Presentación

En los primeros meses del año 1992, en el seno de una Junta de Gobierno primero, y de una Junta General después, se debatió y se tomó el acuerdo de iniciar la publicación de las Monografías de la Real Academia de Farmacia del Instituto de España de Actualización en Ciencias Farmacéuticas de las que se presenta ahora el primer número.

Cabe preguntarse: ¿Qué son las Reales Academias, y qué se pretende lograr con la serie de MONOGRAFIAS que ahora se inicia?

En nuestra opinión, ambas preguntas tienen respuesta. A la primera se puede responder transcribiendo las frases del Prof. Artola, Presidente del Instituto de España, en la presentación del libro de reciente publicación: «LAS REALES ACADEMIAS DEL INSTITUTO DE ESPAÑA»: «La Academia es, en su versión más simple, la reunión en torno a una mesa de un grupo de personas de capacidad probada y cuyas opiniones, aún lejanas, por razón de la materia, tienen particular interés para los otros. El debate incondicional es el atributo esencial de la vida académica.» Así, la Academia se erige en foro de discusión, y foco de radiación, de los conocimientos e inquietudes propios de la rama de la Ciencia a la que consagra su trabajo.

A la segunda pregunta: ¿Qué se pretende con esta serie de MONOGRAFIAS?, también hay una respuesta. Proporcionar a los científicos y profesionales, que trabajan en cualquiera de los campos de las Ciencias Farmacéuticas, una visión actualizada, escrita por destacados especialistas, de la materia objeto de cada una de las MONOGRAFIAS.

Es digna de encomio la favorable acogida que tuvo, por parte de todos los señores Académicos, la idea de iniciar una publicación de esta naturaleza, que, con una periodicidad de unas dos monografías por año, permitiría una revisión cíclica de los contenidos de cada número. En una ciencia en continua evolución, cinco años es un período de tiempo excesivo para pretender que las ideas mantengan plena vigencia. Los hechos fundamentales no cambian, pero las fronteras del saber se desplazan de forma ininterrumpida ampliando los conocimientos y beneficiándose de nuevas aplicaciones.

Quizá sea conveniente una breve indicación de cómo se gesta una MONOGRAFIA. El mecanismo es bien sencillo. Cualquier señor Académico puede proponer la materia objeto de una nueva MONOGRAFIA. Entre las propuestas, la Junta de Gobierno selecciona y propone los contenidos más sugestivos a la Junta General. Acordado el contenido, se designa un Académico de Número como coordinador de los trabajos, quien propone los colaboradores que van a intervenir en la redacción, y asigna a cada uno, en razón de la materia en la que está especialmente cualificado, el capítulo que debe desarrollar. El coordinador de cada monografía asume la responsabilidad, ante la Real Academia, de la elección de contenidos, autores, calendario y ejecución.

Al tiempo que se manifestaba una muy favorable predisposición a emprender la tarea, se ponían de relieve las dificultades de naturaleza económica que podría suponer llevarla a cabo, dada la endémica penuria de medios de nuestra Institución. Se han discutido posibles fuentes de financiación encaminadas, exclusivamente, a hacer frente a los gastos que comporta la edición, prescindiendo de cualquier beneficio, ajeno al puramente intelectual, que pudiera derivarse para esta Real Academia.

Gracias al mecenazgo de una institución tan representativa de la Industria Farmacéutica como es FARMAINDUSTRIA, se ha logrado la edición y publicación de este primer volumen. La gratitud de esta Real Academia a la citada Asociación es profunda y sincera y tiene sus nombres propios: Jorge Gallardo, Presidente de FARMAINDUSTRIA, y Enrique González Hervada, Vicepresidente Primero y Director General, decidido y permanente impulsor de las muy importantes y destacadas actividades científicas y culturales de FARMAINDUSTRIA.

