rayos X bastante distintos, lo que indicaba que la molécula existe en más de una forma. La forma B, que se observa en las fibras de DNA preparadas en condiciones de humedad elevada y la forma A, fibras de DNA preparadas en condiciones de humedad baja con una estructura diferente, Como se presenta en la Figura 5, las formas A y B son muy distintas, aunque ambas son hélices a derechas. En la hélice B, las bases están próximas al eje de la hélice, que pasa entre los enlaces de hidrógeno. En la hélice A, las bases están situadas más externamente y están muy inclinadas con respecto al eje de la hélice.

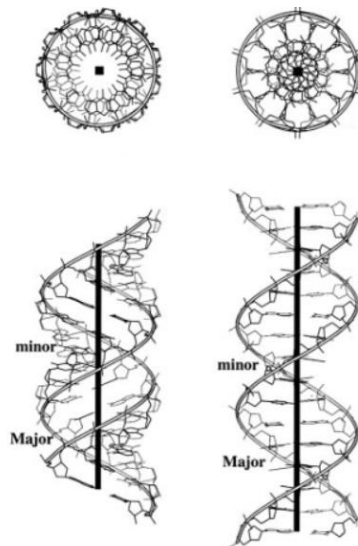


Figura 5. Vistas laterales y superiores que ilustran los rasgos característicos de las estructuras helicoidales regulares A (izquierda) y B (derecha) deducidas a partir de los modelos de difracción de rayos X de fibras representativas.

1.2 Parámetros geométricos para el estudio del DNA

Para el estudio del DNA es necesario contar con parámetros precisos que permitan evaluar la forma de la doble hélice, en el presente se utilizan los ángulos de torsión y el empaquetamiento del azúcar.

1.2.1 Ángulos de torsión.

Para los ácidos nucleicos existen seis ángulos principales de torsión de la cadena azúcar-fosfato, los ángulos de torsión dentro del azúcar son denotados por ν_0, \dots, ν_4 ; Figura 6 y Tabla 1. Uno de estos ángulos de torsión, δ , es particularmente informativo debido a que influye en el empaquetamiento del azúcar o conformación del anillo de desoxirribosa un parámetro que ha jugado un papel importante en estudios anteriores de la estructura del DNA.

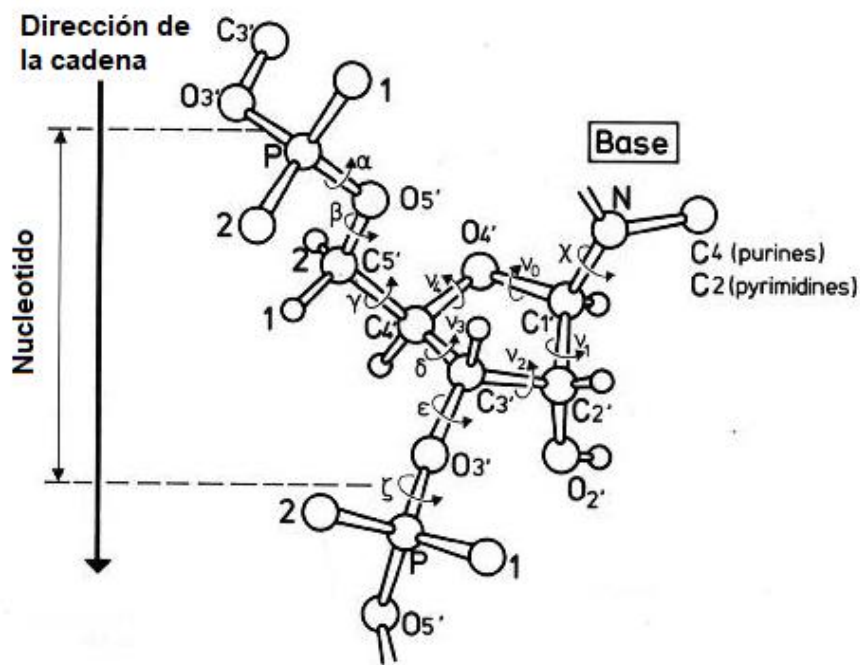


Figura 6. Designación de los ángulos de torsión de una cada de DNA.

El otro ángulo de torsión importante o relevante es el ángulo glucosídico χ , entre el átomo C1' del anillo de azúcar y el nitrógeno de su base adjunta. Cuando el anillo se gira de manera que *syn*, χ tiene un $+70^\circ$. En contraste, en la conformación *anti*, menos restrictiva, el anillo de azúcar se dobla fuera del surco menor, χ entonces es libre de adoptar una amplia gama de valores, desde -80° hasta -180° .

Tabla 1. Definición de ángulos de torsión en los 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	$C3' - C4' - O4' - C1'$

1.2.2 Empaquetamiento del azúcar.

Los anillos de azúcar del DNA pueden adoptar empaquetamientos en los cuales 1 o 2 átomos están fuera del plano formado por el resto. El anillo de azúcar se puede encontrar en la forma E (por su nombre en inglés envelope), donde cuatro carbonos se encuentran en el plano y el oxígeno se encuentra fuera del Plano. O bien se puede encontrar en la forma T (por su nombre en inglés Twist), en el cual dos átomos del anillo (C2' y C3') se encuentran fuera del plano (arriba del plano, exo y abajo endo). Tal como se observa en la Figura 7.

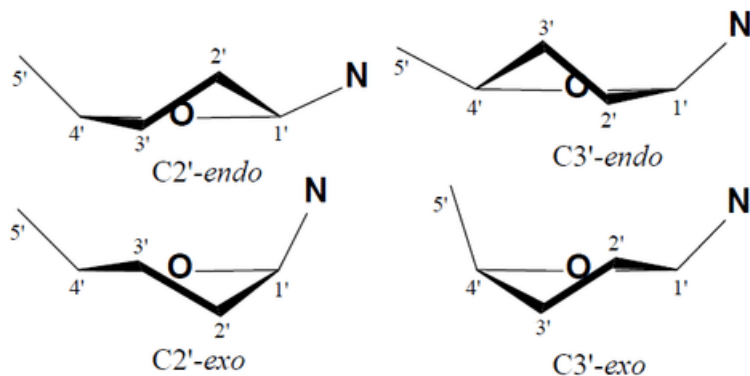


Figura 7. Formas de empaquetamiento más comunes que puede tomar el anillo de azúcar

1.3 Dodecámero de Drew-Dickerson

Todos los estudios de difracción de fibras de DNA tienen una importante limitación. Al analizar los patrones de las fibras, los investigadores no determinan directamente los detalles de la estructura secundaria del ácido nucleico. Este enfoque es necesario porque las fibras no son nunca cristales perfectos y siempre existe una cierta ambigüedad en la interpretación de sus patrones de difracción. Por tanto, se produjo un importante avance cuando R. E. Dickerson y sus colaboradores, en 1981, lograron cristalizar un pequeño fragmento de DNA de doble cadena, que tenía la secuencia:



con una hélice B, en cantidades suficientes y pureza suficiente para un análisis de cristalografía por rayos X [18], la cristalografía de este fragmento DNA nos ha proporcionado una información muy detallada de la estructura secundaria de los polinucleótidos, la estructura obtenida es una doble hélice orientada a la derecha de tipo B con un promedio de 10.1 bases por giro de la hélice

1.3.1 Conformación del Dodecamero de Drew Dickerson

Los ángulos de torsión glucosídicos de la cadena principal para el dodecamero refinado, así como el empaquetamiento del azúcar, se enumeran en la Tabla 2. Los ángulos de torsión de la cadena principal, del α hasta ζ , están cerca de los valores esperados para una hélice B ideal, con la mayor variación en el ángulo de torsión $C5' - C4' - C3' - O3'$ (δ).

1.3.2 Geometría de hidratación del dodecamero de Drew Dickerson.

La hidratación de cualquier hebra de DNA trae consigo cambios estructurales los cuales se ven reflejados en sus ángulos de torsión y el empaquetamiento de los azúcares, existe una característica muy importante en la hidratación del DNA, la espina de hidratación, y es un parámetro de verificación sobre la correcta simulación de cualquier cadena en un ambiente acuoso, especialmente en agua.

Tabla 2. Ángulos de torsión de cadena principal y glucosídicos del dodecamero de Drew Dickerson obtenidos por cristalografía [18].

Residuo	Ángulos (°)							
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ	
1 C	---	---	174*	157	-141	-144	-105	C2'-endo
2 G	-66	170	40	128	-186	-98	-111	C1'-exo
3 C	-63	172	59	98	-177	-88	-135	O1'-endo
4 G	-63	180	57	156	-155	-153	-93	C2'-endo
5 A	-43	143	52	120	-180	-92	-126	C1'-exo
6 A	-73	180	66	121	-186	-89	-122	C1'-exo
7 T	-57	181	52	99	-186	-86	-127	O1'-endo
8 T	-59	173	64	109	-189	-89	-126	C1'-exo
9 C	-58	180	60	129	-157	-94	-120	O1'-endo
10 G	-67	169	47	143	-103	-210	-90	C2'-endo
11 C	-74	139	56	136	-162	-90	-125	C2'-endo
12 G	-82	176	57	111	---	---	-112	C1'-exo
13 G	-65	171	47	79	---	---	-135	C3'-endo
14 C	-72	139	45	113	-174	-97	-125	C1'-exo
15 G	-67	179	50	150	-100	-188	-88	C2'-endo
16 C	-59	185	45	110	-177	-86	-114	C1'-exo
17 T	-59	179	55	122	-181	-94	-120	C1'-exo
18 T	-58	174	60	109	-181	-88	-131	C1'-exo
19 A	-57	186	48	130	-186	-101	-108	C2'-endo
20 A	-57	190	54	147	-183	-97	-106	C2'-endo
21 G	-69	171	73	136	-186	-98	-115	C2'-endo
22 C	-63	169	60	86	-185	-86	-134	O1'-endo
23 G	-51	164	49	122	-182	-93	-116	C1'-exo
24 C	---	---	56	137	-159	-125	-128	C2'-endo
Media	-63	171	54*	123	-169	-108	-117	
$\pm DS$	8	14	8	21	25	35	14	

*Omitiendo el Valor de C1.

1.4 Efectos del entorno en la estructura y dinámica del DNA.

Numerosos estudios han mostrado que el DNA es una molécula muy flexible, capaz de sufrir tanto cambios conformacionales pequeños a nivel de par de bases como cambios macroscópicos en sus fibras. De entre sus movimientos de corta escala destaca la apertura de las bases hacia el exterior durante un breve periodo de tiempo. En ciertos casos esta apertura es espontánea, mientras que en otras ocasiones es debida a tensión en las fibras causado por el superenrollamiento de

estas. En todo caso, tradicionalmente se ha supuesto que las propiedades conformacionales del DNA dependientes de secuencia vienen determinadas a nivel del par de bases.

1.4.1 El agua.

El agua, junto con los iones, es uno de los grandes contribuyentes al mantenimiento de la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, ya que gracias a ella se apantallan las repulsiones de la carga entre los fosfatos, que de otra manera destrozarían la estructura de la macromolécula.

La solvatación juega un papel muy importante en los cambios conformacionales, como se demuestra en las transiciones desde la forma B (de alta hidratación) a la A (de baja hidratación). La hidratación alrededor de las dobles hélices de DNA no es homogénea, sino que se diferencian dos capas de hidratación. En la primera capa de hidratación existen entre once y veinte moléculas de agua por nucleótido. Estas moléculas se agrupan en tres formas, en función de su afinidad decreciente por el fosfato, en los enlaces fosfodiéster más el azúcar y en las bases. Dependiendo de la concentración de agua, se observa que la proporción de moléculas de agua unidas a las diferentes regiones del DNA varía. La segunda capa de hidratación es menos estructurada y en muchas ocasiones indistinguible del resto del medio acuoso por lo que respecta a permeabilidad de iones y movilidad del agua, pero es clave para estabilizar la estructura.

El plegamiento de los ácidos nucleicos en estructuras ordenadas diferentes conlleva que algunos átomos queden más expuestos al solvente que otros, lo cual se puede monitorizar mediante el cálculo de la superficie accesible al solvente (SAS). Así, mientras que la SAS de las formas A y B son prácticamente equivalentes cuando se usa el radio de una molécula de agua (1.4 Å), al incrementar el valor del radio (típico de iones hidratados o cadenas laterales de aminoácidos) se observa que los fosfatos de la forma B están más expuestos que los de la A, al contrario de lo que sucede con los carbonos.

1.4.2 Los iones

El DNA es un polielectrolito en condiciones fisiológicas y por ello normalmente está rodeado de iones que neutralizan parcialmente sus cargas. Estos cationes suelen ser inorgánicos e hidratados, pero también es posible encontrar cadenas laterales de aminoácidos o poliaminas.

Los iones inorgánicos presentes en el interior celular en concentraciones micromolares son Mg^{++} , Ca^{++} , Na^+ y K^+ y por ello se hallan normalmente unidos al DNA. En general, van a tener propiedades estabilizadoras globales, aunque pueden producir el efecto contrario si sus concentraciones son muy elevadas. Los iones son capaces de discriminar la estructura tridimensional del DNA a través del potencial electrostático molecular y del entorno de puentes de hidrógeno. Atraídos por la carga del fosfato, los cationes están normalmente ligados a sus oxígenos, aunque también pueden asociarse con los átomos de las bases.

Estudios sobre diferentes estructuras cristalográficas del dodecamero de Dickerson han puesto de manifiesto que el surco menor del fragmento central AATT es ligeramente más estrecho que el resto, asociándose este fenómeno local a la rigidez conformacional y curvatura del DNA. Para explicar este suceso existen dos teorías, la primera de ellas propone que la información que define la estructura está implícita en la secuencia, mientras que la segunda propone que son las interacciones con el solvente las responsables de la menor amplitud del surco.

1.4.3 Interacción del DNA con ligandos

Durante las dos décadas pasadas las técnicas de biología estructural han generado información precisa sobre cómo diferentes moléculas son capaces de unirse específicamente a los ácidos nucleicos. En el caso de las proteínas, los primeros estudios sobre represores de fagos mostraban un motivo de unión relativamente simple, donde dímeros de proteína posicionaban sus hélices alfa de manera que éstas encajasen entre dos surcos anchos consecutivos de la doble hebra. Esta unión apenas generaba modificación de las estructuras originales del complejo. A medida que se han obtenido más estructuras de complejos DNA-proteína, se ha visto que los modos de reconocimiento son muchos y diferentes. Por ejemplo,

algunas proteínas distorsionan el ácido nucleico para su correcto reconocimiento, a partir de uno o los dos surcos. Otras sufren un proceso de estructuración después de la unión al DNA y algunas son incluso capaces de combinar partes rígidas con colas flexibles que tienen la capacidad de entrelazarse al DNA.

Por lo que respecta a ligandos químicos de pequeño tamaño, también existen modelos de reconocimiento a través de ambos surcos, la mayoría de ellos reversible. En el caso de que exista especificidad de secuencia, suele haber preferencia por el surco estrecho con respecto al ancho. Como sucede con las proteínas, en algunos casos el ligando se une de manera rígida sin modificar la geometría del DNA mientras que en otras es capaz de distorsionarlo, pero normalmente no de la misma manera que las proteínas.

Existen dos tipos principales de modos fundamentales por los que los ligandos químicos pueden unirse de manera no covalente al DNA: la intercalación y la unión al surco menor.

Los intercaladores poseen en su estructura química, diversos anillos aromáticos que les brindan la posibilidad de introducirse entre dos bases adyacentes de la hélice de DNA. La unión se realiza principalmente por interacciones asociativas de apilamiento que pueden complementarse con interacciones de largo alcance del surco estrecho. En el transcurso de esta unión, los intercaladores suelen generar fuertes perturbaciones en el esqueleto del ácido nucleico debido al movimiento que se genera en las bases para permitir su intercalación. Los intercaladores suelen tener preferencia por zonas citosina-guanina (o guanina-citosina) frente a zonas adenina-timina. Tienen además preferencia en general por secuencias $d(5'CG3')$ frente a secuencias $d(5'GC3')$, aunque las razones fisicoquímicas que se esconden detrás de estas preferencias no están claras. En cualquier caso, y aun cuando la preferencia es por CG (o GC) se pueden dar intercalaciones en cualquier otra secuencia, especialmente si el intercalador cuenta con un brazo que se dispone a lo largo del surco menor.

Los ligandos de unión al surco menor poseerán características químicas únicas que les permitirán aprovechar las características que les brinda este surco del DNA

Estos compuestos poseen anillos aromáticos capaces de adaptarse a la curvatura del surco estrecho, cargas positivas en los extremos que les procuran afinidad hacia el túnel electronegativo en el interior del surco y además muchos de ellos poseen donadores o aceptores de puente de hidrógeno complementarios a los que las bases del DNA se disponen por su surco estrecho. Su unión al DNA apenas causa distorsión en el esqueleto fosfodiéster, aunque en ocasiones son capaces de estabilizar la estructura de la forma B del DNA a través de su rigidificación.

La mayoría de los ligandos de unión al surco menor se acoplan de manera selectiva a las secuencias ricas en AT, donde la amplitud del surco suele ser menor, lo que favorece la inserción de los anillos aromáticos tanto por interacciones de van der Waals como electrostáticas. La interacción se estabiliza con la formación de puentes de hidrógeno con grupos aceptores, como el átomo O2 de la Timina y N3 de la Adenina, por la interacción con alguna molécula de agua y por el término entrópico ligado a la desestructuración de la espina de hidratación

1.5 Cafeína

La cafeína, una sustancia presente en una gran cantidad de alimentos, desde té, café, chocolate o soda, es consumida prácticamente por todos los seres humanos, desde muy jóvenes hasta edad avanzada, lo que la ha hecho el objetivo de un sin número de estudios de los efectos fisiológicos, por su estructura, que es muy parecida a la de la purinas Figura 8.

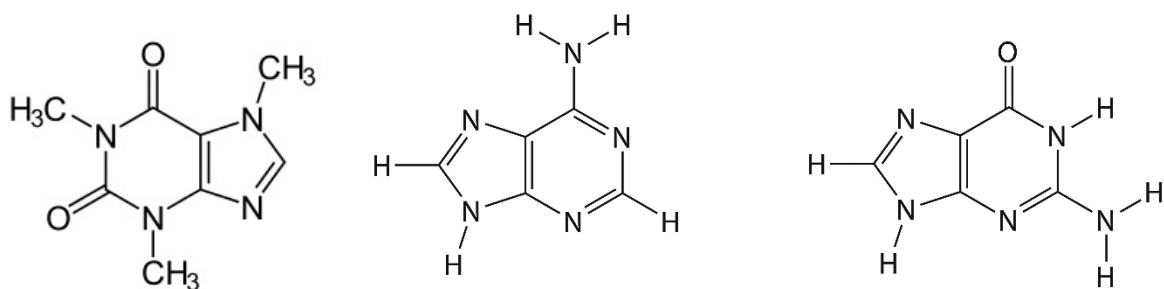


Figura 8. Estructuras de la cafeína (izquierda), Adenina (centro) y Guanina (derecha), se aprecia la similitud entre ellas donde se cambian los sustituyentes de los carbonos 1,3 y 9.

La similitud con las purinas, ha llevado a los investigadores a cuestionarse que efecto tiene la cafeína sobre el DNA y se ha encontrado que causa la supresión de

la proliferación celular que puede vincularse con una disminución de la carcinogénesis *in vivo* [6], que interfiere con los efectos de diversos agentes antitumorales [7], los efectos directos sobre el DNA que se han observado es la inhibición de los puntos de control activados por el daño [8] y una transducción reducida del HIV-1 en células humanas [9].

La fórmula de la cafeína es $C_8H_{10}N_4O_2$, su nombre sistemático es 1, 3, 7-trimetilxantina o bien 3, 7-dihidro-1, 3, 7-trimetil-1H-purina-2, 6-diona, se representa como un anillo que tiene tres centros protón-aceptores (átomos O2, O6 y N9), tres grupos metilos y ningún grupo protón-donador, por lo que la cafeína esta imposibilitada de formar complejos que contengan dos enlaces de hidrogeno con otra molécula de cafeína o alguna de las bases nitrogenadas.

Capítulo 2. Metodología

2.2 Docking Molecular.

El reconocimiento molecular juega un papel clave en los eventos biomoleculares tales como: interacciones enzima-substrato, proteína-inhibidor y ácido nucleico-inhibido [19], los procesos biológicos dependen de las interacciones de los receptores moleculares y sus ligandos.

En química computacional el docking molecular es un procedimiento utilizado para explorar e intentar predecir los posibles modos de formación de complejos ligando-receptor [20], siendo generalmente el receptor una proteína u oligómero y el ligando una molécula de pequeño tamaño u otra proteína.

El proceso por el cual una pequeña molécula se une a su proteína receptora no es sencillo, ya que está influenciado por diversos factores entrópicos y entálpicos. Así como la movilidad, tanto del ligando como del receptor, el efecto de la proteína sobre la distribución de cargas del ligando y sus interacciones con las moléculas de agua complican la descripción cuantitativa del proceso. La idea básica es generar un conjunto suficiente de conformaciones del complejo y entonces clasificarlas de acuerdo con su estabilidad.

El procedimiento general (iterativo) es: generar una postura (cada postura es una determinada posición y orientación del ligando en el sitio activo), puntuarla y compararla con las demás posturas; entonces la actual postura es aceptada o rechazada según la puntuación que obtenga. Un algoritmo de búsqueda riguroso debería elucidar exhaustivamente todos los modos posibles de unión entre el ligando y el receptor, pero por el tiempo de cómputo que un análisis exhaustivo requeriría, sólo se puede explorar una pequeña parte del espacio conformacional, por lo que se tiene que buscar un balance entre el costo computacional y el espacio de búsqueda examinado; en la práctica esto se traduce en aplicar una serie de restricciones y aproximaciones, a fin de reducir la dimensión del problema [21].

Inicialmente, los programas de docking representaban, tanto al receptor como al ligando, con sus átomos en forma explícita. Posteriormente, con la utilización de

cálculos de superficie molecular se consiguió aumentar la velocidad de los algoritmos de docking, si bien estos se utilizan preferentemente en el docking de proteína a proteína. Pero el mayor avance fue la aplicación de rejillas (grids) tridimensionales rectangulares con las que se discretiza el espacio alrededor del receptor o de su centro activo, evaluándose la energía de interacción entre la molécula y un átomo (sonda química), localizado en cada uno de los nodos situados en puntos igualmente espaciados, de la rejilla tridimensional. Como muchas formas de la energía potencial son de corto alcance, el espaciado de la rejilla debe ser $\leq 0.5 \text{ \AA}$.

Para cada tipo de átomo del ligando se necesita una rejilla, de forma que se tiene un *array* de cuatro dimensiones (*grid*) en el que un elemento de este, $grid(x_i; y_i; z_i; k)$, representa la energía de interacción de un átomo sonda, tipo k , con la proteína receptora y localizado en el nodo de la rejilla con índice $x_i; y_i; z_i$; calculándose los índices en la forma:

$$x_i = \frac{(x - x_0)}{\Delta e} + 1 \quad (2.1),$$

siendo Δe el espaciado de la rejilla, x la coordenada del nodo de la rejilla y x_0 la coordenada del origen de la rejilla.

Estas rejillas se precaculan una sola vez, de tal forma que la puntuación correspondiente a la contribución de un determinado átomo del ligando al acoplamiento, la puntuación total de un ligando con N átomos será:

$$\text{puntuación (scoring)} = \sum_{j=0}^N grid(x_i; y_i; z_i; k_j) \quad (2.2),$$

donde x_i, y_i, z_i son los índices del nodo más cercano a la localización del átomo j , y k_j es su tipo atómico.

Con el uso de estas rejillas se reduce notablemente el tiempo de cálculo, lo que, por un lado, permite la implementación de funciones de puntuación más sofisticadas,

por otro lado, permite ir modificando las posiciones atómicas del ligando y calcular rápidamente las energías del acoplamiento. AutoDock fueron los primeros programas en implantar el uso automatizado de rejillas

2.2.1 Algoritmos de búsqueda de mínimos

2.2.1.1 Algoritmos que tienen en cuenta la flexibilidad del ligando

Normalmente se desconoce cuál es la conformación más favorable del ligando para su interacción con el receptor. Los algoritmos que tratan de modelizar la flexibilidad del ligando se pueden dividir en tres categorías principales: métodos sistemáticos, métodos aleatorios o estocásticos y métodos de simulación.

Búsqueda sistemática. Estos algoritmos intentan explorar todos los grados de libertad de la molécula; presentan el problema de la explosión combinatorial, que se debe a que el número de posibles conformaciones puede llegar a ser enorme, al venir dado por la ecuación:

$$N_{\text{conformaciones}} = \prod_{i=1}^N \prod_{j=1}^{n_{\text{inc}}} \frac{360}{\theta_{i,j}} \quad (2.3),$$

donde, N es el número de enlaces rotables y $\theta_{i,j}$ el tamaño del incremento angular del ángulo j del enlace i .