El propio contenido del libro ha facilitado grandemente este punto de encuentro entre la Real Academia de Farmacia y FARMAINDUSTRIA. Es ciertamente indiscutible que un texto –una Monografía– que trata de «Diseño de Fármacos», escrito por los primeros especialistas del país, constituye un claro punto de convergencia en el que confluyen el interés académico y el de la industria farmacéutica.

Esperemos que esta primera MONOGRAFIA tenga una acogida proporcional al entusiasmo que se ha puesto en su preparación y edición, y que, con el andar de los años, el conjunto de MONOGRAFIAS publicadas constituyan una Colección de referencia para todos los estudiosos de las Ciencias Farmacéuticas.

RAFAEL CADÓRNIGA
Director de la Real Academia de Farmacia

Prólogo

La Real Academia de Farmacia inicia una Serie de textos bajo el título «Monografías de la Real Academia de Farmacia del Instituto de España de Actualización en Ciencias Farmacéuticas». FARMAINDUSTRIA ha visto con especial interés el proyecto por lo que tiene de relación con las actividades de nuestra Industria, siempre en vanguardia en la investigación de medicamentos.

Aquel interés alcanzó máximas cotas cuando conocimos que el primer volumen de la «Serie» se referiría a «Diseño de Medicamentos». El que un tema de tanto interés en la creación e investigación de fármacos fuese abordado, con todas las garantías científicas, por un plantel de profesores e investigadores como los que firman el volumen, nos estimula grandemente para alinearnos con la Real Academia de Farmacia en la publicación de este primer número de las Monografías.

No es preciso subrayar que el diseño de fármacos incluye facetas tan complejas como la mecánica molecular, la estructura de los receptores o las distancias geométricas y exige dominar tecnologías como el reconocimiento de patrones, la conectividad molecular, la computación de modelado molecular, el análisis conformacional, los métodos variacionales o las técnicas QSAR.

Todos estos aspectos están tratados con singular altura y su ensamblaje garantizado a través de un minucioso estudio de los fundamentos generales del diseño de fármacos.

Cada vez más lejos de la «ruleta molecular», la Industria Farmacéutica innovadora prioriza sus esfuerzos en I + D en nuevas técnicas en las que la relación estructura-actividad cobra mayor fuerza y, por consiguiente, son precisos más sofisticados modelos –diseño asistido por ordenador: supercomputación–, conducentes a lograr una mayor racionalización en la búsqueda de nuevos fármacos.

Hemos pasado, como se dice en la literatura científica, de una «química del producto» a una «química de la función». Nuevos campos, como la terapia génica, abren, también, prometedoras vías en el diseño de fármacos partiendo, en este caso, de la íntima estructura del genoma.

Acierto sin duda de FARMAINDUSTRIA al propiciar la publicación de este volumen, espléndida iniciativa de la Real Academia de Farmacia del Instituto de España, que abre con él su Serie de Monografías a las que auguró un éxito tan rotundo como el que, sin duda, alcanzará este número.

JORGE GALLARDO
Presidente de FARMAINDUSTRIA

Fundamentos del Diseño de Medicamentos

ARTURO MOSQUEIRA TORIBIO
de la Real Academia de Farmacia

El descubrimiento de un nuevo medicamento y el desarrollo posterior del mismo, son las dos fases, que condicionan lograr un nuevo producto que sea útil en terapeútica.

El descubrimiento debe ser diferenciado del desarrollo. Se puede acordar, considerar, el descubrimiento como la fase que comprende todo lo necesario para que podamos asegurar que el compuesto posee un deseable perfil de actividad; comprende toda la fase pre-clínica de los ensayos, que constituyen las pruebas de eficacia y seguridad, que nos confirmen que el compuesto es aceptable para su ensayo en seres humanos.