En una primera etapa el ligando se divide en un fragmento rígido y otro flexible (cadenas laterales); posteriormente estas ramificaciones se subdividen en cada nuevo enlace rotatable que posean. Los fragmentos rígidos se van situando en el sitio activo y las cadenas laterales se van conectando de forma secuencial acompañando el proceso con una búsqueda sistemática de los ángulos diedros.

Métodos aleatorios. La búsqueda se realiza por medio de cambios aleatorios en la estructura del ligando. El método más popular es el método Monte C, cuyo algoritmo es el siguiente:

1. Genera una configuración aleatoria inicial del ligando en el sitio activo.
2. Almacena la configuración inicial.

3. Genera una nueva configuración. Si esta nueva configuración tiene mejor puntuación que la anterior se acepta automáticamente. Si, por el contrario, no es un nuevo mínimo, se le realiza una prueba basado en la función de probabilidad de Boltzmann; si lo supera se acepta, en caso contrario se rechaza.
4. Se repiten los pasos previos hasta que se tenga un número deseado de configuraciones.

Los algoritmos genéticos son métodos estocásticos similares al Monte Carlo, que se utilizan para encontrar el mínimo global, basándose en los principios biológicos de población y competición. Se genera una población inicial de conformaciones del ligando; en esta población, unos con otros compiten por su supervivencia y se exige que sólo los «individuos» más aptos continúen en la siguiente generación, realizándose una minimización del mejor, permitiéndose cruces y mutaciones aleatorias o parciales.

AutoDock añade un algoritmo Lamarckiano (LGA) para mejorar la convergencia en los ligandos con más de ocho enlaces rotables. El LGA intercambia entre el espacio genotípico y el fenotípico. La mutación y el cruce tienen lugar en el espacio genotípico mientras que el espacio fenotípico queda determinado por la optimización de la función de energía. La minimización (local sampling) se realiza después de haber realizado los cambios genotípicos en la población (global sampling) en el espacio fenotípico, lo cual es conceptualmente similar a la minimización MC. El método LGA es el más eficiente y fiable de los algoritmos antes mencionados

Métodos de simulación. La aproximación más utilizada es la dinámica molecular, si bien ésta tiene el inconveniente de que a veces no es capaz de atravesar barreras de alta energía en unos tiempos razonables de simulación, por lo que sólo pueden acomodar ligandos en mínimos locales de la hipersuperficie potencial. Se intenta paliar este problema, o bien simulando diferentes partes del complejo a diferentes temperaturas, o comenzando la dinámica desde diferentes posiciones del ligando

2.2.1.2 Algoritmos que tienen en cuenta la flexibilidad del receptor

Actualmente, el manejo eficiente de la flexibilidad de la proteína receptora se considera una de las principales metas en el campo del docking. Las proteínas están en constante movimiento entre diferentes estados conformacionales de similar energía y se sabe que esta flexibilidad, por un lado, aumenta la afinidad por el ligando y, por otro lado, influye en el centro activo. Aunque todavía están en un estado poco avanzado, hay ya técnicas que permiten tener en cuenta esta flexibilidad. Estas son algunas de las aproximaciones que consideran la flexibilidad del receptor:

Soft docking. Es la más simple de las aproximaciones, consistiendo en tratar la flexibilidad de la proteína de forma indirecta. Aunque el receptor se sigue tratando como un objeto rígido, los términos repulsivos del potencial Lennard-Jones se pueden atenuar generando una interacción «suave». De esta manera, al ligando se le permite «penetrar» la superficie de la proteína en un intento de tener en cuenta cambios pequeños y localizados que podrían tener lugar en un ambiente flexible.

Flexibilidad de las ramificaciones. En esta técnica se permite la movilidad de algunos residuos, sobre todo los del sitio activo, y pueden ser tratados explícitamente, o bien durante el docking, o bien después de que el ligando se halla situado en el sitio activo de forma aproximada.

Aunque esta aproximación conlleva un aumento del coste computacional, permite movimientos localizados de la proteína, lo cual mejora el ajuste del ligando. No se consideran los cambios del esqueleto de la proteína.

Simulaciones de Dinámica Molecular. De la panoplia de diferentes estados conformacionales de la proteína en disolución, no todas las conformaciones se enlazarán con la misma estabilidad a un ligando dado. Por sí mismo, la presencia del ligando afecta a la estructura del sitio activo y al equilibrio dinámico entre los diferentes estados conformacionales de la proteína

Durante el proceso de acoplamiento, el conformero de la proteína que sea el más probable para acomodar al ligando se irá agotando en la disolución para formar el

complejo y otros conforméromos irán rellenando el espacio conformacional vacante, conduciendo así el proceso de enlace.

Este método constituye la aproximación más rigurosa y exhaustiva, pero por otro lado más costosa. No es una opción realista para la búsqueda de varios compuestos, pero sí es válida para problemas de acoplamientos complicados donde incluso pequeños cambios conformacionales del receptor tengan una gran influencia en el proceso de enlace.

2.2.3 Docking con AutoDock 4.2.

AutoDock 4.2 utiliza un procedimiento para predecir la interacción de ligandos con macromoléculas objetivo cuya interacción será evaluada el Algoritmo Genético Lamarckiano y función empírica de puntuación de energía libre, por lo proporcionará resultados de acoplamiento, utiliza un campo de fuerza de energía libre semi-empírico para evaluar las conformaciones durante las simulaciones de acoplamiento [22]. El campo de fuerza se parametrizó usando una gran cantidad de complejos de proteína-inhibidor para los que se conocen tanto la estructura como las constantes de inhibición.

El campo de fuerza incluye seis evaluaciones por pares (V) y una estimación de la entropía conformacional perdida al unirse, ecuación (2).

$$\Delta G = (V_{bound}^{L-L} - V_{unbound}^{L-L}) + (V_{bound}^{P-P} - V_{unbound}^{P-P}) + (V_{bound}^{P-L} - V_{unbound}^{P-L} + \Delta S_{conf}) \quad (2.4),$$

Cada uno de los términos energéticos por pares incluye evaluaciones de dispersión / repulsión, enlaces de hidrógeno, electrostática y desolvatación, ecuación:

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \left(\frac{q_i q_j}{e(r_{ij}) r_{ij}} \right) + W_{sol} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) e \left(-\frac{r_{ij}^2}{2\sigma^2} \right) \quad (2.5),$$

En la Figura 9 se observa la metodología de como el software AutoDock Vina calcula la energía del complejo ligando-receptor.

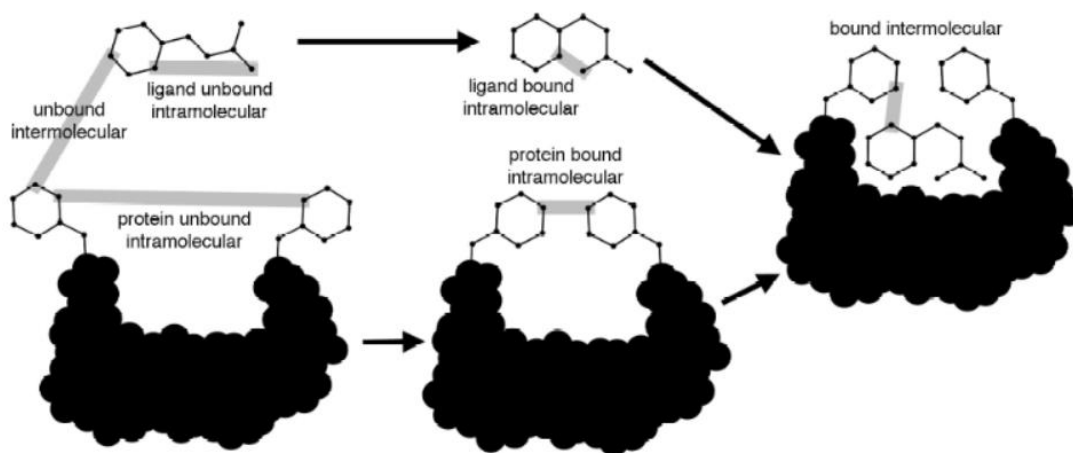


Figura 9. Pasos utilizados por el software AutoDock 4.2 para evaluar la unión ligando-receptor.

2.3 Dinámica Molecular

La dinámica molecular (DM) es una de las principales herramientas para el estudio de biomoléculas. Las simulaciones de DM permiten el estudio de procesos dinámicos complejos de los sistemas biológicos tales como: estabilidad de proteínas, cambios conformacionales, reconocimiento molecular de biomoléculas, transporte de iones, etc.

La DM se basa en la segunda ley del movimiento de Newton,

$$F = ma \quad (2.6),$$

donde F es la fuerza ejercida sobre una partícula, m es su masa y a su aceleración. Conociendo la fuerza ejercida sobre cada átomo es posible determinar su aceleración en el sistema. La integración de las ecuaciones del movimiento producirá entonces una trayectoria que describe las posiciones, velocidades y aceleraciones de las partículas en función del tiempo. A partir de esta trayectoria, se pueden determinar los valores promedio de las propiedades del sistema. El método es determinístico: una vez que se conocen las posiciones y velocidades de cada átomo, se puede predecir el estado del sistema para cualquier valor del tiempo.

2.3.1 Fundamentos.

2.3.1.1 Mecánica clásica

El método consiste en la resolución (integración) del sistema de ecuaciones diferenciales dada por la segunda ley de Newton:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{f}_i, \quad \text{para } i = 1, 2, \dots, N \quad (2.7),$$

donde m_i y \mathbf{r}_i son la masa y posición (coordenadas) de la partícula i , y la fuerza viene expresada en función del gradiente de la energía potencial $V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$:

$$\mathbf{f}_i = -\nabla_{\mathbf{r}_i} V \quad (2.8),$$

El resultado de la integración nos dará información sobre cómo varían las posiciones y velocidades de las partículas del sistema en función del tiempo, a lo cual se le denomina trayectoria.

Para simplificar, se utilizan los momentos atómicos \mathbf{p}_i , de manera que la energía cinética se puede escribir como:

$$K = \sum_{i=1}^N \frac{|\mathbf{p}_i|^2}{2m_i} \quad (2.9),$$

De esta forma, la energía total (hamiltoniano) se puede escribir como la suma de los términos cinéticos y de potencial: $H = K + V$ y escribir las ecuaciones clásicas del movimiento en la forma:

$$\frac{d\mathbf{r}_i}{dt} = \frac{\mathbf{p}_i}{m_i} \quad \text{y} \quad \frac{d\mathbf{p}_i}{dt} = \mathbf{f}_i \quad (2.10),$$

Este es un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que se debe resolver mediante integración numérica paso a paso. Existen muchos métodos para ello, pero el más utilizado, por sus ventajas, es el algoritmo de Verlet que se puede expresar como:

$$\mathbf{p}_i \left(t + \frac{1}{2} \Delta t \right) = \mathbf{p}_i(t) + \frac{1}{2} \Delta t \mathbf{f}_i(t) \quad (2.11a),$$

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \frac{\Delta t \mathbf{p}_i\left(t + \frac{1}{2} \Delta t\right)}{m_i} \quad (2.11b),$$

$$\mathbf{p}_i(t + \Delta t) = \mathbf{p}_i\left(t + \frac{1}{2} \Delta t\right) + \frac{1}{2} \Delta t \mathbf{f}_i(t + \Delta t) \quad (2.11c),$$

Sobre esta base teórica, el esquema básico de funcionamiento de una simulación de DM será:

1. Se establecen los parámetros para la simulación: temperatura inicial, paso del tiempo, Δt , tiempo total de simulación, etc.
2. Se ajusta el sistema, asignando las posiciones y velocidades iniciales:

Las posiciones iniciales de los átomos se pueden obtener a partir de estructuras experimentales, determinadas por rayos X o por RMN, o bien modelizadas teóricamente. Por su parte, las velocidades iniciales v_i se suelen escoger aleatoriamente a partir de una distribución de Maxwell-Boltzmann, la cual da la probabilidad \mathcal{P} de que un átomo i tenga una velocidad v_α en la dirección $\alpha(x, y, z)$ a una temperatura T :

$$\mathcal{P}(v_{i\alpha}) = \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T}\right)^{1/2} \exp\left[-\frac{m_i v_{i\alpha}^2}{2k_B T}\right] \quad \text{siendo } \alpha = x, y, z \quad (2.12),$$

Normalmente, las velocidades se ajustan de forma que $\mathbf{p}_i = \sum_{i=1}^N m_i \mathbf{v}_i = 0$ (momento global nulo).

3. Se calculan las fuerzas sobre todas las partículas.
4. Se integran las ecuaciones del movimiento. Este paso y el anterior se van repitiendo, durante el tiempo total de simulación estipulado, para calcular la evolución temporal del sistema. En cada paso, se van guardando en un archivo, para su posterior análisis, las posiciones, velocidades, fuerzas, etc. El tiempo total de la simulación dependerá del tamaño del sistema, de las propiedades físicas de interés y, por supuesto, de los recursos computacionales disponibles.

2.3.1.2 El potencial

Como se ha indicado, el cálculo de las fuerzas se hace a través de la energía potencial obtenida en cada paso. En general, la energía potencial V de un sistema de N átomos se puede expresar como sigue:

$$V = \sum_{i=1}^N u_1(\mathbf{r}_i) + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N u_2(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j) + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \sum_{k>j>1}^N u_3(\mathbf{r}_i, \mathbf{r}_j, \mathbf{r}_k) + \dots \quad (2.13),$$

donde el primer término u_1 representa las interacciones de un cuerpo (fuerza externa), u_2 las interacciones entre dos cuerpos y así sucesivamente; los términos mayores serán la interacción de muchos cuerpos, que tienen en cuenta los efectos de cluster sobre un átomo por estar rodeados de varios.

El mejor método para obtener las fuerzas que actúan sobre los átomos es por medio de la Mecánica Cuántica, resolviendo la ecuación de Schrödinger para un sistema de N partículas interactuando entre ellas. Sin embargo, el costo computacional para hacer esto es altísimo e inviable para la mayoría de las macromoléculas, lo habitual es utilizar los campos de fuerza que se han desarrollado para tratar con macromoléculas (proteínas y polímeros): AMBER, CHARMM, OPLS, etc., que, a pesar de tener funcionales más simples que otros, ofrecen buenos resultados.

2.3.1.3 Restricción de los grados de libertad

A lo largo de una optimización o dinámica, basada en métodos de mecánica molecular, es posible encontrar situaciones en las que o bien no se exploran las proximidades del mínimo global o el sistema es incapaz de abandonar por sí mismo una determinada conformación durante la simulación. Por ello, cuando se busca hallar un mínimo global, o explorar el mayor número de conformaciones posibles, se puede emplear un algoritmo que aplique, durante un cierto tiempo, un conjunto de fuerzas y velocidades aleatorias que permita al sistema bajo estudio acceder a nuevas conformaciones, en estos procesos se suele fijar la longitud de los enlaces, con lo que

no sólo se posibilita una mayor exploración, sino que se reduce el coste computacional, lo que típicamente permite ampliar el número de ciclos de la búsqueda.

2.3.1.4 Condiciones de contorno periódicas

Para simular el sistema macroscópico, se suelen emplear condiciones de contorno periódicas, ya que así se minimizan los efectos superficiales. Esto se soluciona

rodeando el cubo de réplicas de él mismo, como se ejemplifica en la Figura 10 ahora bien, si consideramos el cálculo de la fuerza sobre una partícula de la Figura y la energía potencial que la involucra, teniendo en cuenta sólo las interacciones diatómicas, deberíamos calcular las interacciones entre la partícula 1 y el resto de las partículas, y además con todas las imágenes de las réplicas, lo que daría lugar a un número infinito de interacciones, que harían inviable su cálculo.

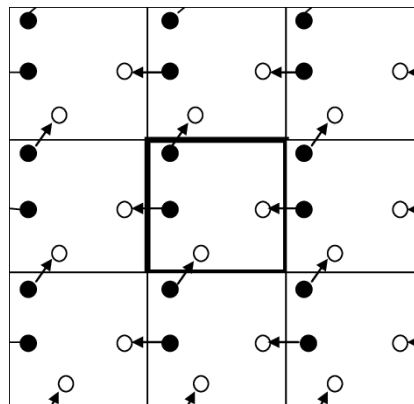


Figura 10. Ejemplo de condiciones de contorno periódicas.

Para solucionar esto, se recurre al convenio de mínima imagen: si la fuerza es de corto rango, se considerarán sólo las partículas cercanas a la partícula en cuestión y si la interacción es a mayor distancia, simplemente se ignora. Lo que se hace es: tomando como centro a la partícula, se construye una caja del mismo tamaño y forma que la caja original y sólo se consideran las interacciones entre la partícula y el resto de las partículas que se encuentran dentro de esta caja.

2.3.1.5 Radio de corte

Por otra parte, la contribución a la energía y a las fuerzas sobre una partícula provienen de sus vecinos más cercanos, por lo que se suelen tener en cuenta sólo

potenciales de corto alcance que normalmente no van más allá de quintos vecinos e introducir un radio de corte, r_c , de tal forma que $u(r_{ij}) = 0$ si $r_{ij} > r_c$ y, para asegurar que las fuerzas y la energía potencial tiendan suavemente a 0 en $r = r_c$, se puede usar un ajuste del tipo:

$$V(r) \rightarrow \mathcal{V}(r) - \mathcal{V}(r)|_{r=r_c} - (r - r_c) \left. \frac{d\mathcal{V}}{dr} \right|_{r=r_c} \quad (2.14),$$

Así se evalúan solo las interacciones dentro de la esfera (de radio r_c) de influencia del potencial.

2.3.1.6 Lista de vecinos

En cada paso hay que examinar la distancia entre todos los pares de partículas para saber cuál está fuera o cuál está dentro del radio de corte, lo que conlleva un tiempo de cálculo proporcional a N^2 .

Verlet ideó un sistema para mejorar la velocidad de los cálculos, consistente en crear una lista de vecinos, los cuales se encuentran dentro de un radio r_l de cada partícula; la lista se renueva cada cierto número de pasos. De esta manera sólo se examinan en cada paso, las distancias entre la partícula i y sus partículas vecinas, reduciendo considerablemente el tiempo computacional. El método presupone que los vecinos que están dentro de la lista no varían mucho entre paso y paso, y que sólo cada cierto número de pasos, unas partículas entran y otras salen, por lo que periódicamente la lista debe ser renovada.

2.4 Dinámica molecular en un medio acuoso

De manera general, existen dos modelos teóricos para tener en cuenta el efecto del disolvente. Uno, que es el más obvio, trata el disolvente de forma explícita: en la simulación, sus moléculas se sitúan alrededor del soluto y un segundo modelo, que lo que hace es considerarlo de forma implícita. El primer método da una información detallada y generalmente más precisa, pero es a costa de un mayor tiempo de computación, frente al segundo método que es más simple, aunque menos preciso, porque ignora los efectos debidos a las interacciones de corto alcance.

2.4.1 Métodos de cálculo con disolvente explícito

Desde un punto de vista microscópico, la solvatación da lugar, tanto a interacciones entre el soluto y el disolvente, como a interacciones entre las propias moléculas del disolvente en las cercanías del soluto.

La solvatación de un soluto como el proceso en el que una partícula de este se transfiere desde una posición fija en fase gas a otra posición fija en disolución, a temperatura, presión y composición del disolvente constantes. Ateniéndonos a esta definición, la energía libre de solvatación (ΔG_{sol}), que es el parámetro clave para definir la solvatación, queda definida como el trabajo reversible empleado en la transferencia de soluto, en aquellas condiciones en que la densidad en fase gas es la misma que en disolución y se puede determinar mediante la ecuación:

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{ele} + \Delta G_{vdw} + \Delta G_{cav} \quad (2.15),$$

Donde ΔG_{ele} es la contribución electrostática; ΔG_{vdw} son las fuerzas de dispersión-repulsión de van der Waals entre el soluto y las moléculas de disolvente; ΔG_{cav} es la energía libre de cavitación (o contribución estérica) debida a la rotura de las fuerzas de cohesión que existen entre las moléculas del disolvente (desfavorable para la solvatación).

Se pueden utilizar tres niveles de teoría para representar de forma explícita las interacciones moleculares de los sistemas solvatados: a nivel de mecánica cuántica, a nivel de mecánica molecular y mediante métodos mixtos. El tratamiento de mecánica cuántica puro es el más riguroso, pero no es útil para sistemas grandes por el gran costo computacional; de ahí la utilización de los métodos mixtos que tratan el soluto o una parte de él, mientras que el resto del sistema lo hacen por medio de métodos de mecánica molecular. Para los estudios bioquímicos, son los métodos de mecánica molecular los más utilizados, combinados con algoritmos estocásticos como el de Monte Carlo (MC).

2.4.2 Tratamiento del Disolvente Explícito.

En los modelos explícitos no se incluyen nuevos términos (potenciales) en los campos de fuerza, sino que se añaden los parámetros que definen la molécula de

disolvente. El cálculo del potencial total incluirá la suma de los átomos del soluto más las moléculas de disolvente que se sitúan en una caja de simulación.

Existen diferentes modelos explícitos que usan agua como disolvente:

1. Modelos simples que conllevan un menor costo computacional. En estos, la molécula de agua se considera rígida y los pares electrostáticos e interacciones de van der Waals se modelizan mediante potenciales de Coulomb y de LennardJones, respectivamente. Algunos modelos son: *SPC* y *SPC/E*, *TIP3P*, *BF*, *TIP4P*, *ST2* y *TIP5P*.
2. Modelos flexibles, que incluyen cambios conformacionales en la molécula de agua al considerar tensiones y flexiones de enlace.
3. Modelos de agua polarizable, para sistemas que no son homogéneos con una considerable contribución de los campos electrostáticos de los iones y otros grupos cargados.

Con estos modelos, utilizados en simulaciones de DM o MC, se puede obtener una información importante sobre el comportamiento estructural y dinámico de las biomoléculas. Grandes solutos como las proteínas o ácidos nucleicos son flexibles en disolución, y su papel funcional suele depender de estas fluctuaciones estructurales; el análisis de los componentes principales (PCA) se aplica a las trayectorias de DM para identificar los movimientos más importantes en las macromoléculas.

Por otra parte, también se puede obtener una representación aceptable de la estructura del disolvente alrededor del soluto. Mediante adecuadas funciones de distribución del disolvente se pueden obtener los detalles estructurales del mismo alrededor del soluto o bien el cálculo de las energías libres de solvatación.

El análisis de la energía de un sistema solvatado, ésta varía apreciablemente durante todo el tiempo de evolución de la trayectoria, lo cual limita su estimación. Sin embargo, recurriendo a la mecánica estadística, se puede definir una función de «pseudoenergía»:

$$E = \langle E_{\text{soluto-soluto}}^{\text{campo de fuerza}} \rangle + \langle \Delta_{\text{sol}} \rangle$$

donde, la energía de solvatación Δ_{sol} , se puede calcular utilizando métodos basados en la teoría de la respuesta extendida lineal.

$$\Delta G_{sol} = \frac{1}{2} \langle E_{ele}^{sx} \rangle + \alpha SAS^S + \beta \langle E_{vdw}^{sx} \rangle \quad (2.16),$$

siendo E^{sx} la energía de interacción electrostática y de van der Waals, α y β parámetros empíricos y SAS es la superficie del soluto accesible al disolvente.

2.4.3 Metodología de la dinámica molecular.

La dinámica molecular (MD, Molecular Dynamics) es un tipo de simulación computacional de moléculas, que intenta predecir el comportamiento o evolución de un sistema a través del tiempo, aplicando las ecuaciones del movimiento de Newton para calcular las fuerzas entre los átomos que forman dicho sistema [23].

Gracias a la MD, se pueden calcular diferentes propiedades fisicoquímicas del sistema, y en sistemas biológicos, permite medir la fuerza de interacción entre posibles fármacos y sus blancos biomoleculares o receptores. Aunque, las ecuaciones del movimiento de Newton no describen el sistema a nivel cuántico este tipo de estudios han mostrado buena correlación con resultados experimentales.

Para comenzar se requiere de una configuración inicial del sistema a analizar, es decir, se necesitan las posiciones iniciales de los átomos que lo integran, información que usualmente se obtiene de fuentes experimentales, tales como difracción de rayos-X o RMN, que brindan información sobre la distribución tridimensional de los átomos que lo conforman.

Para realizar cálculos en dinámica molecular se emplea un conjunto de ecuaciones para describir la superficie de la energía potencia y cuya forma matemática de toma de la mecánica clásica, este conjunto de ecuaciones del potencial es llamado 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 MD son útiles en el estudio de estructuras, energías conformacionales, y otras propiedades moleculares. Dentro de esta metodología se les considera a los átomos

como partículas de radio r , con una carga atómica. Las cargas atómicas son generalmente calculadas con mecánica cuántica.