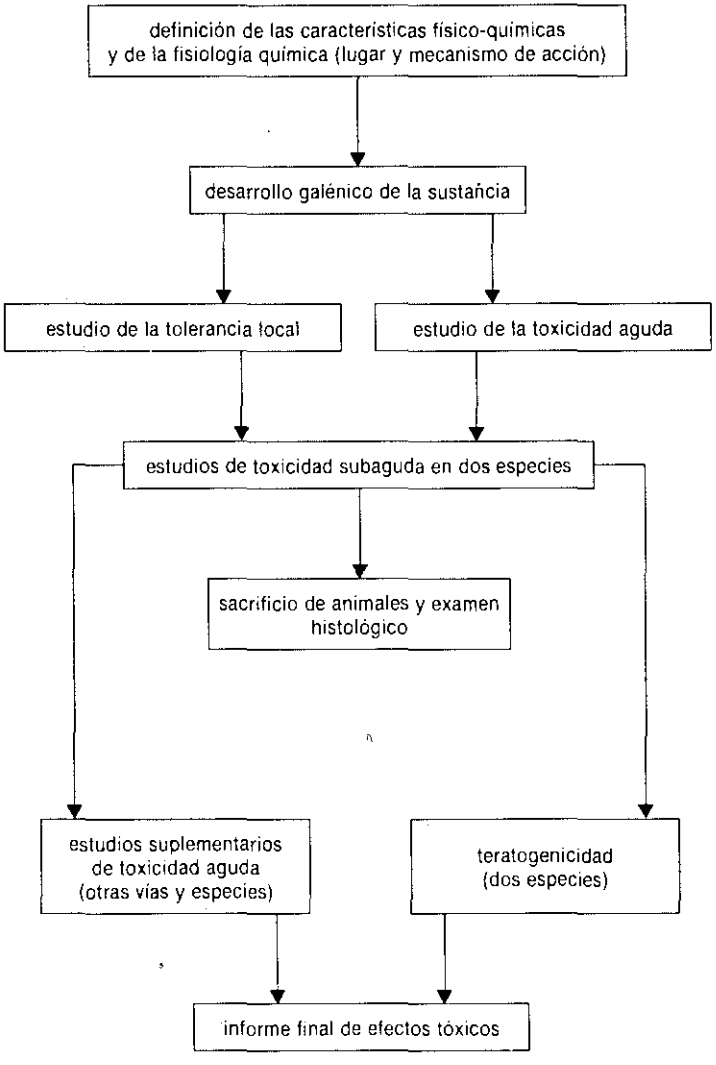
Esta fase pre-clínica que constituye el descubrimiento del medicamento incluye a su vez dos etapas. Una la creación de una nueva molécula o compuesto activo y otra la comprobación de su eficacia y seguridad.

La creación de una nueva entidad terapéutica es un proceso largo y costoso, que pone a prueba la creatividad de un equipo de trabajo y que requiere una importante acumulación de recursos tecnológicos y humanos.

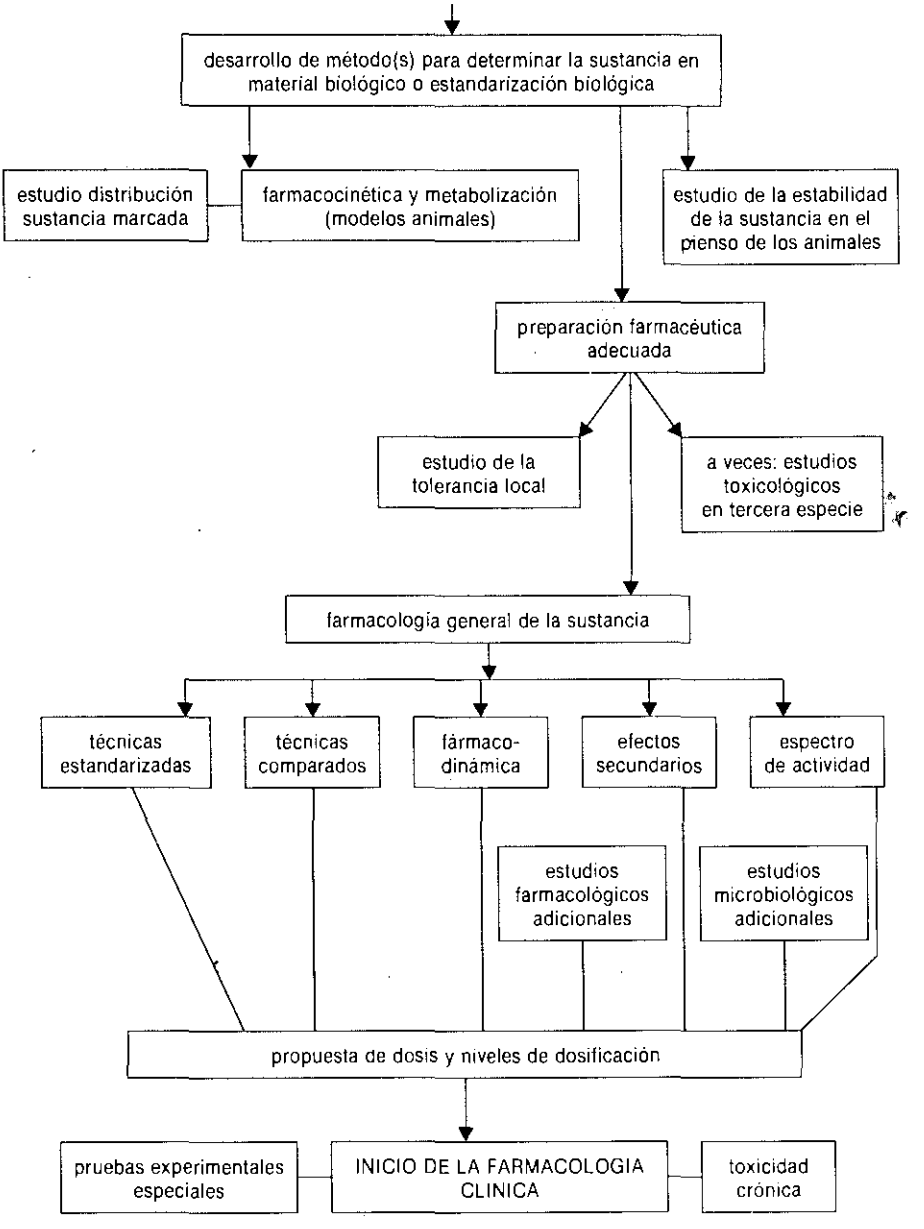
Es toda una larga secuencia de actos que culminan en la utilización en terapéutica de un nuevo medicamento; comienza con la obtención de un nuevo producto activo obtenido a partir de una fuente natural, por síntesis orgánica, o por bio-tecnología.

En todo caso, y es importante hacerlo constar cuanto antes, no es bastante la obtención, la síntesis o el descubrimiento de una nueva entidad química, es preciso someterla a unos ensayos que fijen su actividad y la seguridad de su empleo.

Así indicamos, en las tablas siguientes, el conjunto de pruebas que debe superar una nueva entidad antes de su primera aplicación en el hombre:


definición de las características físico-químicas
y de la fisiología química (lugar y mecanismo de acción)
desarrollo galénico de la sustancia
estudio de la tolerancia local
estudio de la toxicidad aguda
estudios de toxicidad subaguda en dos especies
sacrificio de animales y examen
histológico
estudios suplementarios
de toxicidad aguda
(otras vías y especies)
teratogenicidad
(dos especies)
informe final de efectos tóxicos

sigue



Obtenido de la publicación del Dr. Aznar López, director médico de Boeringer Ingelhein. España. Del curso de la Universidad de Málaga. Departamento de Farmacología.

La fase preclínica, es decir, desde su síntesis al primer ensayo en humanos se estima que dura 42,6 meses. Además, los ensayos de larga duración y el desarrolo clínico de las fases uno, dos, tres, duran otros 68,6 meses. A esto hay que añadir el tiempo que tarda en ser aprobado por la Administración, 30,3 meses, como promedio. En total un largo período de 11,8 años.