Debido a que la MD nos arroja la evolución del sistema en el tiempo se pueden observar los cambios conformacionales que una macromolécula sufre en presencia de un ligando, lo que brinda información crucial para el diseño de nuevas moléculas para uso clínico, otra ventaja es que no sólo proporciona una simulación del ligando-proteína, sino que se puede incluir el disolvente que se desee, así como la inclusión de iones, regular la temperatura o la presión, que usualmente no son consideradas en otros métodos de simulación de tipo cuántico [24].

Para llevar a cabo la MD es necesario tener en mente las siguientes etapas [25]:

Preparación del sistema. Se establece o elige la configuración inicial compuesta de N átomos y se definen las condiciones de equilibrio.

Equilibramiento. Mediante diferentes esquemas o ensambles de simulación (microcanónico, canónico, isotérmico-isobárico), se lleva el sistema al equilibrio donde la energía permanece casi constante. Dependiendo del esquema a utilizar, se pueden definir condiciones constantes de volumen, presión y/o temperatura.

Simulación MD. Se define el tiempo de ejecución y se corre la dinámica molecular. Este es el paso que requiere el mayor tiempo, pues puede ir de pocos picosegundos a nanosegundos (horas a semanas). Se realiza el cálculo de fuerzas del sistema con lo que se pueden obtener las propiedades fisicoquímicas de interés.

Resultados. Finalmente, se analizan los resultados y se obtiene la información deseada. Se puede hacer el cálculo de muchos parámetros, además, se puede analizar la trayectoria o comportamiento del sistema (animación o película) por medio de visualizadores moleculares con interfaz gráfica

2.5 Campos de Fuerza

Muchos de los problemas que nos gustaría abordar en la simulación molecular son demasiado grandes para poder ser resueltos con mecánica cuántica, por lo que debemos recurrir a métodos que ignoren el movimiento de los electrones y que

calcule la energía del sistema solamente en función de las posiciones nucleares, debido a esto la mecánica molecular es utilizada para realizar cálculos que contienen un gran número de átomos.

Es el conjunto de leyes de la mecánica clásica y constantes utilizadas para la obtención de la energía del sistema molecular lo que se conoce como un campo de fuerzas.

2.5.1 Estiramiento del enlace

Se utiliza una expansión de Taylor alrededor de una longitud de enlace de equilibrio l_0 . La expresión se corta en el término de segundo orden.

$$V_b(l_{ij} - l_{ij0}) = V(0) + \frac{dV}{dl}(l_{ij} - l_{ij0}) + \frac{1}{2} \frac{d^2V}{dl^2}(l_{ij} - l_{ij0})^2 \quad (2.17),$$

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 este alrededor del valor de equilibrio.

$$V_b(l_{ij} - l_{ij0}) = \frac{k_{ij}}{2}(l_{ij} - l_{ij0})^2 \quad (2.18),$$

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.

2.5.2 Flexión del ángulo.

En espectroscopia vibracional se observa que, para pequeños desplazamientos del punto de equilibrio, la variación de la energía asociada con las deformaciones del ángulo de enlace es bien modelada por expansiones de polinomios, de esta manera la función del campo de fuerzas para la flexión del ángulo es:

$$V_a(\theta_{ijk} - \theta_{ijk0}) = \frac{1}{2} [k_{ijk} + k_{ijk}^{(3)}(\theta_{ijk} - \theta_{ijk0}) + k_{ijk}^{(4)}(\theta_{ijk} - \theta_{ijk0})^2 + \dots] (\theta_{ijk} - \theta_{ijk0})^2 \quad (2.19),$$

Donde θ es el valor del ángulo entre los enlaces ij y jk y las constantes de fuerza ahora en subíndices ijk es para enfatizar que dependen de los tres átomos. Si la ecuación es truncada

2.5.3 Variación del ángulo de Torsión.

El ángulo diedro ω , se define como el ángulo entre el semiplano BCD y el semiplano ABC, más precisamente, el ángulo diedro está definido por AB. Este ángulo diedro molecular implica a los cuatro átomos A, B, C, D, Figura 11 los enlaces AB y CD probablemente no son perpendiculares al enlace BC, de forma que se debe proyectar AB y CD en el plano perpendicular a la línea BC. Esto se hace dibujando una proyección de Newman con una línea BC perpendicular al plano del papel. Se escoge el intervalo de los ángulos diedros como: $0 \leq \omega < 360$. Por definición una rotación a favor de las agujas del reloj del enlace AB proyectado de frente, para unirse al átomo D.

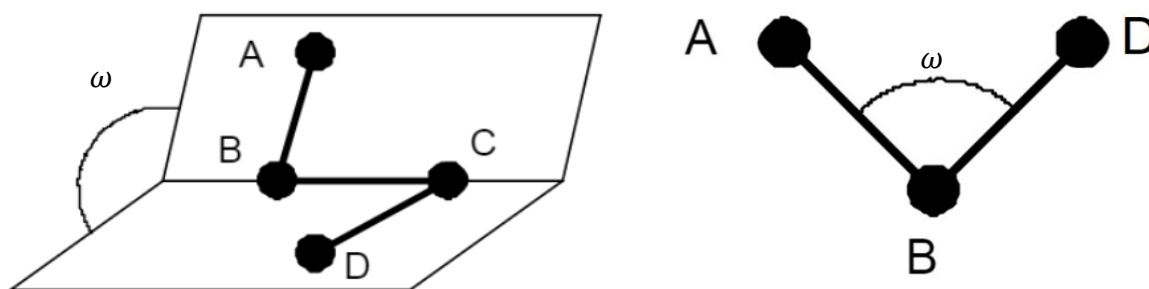


Figura 11. Definición del ángulo diedro entre los semiplanos ABC y BCD (derecha), ángulo diedro ABD, el átomo C está detrás del ángulo B (izquierda).

Los ángulos de torsión diedros son periódicos, sin embargo, la energía mínima para muchas torsiones es para el arreglo interplanar, es decir $\omega = \pi$, por lo que también es común la convención $-\pi < \omega < \pi$ ($-180 < \omega < 180$). 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:

$$V_t(\omega_{ijkl}) = \frac{1}{2} \sum_{n,ijkl} V_{ijkl} [1 + (-1)^{n+1} \cos(n \omega_{ijkl} + \psi_{n,ijkl})] \quad (2.20),$$

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 valores de torsión $ijkl$.

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 unos conjuntos de ceros.

La energía potencial de torsión total $V_t(\omega)$ se toma como la suma de términos $V_t(\omega_{ijkl})$ para todos los pares de átomos 1, 4:

$$V_t(\omega) = \sum_{1,4} V_t(\omega_{ijkl}) \quad (2.21),$$

2.5.4 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 (estéricas), atractivas (London).

Las 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. 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} varía con la elección de las variables estructurales.

2.5.5 Interacciones de Van der Waals

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:

$$F_q = -\frac{\partial V}{\partial q} \quad (2.22),$$

Esta curva de energía potencial es ilustrada en la Figura 12

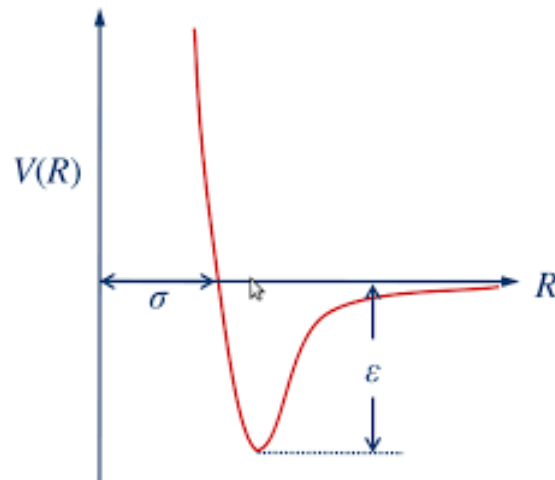


Figura 12. Potencial de Lennard Jones (Rojo).

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

$$V_{\text{vdw}}(\mathbf{r}_{ij}) = \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (2.23),$$

y la ecuación de Buckingham

$$V_{\text{vdw}}(\mathbf{r}_{ij}) = a_{ij} \exp(-b_{ij}r_{ij}) - \frac{c_{ij}}{r_{ij}^6} \quad (2.24),$$

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 del término repulsivo en el potencial de Lennard Jones fue originalmente elegido por motivos de conveniencia. Los factores de escala B_{ij} y c_{ij} en los términos atractivos de las ecuaciones 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

$$B_{ij} = \frac{365\alpha_i\alpha_j}{\left[\left(\frac{\alpha_i}{N_i}\right)^{\frac{1}{2}} + \left(\frac{\alpha_j}{J}\right)^{\frac{1}{2}}\right]} \quad (2.25),$$

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. Aun 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 $V_{\text{vdw}}(\mathbf{r}_{ij})$ en un valor de \mathbf{r}_{ij} cercano a la suma de los radios de Van der Waals de los grupos i y j .

Evaluando \mathbf{r}_{ij} cuando la derivada es igual a cero:

$$\frac{\partial V_{\text{vdw}}}{\partial \mathbf{r}_{ij}} = 6 \left(\frac{-2A_{ij}}{\mathbf{r}_{ij}^{13}} + \frac{B_{ij}}{\mathbf{r}_{ij}^7} \right) \quad (2.26),$$

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

$$A_{ij} = \frac{B_{ij} \mathbf{r}_{\text{min}}^6}{2} \quad (2.27),$$

En esta expresión \mathbf{r}_{min} es el valor de \mathbf{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 \mathbf{r}_{min} y V_{min} , que corresponde al mínimo de energía de interacción a pares. Específicamente:

$$V_{\text{vdw}} = -V_{\text{min}} \left[\left(\frac{\mathbf{r}_{\text{min}}}{\mathbf{r}_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\mathbf{r}_{\text{min}}}{\mathbf{r}_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.28),$$

En ocasiones se necesitan pequeños ajustes al radio de Van der Waals de moléculas individuales para contrarrestar efectos de compresión de moléculas, asociados con grandes ensambles de pares mutuamente atractivos. La mejor función conocida para el potencial Van der Waals es la función de Lennard Jones.

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. 2.29) se toma como la suma de todas las interacciones posibles de pares de átomos

$$V_{\text{vdw}} = \sum_{1, \geq 4} V_{\text{vdw}}(r_{ij}) \quad (2.29),$$

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 $V_{\text{vdw},ij}$, 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 $V_{\text{vdw},ij}$ como un potencial de Lennard-Jones que se puede escribir de dos formas equivalentes:

$$V_{\text{vdw},ij}(r_{ij}) = \varepsilon_{IJ} \left[\left(\frac{R_{IJ}}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{IJ}}{R_{ij}} \right)^6 \right] = 4\varepsilon_{IJ} \left[\left(\frac{\sigma_{IJ}}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{\sigma_{IJ}}{R_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.30),$$

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

2.5.6 Tipos de Campos de Fuerza

Muchos campos de fuerzas que se utilizan pueden interpretarse en términos de 4 componentes simples ecuación (2.31) que ilustran las fuerzas inter e intramoleculares de un sistema. Las penalizaciones energéticas son asociadas con las desviaciones de los enlaces y sus ángulos con respecto a los valores de equilibrio.

$$V(r^N) = \sum_{\text{bonds}} \frac{k_l}{2} (l_i - l_{i0})^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{k_\theta}{2} (\theta_i - \theta_{i0})^2 + \sum_{\text{torsion}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\ + \sum_{i=1} \sum_{j=i+1} \left(4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + k \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right) \quad (2.31),$$

2.5.6.1 Barcelona Supercomputing Center 1 Force Field (BSC1).

El campo de fuerza parmbsc1 fue desarrollado con el objetivo de crear un campo de fuerza de propósito general para simulaciones de DNA. Se evaluó su rendimiento probando su capacidad para simular una amplia variedad de sistemas de DNA.

Parmbsc1 pudo ajustar bien los datos de mecánica cuántica, mejorando los resultados anteriores del campo de fuerza (BSC0). Primero probaron los parámetros derivados de mecánica cuántica en el dodecamero Drew-Dickerson, una estructura de DNA bien estudiada que generalmente se usa como punto de referencia en el desarrollo del campo de fuerza.

Las trayectorias de Parmbsc1 muestrearon un dúplex estable de tipo B que permaneció cerca de las estructuras experimentales, preservando los enlaces de hidrógeno y las características helicoidales incluso en los pares de bases terminales, donde los artefactos de deshilachado son comunes con otros campos de fuerza [26].

2.5.6.2 Universal Force Field (UFF)

El Campo de fuerza universal (UFF), está diseñado de forma tal que los parámetros del campo de fuerza se estiman utilizando reglas generales basadas solo en el elemento, su hibridación y su conectividad. Se representan las formas funcionales del campo de fuerza, los parámetros y las fórmulas generadoras para la tabla periódica completa, permitiendo así la formulación de un campo que nos permite simular una gran cantidad de situaciones desde sistemas biológicos hasta estado sólido.

Los parámetros utilizados para generar el campo de fuerza Universal incluyen un conjunto de radios de enlace atómico dependientes de la hibridación, un conjunto de ángulos de hibridación, parámetros de van der Waals, barreras torsionales y de inversión, y un conjunto de cargas nucleares efectivas [27].

2.5.6.3 General AMBER Force Field (GAFF)

GAFF está diseñado para ser compatible con los campos de fuerza AMBER existentes para proteínas y ácidos nucleicos, y tiene parámetros para la mayoría de

las moléculas orgánicas y farmacéuticas que están compuestas de H, C, N, O, S, P y halógenos. Utiliza una forma funcional simple y un número limitado de tipos de átomos, pero incorpora modelos empíricos y heurísticos para estimar constantes de fuerza y cargas atómicas parciales. El rendimiento de GAFF en casos de prueba es alentador, se compararon 74 estructuras cristalográficas con las estructuras minimizadas de GAFF, con un desplazamiento medio cuadrático de 0.26 Å, que es comparable al del campo de fuerza Tripos 5.2 (0.25 Å) y mejor que las de MMFF 94 y CHARMM (0,47 y 0,44 Å, respectivamente), las minimizaciones de fase gaseosa se realizaron en 22 pares de bases de ácido nucleico, y las estructuras minimizadas y las energías intermoleculares se compararon con los resultados de MP2 / 6-31G *. El error RMS en energías relativas (en comparación con el experimento) es de aproximadamente 0,5 kcal / mol. GAFF se puede aplicar a una amplia gama de moléculas de forma automática.

2.6 Software AMBER

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 reempaquetamiento 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 termino AMBER algunas veces es referido al campo de fuerzas empírico que esta 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 construido 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.

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.

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.

2.7 Metodología de trabajo para realización de los cálculos

2.7.1 Búsqueda de las estructuras iniciales para el cálculo de Dinámica Molecular.

Como primer paso era necesario encontrar un fragmento de DNA significativo en el cual comprobar las interacciones que tiene con la cafeína, al llevar a cabo una revisión de la historia del DNA y sus estudios se concluyó que el fragmento con el cual se trabajaría sería el Dodecámero de Drew Dickerson (Figura 13), el cual ha sido ampliamente estudiado, lo cual nos lleva a escoger un dodecamero del Nucleic Acid Data Bank cuyo NBA ID es NA2708 y su PDB ID es 4C64, con título “Ultra High Resolution Dickerson-Drew Dodecamer B-DNA” y una secuencia 5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP* TP*TP*CP*GP*CP*G)-3' el cual fue escogido debido a que la forma “B” es la común en la naturaleza y su estructura fue obtenida por difracción de Rayos X 1.3 Å [28].

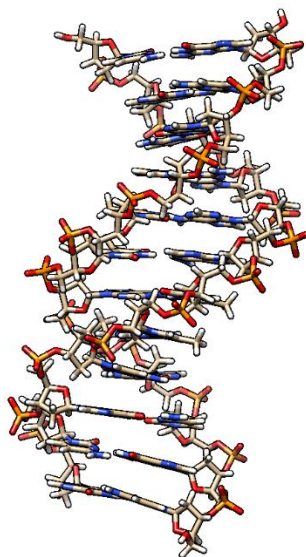


Figura 13. Estructura del Dodecámero de Drew Dickerson utilizado para la simulación (PDB ID: 4C64).

Fue necesario obtener una molécula de cafeína para realizar los cálculos pertinentes, la cual fue obtenida la base de datos ZINC15 [17] cuyo ID es ZINC00001084, que al ser analizada se observó que la geometría no estaba optimizada, por lo que fue sujeta a una optimización de geometría utilizando el Universal Force Field (UFF) [18] y comparando con resultados obtenidos por el cuerpo académico en trabajos pasados.

Al analizar la cafeína (Figura 14) se observa fácilmente que tiene 3 puntos donde pueden establecerse puentes de hidrogeno, los oxígenos unidos a los carbonos 2 y 6, así como el nitrógeno 9.

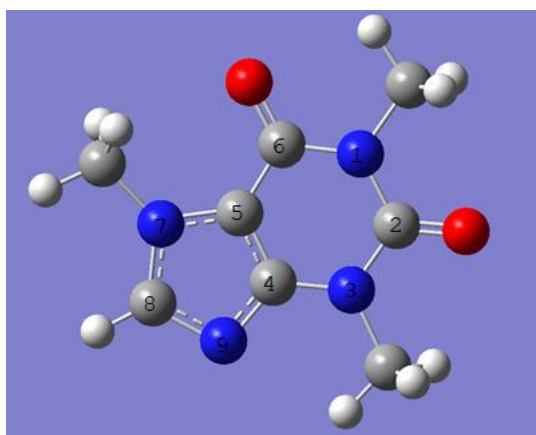


Figura 14. Molécula de cafeína donde se observan las zonas de unión, dos oxígenos unidos a los carbonos 2 y 6, así como el nitrógeno 9, capaces de formar puentes de hidrogeno.

El DNA tiene dos surcos, el mayor y el menor, por lo que al analizar estos detalles aparecen dos tipos de interacciones, la cafeína y uno de sus puntos de unión orientados a la zona de unión de las bases exceptuando las bases de los extremos del fragmento para evitar interacciones anómalas de stacking que podrían tener menor energía que las que se están buscando.

De igual manera es posible hacer la misma relación con una posición, donde la interacción se lleva a cabo entre dos zonas de la cafeína y dos del DNA, para cada uno de los surcos, mayor y menor, evitando de nuevo las interacciones por stacking.

Finalmente, y por estudiar un enlace diferente al puente de hidrogeno convencional, se estudia la interacción que se da entre el hidrogeno enlazado al carbono 8, para revisar interacciones C-H—O conocida como un puente de hidrogeno débil, que aparece frecuentemente en biomoléculas como aminoácidos, proteínas, DNA y RNA.

Al realizar el conteo de los 4 puntos simples y así como la interacción simultanea de dos puntos, por cada uno de los surcos se obtienen un total de 108 simulaciones a realizar, en las cuales se coloca la cafeína a una distancia prudente y se optimiza la geometría, pero primero es necesario caracterizar los compuestos que no están descritos en los campos de fuerza de AMBER, para que puedan ser modelados por el software.

2.7.2 Uso de AutoDock para el Docking Molecular.

Ya con los archivos preparados en formato MOL2, se prepararon los archivos en formato PDBQT con los cuales se inicia un docking con el programa AutoDock Vina [22], los cuales, al mostrar pocos sitios de unión, se concluyó en que era necesario realizar un análisis más profundo del dodecamero y de la cafeína para llevar a cabo la dinámica molecular.

2.7.3 Caracterización de la cafeína utilizando el GAFF en antechamber.

Previo al uso de xleap en AMBER [29] es necesario tener descritas todas las moléculas que intervengan en la dinámica molecular, en nuestro caso la única molécula no descrita es la cafeína, la cual por su naturaleza orgánica puede ser

descrita con gran exactitud por el General AMBER Force Field (GAFF) [30], para lo cual después de su optimización GAFF mediante antechaber debe calcular el tipo de átomo, la carga, los parámetros de Lennard-Jones, los parámetros de enlace, ángulos y ángulos de torsión, los cuales serán guardados en una librería la cual deberá ser cargada en xleap.

Una vez caracterizada cafeína, xleap reconocerá el residuo de cafeína y será posible preparar los archivos de parámetros-topología (extensión “.prmtop”) y de coordenadas (extensión “.rst7”).

Para realizar los archivos es necesario cargar los campos pertinentes, en este caso son el BSC1 [31], TIP3P y GAFF, seguido de los parámetros de iones los cuales son necesarios para la neutralización del fragmento, así como los parámetros ya calculados para la cafeína usando GAFF.

Durante el uso de xleap, es necesario agregar los iones necesarios para neutralizar la carga de los grupos fosfato del DNA, en este caso se agregan suficientes iones de Sodio (Na⁺), al tener la estructura en seco de nuestro complejo DNA-Cafeína, se debe escoger un solvente para lo cual se ha elegido agua, debido a que se asemeja al medio donde naturalmente se encuentra el DNA.

2.7.4 Minimización del complejo, previo a la dinámica molecular.

Es necesario minimizar el sistema, antes de realizar dinámica molecular, para eliminar cualquier contacto defectuoso creado por hidrogenación y solvatación, esto se logra en dos etapas, la primera utilizando un potencial restrictivo sobre el DNA y la cafeína de 500 kcal/mol de 500 pasos de un “steepest descent”; seguido de 1,000 pasos de “steepest descent” más pronunciado seguido de 1,500 pasos de minimización de gradiente conjugado sin restricciones.

2.7.5 Equilibrio inicial y Dinamica Molecular

Es esencial comenzar a ejecutar la dinámica molecular con un equilibrio inicial, para lo cual se ejecutarán 20 ps de calentamiento / equilibrio a volumen constante con límites periódicos de volumen constante con restricciones débiles (10 kcal / mol) en el DNA y la cafeína, con una temperatura inicial de 0 K, temperatura final de 5 K,

Finalmente, dentro de nuestra simulación se ejecutan otros 0.8 ns de MD. En esta etapa se utilizará una simulación sin restricciones en el DNA, se mantendrá la temperatura a 5 K utilizando el termostato Langevin, con límites periódicos de presión volumen constante, para simular agua líquida en las condiciones deseadas.

2.7.6 Análisis de trayectoria y cálculo de RMSD.

Para calcular RMSD (desviación cuadrática media de las coordenadas) de los átomos y conocer qué está sucediendo con la estructura del DNA, se necesita obtener el archivo cpptraj para volver a crear una imagen de toda la trayectoria y también eliminar las aguas del archivo.

En el análisis visual se observa de cerca la interacción cafeína-DNA y se cuentan los puentes de hidrogeno que se crearon entre estos, así como los puentes cafeína-agua-DNA, y se clasifican los resultados.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Interacción de cafeína con el dodecamero de Dickerson utilizando Docking Molecular.

Como primer paso para evaluar la interacción de cafeína con el DNA en un ambiente hidratado se realizó el docking molecular del complejo “Cafeína-dodecamero Dickerson”; para lo cual, fue necesario agregar la carga parcial de los dos elementos, se utilizó una carga de tipo Mulliken, se señalaron los grados de libertad de torsión de la cafeína, se delimitó un espacio en forma de paralelogramo que permitiera excluir las interacciones de tipo “Stacking” entre la cafeína y los extremos del fragmento de DNA, finalmente se efectuó el docking entre la cafeína y el dodecamero completo. Se obtuvieron diversas configuraciones de las interacciones con cafeína. En la Figura 15 se muestra la configuración más favorable con una energía de -6.4 kcal/mol, esta estructura se utiliza como referencia geométrica para las demás estructuras como se muestra en la Tabla 3, en la segunda columna se muestra la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas con respecto al primer resultado, en las siguientes columnas se muestran los puentes de hidrógenos formados entre la cafeína y el fragmento de DNA, así como la cantidad de átomos involucrados en estos enlaces.

Tabla 3. Resultados del Docking Molecular entre el dodecamero de Drew Dickerson y la cafeína.

Energía (Kcal/mol)	R.M.S.D.	Puentes de H.	Átomos del ligando en un puente de H.	Átomos del DNA en un puente de H.
-6.4	0	2	1	2
-6.3	1.827	2	1	2
-6.3	1.61	2	1	2
-6.3	1.005	2	1	2
-6.0	1.771	1	1	1
-5.9	1.632	2	1	2
-5.8	1.169	2	1	2
-5.8	1.636	2	1	2
-5.8	1.245	2	1	2

Todos los resultados del Docking obtuvieron una desviación de la media cuadrática (R.M.S.D.) muy parecida, es evidente que la cafeína tiene un lugar predilecto para interactuar con el DNA, lo cual se observa en la Figura 15, donde claramente se ve que los nucleótidos involucrados son la Citosina y Guanina, que en la secuencia de la cadena A del dodecamero ocupan los lugares 9 y 10, así como su respectivo complemento de la cadena B.