Esto representa, para una nueva entidad un coste en investigación y desarrollo de unos 231 millones de dólares para el período entre 1975 y 1982; (Según Ronald Hansen, "The Pharmaceutical Development Process: Estimates of Current Development Costs and Times and the Effects of Regulatory Change" in R.I. Chien ed., Issues in Pharmaceutical Economics (Lexington Books, Lexington. MA), pp. 151-187).

Los costes preclínicos parecen haberse elevado más rápidamente que los clínicos y, por ello, son más significativos en el coste total en el período 1970-1982 que en el 1963-1975. La gran complejidad que implica todo este largo proceso hace que el número de nuevas entidades introducidas en terapéutica, sea muy corto en relación con las moléculas que han sido sintetizadas para obtener productos de interés en medicina. Así en el cuadro siguiente:

Número de nuevas Entidades Farmacéuticas introducidas en los cinco últimos años:

AÑO	NUMERO
1987	61
1988	53
1989	35
1990	40
1991	43*
TOTAL	232

*

CARDIOVASCULARES	10
ANTI-INFECCIOSOS	8
ONCOLITICOS	5
PSICOTROPICOS	4
VARIOS	16

Fuente: Scrip, 14.1.1.992 (2)

Un paso decisivo en la fijación de relaciones cuantitativas actividad-/estructura, lo establecen los trabajos de Ferguson, que determina, por vez primera, una ecuación general entre la actividad y distintas constantes (1939).

Las ecuaciones:

$$C_r = KS_r^{1/n}$$

$$C_r = KP_r^{1/n}$$

relacionan la concentración tóxica de una serie de compuestos, la solubilidad S en moles/litro y la presión de vapor P; C_r significa la concentración tóxica del término r, y k y n son constantes, siendo n siempre mayor que 1.

Estas ecuaciones pueden generalizarse, escribiendo c_r + KA, siendo A, el parámetro elegido (coeficiente de partición, número de átomos de carbono de una cadena lateral, solubilidad, presión de vapor, etc.).

En 1956, Bruice, Kharasch y Winzler determinan la base de modelos cuantitativos estructura/actividad, que ha constituído el comienzo de una serie de trabajos efectuados posteriormente a los años 60.

Un nuevo paso, decisivo, en el diseño de nuevos medicamentos lo estableció Hansch (1964) utilizando la ecuación de Hammett (1956); empleó como base la velocidad de hidrólisis de derivados del ácido benzoico

$$\log \frac{Kx}{Ku} = \rho\sigma$$

siendo Kx y Ku las constantes de equilibrio para las reacciones de los compuestos sustituídos y no sustituídos, respectivamente; σ y ρ unas constantes que dependen de la naturaleza y del tipo de la reacción y la clase de compuestos.

Como que el logaritmo de la constante de equilibrio es proporcional al cambio de energía libre:

$$\Delta G = -RT \ln K$$

la ecuación anterior y otras análogas derivadas de ellas, se consideran dentro de un grupo común llamado Lineal Free-Energy-Related (L.F.E.R.).

Hansch, basándose en los trabajos de Overton y conociendo la importancia del coeficiente de partición en el transporte de la molécula activa, hasta el lugar de acción, ha ampliado la expresión de Hammett

incluyendo parámetros de orden fisioquímico; comprende dos procesos fundamentales:

1º El movimiento de la molécula activa desde el punto de aplicación al lugar donde va a ejercer su acción.
2º Interacción química o física con el receptor.

Ambos procesos son diferentes en tiempo y espacio, pues el medicamento, antes de llegar al punto donde va a actuar, ha de pasar por una serie de compartimientos, construídos fundamentalmente por fases acuosas y lípidas; este hecho fue tenido en cuenta por Meyer y Overton y se ha incorporado al modelo de Hansch.

La expresión de Hansch:

$$lg\left(\frac{1}{c}\right)=K_1\pi+\rho\sigma+k_2$$

en la que c representa la concentración molar de la molécula activa; π es el coeficiente de partición, definido como la diferencia entre los logaritmos de los coeficientes de partición en octanol/H_2O de los compuestos sustituídos y no sustituidos de una serie determinada; σ es la constante de Hammet; K_1 y K_2 son las constantes que se obtienen, en una serie determinada, por análisis de regresión de los datos experimentales.

En el capítulo correspondiente se estudian estas técnicas ampliamente.

Si se conoce la base biológica de una enfermedad o de un desarreglo metabólico, es posible diseñar un medicamento, utilizando un mecanismo de aproximación al proceso patológico. Cuando se conoce este proceso en su base molecular y se pueden definir las moléculas implicadas en el mismo, es posible diseñar medicamentos que interactúen con la molécula responsable, de tal forma que la modifique y se modifique, asimismo la patología.

Lo primero, sería definir la base molecular del proceso patológico, para lo cual es preciso conocer los diversos pasos implicados en un proceso fisiológico, que conlleva la realización de una función normal y el conocimiento de qué paso, exactamente, es el que está alterado, en la situación patológica.

El punto clave, es saber cuales son las moléculas responsables; frecuentemente son macromoléculas: enzimas, receptores o ácidos nucleicos.

Este tipo de enzimas, como por ejemplo, la Dihidrofolato reductasa, son proteínas de no alto peso molecular, solubles en agua y fácilmente aislables. En algún caso, puede ser obtenidas por ingeniería genética, en cantidades suficientes para su estudio por rayos X o NMR, con lo que se puede determinar su estructura tridimensional y, asi, es posible diseñar efectores, por técnicas de computación gráfica o modelación.

A veces, una patologia se reduce por el bloqueo de la acción de un efector sobre un receptor celular, por ejemplo la inhibición del efector histamina-2 gástrica por la cimetidina, con lo que se reduce la formación de úlceras. Los receptores a diferencia de las enzimas, que circulan por el organismo y pueden ser estudiadas fuera de su entorno biológico, están embebidos en la membrana celular. No obstante pueden ser aislados y también, por ingenieria genética, pueden ser obtenidos en cantidades suficientes para su estudio estructural.

Algunas enfermedades pueden ser evitadas, bloqueando la síntesis de proteinas no deseables, al nivel del ácido nucleico, esta estrategia se utiliza en antimicrobianos y anticancerosos, empleando medicamentos que bloquean el DNA y previenen la sintesis de proteinas, que son necesarias para el microorganismo o la célula tumoral, impidiendo por ello su proliferación. Un ejemplo seria la utilización de adriamicina para tratar ciertas formas de cáncer. Los antimaláricos parece ser que actúan de esta manera, produciéndose una transferencia de carga entre los niveles HOMO y LEMO del DNA del germen y el antimalárico.

Según Kuntz (1992), posiblemente las nuevas generaciones de medicamentos serán obtenidos por una combinación de métodos computacionales y cristalográficos, pero en la actualidad la gran mayoria han sido y son derivados por selección de grupo de moléculas ,previamente obtenidas, por métodos variacionales a partir de una molécula o núcleo prototipo. Los sistemas robóticos permiten verificar miles de ensayos por dia utilizando nuevos métodos de análisis instrumental cada vez más sofisticados. Se puede según Kuntz revisar los datos de cien mil a quinientos mil compuestos en plazo de 1 año. Los ensayos toxicológicos pueden ser acelerados por la utilización de microsensores. Como indica Kuntz, el único medicamento útil, actualmente, contra el sindrome de inmunodeficiencia adquirida, ha sido obtenido por técnicas de selección, por métodos variacionales.

El mismo Kuntz apunta la importancia de los métodos que interfieren en los mecanismos específicos de sistemas bioquímicos y las estrategias derivadas de los trabajos de Hansch (1969), relacionan la actividad biológica y ciertos parámetros físico-químicos (coeficientes de partición, volúmenes moleculares, refractividad molecular, etc.).