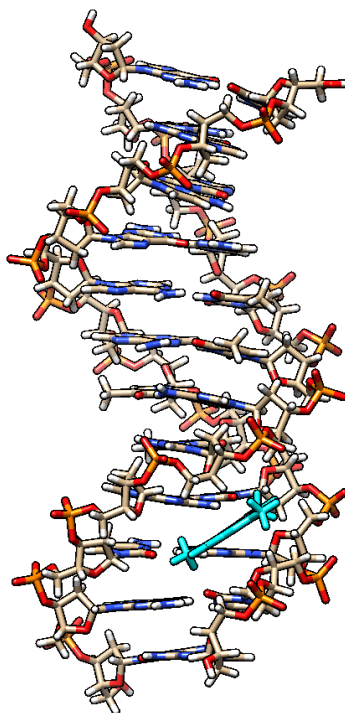


Figura 15. Zona de interacción entre el dodecamero y cafeína (cian), la cual involucra a las bases 9 y 10 de la secuencia, C y G respectivamente.

En la Figura 16 se realiza un acercamiento donde se observan los diversos tipos de interacciones que tiene la cafeína con el DNA, comprobando que tanto los oxígenos de los carbonos 2 y 6, como el nitrógeno 9, son capaces de formar puentes de hidrogeno con la cadena.

Al evaluar este resultado, salta a luz que el docking solo es capaz de revelar una zona de menor energía, lo cual genera el problema de como poder simular interacciones menos favorecidas a lo largo de la cadena, tanto en el surco mayor como en el menor.

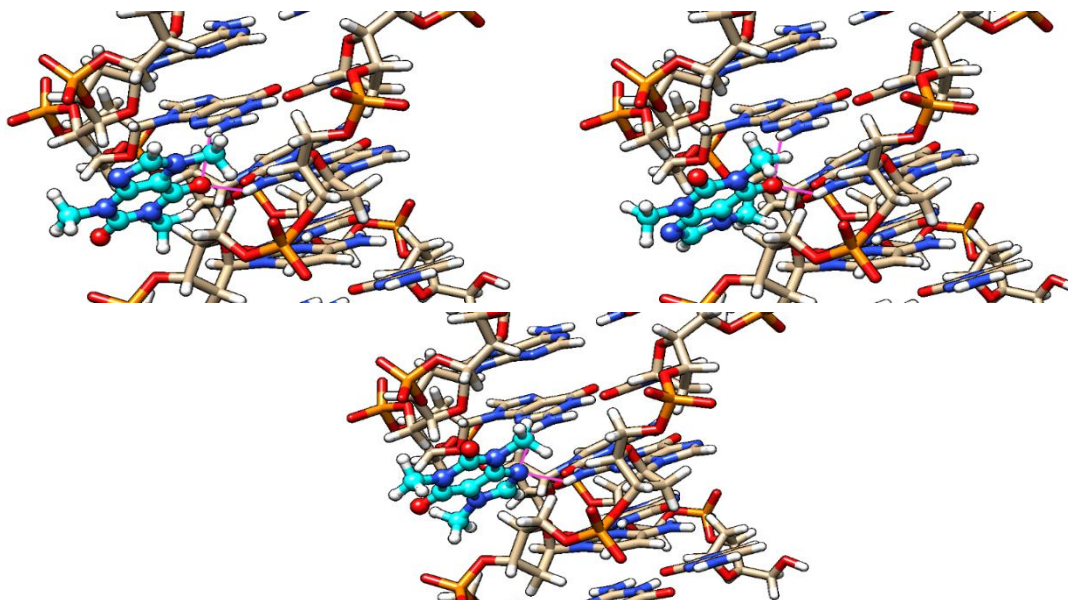


Figura 16. Interacciones entre la cafeína y el dodecamero, se observan las diferentes zonas de formación de enlaces de hidrogeno (violeta) de la cafeína (cian) con la cadena, a) Oxígeno del carbono 6, b) Nitrógeno 9, c) Oxígeno del carbono 2.

Se realizó una serie de cálculos de docking, donde se seccionó la cadena en fragmentos de 2 dinucleótidos, para encontrar las geometrías de inicio que se utilizaron como punto de partida de la dinámica molecular, debido a que estos resultados no trascienden más allá de ser simples puntos de partida y debido a su gran número se omiten en este párrafo.

3.2 Hidratación de dodecamero de Dickerson utilizando el potencial de interacción GAFF de AMBER

Para llevar a cabo la dinámica molecular de la interacción del dodecamero con la cafeína en ambiente explícito acuoso, fue necesario hidratar el dodecamero de Drew Dickerson, para lo cual se delimitó un volumen en forma de paralelepípedo en el cual el átomo más cercano de la doble hélice al borde del paralelepípedo se encuentra a 10 Å, por lo tanto las dimensiones del paralelepípedo son de 55.056 Å de largo, 54.554 Å de ancho y 68.898 Å de altura, con un volumen total de 206934.529 Å³, en el cual se añadieron 4885 moléculas de agua.

En la Tabla 4 se presentan los ángulos de torsión y el empaquetamiento de la molécula del azúcar (desoxirribosa), después de un periodo de tiempo de 0.8 ns y

las condiciones estandarizadas de una temperatura de 5 K y un ensamble NVT, en la Tabla se muestran los resultados de la posición promedio de los últimos 0.4 ns donde ya se ha alcanzado el equilibrio del sistema, se observa que los ángulos se mantuvieron en un rango similar a los del dodecamero en la estructura cristalizada, con excepción de ángulo ζ que sufrió un cambio de -10° en promedio, sin que se vea alterada su desviación estándar, lo cual puede explicarse por el empaquetamiento que sufre la cadena al formarse el cristal.

Tabla 4. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson, después de una simulación de 0.8 ns, a 5 K y volumen constante.

Residuo	Ángulos ($^\circ$)						
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
1 C	---	---	300.8	154.8	-177.6	-85.5	-101.5
2 G	-66	163.5	55.3	86.8	-177.1	-85.3	-128.3
3 C	-67.1	165.3	61.3	99.7	-184.4	-91.2	-119.4
4 G	-59	182.5	60.1	150.6	-198.9	-86.8	-87.4
5 A	-68.4	193.1	54.1	138.5	-186	-91.2	-95.3
6 A	-65.7	173.3	53.4	98.5	-182.3	-88	-126.7
7 T	-55.4	162.3	63.9	122.9	-173.8	-108.8	-130.7
8 T	-65.9	174.9	59.6	136.8	-181.1	-88	-112.5
9 C	-51.5	154.8	70.7	81.8	-131	-89.1	-163.1
10 G	-73.6	152.5	60.9	152.3	-97.5	-196.4	-88.1
11 C	-90.7	156.6	51.1	131.2	-176.8	-92.3	-123.9
12 G	-63	178.9	54.7	143.6	---	---	-97.3
1 G	-70.8	184.8	47.9	84.5	---	---	-132.2
2 C	-52.8	114.7	49.2	79.2	-165.4	-71.9	-144.9
3 G	-80.9	168.6	46.6	136.4	-136.3	-199.1	-77
4 C	-61.6	174.9	61.6	138.9	-153.4	-80.2	-115.9
5 T	-66.7	161	60.9	87.6	-179.9	-82.4	-143.1
6 T	-58.9	162.7	58.3	109.3	-174.8	-88.6	-127.2
7 A	-66.7	183	53.2	136.4	-177.3	-92.6	-105.1
8 A	-56.2	201	49.1	142.1	-187.9	-90.8	-102
9 G	-62.2	172.5	67.2	144.4	-196	-93.9	-105.2
10 C	-70.1	169.2	59.1	83.5	-173.8	-79.9	-136.5
11 G	-65.8	187.3	46.4	139.7	-184.6	-99.8	-98.2
12 C	---	---	58.3	136.6	-181.7	-94.2	-116.7
Media	-65.4	169.9	56.6	121.5	-171.7	-98.9	-115.8
$\pm DS$	8.9	17.6	6.5	26.3	23.3	32.8	20.9

Durante el proceso se formó una espina de hidratación en torno al surco menor que se visualiza en la Figura 17, lo que se compara con los resultados encontrados por Dickerson y Drew en 1981 [32], se encontró una estructura ordenada y regular, Dickerson y Drew afirman que esta espina de hidratación no puede atribuirse al empaquetamiento del cristal realizado en su trabajo, lo cual queda conformado por la simulación realizada en el presente.

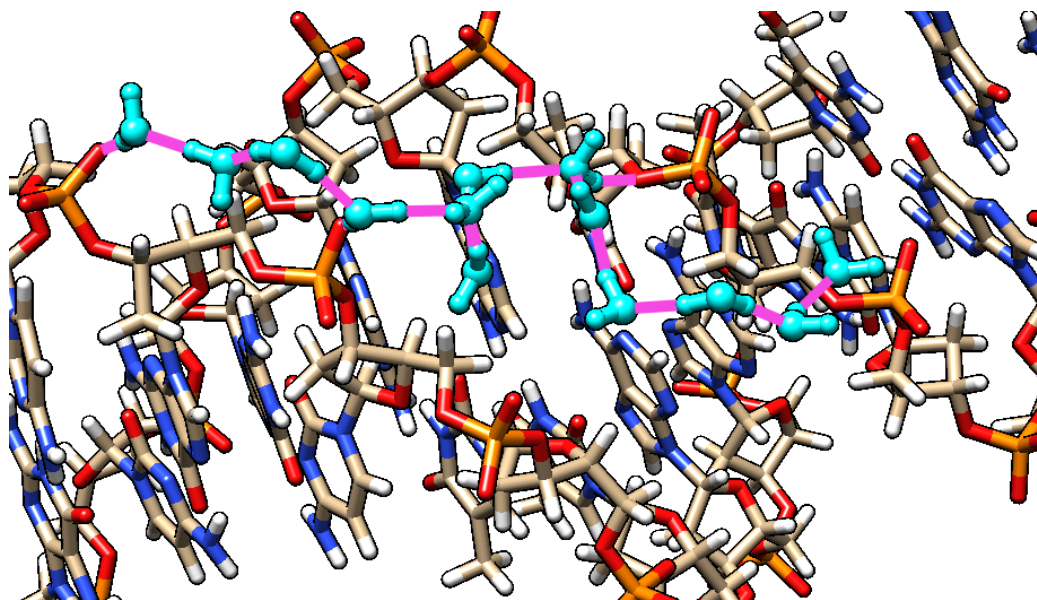


Figura 17. Espina de hidratación encontrada en el proceso de hidratación de las simulaciones realizadas, se aprecian la organización y regularidad que caracteriza a la espina del dodecamero hidratado. Las moléculas de agua están en color cian y en violeta se marcan los puentes de hidrógeno.

Sin embargo, al tratarse de procesos en condiciones físicas diferentes, aparecen ciertas diferencias en los enlaces de las espinas de agua respecto al dodecamero cristalizado, realiza sus enlaces de hidrogeno directamente con los grupos N3 en la adenina y O2 en la guanina, sin embargo, la técnica utilizada por Dickerson y Drew no toma en cuenta la orientación de los hidrógenos, simplemente la posición de lo oxígenos de la molécula de agua, en cambio en el presente se discrimina el ángulo de formación del enlace, aun así se encontraron oxígenos en distancias de formación de puentes de hidrógenos como se muestra en la Figura 18 sin embargo los software utilizados descartaron estos enlaces debido a los ángulos de formación.

La formación de puentes de hidrogeno en el esqueleto azúcar-fosfato del dodecamero se dio de forma desordenada, así como también lo encontraron Drew y Dickerson, las similitudes encontradas en la hidratación de la simulación y la estructura cristalizada avalan las condiciones propuestas en el presente, y las diferencias encontradas se explican por la naturaleza del proceso de cristalización en la difracción de rayos.

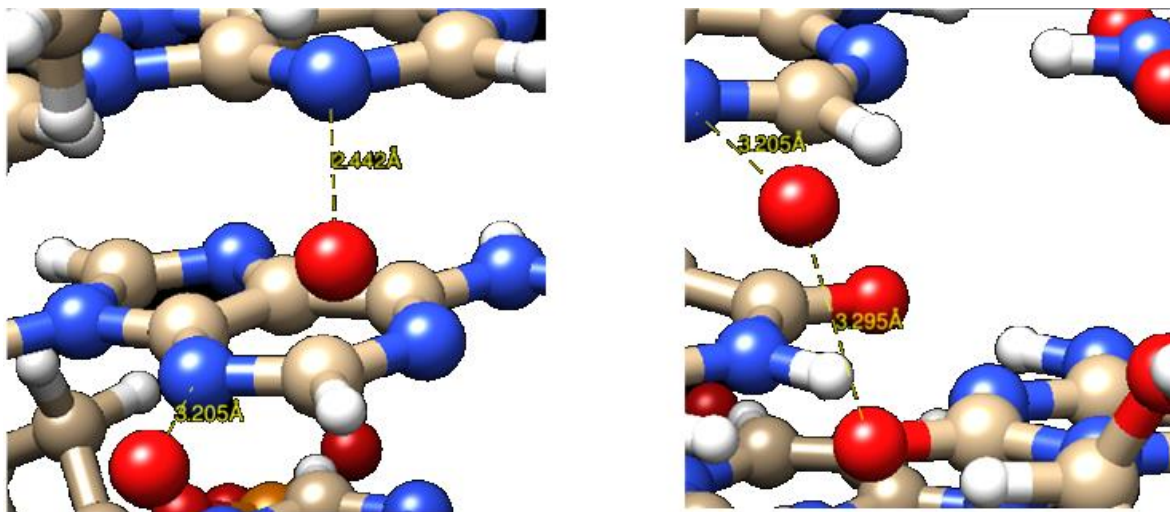


Figura 18. Distancias entre los oxígenos de diferentes moléculas de agua y el átomo N3 de las adeninas de los pares 7 y 8 (Izquierda) y entre la citosina del par 9 (derecha) en el dodecamero hidratado, las distancias se encuentran entre los 2.2 y los 3.5 Å.

3.3 Interacción de la cafeína con el dodecamero de Dickerson utilizando diferentes potenciales de interacción AMBER.

3.3.1 La molécula de cafeína

En la Figura 19 se muestra la molécula de cafeína con la nomenclatura correspondiente a la Tabla 5, como se observa, esta nomenclatura no coincide con la tercera columna que representa los tipos de átomos los cuales se describen en la cuarta columna, sin embargo, para un campo de fuerzas estas etiquetas son simplemente una identificación para reconocer y asociar las características según el tipo de átomo y su posición en la molécula.

Las características asociadas a cada átomo se resumen en la Tabla 5, los tipos de átomos se utilizan para llevar a cabo la dinámica molecular, con el software AMBER.

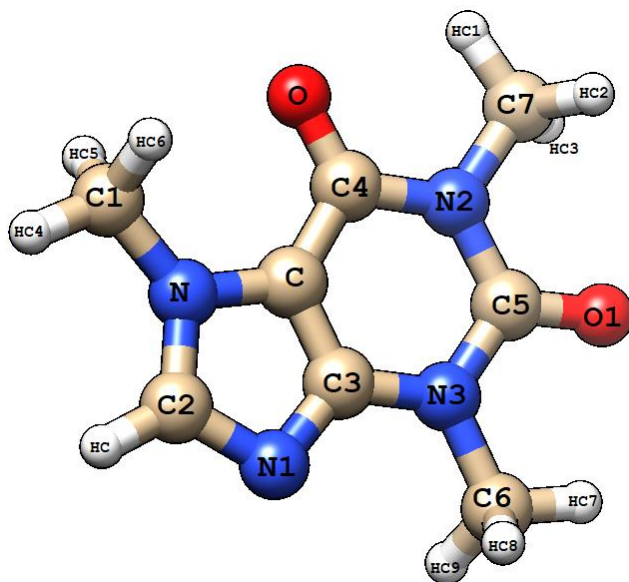


Figura 19. Numeración de la cafeína leída por el GAFF, para su caracterización.

Las cargas calculadas para los átomos de la molécula de cafeína son equiparables con las cargas descritas en el campo de fuerzas BSC1, por lo que se aceptan los encontrados por el GAFF como correctos y proseguir con la dinámica molecular. En cuanto a la identificación de los átomos se aceptan fácilmente que los hidrógenos de HC1 al HC9 pertenecen a grupos metilo, cuyos carbonos son alifáticos, por otro lado el hidrogeno HC se encuentra en el anillo imidazol de la de la cafeína el cual es aromático lo cual es una contradicción con lo reportado por antechamber utilizando GAFF, debido a que ambos oxígenos se encuentran en un doble enlace, la deducción sobre ellos es correcta, los nitrógenos, N2 y N3, en el anillo de 6 elementos son parte de los grupos aminas junto con los oxígenos, por otro lado el nitrógeno N es un nitrógeno con 3 sustituciones y el N1 es el donador de electrones para darle la característica aromática al anillo imidazol, por lo que la caracterización de los nitrógenos es correcta, finalmente los carbonos, C1, C6 y C7, son carbonos metílicos con la hibridación sp^3 , los carbonos en el anillo imidazol, C, C2 y C3, son carbonos aromáticos cuyos electrones forman enlaces π , en cuanto a los carbonos de los grupos amino su hibridación es sp^2 , al hacer la revisión de la caracterización por GAFF encontramos que aunque las cargas son válidas, GAFF tiene problemas en detectar el tipo de átomo que es el carbono C2 en el anillo imidazol, ya que este lo detecta como alifático y en realidad es aromático.

Tabla 5. Caracterización de los átomos en la molécula de cafeína dentro del campo de fuerzas GAFF.

Nombre	Elemento	Tipo	Descripción	Carga
C	Carbono	cc	Carbono interno sp^2 en sistemas de anillos conjugados.	-0.350200
C1	Carbono	c3	Carbono sp^3	0.009600
C2	Carbono	cc	Carbono interno sp^2 en sistemas de anillos conjugados.	0.443400
C3	Carbono	cd	Carbono interno sp^2 en sistemas de anillos conjugados.	0.485200
C4	Carbono	c	Carbono sp^2 en $C = O$, $C = S$	0.765100
C5	Carbono	c	Carbono sp^2 en $C = O$, $C = S$	0.814500
C6	Carbono	c3	Carbono sp^3	0.090300
C7	Carbono	c3	Carbono sp^3	0.080300
N	Nitrógeno	na	Nitrógeno sp^3 con tres sustituciones.	-0.148900
N1	Nitrógeno	nd	Nitrógeno interno sp^2 en sistemas de anillos conjugados	-0.685000
N2	Nitrógeno	n	Nitrógeno sp^2 en aminas.	-0.483400
N3	Nitrógeno	n	Nitrógeno sp^2 en aminas.	-0.417300
O	Oxígeno	o	Oxígeno sp^2 en $C = O$	-0.633500
O1	Oxígeno	o	Oxígeno sp^2 en $C = O$	-0.637500
HC	Hidrogeno	h5	Hidrogeno en un carbono alifático con dos grupos captadores de electrones	0.071100
HC1	Hidrogeno	h1	Hidrogeno en un carbono alifático con un grupo captador de electrones	0.063367
HC2	Hidrogeno	h1	Hidrogeno en un carbono alifático con un grupo captador de electrones	0.063367
HC3	Hidrogeno	h1	Hidrogeno en un carbono alifático con un grupo captador de electrones	0.063367
HC4	Hidrogeno	h1	Hidrogeno en un carbono alifático con un grupo captador de electrones	0.071700
HC5	Hidrogeno	h1	Hidrogeno en un carbono alifático con un grupo captador de electrones	0.071700
HC6	Hidrogeno	h1	Hidrogeno en un carbono alifático con un grupo captador de electrones	0.071700
HC7	Hidrogeno	h1	Hidrogeno en un carbono alifático con un grupo captador de electrones	0.063367
HC8	Hidrogeno	h1	Hidrogeno en un carbono alifático con un grupo captador de electrones	0.063367
HC9	Hidrogeno	h1	Hidrogeno en un carbono alifático con un grupo captador de electrones	0.063367

Pero para muchos autores tanto el anillo imidazol como el de 6 elementos cuentan con características aromáticas, pero estudios computacionales revelan que la aromaticidad de la cafeína se centra en el anillo imidazol [33].

3.3.2 Interacción de cafeína con el dodecamero de Dickerson en agua utilizando Dinámica Molecular

Se realizaron 108 simulaciones del complejo “DNA-Cafeína” en AMBER, con el campo de fuerzas BSC1 que es compatible con los parámetros obtenidos para la cafeína con GAFF, de las trayectorias obtenidas se extrajeron las estructuras promedio de cada simulación y se evaluaron las distancias inter e intramoleculares con el software UCSF Chimera con la herramienta “Find Clashes/Contacts” donde se definió una superposición menor a 0.6 Å en sus interacciones de Van der Waals para descubrir alguna anomalía causada por las estructuras utilizadas o durante la dinámica molecular.

Las anomalías encontradas, fueron principalmente de dos tipos, en la primera, 3 enlaces estaban comprometidos, en el grupo metilo de la séptima base (Timina) del dodecamero, la distancia C-H reportada fue de 1.0438 Å, lo cual es menor a la distancia típica, sin embargo, al tratarse de una estructura promedio durante el tiempo de simulación esta anomalía no es trascendental en el análisis.

La segunda anomalía se dio en la primera base del dodecamero (Citocina) donde las distancias N-H del nitrógeno unido al carbono 4, tenía una distancia promedio de 1.009 Å, y la distancia normal es de 1.1 Å, de nuevo una anomalía probablemente causado por tratarse de una estructura promedio en el tiempo.

No existieron anomalías intermoleculares, que suelen ser las que conducirían a una simulación deficiente, a pesar de las anomalías anteriormente descritas los resultados obtenidos son aceptables, por lo tanto, continuamos con el análisis de las estructuras.

La cafeína en interacción con el dodecamero durante las simulaciones adquirió una posición acorde al surco donde se encuentra (Figura 20), lo que se traduce como

un efecto estabilizador sobre la cafeína dentro de los surcos mayor y menor, lo cual refuerza las posiciones planteadas por el docking molecular.

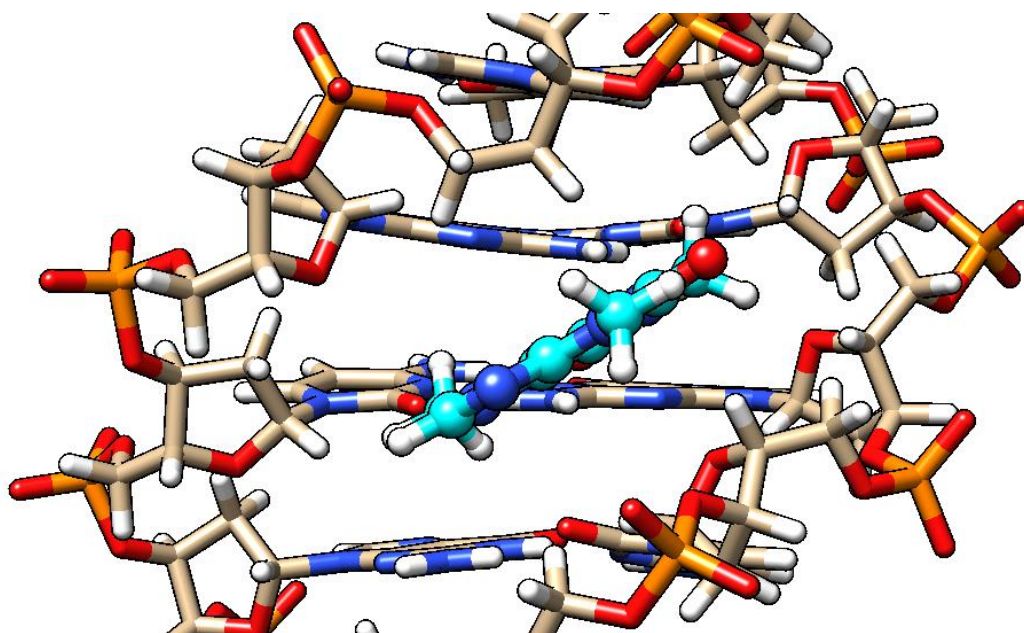


Figura 20. Posición adquirida por la cafeína (cian) dentro del surco menor en interacción con el dodecamero entre la posición A6 y T7 (el centro del dodecamero).

3.3.3 Formación de enlaces de hidrógeno en la interacción Cafeína-dodecamero.

Las 108 simulaciones realizadas, las estructuras obtenidas se pueden organizar en dos grandes grupos, el primero está formado de las estructuras donde las interacciones de los átomos donadores de enlaces H, de cafeína se ponen en contacto dos de sus aceptores del dodecamero de DNA, las cuales van de la siguiente forma: el oxígeno del carbono 2 con el nitrógeno 9, y otra donde se colocan los oxígenos de los carbonos 2 y 6, posiciones que se etiquetan como O1 y O6, por las etiquetas asignadas en el archivo utilizado para la cafeína; en el segundo grupo, de contacto simple, la cafeína forma solo un puente de hidrogeno orientado a la doble hélice, los oxígenos de los carbonos 2 y 6 , el nitrógeno 9, y el hidrogeno del carbono 8.

En cuanto a la formación de enlaces de hidrogeno, en algunos casos se formaron puentes directos de la cafeína con las bases como se observa en la Figura 21 donde el oxigeno de cafeína interactúa con uno de los hidrogenos del grupo amina del

carbono 6 de adenina, pero muchas veces también aparecieron puentes de hidrogeno de la forma “cafeína-agua-DNA” donde el oxígeno del carbono 2 de la cafeína se enlaza con el nitrógeno 7 de guanina a través de una molécula de agua, los resultados obtenidos se enlistan en las tablas Tabla 6 y Tabla 7, no se discrimina la localización de la cafeína, y se engloban los resultados tanto para el surco mayor como en el surco menor, y no se toma en cuenta el enlace C-H...O.

Tabla 6. Puentes de hidrogeno formados en el complejo cafeína-DNA, en las diversas simulaciones de contacto doble.

Bases	Zona de Contacto			
	C7		C6	
	CAF – DNA	CAF – H2O – DNA	CAF – DNA	CAF – H2O – DNA
GC	0	2	0	2
CG	1	0	1	1
GA	1	2	1	1
AA	1	0	1	0
AT	1	1	2	0
TT	1	0	1	0
TC	2	1	0	2
CG	0	2	1	0
GC	1	2	1	1

Tabla 7. Puentes de hidrogeno formados en el complejo cafeína-DNA, en las diversas simulaciones de contacto simple.

Bases	Zona de Contacto							
	O1		O8		HC		N1	
	CAF-DNA	CAF-H2O-DNA	CAF-DNA	CAF-H2O-DNA	CAF-DNA	CAF-H2O-DNA	CAF-DNA	CAF-H2O-DNA
GC	0	2	0	1	1	1	0	2
CG	1	0	1	2	0	0	1	1
GA	1	1	1	0	1	0	1	0
AA	0	1	0	1	1	2	0	2
AT	1	1	1	2	1	1	1	0
TT	1	2	2	0	0	0	1	1
TC	1	1	0	1	1	1	1	0
CG	1	0	1	1	0	1	0	2
GC	1	1	1	1	1	1	1	0

Los puentes de hidrogeno formados en el complejo “DNA-cafeína”, muestran que con la interacción (Figura 21 y Figura 22), existe una deformación en la hélice, que será analizada más adelante.

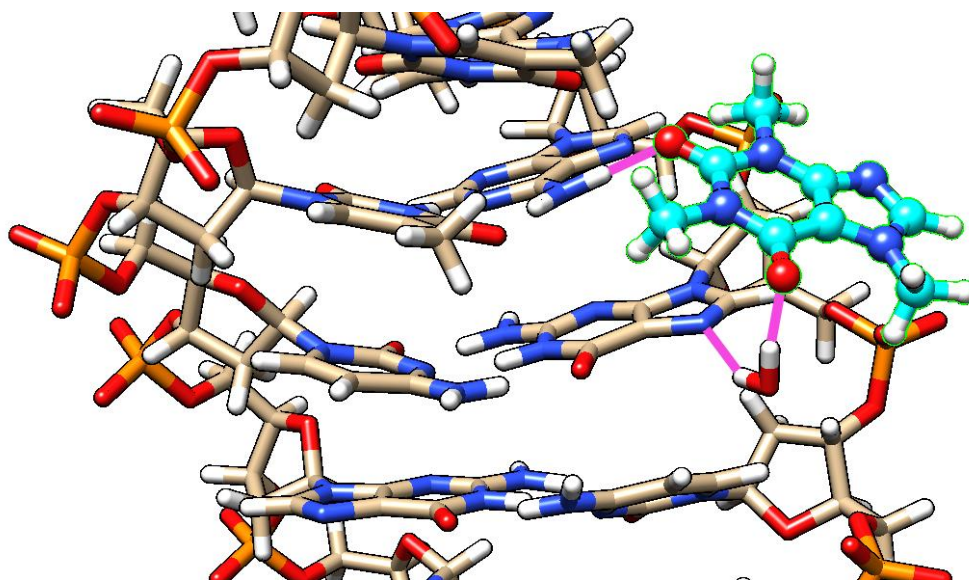


Figura 21. Ejemplo de la formación de un puente de hidrogeno formado entre la cafeína y una base del dodecamero, así como la formación de una unión del tipo CAF-H2O-DNA, de cian la cafeína y de violeta los enlaces de hidrogeno.

En el esquema de la Figura 23, se muestran las diversas posiciones de una molécula de cafeína en interacción con las bases en el surco mayor del DNA. En el esquema resumimos las posiciones de la cafeína en el DNA, sin embargo las simulaciones se hicieron de una molécula de cafeína con el DNA, desde la secuencia de bases 2G3C hasta 10G11C, también en la figura se muestran las distancias promedio formadas en las diversas simulaciones representadas por diferentes colores (en rojo los enlaces entre el dodecamero y el átomo O2 de la cafeína, en verde los enlaces entre el dodecamero y el átomo O6 de la cafeína y en azul los enlaces entre el dodecamero y el átomo N9 de la cafeína.), Se observa que la cafeína se puede colocarse a lo largo del surco mayor formando enlaces de hidrogeno con casi todas las bases a diferencia de lo que pasa en el surco menor donde en la parte central (secuencia AATT) no se presentan enlaces H.

También se nota que la cafeína prefiere para formar enlaces H con las bases Adenina y Citosina, esto se puede explicar porque la cafeína tiene 3 grupos aceptores de protones y Adenina y Citosina en el surco mayor contienen donadores de protones en N6 y N4, en cambio la Guanina con cuenta solo con aceptores de protones, O6 y N7, de igual manera la Timina cuenta con un aceptor, el O4; por lo que es prácticamente imposible la formación de enlaces de hidrogeno con la cafeína.

En el surco menor, la formación de enlaces se ve muy disminuida, se aprecia en la Figura 24, con la misma simbología que en la Figura 23, que a pesar de que existe evidencia que la cafeína interrumpe la espina de hidratación formada en la zona AATT del dodecamero, no existe la formación de enlaces de hidrogeno debido a que, en el surco menor, los átomos expuestos de estas bases son aceptores de protones, O2 para la Timina y el N3 para la adenina, sin embargo en esta posición existen interacciones del tipo C-H...O como se observa en la Figura 25, la distancias que se encontraron para este tipo de interacción estuvo entre 3.00 y 4.00 Å, lo que concuerda con las distancias encontradas por Desiraju [34] para los enlaces de este tipo.

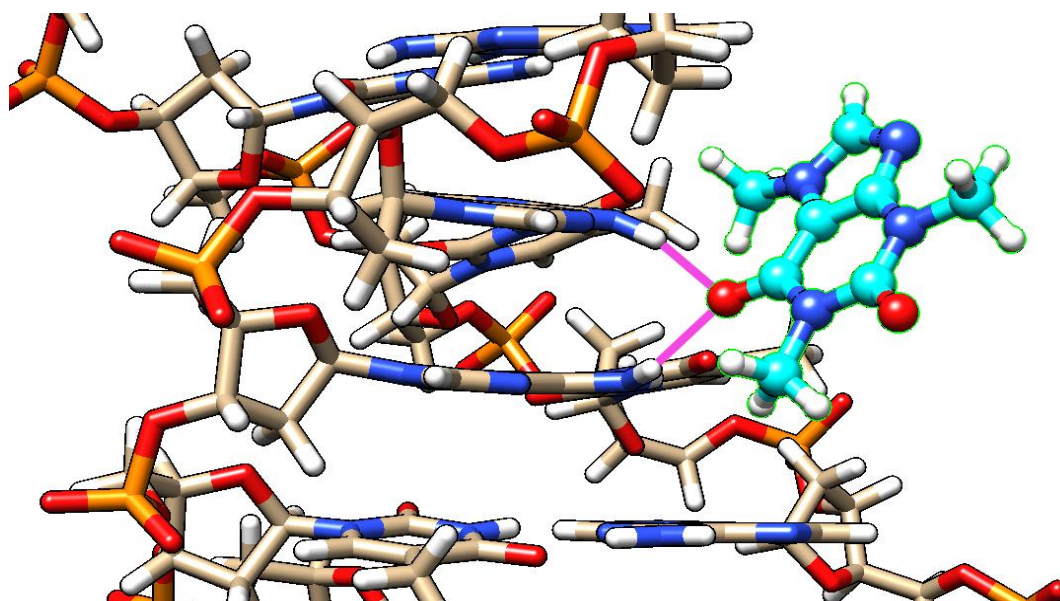


Figura 22. Ejemplo de la formación de dos puentes de hidrogeno (violeta) formados entre la cafeína (cian) y dos bases del dodecamero, se observa la deformación de la cadena causada por esta interacción.

Las interacciones encontradas en el presente trabajo, fueron comentadas igualmente por Kalugin [14], tanto las interacciones en el surco menor como las del surco mayor fueron descritas, y se encontró que los segmentos 5'-GAA en el surco menor son los predilectos para la formación de interacciones donde no se forman enlaces de hidrogeno convencionales, en dicho trabajo también se estudió el efecto de elevar la concentración de cafeína.

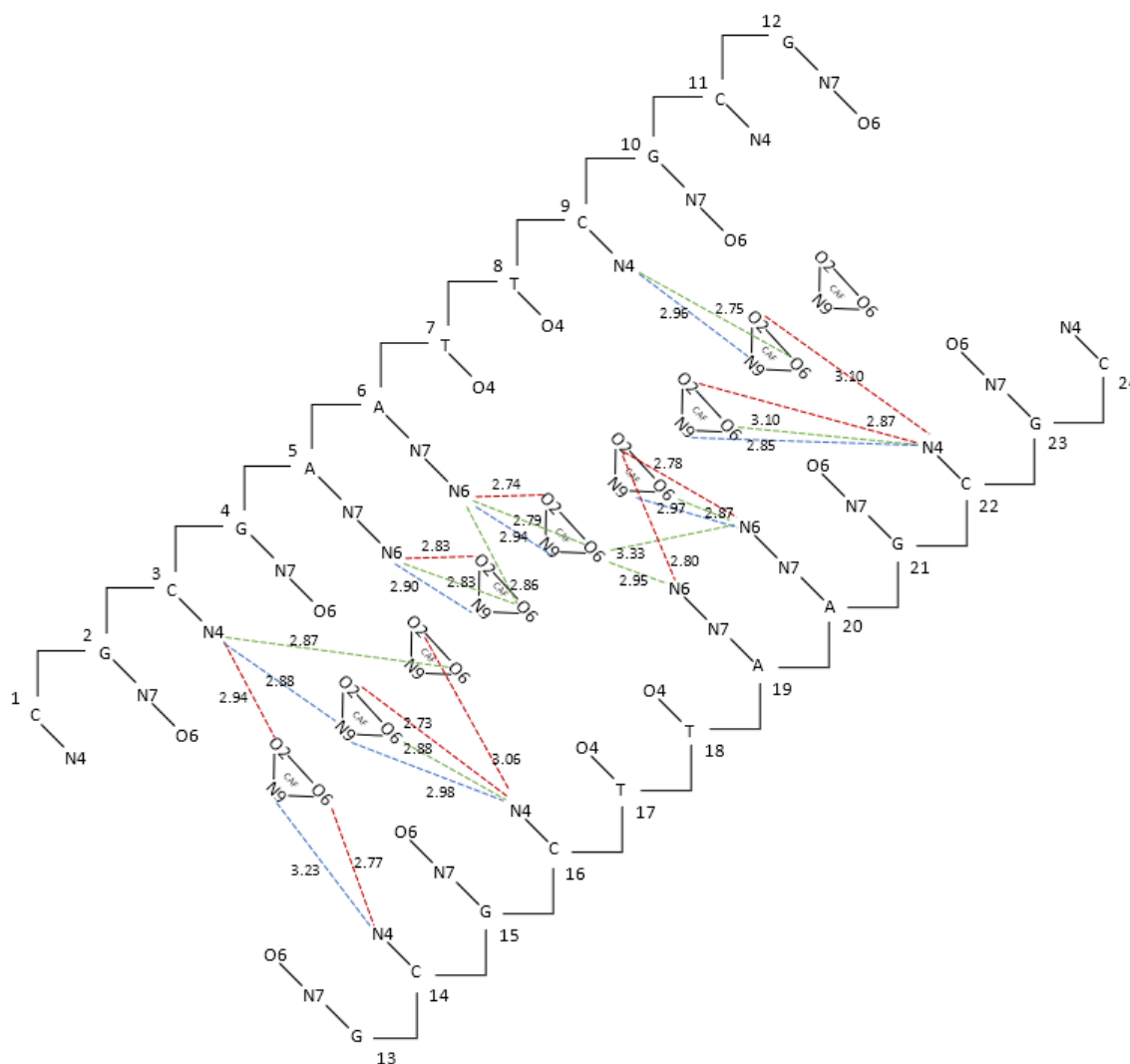


Figura 23. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco mayor en rojo los enlaces entre el dodecamero y el átomo O2 de la cafeína, en verde los enlaces entre el dodecamero y el átomo O6 de la cafeína y en azul los enlaces entre el dodecamero y el átomo N9 de la cafeína.

Es interesante comentar que encontramos configuraciones donde la molécula de cafeína interacciona entre dos bases que corresponden a las dos cadenas complementarias, es decir la cafeína hace un puente entre las dos cadenas de la doble hélice, consideramos que esto podría estabilizar el fragmento ante las posibles deformaciones de las hélices por la interacción de cafeína.

Las configuraciones de las interacciones individuales de cafeína con el dodecamero se encuentran en el Apéndice B.

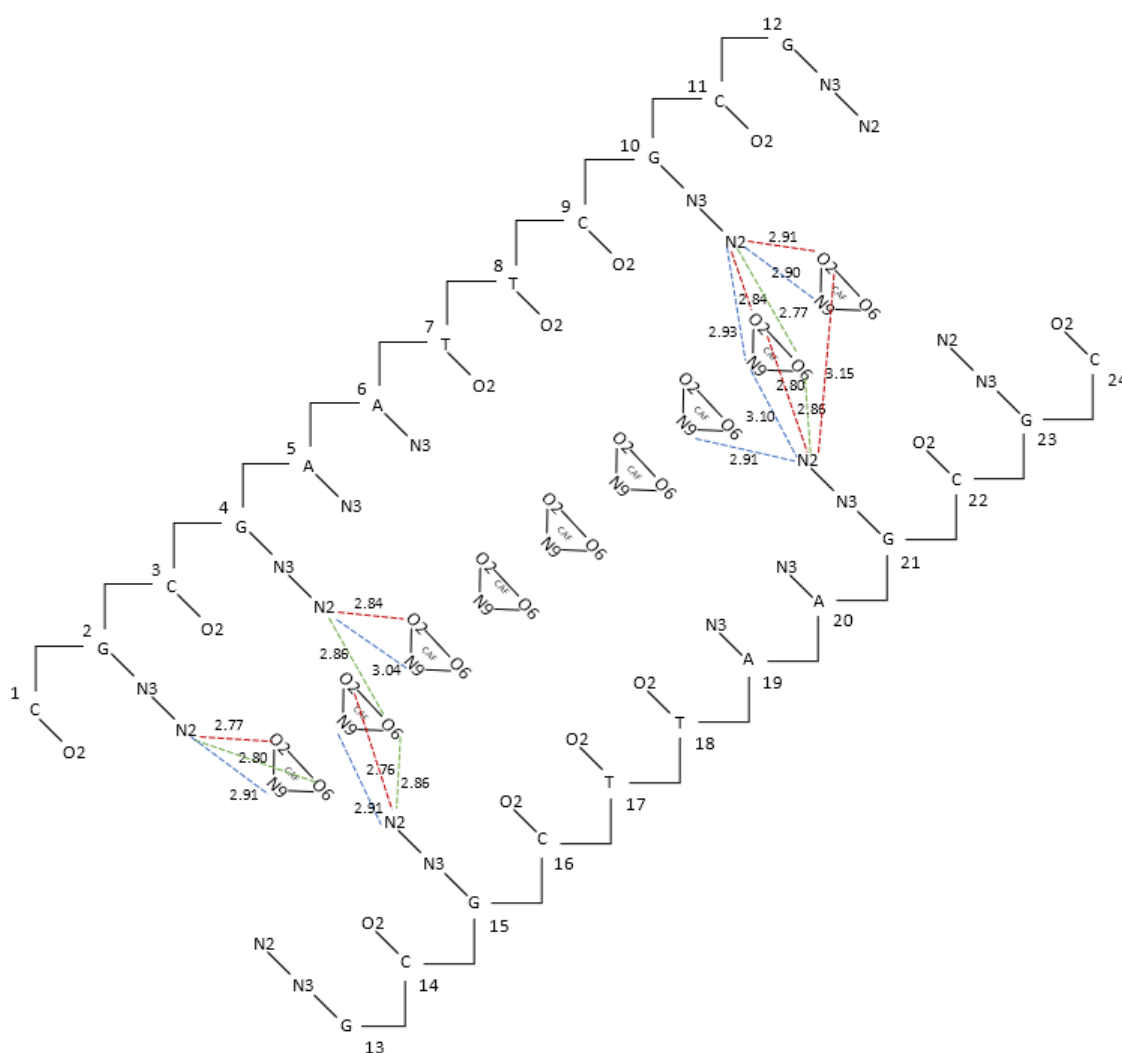


Figura 24. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco menor mayor en rojo los enlaces entre el dodecamero y el átomo O2 de la cafeína, en verde los enlaces entre el dodecamero y el átomo O6 de la cafeína y en azul los enlaces entre el dodecamero y el átomo N9 de la cafeína.

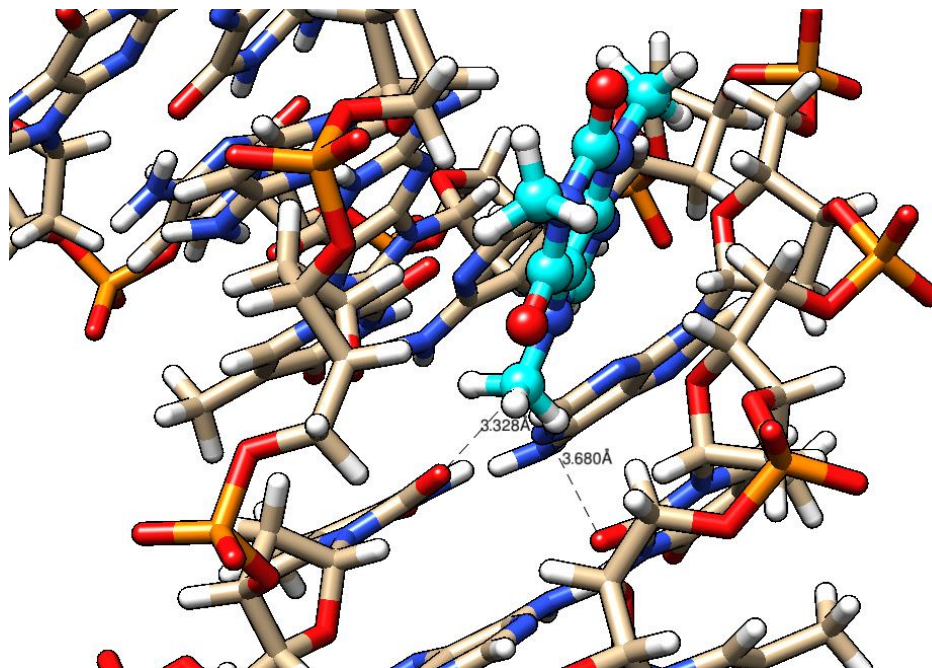


Figura 25. Formación de puentes de hidrogeno de la forma C-H...O, en el surco menor entre las dos bases del dinucleótido 7, TA.

3.3.4 Estructura del esqueleto azúcar fosfato de “cafeína-dodecamero” en agua.

Los ángulos de torsión del esqueleto azúcar fosfato cambiaron durante la simulación sin perder la forma B, las tablas con los promedios de los ángulos de torsión para cada zona de contacto se incorporan en el Apéndice B, los ángulos de torsión de las estructuras promedio de cada una de las bases del dodecamero en contacto con la cafeína por el surco mayor se muestran en la Tabla 8, se observa que la estructura B del DNA se conserva y que en la mayoría de las interacción no existe una deformación notoria del dodecamero, sin embargo en la base 9C existe un cambio grande en los ángulos de torsión, con un aumento de 11.5° en el ángulo α , una disminución de 26.1° en el ángulo β , un aumento de 17.7° en el ángulo γ , una disminución de 55.4° en el ángulo δ , un aumento de 33° en el ángulo ε , una leve disminución de 5.5° en el ángulo ζ y una disminución de 43.6° en el ángulo χ , lo cual, salvo por el ángulo ζ donde no se aprecia un cambio significativo, el cambio que ocurre en los ángulos α , β y ε es más grande que una desviación estándar, un cambio de dos desviaciones ocurre para el ángulo δ y finalmente un cambio de tres veces la desviación estándar para γ y χ .

Los cambios en esta base solo se dan en la base citosina, en su base apareada la guanina, no se observan cambios en los ángulos, lo cual se explica debido a que en el surco mayor la cafeína interacciona con la citosina en los pares de bases CG, por el cambio que sufre el ángulo χ en de un solo lado, indicaría un cambio en los parámetros Buckle, Propeller, h-Rise, etc, sin embargo es necesario aumentar el número de simulaciones y el tamaño de la cadena para realizar estimaciones de este tipo de cambios.

Tabla 8. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con cafeína colocada entre las diversas bases en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	296.9	147.1	-177.7	-99.7	-111.7
2 G	-84.4	188.8	45	140.6	-173.7	-103.4	-107.6
3 C	-73.1	165.7	58.2	95.7	-166.5	-91.5	-130.3
4 G	-58.8	174.3	63.4	145.9	-185.1	-100	-102.4
5 A	-63.3	180.3	55.5	145.9	-184.5	-86	-104
6 A	-66.2	169.8	55	114.6	-177.4	-98.8	-120.9
7 T	-64.3	169.4	58.7	112.7	-177	-94.1	-134.1
8 T	-63.2	171.2	63	128.7	-186	-94.6	-123.7
9 C	-63	180.9	53	137.2	-164	-83.6	-119.5
10 G	-68.4	166.6	54.8	141.6	-100.8	-203.3	-100.8
11 C	-75.5	146.1	48.4	135.8	-175.2	-89.4	-120.9
12 G	-74.5	172.9	52.8	132.7	---	---	-102.2
1 G	-73.1	175.5	54.6	85.8	---	---	-141.1
2 C	-68.7	119.9	55	82.1	-163.4	-71	-153.3
3 G	-82.5	167.6	48.2	137.7	-131.2	-183.7	-91.5
4 C	-66.8	182.6	53.6	134.2	-158.3	-87.2	-113.6
5 T	-62.6	178.7	56	123.9	-180.7	-94.4	-126
6 T	-66.9	171.4	57.4	110.4	-178.6	-94.5	-135.9
7 A	-64.4	165.8	57	125.7	-174.2	-92.5	-126.2
8 A	-61	186.2	55.9	141.6	-180.4	-93.7	-111.9
9 G	-60.4	173.6	66.2	145.7	-190	-93.6	-106.6
10 C	-63.6	150.1	61.4	82.5	-180.4	-80.8	-138.2
11 G	-85	186.5	44.2	146.3	-153.7	-138.2	-111.8
12 C	---	---	62.2	123.8	-168.9	-96.9	-111.9
Media	-68.6	170.2	55.6	125.8	-169.4	-103.2	-118.6
$\pm DS$	7.7	15.4	5.6	21	20.1	31.8	15

En la Figura 26, se observa la apertura de los ángulos β y δ , así como los cambios en ζ y χ , en relación con los pares de bases con interacción en otros puntos del dodecamero, en otros pares de bases el cambio los ángulos de torsión no fue estadísticamente significativo en el surco mayor

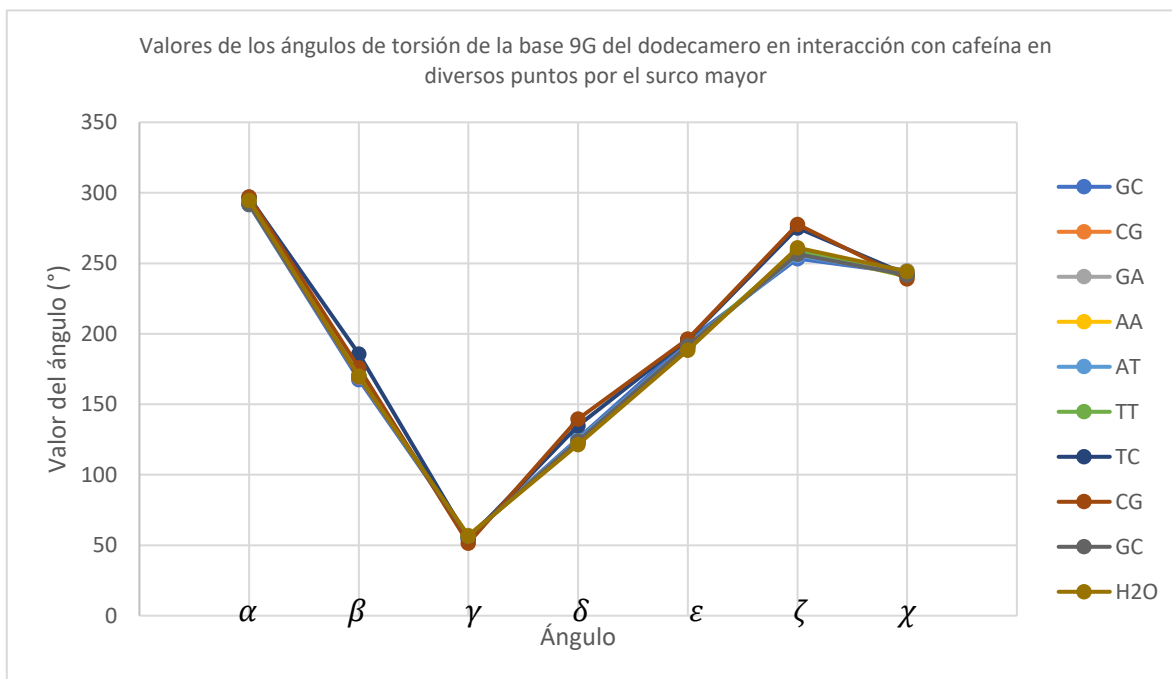


Figura 26. Grafica de los valores de los ángulos de torsión de la base 9G, donde se aprecia los cambios en los valores de los ángulos cuando las bases esta en interacción con cafeína en el surco mayor.