Se refiere también a los métodos basados en la estructura del receptor y su complementario, la molécula agonista. El ciclo comienza con la determinación de la estructura del receptor; se utilizan métodos experimentales y principios teóricos, para seleccionar una serie de posibles ligandos. Estos compuestos son sintetizados y ensayados. el punto final sería la determinación de la estructura del complejo ligando-receptor.

Se ha desarrollado un programa llamado Dock, para insertar los ligandos proyectados, en los lugares apropiados del receptor. El punto de partida es el conocimiento de la estructura de la macromolécula. El programa explora 3 aspectos importantes: una imagen en "negativo" del lugar del receptor, localización del ligando dentro de este lugar y evaluación de la efectividad del acoplamiento. El programa es válido no solo para receptores y enzimas, sino también para ácidos nucleícos, Kervin 1991. El segundo paso del programa es la determinación de la estructura de los ligandos proyectados, Rusinko (1989), bien por rayos X o por métodos de computación y la comparación de las distancias, lo que Wilson llama el grado isomórfico.

La determinación de todos los posibles caminos para encajar estructuras complejas, no es fácil; se pueden utilizar métodos de "feliz idea". Según Schoichet (1992) se pueden experimentar millares de alternativas diferentes por segundo. En cada orientación debe ser comprobada su efectividad, actualmente, además, se emplean también métodos que incluyen el campo de fuerzas intermoleculares. Meng (1992).

La estructura de los ligandos puede ser examinada a una cadencia de 10 a 100 por minuto, dependiendo de su complejidad. Es posible llegar a revisar, con una estación informática adecuada, hasta 100 mil estructuras en 1 semana.

Utilizando el programa DOCK y el CSD (Cambridge Structural Data Base), la escuela de Kuntz, ha podido diseñar inhibidores para una gran variedad de sistemas enzimáticos y de receptores.

Kuntz señala también que de 100 ó 200 compuestos prometedores, examinados por sistemas gráficos computacionales, entre 10 a 50 son seleccionados para su ensayo toxicológico y farmacodinámico. Entre el 2% y el 20% de los compuestos mostraban actividad del orden de micromol.

Los sistemas utilizados se indican en la tabla siguiente:

TABLA I

Relación estructura actividad
Gráficas
- a) Gráficas interactivas
- b) Superficies moleculares

Cálculos moleculares
- a) Métodos cuánticos
- b) Generación de conformaciones
  - b.1) Sistemática
  - b.2) Heurística
  - b.3) Geometría de la distancia

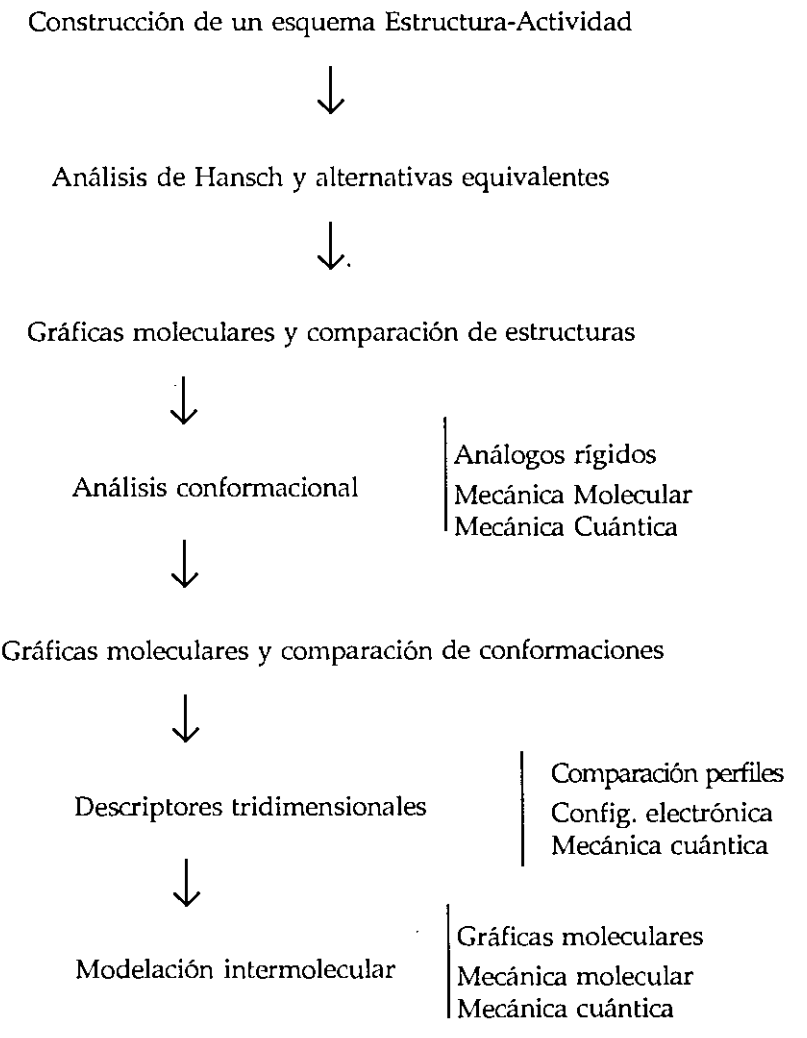
Mecánica Molecular
Dinámica molecular
Perturbación de la energía
Ajuste
Similitud