En el surco menor existe la misma zona de cambio, la base 9C , con un aumento de 9.8° en el ángulo α , una disminución de 18.7° en el ángulo β , un aumento de 12.2° en el ángulo γ , una disminución de 26.5° en el ángulo δ , un aumento de 29.7° en el ángulo ϵ , una leve disminución de 2.9° en el ángulo ζ y una disminución de 30° en el ángulo χ , al igual que en el surco mayor el ángulo ζ no tiene cambios significativos, el cambio en los ángulos α, β, δ y ϵ es mayor a una desviación estándar y para los ángulos γ y χ es mayor a dos desviaciones estándar.

De nuevo solo existe cambios en los ángulos de torsión para la base 9C lo cual se explica por la afinidad de la cafeína a formar enlaces con el conjugado de 9C, ya que por el surco mayor la guanina siempre fue la que formo los puentes de hidrogeno con la cafeína.

Tabla 9. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con cafeína colocada entre las diversas bases en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	296.5	149.4	-173.9	-109.3	-106
2 G	-62.3	186.7	48.9	141.1	-167.6	-101.4	-102.5
3 C	-71.3	165.4	58.6	95.4	-173.6	-90.2	-119.5
4 G	-66.2	171.9	60.6	146.2	-171.1	-129.1	-104.3
5 A	-65.7	180	53.3	145.4	-171	-86.5	-108.6
6 A	-69.7	162.5	58.5	109.6	-185.8	-100.1	-118.6
7 T	-61.9	170.8	62.3	112.7	-178.9	-87.8	-134.2
8 T	-62.4	174.1	58.1	124.7	-177.1	-95.8	-120
9 C	-61.3	173.5	58.5	108.3	-160.7	-92	-133.1
10 G	-67.3	163.1	54.7	144.6	-114.7	-194.4	-98.3
11 C	-72.3	152.8	48.4	136.5	-172.7	-89.6	-117.7
12 G	-71.9	170	52	137.2	---	---	-101
13 G	-73.2	175.4	53.4	87.1	---	---	-137.7
14 C	-85.1	134.7	64.1	96.3	-166.9	-79.3	-135.5
15 G	-73	169.5	47.8	142.7	-126.5	-180.4	-92.1
16 C	-61.1	172.6	58.6	120.8	-166.1	-85.7	-123.3
17 T	-66.8	163	59	102.3	-172.3	-84.7	-133.7
18 T	-67.1	170	61.1	112.8	-179	-91.5	-126.7
19 A	-65.5	175.5	52.7	130	-175.2	-103.8	-109.2
20 A	-62	183.7	55.3	143.8	-176	-93.5	-103.4
21 G	-58.8	169.8	66.9	145.3	-185.1	-93.8	-102.5
22 C	-63.8	162.5	62.7	91.7	-175.2	-84.7	-132.1
23 G	-76.5	167.4	52.2	102.7	-182.5	-92.4	-119
24 C	---	---	60	122.5	-170	-96.9	-115.4
Media	-67.5	168.9	56.9	122.9	-169.2	-102.9	-116.4
$\pm DS$	6.2	10.7	5.2	20.3	16.9	29.3	13.6

En la Figura 27, se observa la apertura de los ángulos β y δ , así como los cambios en ζ , ε y χ , en relación con los pares de bases con interacción en otros puntos del dodecamero, en otros pares de bases el cambio los ángulos de torsión no fue estadísticamente significativo en el surco menor, este tipo de cambios y los del surco mayor, son un buen primer acercamiento para comenzar a entender los cambios conformacionales que sufre el DNA en presencia de la cafeína.

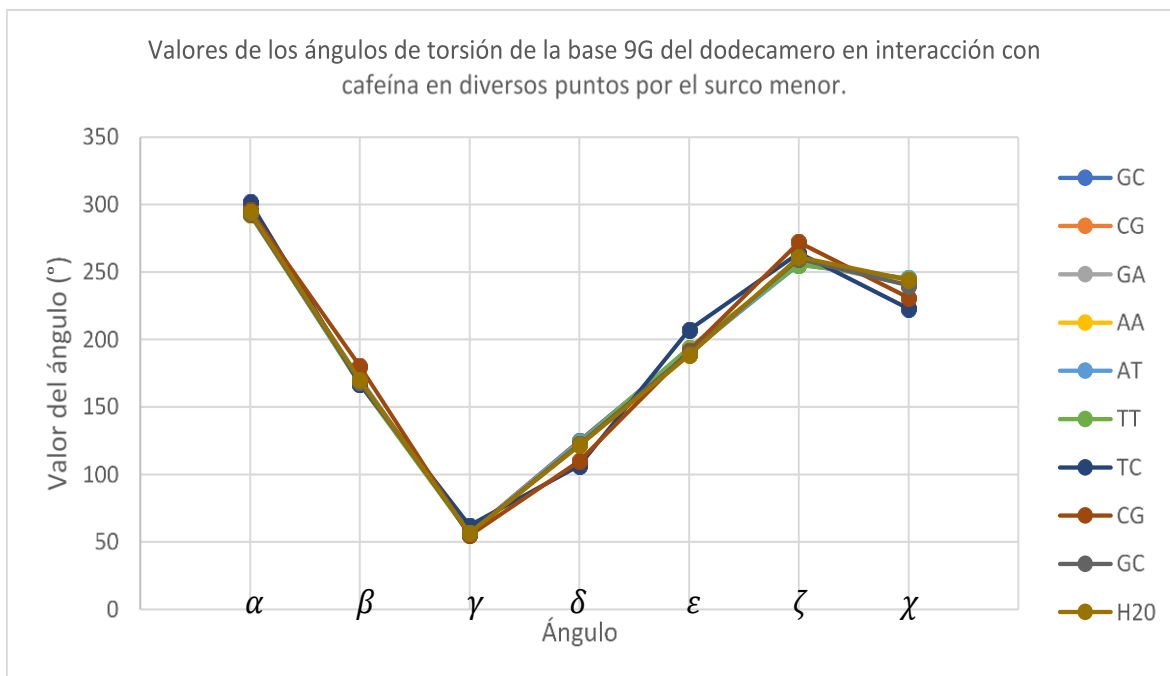


Figura 27. Grafica de los valores de los ángulos de torsión de la base 9G, donde se aprecia los cambios en los valores de los ángulos cuando las bases está en interacción con cafeína en el surco menor.

Los cambios conformacionales de los azúcares de la cadena de DNA, no muestran un patrón de cambio definido lo cual puede ser debido a la interacción de los azúcares con las moléculas de agua, ya que la cafeína como tal no hizo interacciones directas con el esqueleto azúcar fosfato, las conformaciones de los azúcares para las estructuras en interacción se muestran en la Tabla 8 y Tabla 9, y para cada una de las estructuras en interacciones en particular se pueden consultar en el Apéndice.

Conclusiones.

El docking molecular permitió encontrar la zona predilecta de la cafeína en contacto con el dodecamero de Dickerson, la zona del par 9C y 10 G, donde la cafeína prefiere cualquiera de sus orientaciones antes de colocarse sobre cerca de otro par de bases, en segundo lugar, la cafeína tiende a formar enlaces en el par 3C y 4G, en ambos casos siempre por el surco menor.

La hidratación del dodecamero puro y su simulación de 0.8 ns, nos permitió encontrar la famosa espina de hidratación que los autores originales encontraron sobre el surco menor.

Aunque no se trató de cálculos cuánticos, la caracterización de la cafeína con GAFF dio resultados bastante aceptables para la simulación del complejo cafeína-DNA con BSC1.

Los puentes de hidrogeno encontrados entre la cafeína y el DNA, concuerdan con las interacciones encontradas por otros autores, en la posición de bases y el surco en el que se halla el ligando.

Los cambios de los ángulos de torsión que se encontraron después de la simulación muestran un cambio en la zona del par 9C y 10 G, zona que mostro la mayor formación de enlaces y fue favorecida de gran manera en el docking molecular.

Apéndice A. Tablas de los ángulos de torsión para cada tipo de simulación realizada.

Tabla 10. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 2G y 3C en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	292	150.7	-182.6	-103.2	-107
2 G	-62.3	186.7	48.9	141.1	-167.6	-101.4	-102.5
3 C	-72.9	158	59.8	83.3	-177.4	-78.9	-125.5
4 G	-65.1	176.4	60.7	145.1	-177.2	-118.5	-99.5
5 A	-60.9	172.4	55.4	138.2	-171.1	-88	-114.5
6 A	-69.1	171.1	52.3	117.1	-182.4	-94.1	-115.3
7 T	-61.7	165.4	59.9	92.9	-180.7	-86.1	-143.1
8 T	-54.9	166.9	62	137.4	-179	-105.5	-115.8
9 C	-64.4	183.7	53.5	135.3	-164.3	-86.3	-117.9
10 G	-71	164.3	50.4	133.9	-94.9	-210.3	-99.5
11 C	-74.4	136.5	53.5	125.4	-164.6	-84.7	-120.2
12 G	-71.9	170.5	53.3	139	---	---	-101.6
13 G	-76.5	178	53.9	86.7	---	---	-135.4
14 C	-85.1	134.7	64.1	96.3	-166.9	-79.3	-135.5
15 G	-78.1	172.1	44.3	143.9	-127.4	-186.7	-85.5
16 C	-67.9	181.9	59.1	141.1	-159.9	-85.6	-116.6
17 T	-67.8	162.4	61.9	122	-176.8	-96.6	-127.6
18 T	-60.8	177.7	53.3	120.5	-172.1	-104.6	-124.5
19 A	-60.5	165.3	51.6	130.2	-181.2	-95	-112.4
20 A	-60.1	182	53.2	142.6	-172.5	-107.8	-102.2
21 G	-61.3	172.5	70.5	147.1	-183.3	-95.1	-107.4
22 C	-59.9	138.9	58.5	82.1	-173.6	-76.1	-140.7
23 G	-71.7	169.2	55.9	124.8	-162.8	-130.4	-106.9
24 C	---	---	62.9	124.6	-170.5	-87.3	-105
Media	-67.2	167.6	56.5	125.1	-167.7	-104.6	-115.1
$\pm DS$	7.4	14.5	5.8	21.1	20.4	34.1	14.7

Tabla 11. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 3C y 4G en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
1 C	---	---	295.3	147.4	-172.5	-122.6	-105.9
2 G	-74.1	197.3	47.5	144.8	-181.2	-92.9	-102.6
3 C	-69.6	172.7	57.3	107.4	-169.7	-101.5	-113.4
4 G	-67.8	169.8	60.4	145.4	-176.9	-123.8	-103.1
5 A	-60.8	180.5	50.2	144	-171.7	-85.5	-113.4
6 A	-65.5	163.6	56.3	108.1	-187.5	-92.9	-126.1
7 T	-57.6	178.9	57.1	122.9	-175.3	-89	-127.2
8 T	-60.5	170.6	57.5	112.1	-184.2	-90	-128.5
9 C	-61.5	179.7	57.2	124.8	-163.8	-91.4	-120.7
10 G	-69.6	166.5	53.3	140.6	-102	-204.3	-96.1
11 C	-63.2	127.2	53.9	131.5	-165.3	-89.9	-119.8
12 G	-76.5	173	48	136	---	---	-100
13 G	-69.2	170.1	53.1	84.7	---	---	-145.9
14 C	-71.9	127.9	53	81.2	-164.2	-72	-153.6
15 G	-67.8	166.9	51.2	141.5	-125.6	-174	-98.7
16 C	-63.3	174.9	52.6	111.5	-172.1	-85.4	-123.8
17 T	-63	181.1	56.3	137.8	-177.8	-90.7	-114.3
18 T	-60.4	171.8	60.6	120.5	-181.7	-98.6	-133.8
19 A	-66	167.1	57.5	109.9	-181.9	-88.7	-127.4
20 A	-62.9	190.2	53.8	140.4	-177.6	-91.1	-110.3
21 G	-63.4	164.2	72.4	146.8	-186.5	-97.4	-114.1
22 C	-73.7	146.6	63.9	79.9	-179.9	-85.9	-136.9
23 G	-65	175.1	53.8	127.5	-161.7	-107.8	-105.2
24 C	---	---	63.6	135.4	-183.8	-95.3	-92.4
Media	-66.1	168.9	56.1	124.3	-170.1	-103.2	-117.2
± DS	5	16.7	5.6	20.8	20.5	30.9	16

Tabla 12. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 4G y 5A en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	293.8	154.6	-174.1	-109.5	-102.7
2 G	-74.8	194.4	42.3	142.6	-175.4	-104.4	-104.9
3 C	-72.4	165.9	58.5	97.1	-174	-80.4	-126.7
4 G	-64.6	174	60.8	146.9	-165.2	-134.4	-105.4
5 A	-63.9	169.3	57.5	143.1	-172.9	-88.2	-115.9
6 A	-64.8	168.2	51.5	109.2	-177	-90	-124.6
7 T	-60.4	165	60.3	110.2	-178	-93	-131.5
8 T	-59.9	169.1	62.7	117.6	-183.1	-91.1	-127.9
9 C	-61.4	179.3	56.4	126.7	-162.6	-86	-124.6
10 G	-76.2	163.7	54.8	145.2	-94.5	-207.6	-99.2
11 C	-75.9	154.3	47.9	138.7	-166.1	-89.4	-116
12 G	-72.3	167.4	54.8	139.5	---	---	-98.7
13 G	-77.2	169.6	55	80.7	---	---	-149.6
14 C	-60.1	121.5	56.1	80.7	-151.8	-68.1	-159.4
15 G	-75.2	164.6	47.2	138.7	-142.2	-174.9	-97.6
16 C	-58.9	170.2	64.6	130	-160.1	-85.9	-122.8
17 T	-67.2	163.9	59.8	107.6	-179.4	-89.9	-135.2
18 T	-65.8	172.9	55.9	122.6	-173.5	-104.8	-123.2
19 A	-61.8	164.4	58.5	123.9	-174.5	-91.2	-122.3
20 A	-63.8	170.6	58	119.2	-178.9	-102	-111.3
21 G	-58.3	171.5	72.5	148.6	-181.1	-85.3	-101.2
22 C	-70.6	159.8	63.2	82.7	-178.5	-80.6	-139.9
23 G	-67.6	175.5	54.2	128.4	-181.1	-100.1	-106.6
24 C	---	---	55.8	111.9	-171.6	-86.7	-119.4
Media	-67	167.1	56.9	122.8	-168	-102	-119.4
± DS	6.3	12.8	6.2	21.3	19.7	32.9	16.3

Tabla 13. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 5A y 6A en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
1 C	---	---	300.3	143.9	-179.6	-97.5	-114.9
2 G	-74.2	202	47.1	141.7	-158.6	-129.4	-98
3 C	-64	154.5	51.6	95.2	-175.8	-84.9	-127.5
4 G	-63.4	172.3	62.3	144.3	-176.2	-113.2	-99.1
5 A	-67.4	190.7	49.1	147.6	-169	-84.7	-101.3
6 A	-70.8	159.3	61.3	98.5	-196.6	-91.5	-121.7
7 T	-57.6	174.2	60.2	115	-173.3	-83.1	-133.4
8 T	-60.8	177.8	52	121.2	-186.5	-93.2	-116.9
9 C	-56.3	167.6	63.8	119.1	-158.6	-84.7	-130.1
10 G	-78.8	169.2	50.8	145.2	-91.6	-212.2	-95.4
11 C	-66.1	146.3	40.7	138.7	-157.7	-106.6	-121.2
12 G	-71.1	162.5	55.8	142.2	---	---	-100.5
13 G	-74.7	174.2	52.3	99.1	---	---	-125.6
14 C	-68.7	129.5	57.9	91	-166.7	-80.4	-139.2
15 G	-72.7	174.3	53.1	144.8	-127.9	-164.9	-95.1
16 C	-66.4	162	58.1	97	-165.2	-79.4	-132.1
17 T	-65.7	173.3	64.1	128.4	-174.1	-90.8	-118.8
18 T	-64.3	167.6	60.6	101.2	-172	-89.9	-138.1
19 A	-66.7	169.2	56.6	126.8	-179.2	-92.4	-114.7
20 A	-63.3	173.8	53.7	147	-176.2	-92.6	-110
21 G	-61.2	166.5	67.7	146.9	-159.5	-133.5	-110.5
22 C	-72.6	171.1	55.3	83.1	-166.3	-76.1	-133.8
23 G	-72.8	169.8	60.2	128.4	-184.6	-87.2	-113.6
24 C	---	---	62.2	115.5	-166.7	-92.5	-117.9
Media	-67.3	168.5	56.4	123.4	-166.5	-102.8	-117.1
± DS	5.8	14.2	6.3	21.4	21.9	33	14.1

Tabla 14. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 6A y 7T en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	298	144.8	-170	-116.6	-109.9
2 G	-69.9	197.3	42.1	144.7	-178.1	-94.5	-104.1
3 C	-71.5	166.2	57.3	82.2	-176	-80.6	-131.5
4 G	-59.7	167.6	64.2	148	-173.5	-120.5	-103.6
5 A	-62.7	181.5	50.8	145.6	-172.5	-86.5	-108
6 A	-68.5	165.6	55.6	120.6	-175	-108.6	-115.4
7 T	-64.3	167.9	61.5	108.9	-181.9	-85.9	-137.1
8 T	-59.7	178.3	57.3	120.5	-187	-89.3	-122.1
9 C	-57.4	177.8	58.7	129.5	-162.4	-85.1	-119.5
10 G	-74	166.8	54	134.4	-90.3	-217.9	-94.2
11 C	-73.1	136.3	49.8	137.6	-167.2	-89.4	-115.4
12 G	-78.7	175	48.6	121.3	---	---	-103.2
13 G	-68.6	173.2	58	87	---	---	-136.7
14 C	-81.8	134.7	55.1	80.6	-167.7	-70.2	-149.7
15 G	-77.2	166.6	51	139	-127.2	-173.8	-92.3
16 C	-63	171	58.1	111.1	-160.8	-81.7	-125
17 T	-60.5	175.3	60.3	135.6	-177.9	-92.8	-112.2
18 T	-68.4	166.6	58	97.2	-183.8	-92.2	-134.5
19 A	-62	183.2	52	134.6	-174.3	-93.1	-103.4
20 A	-59.4	188.7	53.9	143.9	-189.9	-89.2	-98.9
21 G	-58.2	176.8	61.3	141.7	-192.5	-93.4	-100.9
22 C	-71.1	157.8	58.4	79.7	-193.1	-84.9	-125.5
23 G	-67.2	187.3	49	146.5	-172	-88.9	-98.2
24 C	---	---	62.1	139.9	-163.8	-160.4	-112.2
Media	-67.1	171	55.5	124	-169.9	-104.3	-114.7
$\pm DS$	7	14.7	5.3	23.2	23.1	36.3	15.6

Tabla 15. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 7T y 8T en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	298	149.7	-162.4	-114.2	-100.6
2 G	-77.7	188.1	43.6	140.2	-163	-123	-99
3 C	-64.7	148.1	57.2	85.2	-174.2	-80.9	-129.4
4 G	-61.2	171.1	63.7	145.8	-181.3	-110.9	-98.1
5 A	-63	179.5	55.9	145.4	-170.3	-89.8	-107
6 A	-74.2	166.1	52	108.6	-186.2	-91	-120.8
7 T	-59.4	173.7	63	116.4	-175.8	-89.7	-131.3
8 T	-61.1	173.5	56	121.9	-174.8	-102.3	-122.5
9 C	-61.9	171.8	62.2	124.9	-159.2	-87.3	-121.7
10 G	-68	161.9	48.8	136.9	-94.8	-210.5	-96.7
11 C	-71.3	132.1	52.9	130.3	-152.9	-88.4	-122.5
12 G	-73.4	163.9	52.2	139.1	---	---	-92.4
13 G	-70.4	175.9	52.3	85.9	---	---	-135.7
14 C	-68.4	116.8	49.7	77.8	-165.7	-71.8	-146.4
15 G	-75.5	170	50.4	140.5	-110.8	-192.1	-90.9
16 C	-64.9	182.4	53.3	122.8	-169.2	-84	-115
17 T	-64	181.1	53.6	134.1	-178.7	-99.1	-113.5
18 T	-62.9	170.2	58.9	128.1	-179.6	-90.4	-127.1
19 A	-68.9	167.8	53.4	125.4	-176	-114.5	-115
20 A	-58.3	175.6	57.7	144	-171.9	-90.9	-107.4
21 G	-60.1	168	69.2	145.9	-181.3	-109	-108.1
22 C	-68.2	162.6	59.1	83.6	-175.1	-77.7	-135
23 G	-62.9	170.8	60.8	127.5	-182.3	-93.5	-109.5
24 C	---	---	58.1	97.6	-169.5	-86	-120.1
Media	-66.4	166.9	55.8	123.2	-166.1	-104.4	-115.2
$\pm DS$	5.6	16.2	5.7	21.9	22.7	34.8	14.8

Tabla 16. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 8T y 9C en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	296.5	155.6	-185.8	-98.3	-104.6
2 G	-71.6	199.8	46.3	133.4	-174.9	-93.7	-103.6
3 C	-71.3	159.2	60.7	88.3	-179.9	-83.6	-128.7
4 G	-62.8	173.3	62.1	144.3	-170.4	-121.2	-108.2
5 A	-61	166.9	61.8	138.6	-173.1	-82.2	-116.7
6 A	-70.8	167.5	55.5	106.8	-180.6	-92.3	-125.6
7 T	-59.3	169.4	59.7	115.9	-180.5	-97	-128.6
8 T	-63.6	174.7	60.1	127.5	-179.3	-89.2	-117.4
9 C	-58.4	166.9	62.1	106.6	-152.9	-95.9	-137.1
10 G	-79	164.5	58.3	151	-95.4	-206.5	-93
11 C	-75.7	149.8	46.2	139.1	-171.5	-94.7	-115.2
12 G	-70.1	174.2	52	141.6	---	---	-101.6
13 G	-72.6	178.6	49	85.6	---	---	-139
14 C	-55.2	112.8	56.1	81.1	-158.3	-75.3	-149.7
15 G	-76.9	163.9	45.4	135.8	-135.4	-185.5	-91.9
16 C	-58	169.8	67.6	137.3	-150.4	-82.2	-120.5
17 T	-73.9	169.7	57.4	97.8	-180	-82.2	-138.9
18 T	-73.4	175.7	57.9	108.4	-171.1	-92.7	-135.6
19 A	-68.9	168.4	63.5	130.6	-180.5	-96.5	-115.4
20 A	-65.7	191.8	52.8	143.6	-180	-96.1	-99.4
21 G	-56.4	164	73.5	150.2	-187.7	-96.5	-102.5
22 C	-68.7	160.1	63.7	83.5	-178.3	-80.7	-134.6
23 G	-72	170.3	53	108.3	-172.9	-90	-121.6
24 C	---	---	60.8	130.8	-171.4	-93.1	-119.6
Media	-67.5	167.8	57.6	122.6	-168.7	-101.2	-118.7
± DS	7.1	16.1	7	22.7	20.8	33	15.9

Tabla 17. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 9C y 10G en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	296.2	149	-157.8	-126.1	-106.4
2 G	-67.1	177.7	43.5	145.8	-164.5	-108.8	-100.3
3 C	-70	157.5	57.3	97	-178.1	-86	-122.2
4 G	-64.8	173.3	60.5	145.4	-167.1	-134.1	-104.7
5 A	-63	174.3	57.6	148.1	-171.1	-86	-106.3
6 A	-67.3	160.9	55.4	102	-180.8	-90.3	-128.4
7 T	-56.4	163.4	63.8	95.2	-175.6	-86.9	-148.3
8 T	-61.5	171.3	62.6	128.9	-184	-85.2	-121.5
9 C	-64.2	180.1	54.9	110	-168.4	-88	-129
10 G	-64.1	162.6	52.6	144.8	-119.4	-189.3	-98.8
11 C	-72.6	153.4	51.5	134.5	-169.4	-86.8	-126.4
12 G	-67.4	174.1	48.6	139.4	---	---	-99.5
13 G	-73.4	180.9	53	88.4	---	---	-129.7
14 C	-57.5	126.5	51.3	81	-160.2	-72.8	-147.5
15 G	-79.9	162.3	48.2	128.2	-146.3	-170.2	-98.9
16 C	-61.7	174.6	60.2	140.9	-157.8	-85.1	-116.5
17 T	-66.4	169.3	56.6	123.3	-178	-107	-122.8
18 T	-62	177.6	55.7	117.7	-172.6	-94.5	-129.7
19 A	-64.9	174.7	55.5	126.9	-179.9	-82	-120.9
20 A	-59.8	165.4	59.5	124.5	-174.7	-108.4	-119.1
21 G	-61.1	175.5	60.3	140.4	-182.5	-91.1	-102.5
22 C	-64.2	165.5	62.4	98.3	-174.2	-90.2	-130.1
23 G	-72.5	182.1	52.4	136	-185	-101.3	-97.9
24 C	---	---	62.1	120.9	-170.9	-90.8	-125
Media	-65.5	168.3	55.9	123.6	-169	-102.8	-118
± DS	5.6	12.2	5.2	20.3	14.8	29.1	15

Tabla 18. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 10G y 11C en el surco menor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
1 C	---	---	298.5	148.5	-180.1	-95.3	-102.2
2 G	-73.8	193.4	45.1	126.9	-172.7	-100.4	-110.5
3 C	-72.5	163.8	62.9	110.3	-180.4	-91.7	-119.5
4 G	-64.2	171.8	57.7	140.7	-177	-119.4	-107.9
5 A	-58.6	169.2	62.2	141	-167.7	-83.3	-122
6 A	-67.8	164.3	51.8	105.1	-180.1	-91	-127.6
7 T	-57.3	166.4	60.6	96.9	-177.5	-91.8	-144.6
8 T	-57.7	171	60.4	132.8	-184.3	-91.5	-115.1
9 C	-62	178.7	56.2	116.7	-164.3	-87.8	-124.8
10 G	-70.5	163.6	56.7	144.3	-109.9	-199.5	-97.7
11 C	-72.3	152.8	48.4	136.5	-172.7	-89.6	-117.7
12 G	-65.8	169	54.6	136.9	---	---	-111.8
13 G	-76.4	178.1	53.8	85.8	---	---	-141.7
14 C	-67.4	120.3	57.5	83.5	-160.7	-71.3	-148.9
15 G	-86	174.3	48.2	137.7	-136.5	-178.4	-89.4
16 C	-65.7	178.2	61.2	142.6	-163.2	-85.3	-116.9
17 T	-64.1	167.9	58.6	120	-174.9	-101.8	-129.2
18 T	-63.7	171	59.3	103.4	-178.2	-91.1	-136.7
19 A	-63.1	181	56.2	140.1	-180	-88.9	-109.7
20 A	-62.6	175.1	55.4	127.4	-178.6	-94.1	-117.6
21 G	-58.9	171.2	68.1	147.2	-182.9	-102.2	-105.2
22 C	-63.4	159.4	63	85.1	-176.2	-79.2	-134.1
23 G	-76.5	167.4	52.2	102.7	-182.5	-92.4	-119
24 C	---	---	52	126.2	-161.8	-80.1	-127
Media	-66.8	168.5	56.6	122.4	-170.1	-100.3	-119.9
± DS	7.2	13.6	5.5	20.7	17.5	31.2	14.6

Tabla 19. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 2G y 3C en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	297.1	152.5	-162.1	-111.9	-97.4
2 G	-84.4	188.8	45	140.6	-173.7	-103.4	-107.6
3 C	-72.4	163.2	58.7	106.1	-155.7	-102.5	-125.8
4 G	-66.7	163.1	60.2	149	-159.4	-144.4	-111.2
5 A	-62.5	167.3	56.1	145.3	-173	-82.2	-121
6 A	-69.1	171.4	52.3	116.2	-178	-97.5	-122
7 T	-59.8	170.6	60.4	112.5	-179.4	-95.2	-131.7
8 T	-58.7	175.1	58.8	125.5	-181.9	-90.8	-118.8
9 C	-60.4	173.1	58.7	113.6	-161.4	-86	-130.4
10 G	-68.6	165.8	47.6	143.6	-92.5	-210.9	-94.7
11 C	-80.2	151.6	49	139.4	-169.8	-95.4	-115.4
12 G	-71.7	173.2	55	140.3	---	---	-101.6
13 G	-71.4	174	58.5	88.1	---	---	-143.5
14 C	-68.7	119.9	55	82.1	-163.4	-71	-153.3
15 G	-86.2	171.3	46.8	136.7	-126.7	-184.4	-93.9
16 C	-64.1	178.6	61	136	-159.2	-86.8	-117.6
17 T	-67.1	171.2	58	122.5	-178.1	-92.1	-123.2
18 T	-68.8	173.6	55.7	116.9	-177	-102.6	-126.3
19 A	-66.1	165.9	56.3	135.9	-174.9	-92	-115.5
20 A	-62.2	178	51.5	137	-167.2	-121.2	-99.7
21 G	-55.4	169	73.1	148.4	-182.8	-86.1	-104.1
22 C	-69.5	157.5	62.9	82	-182.1	-84.2	-138.4
23 G	-71.4	160	49	110.1	-174.3	-92.4	-115.3
24 C	---	---	62.3	136.2	-153.9	-116.4	-104
Media	-68.4	167.4	56.2	125.7	-164.8	-106.8	-117.2
± DS	7.8	13.2	6.3	20.5	21.2	34.3	15.3

Tabla 20. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 3C y 4G en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	297.4	148.4	-179.8	-103	-118.5
2 G	-73.6	199.7	48.3	143	-182	-100.7	-100.7
3 C	-73.8	168.2	57.7	85.2	-177.2	-80.5	-134.7
4 G	-58.8	172.3	64.3	147.1	-182	-101.7	-106.1
5 A	-65	181.2	58.5	133.1	-175.5	-85.6	-117.9
6 A	-68	172	53.3	120.1	-183.7	-96.2	-116.3
7 T	-61.4	175	57.6	108.2	-181.9	-90.9	-132
8 T	-58.7	170.8	62.4	126.7	-180.8	-89.8	-118
9 C	-58.8	166.6	60.1	104.9	-156.5	-83.4	-135.4
10 G	-74.5	163.7	54.2	145.6	-92.2	-203	-96.5
11 C	-77.8	148.2	45.9	129.6	-172.4	-97.8	-119.5
12 G	-66.6	174.5	55.2	143.8	---	---	-101.8
13 G	-75.2	180.8	49.1	85.8	---	---	-133.5
14 C	-60.1	120.3	56	86.9	-163.9	-75.4	-148.8
15 G	-78.7	163.8	49.5	138.6	-135.6	-183	-89.1
16 C	-65.3	182.9	54.6	139.1	-155.8	-85.5	-116.6
17 T	-62.4	172.4	62.7	135.8	-179.6	-101.1	-119.7
18 T	-69.3	171.5	52.7	90.9	-176.6	-84	-142.6
19 A	-65.8	169.4	59.1	132.6	-177.9	-90.3	-119.5
20 A	-68	180.2	56.5	140	-175.7	-115.4	-105.6
21 G	-60.3	168.4	69.6	148.3	-182.2	-96.6	-104.4
22 C	-62.5	158	66.3	86.9	-175.3	-83.6	-134.5
23 G	-75.3	166.8	54.8	103	-180.4	-87	-117.7
24 C	---	---	59.8	135.3	-170.5	-95.9	-106.3
Media	-67.3	169.4	56.9	123.3	-169.9	-101.4	-118.2
± DS	6.6	14.9	5.9	22.7	21.2	31.9	15.6

Tabla 21. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 4G y 5A en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
1 C	---	---	295.2	142.7	-173.3	-101.6	-111.3
2 G	-74.2	189.4	50.2	148.6	-141.4	-145.6	-91.4
3 C	-71.4	148.4	47.7	79.5	-171.8	-82.8	-129.8
4 G	-58.7	176.3	62.5	144.7	-188.1	-98.2	-98.7
5 A	-64.2	179.4	59.1	144	-187.2	-88.9	-102.6
6 A	-66.9	181.3	56.7	119.9	-171.9	-93.8	-120.3
7 T	-68.1	168.9	56.2	101.7	-181.2	-89.7	-129.1
8 T	-59.9	163	68.1	115.9	-182	-88.4	-133.3
9 C	-61.2	171.7	62.2	111.1	-157	-81.8	-133.5
10 G	-74	166.9	53.1	148.1	-86.4	-210.1	-92.7
11 C	-81.1	157.8	42.3	139.5	-170.3	-93.7	-110
12 G	-71.3	174.2	50.8	142.4	---	---	-91.2
13 G	-73.2	172.6	58.1	90.7	---	---	-132.8
14 C	-45.7	117	51	81.8	-160.9	-75.7	-145.4
15 G	-76.5	165.7	52.6	140.1	-145.1	-187.3	-85.1
16 C	-68.2	182.3	52.6	129.3	-160.8	-88.8	-110.5
17 T	-58.9	186.1	55.3	134.9	-176.3	-94.4	-120.9
18 T	-71.4	169.8	59.8	116.1	-190.1	-96	-124.5
19 A	-62.6	164	57.8	124.3	-171.5	-87	-120.5
20 A	-66.8	194.4	57.8	144.1	-173.4	-104.5	-100
21 G	-61	172.3	68.6	147.2	-191.5	-93.1	-106
22 C	-67	154.4	58.6	80.8	-176.3	-79.2	-136.2
23 G	-67.3	174.7	56.3	129.3	-175	-101.3	-104
24 C	---	---	64.1	111.1	-173.1	-84.6	-124.7
Media	-66.8	169.6	56.6	123.7	-168.4	-103	-114.8
$\pm DS$	7.6	16.1	6.3	23	23	34.9	17.1

Tabla 22. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 5A y 6A en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
1 C	---	---	295.5	148.4	-183.7	-88.3	-110
2 G	-81.8	201.9	43.7	142.4	-153	-138.5	-94.6
3 C	-71.3	146	57.8	86.3	-168.1	-76.1	-129.9
4 G	-65.6	175	65.3	150.1	-171.7	-125.7	-99.8
5 A	-62.3	181.1	51.8	147.7	-181.8	-83.1	-105.3
6 A	-63	169	52.7	99.8	-178.8	-87.4	-128.2
7 T	-61.1	162.9	61.7	101.4	-177.7	-88.2	-141.7
8 T	-63.9	172.1	63.2	140.5	-182	-101.2	-118.8
9 C	-67.6	188.3	54.5	131.5	-167	-91	-129.3
10 G	-75	169.7	54.4	145.1	-103.3	-208.5	-99.4
11 C	-66.4	151.5	49.9	143.8	-171.2	-86.2	-115
12 G	-72.8	175.4	48.9	132	---	---	-98.9
13 G	-73.6	175.1	55.1	83.1	---	---	-149
14 C	-70.6	127.4	57.1	82.6	-164.2	-72.7	-152.2
15 G	-77	167.7	48.6	141.5	-143.9	-168.2	-89.4
16 C	-55.4	172.8	62.6	127.3	-157.2	-86.4	-126.5
17 T	-66.3	171.2	56.6	112.9	-185	-94.3	-131
18 T	-64.7	170.6	56.8	111.3	-172	-95.5	-136.5
19 A	-58.3	166.8	65.3	129.5	-176.3	-92.6	-120.7
20 A	-76.8	218.5	49.4	139.3	-185.6	-91.4	-103.2
21 G	-62.4	168.6	70.5	147.6	-200.1	-86.7	-118.3
22 C	-64.2	146.5	62.2	78.9	-163.8	-75.1	-152.3
23 G	-65.8	177.2	51.8	133.2	-174.1	-117.9	-104.8
24 C	---	---	63	119.5	-178.4	-84.7	-112.9
Media	-67.5	170.7	56.6	124	-170	-101.8	-119.5
$\pm DS$	6.6	18.7	6.7	23.6	19.5	33.4	18.8

Tabla 23. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 6A y 7T en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	298.8	136	-168.5	-104.7	-119.9
2 G	-70.4	193.7	50.8	142.4	-176.2	-90.8	-108
3 C	-68.2	172.3	56.6	114.3	-172.1	-110.5	-109.6
4 G	-64	172.4	54.7	146.2	-185.2	-95.6	-101
5 A	-62.4	189.4	47.7	140.6	-176.4	-96.3	-103.7
6 A	-69.3	170.5	57.3	129.4	-175.9	-110.2	-113.6
7 T	-65.9	172.6	53	103.1	-177.5	-87.5	-140.1
8 T	-59.7	169.3	69	137.5	-180.9	-93.7	-126.4
9 C	-64.4	185.6	53	122.1	-165	-82.5	-131.4
10 G	-72.6	170.6	51.6	141.4	-91.5	-208.8	-93.4
11 C	-77.8	146.6	48	131.1	-165.4	-92.2	-119
12 G	-79.8	172.7	54	129.8	---	---	-99.1
13 G	-70.6	170.5	54.5	84.2	---	---	-137.3
14 C	-59.1	123.2	54.3	82.7	-162.8	-75.7	-144.3
15 G	-73.5	177.7	42.5	142.9	-143.3	-178.5	-87
16 C	-68.1	177.6	56.2	132.6	-167	-85.9	-119.3
17 T	-63.2	178.9	60.3	138.4	-175	-101.8	-116.9
18 T	-69	172.2	58	109.4	-185.1	-93.4	-135.2
19 A	-68.4	161.2	54.2	135.7	-174	-93.8	-117.3
20 A	-58.7	169.3	57.5	127.9	-148.6	-124.3	-122.1
21 G	-59.4	171.2	66	143.3	-181.8	-86.7	-112.4
22 C	-69.5	152.2	56.2	80.4	-179	-85.7	-140
23 G	-59.1	172.4	56.6	140.5	-164.2	-113.6	-102.5
24 C	---	---	65	104.1	-184.6	-84.4	-119.7
Media	-67	170.1	55.5	124.8	-168.2	-104.4	-117.5
± DS	6	14.7	5.9	20.7	20.8	32.2	15.8

Tabla 24. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 7T y 8T en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	295.3	147.3	-187.1	-90.6	-115.7
2 G	-79.5	217.2	40.8	142.8	-173.9	-101.9	-97.9
3 C	-78	163.5	56.9	85.1	-177.2	-83.9	-131.3
4 G	-56.7	165.4	70.8	153	-170.3	-120.7	-98.4
5 A	-68.6	171.9	53.7	140.7	-178.6	-93.9	-106.3
6 A	-64.8	172.9	54.8	109.9	-177.6	-87.8	-128.7
7 T	-62.6	166.2	64.4	122.2	-176.4	-100.6	-128
8 T	-66.1	176.1	58.1	131.4	-185.4	-94.2	-125
9 C	-61.7	184.9	55.7	120.6	-155.8	-89.9	-131.2
10 G	-73.4	160.7	58.3	145	-83.3	-215.5	-94.9
11 C	-79	161.9	42.6	143	-171.3	-90.5	-112.7
12 G	-71.3	169.2	54.5	132.4	---	---	-107.5
13 G	-74.3	183.4	51.7	81.7	---	---	-145.9
14 C	-64.3	120.8	54.2	78.4	-162.2	-69.6	-157.7
15 G	-80.9	163.6	49.6	141.1	-139.8	-177.2	-89.1
16 C	-58.2	175	64.9	139.5	-155.3	-84	-117.7
17 T	-67.3	160.9	63.4	87.8	-182.4	-82.6	-150.1
18 T	-66.4	179.1	54.6	130.4	-175	-99.3	-116.2
19 A	-60.3	170.3	59.7	115.7	-174.4	-91.1	-135
20 A	-67.4	184.5	55	139.9	-182.1	-92.7	-113.8
21 G	-64.3	164.9	71.1	149.3	-182.9	-103.6	-104
22 C	-60.2	167	59.1	81.8	-158.7	-81.7	-131.6
23 G	-65.3	171.1	53.8	105.7	-192.2	-81	-115.4
24 C	---	---	54.5	119.2	-173.3	-86.7	-111.7
Media	-67.8	170.5	56.6	122.7	-168.9	-100.9	-119.4
± DS	7.1	16.6	7.3	24.2	22.9	33.8	18

Tabla 25. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 8T y 9C en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ϵ	ζ	χ
1 C	---	---	295.9	143.7	-182.6	-107.2	-99.4
2 G	-80.3	213.8	39.1	140.5	-184.2	-96.8	-100.2
3 C	-59.1	165	59.8	101.1	-163.7	-85.3	-123.8
4 G	-64.9	169.1	55.8	146.8	-150.3	-150.4	-91.6
5 A	-62.9	151.8	59.7	140.1	-176.3	-83.3	-114.4
6 A	-70.7	174.5	49.7	111.3	-177.9	-93.3	-118.3
7 T	-62.9	165.1	57.5	91.6	-181.1	-83.2	-138.2
8 T	-60.2	166.3	67.8	126	-186.6	-94.9	-122.4
9 C	-63.1	185.7	54.4	134.8	-164.2	-84.8	-118.1
10 G	-70.9	160.9	53.5	143.7	-102.8	-204.3	-100
11 C	-72.6	150.8	51.3	145	-164.2	-87.1	-121.6
12 G	-82.8	173.8	52.3	138.4	---	---	-93
13 G	-68.9	172.9	56.3	86.9	---	---	-147.9
14 C	-70.4	130.3	56.9	83.1	-164.8	-69.4	-157.5
15 G	-78.9	163	51	138.8	-146	-169.2	-91.8
16 C	-60	177.5	56.5	133.9	-157.4	-83.8	-113
17 T	-62.2	173.8	61	120.4	-180.4	-95.2	-124.9
18 T	-61.9	164.6	60	95.9	-178.2	-81.7	-140.2
19 A	-69.2	169.1	59.1	115.4	-173.9	-84.8	-122.7
20 A	-54.6	187.8	56.8	143.3	-178.7	-94.6	-110
21 G	-64.6	176.8	62.3	142.3	-199.1	-93.6	-110.5
22 C	-66.5	162.2	57.9	82.5	-168.5	-80	-137.4
23 G	-66.6	186.4	49.6	134.6	-186.6	-100.8	-97.8
24 C	---	---	63.4	123.6	-180.3	-90.5	-111.1
Media	-67	170.1	56.2	123.5	-170.4	-100.6	-116.9
$\pm DS$	7.1	16.1	5.9	22	20	33	18

Tabla 26. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 9C y 10G en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	297.1	151.4	-184.7	-89.1	-113.8
2 G	-82	210	43.6	141.4	-179.6	-102.6	-92.7
3 C	-66.4	169.3	57.3	101.8	-179	-86.5	-119.3
4 G	-61.4	166.8	56.9	144.8	-160.2	-140.7	-100.7
5 A	-64	163.1	58.1	147	-171.3	-87	-112.4
6 A	-70.3	157.3	61.1	93.7	-172.6	-84.4	-143.8
7 T	-65.2	170.2	59.6	120.5	-176.9	-90.7	-125.7
8 T	-64.1	170	58.4	126.2	-162.3	-129.3	-121.4
9 C	-62.8	176	51.5	139.6	-163.7	-82.4	-120.9
10 G	-70.7	166.7	55.3	140.7	-108.8	-203.5	-97.7
11 C	-73.3	144.2	53.9	137.9	-162.3	-83.4	-126.7
12 G	-84.8	171.6	50.6	113.6	---	---	-105.4
13 G	-71.2	175.4	53.7	87	---	---	-141.6
14 C	-61	117	55.7	78.8	-157.4	-72.2	-153.1
15 G	-77.3	169.5	46.4	135.5	-137.7	-181.2	-91.6
16 C	-62.1	178.6	53.9	133.3	-166.1	-83.4	-111.2
17 T	-63.1	175.3	57.7	127.5	-180.7	-95.4	-120.5
18 T	-59.5	170.6	59.8	118.7	-179.3	-91	-129.1
19 A	-73.4	180.6	51.6	130.9	-181.9	-97.5	-112.1
20 A	-63.3	167.7	64.8	127.8	-171.4	-99.7	-116.9
21 G	-56.1	170.4	70.1	149	-180.8	-93.6	-102.6
22 C	-69.9	166.5	58.6	83.2	-186.8	-85.8	-134
23 G	-82.9	181.3	43.1	138.2	-180.7	-100.7	-100
24 C	---	---	64.8	124.8	-147.1	-109	-120.2
Media	-68.4	169	55.9	124.7	-167.8	-104.1	-117.2
$\pm DS$	7.9	16.5	6.5	21	18.2	33.2	16.3

Tabla 27. Ángulos de torsión del dodecamero de Drew Dickerson en interacción con una cafeína colocada entre las bases 10G y 11C en el surco mayor.

Residuo	Ángulos (°)						
	α	β	γ	δ	ε	ζ	χ
1 C	---	---	298.2	152.1	-178.8	-101.9	-114.5
2 G	-80	200.5	49.3	141	-177.7	-105.3	-99
3 C	-71.3	166.2	55.6	88.7	-173.4	-80.1	-129.3
4 G	-58.9	172.3	59.6	139.5	-178.2	-111.3	-111.4
5 A	-61.9	181.4	57.3	142.2	-183	-88.2	-104.2
6 A	-66.9	174.7	53.9	117.4	-176.8	-92.2	-118
7 T	-63.4	161.4	60.9	98.4	-179.8	-84.6	-137.3
8 T	-57.7	163.2	67.7	133.4	-172.7	-102.2	-122.5
9 C	-68.5	178.2	51.3	111.3	-165.8	-82.4	-126.1
10 G	-66.1	166.5	54.3	142.4	-92.8	-203.1	-103.8
11 C	-75.5	146.1	48.4	135.8	-175.2	-89.4	-120.9
12 G	-69	171.9	54.3	121.2	---	---	-121
13 G	-79.8	174.7	54.1	84.5	---	---	-138.7
14 C	-77.7	133.5	55	88.3	-162.8	-73.3	-141.7
15 G	-75.1	171.4	47.8	137.8	-127.2	-177.7	-91.9
16 C	-65.6	183.2	51.8	132.3	-169.6	-86.5	-113.8
17 T	-62.1	175.2	59	133.9	-179.2	-96.8	-117.7
18 T	-68	164.3	59	110	-183.5	-96.4	-128.8
19 A	-60.1	164.6	60.1	111.5	-169.2	-87.3	-128.1
20 A	-62	187.7	55.5	137.9	-183	-89.6	-111.1
21 G	-63.1	173.6	67.2	147.3	-189	-97.3	-107.8
22 C	-57.2	133.6	64.2	81.7	-173.9	-75.8	-142.4
23 G	-85	186.5	44.2	146.3	-153.7	-138.2	-111.8
24 C	---	---	62.9	140.8	-159.1	-119.5	-96.6
Media	-68	169.6	56.2	124	-168.4	-103.6	-118.3
$\pm DS$	7.9	16.1	6.1	21.7	21.7	32.7	14.4

Apéndice B. Esquemas de los puentes de hidrogeno fuertes entradas para cada tipo de átomo de la cafeína.

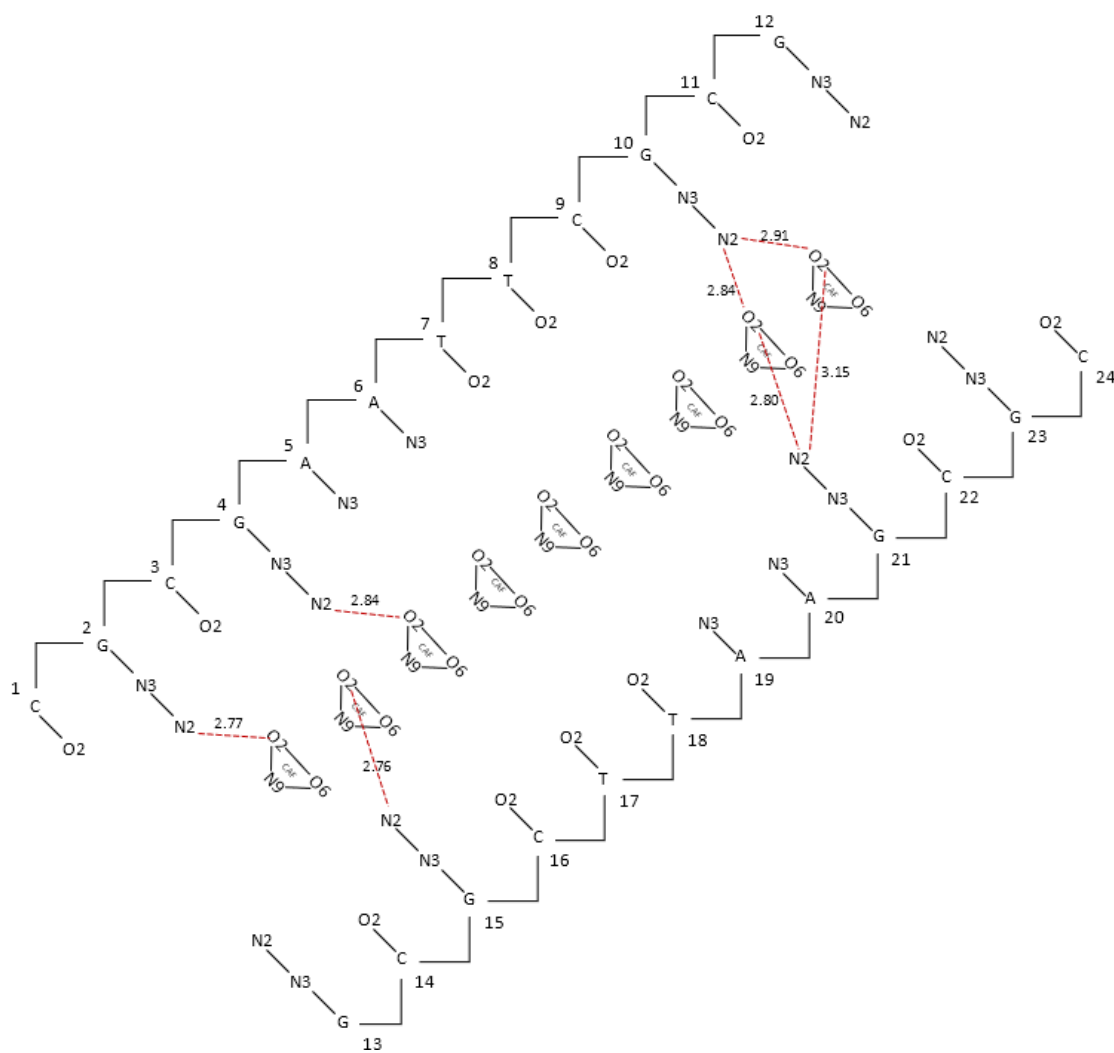


Figura 28. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo O2 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco menor.

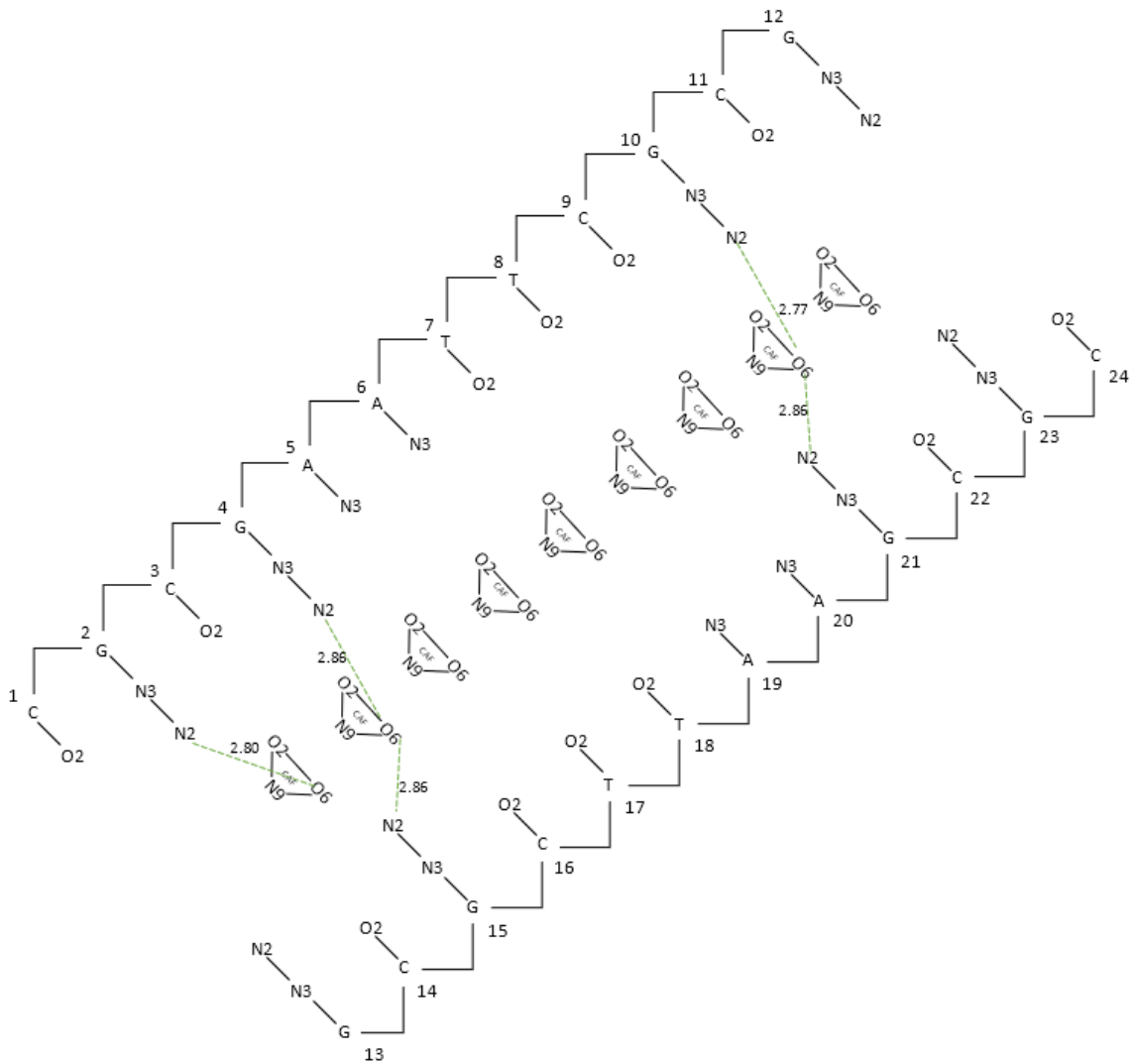


Figura 29. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo O6 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco menor.

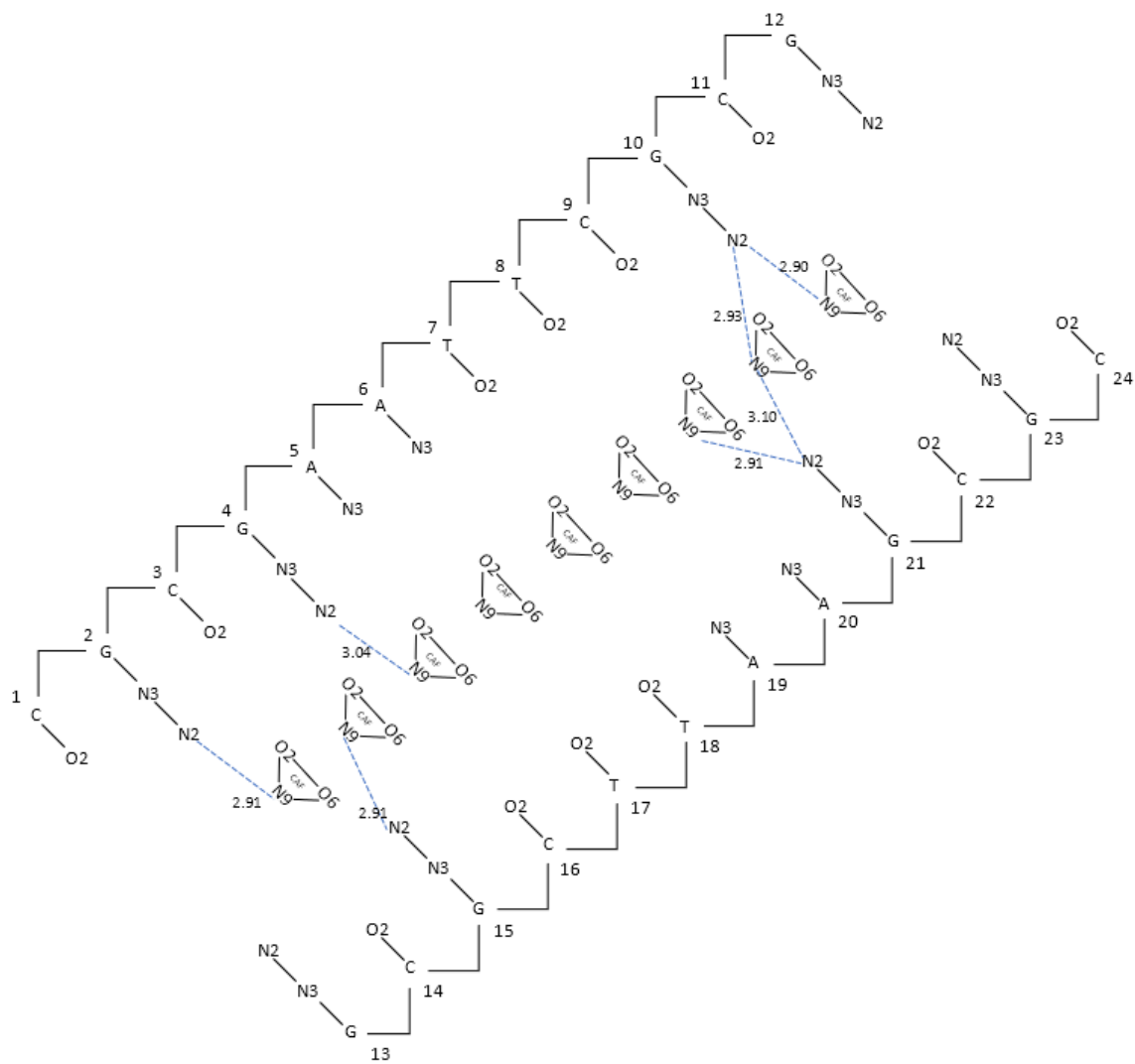


Figura 30. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo N9 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco menor.

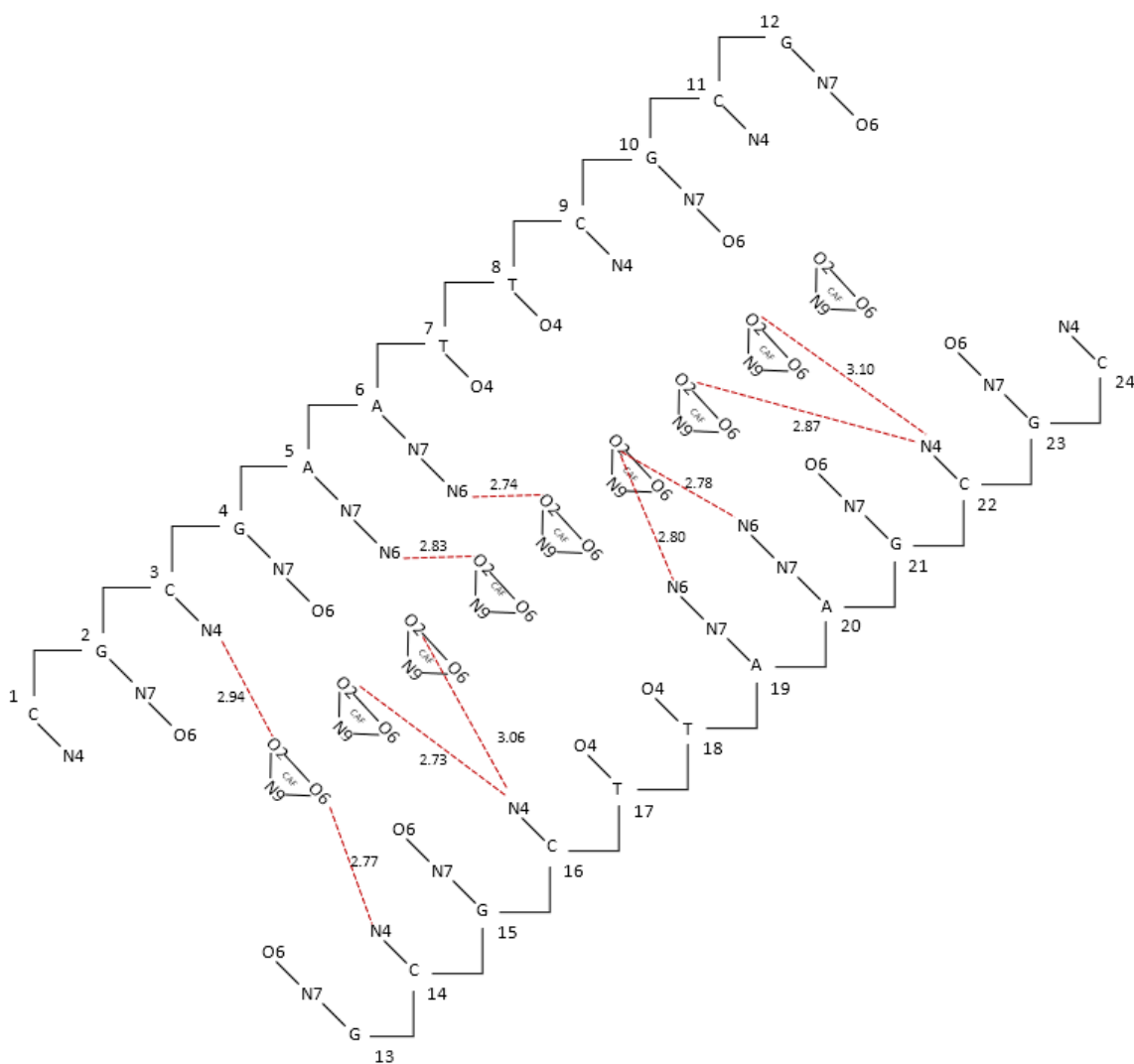


Figura 31. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo O2 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco mayor.

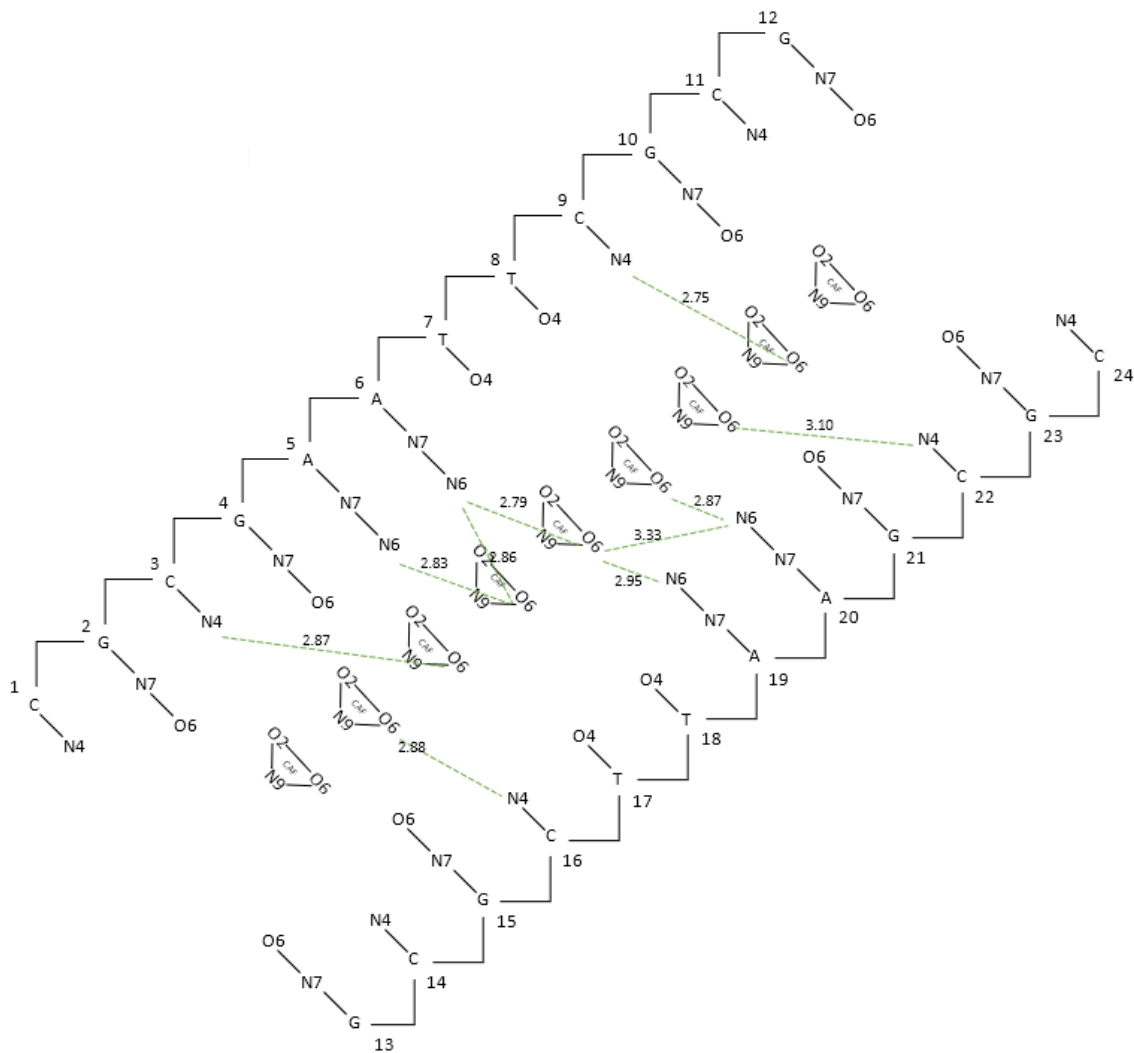


Figura 32. Enlaces y sus distancias en Å de los enlaces formados entre el grupo O6 de la cafeína en las diferentes posiciones estudiadas y las diversas bases del dodecamero de Drew Dickerson por su surco mayor.

Bibliografía

- [1] H. Ashihara and A. Crozier, "Caffeine: A well known but little mentioned compound in plant science," *Trends Plant Sci.*, vol. 6, no. 9, pp. 407–413, 2001.
- [2] A. Liguori, J. R. Hughes, and J. A. Grass, "Absorption and subjective effects of caffeine from coffee, cola and capsules," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 58, no. 3, pp. 721–726, 1997.
- [3] I. B. Goldstein, D. Shapiro, and K. A. K. I. T. Hui, "Blood Pressure Response to the " Second Cup of Coffee " Because of the widespread use of caffeine in the general population (1), there is considerable concern about its possible role in heart disease and hypertension (see review by Ernster (2)). If," vol. 345, pp. 337–345, 1990.
- [4] A. Goldstein, S. Kaizer, and O. Whitby, "Psychotropic effects of caffeine in man. IV. Quantitative and qualitative differences associated with habituation to coffee," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 10, no. 4, pp. 489–497, 1969.
- [5] H. Pohler, "Caffeine Intoxication and Addiction," *J. Nurse Pract.*, vol. 6, no. 1, pp. 49–52, 2010.
- [6] T. Hashimoto *et al.*, "Caffeine Inhibits Cell Proliferation by G0/G1 Phase Arrest in JB6 Cells," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 9, pp. 3344–3349, 2004.
- [7] G. M. Hill, D. M. Moriarity, and W. N. Setzer, "Attenuation of cytotoxic natural product DNA intercalating agents by caffeine," *Sci. Pharm.*, vol. 79, no. 4, pp. 729–747, 2011.
- [8] D. Cortez, "Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) protein kinases," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 39, pp. 37139–37145, 2003.
- [9] R. Daniel, E. Marusich, E. Argyris, R. Y. Zhao, A. M. Skalka, and R. J. Pomerantz, "Caffeine Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transduction of Nondividing Cells," *J. Virol.*, vol. 79, no. 4, pp. 2058–2065,

2005.

- [10] S. Fulle and H. Gohlke, "Molecular recognition of RNA: Challenges for modelling interactions and plasticity," *J. Mol. Recognit.*, vol. 23, no. 2, pp. 220–231, 2010.
- [11] L. Guan and M. D. Disney, "Recent advances in developing small molecules targeting RNA," *ACS Chem. Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 73–86, 2012.
- [12] J. Sheng, J. Gan, and Z. Huang, "Structure-Based DNA-Targeting Strategies with Small Molecule Ligands for Drug Discovery," *Med. Res. Rev.*, vol. 33, no. 5, pp. 1119–1173, 2013.
- [13] S. Tornaletti, P. Russo, S. Parodi, and A. M. Pedrini, "Studies on DNA binding of caffeine and derivatives: evidence of intercalation by DNA-unwinding experiments," *BBA - Gene Struct. Expr.*, vol. 1007, no. 1, pp. 112–115, 1989.
- [14] M. D. Kalugin and A. V. Teplukhin, "Study Of Caffeine–DNA Interaction in Aqueous Solution by Parallel Monte Carlo Simulation," *J. Struct. Chem.*, vol. 50, no. 5, pp. 841–852, 2009.
- [15] A. S. Deriabina, T. I. Grokhlina, N. A. Polteva, E. González, and V. I. Poltev, "Study of mechanisms of some caffeine biological effects via computer simulation of its interactions with DNA fragments," *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 769, no. 1–3, pp. 97–101, 2006.
- [16] M. H. F. Wilkins and J. T. Randall, "Crystallinity in sperm heads: Molecular structure of nucleoprotein in vivo," *BBA - Biochim. Biophys. Acta*, vol. 10, no. C, pp. 192–193, 1953.
- [17] F. Crick and J. Watson, "A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid," *Nature*, vol. 171, no. 4340, pp. 737–738, 1953.
- [18] H. R. Drew *et al.*, "Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 4, pp. 2179–2183, 1981.
- [19] M. S. Park, A. L. Dessal, A. V. Smrcka, and H. A. Stern, "Evaluating docking

methods for prediction of binding affinities of small molecules to the G protein $\beta\gamma$ subunits," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 49, no. 2, pp. 437–443, 2009.

- [20] S. Eid, A. Zalewski, M. Smieško, B. Ernst, and A. Vedani, "A molecular-modeling toolbox aimed at bridging the gap between medicinal chemistry and computational sciences," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 1, pp. 684–700, 2013.
- [21] D. S. Goodsell and A. J. Olson, "Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 8, no. 3, pp. 195–202, 1990.
- [22] O. Trott and A. J. Olson, "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading," *J. Comput. Chem.*, vol. 32, p. NA-NA, 2009.
- [23] M. Karplus and J. A. McCammon, "Molecular dynamics simulations of biomolecules," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 9, no. 9, pp. 646–652, Sep. 2002.
- [24] J. C. Phillips *et al.*, "Scalable molecular dynamics with NAMD," *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1781–1802, 2005.
- [25] J. Li, "Basic Molecular Dynamics," in *Handbook of Materials Modeling*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2005, pp. 565–588.
- [26] I. Ivani *et al.*, "Parmbsc1: A refined force field for DNA simulations," *Nat. Methods*, vol. 13, no. 1, pp. 55–58, 2015.
- [27] A. K. Rappe, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard, and W. M. Skiff, "UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 25, pp. 10024–10035, Dec. 1992.
- [28] L. Lercher *et al.*, "Structural insights into how 5-hydroxymethylation influences transcription factor binding," *Chem. Commun.*, vol. 50, no. 15, pp. 1794–1796, 2014.
- [29] D. A. Case *et al.*, "The Amber biomolecular simulation programs," *J. Comput.*

Chem., vol. 26, no. 16, pp. 1668–1688, 2005.

- [30] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, “Development and Testing of a General Amber Force Field,” *J. Comput. Chem.*, vol. 56531, no. 9, pp. 1157–1174, 2004.
- [31] R. Galindo-Murillo *et al.*, “Assessing the Current State of Amber Force Field Modifications for DNA,” *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 12, no. 8, pp. 4114–4127, 2016.
- [32] H. R. Drew and R. E. Dickerson, “Structure of a B-DNA dodecamer. III. Geometry of hydration,” *J. Mol. Biol.*, vol. 151, no. 3, pp. 535–556, 1981.
- [33] C. M. Gibson and P. W. Fowler, “Aromaticity of caffeine, xanthine and the dimethyl xanthines,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 55, no. 13, pp. 2078–2081, 2014.
- [34] G. R. Desiraju, “The C-H...O Hydrogen Bond: Structural Implications and Supramolecular Design,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 29, no. 9, pp. 441–449, 1996.