En 1985, A.J. Hopfinger indicaba un esquema de actos que condicionan la creación de un nuevo medicamento, como se indica en el cuadro I.

La pérdida de una molécula candidata en las etapas finales, supone tal frustración y pérdida de tiempo, que todos los esfuerzos que se hagan para detectar dificultades en las etapas iniciales, serán muy deseables.

Señala, asi mismo, los éxitos obtenidos (hasta entonces), por una predicción correcta, entre ellas indica los conseguidos por la firma Kiorin japonesa, en el campo de las quinolonas con la creación del AM 715, un ácido quinoloncarbónico, introducido por Merck en Italia y que según Hopfinger, seria el primer producto diseñado por C.A.D.D.. Otro éxito del sistema C.A.D.D., sería la sintesis de aminolactamasas inhibidoras de la angiotensina convertasa (Thorsett 1983) tan activas como el MK-422. Hassal de la casa Roche (1992) ha preparado análogos biciclicos del captoril, original de Squibb, por métodos de determinación de estructura por rayos X, NMR y C.A.D.D. Kuiper y colaboradores han diseñado inhibidores de la D.H.F.R., análogos al trimetoprin.

CUADRO I



Ha sido un punto muy controvertido, la patente obtenida por Yano de la Yano-Miyazaki, en Estados Unidos, en la que reivindica, no un producto ni un método de obtención de un producto, sino un método de predicción de productos edulcorantes.

Hopfinger cita también,que los laboratorios Searle hicieron 83 predicciones de compuestos en un periodo de 3 años; solamente 57 de éstos 83 compuestos predichos fueron sintetizados, por dificultades técnicas en la

obtención de los restantes. En total fueron 24 predicciones correctas, es decir el 42%.

El mismo Hopfinger, indica en la tabla siguiente la situación en 1.985, de los productos, que estaban siendo ensayados en aquellas fechas, por diferentes laboratorios y que procedian de predicciones realizadas por los métodos que se indican a continuación:

CUADRO II

Organización	Arcaterapéutica	Metodo	Situación	
			Desarrollo	Clínica
Sintex	β bloqueante cardiovascular	Hansch	X	X
	Antiinflamatorio	Hansch	X	
Searle	Antiarrítmico	Análisis perfil molecular	a	a
Smith-Kline	inhibidor renina	Hansch	X	
Merk	Analgésido opiáceo no aditivo	Perfil Molecular	X	
SRI	Insecticida	Computación	a	a
FML		Hansch	X	

a) Ensayo clínico inmediato

Conocer la estructura tridimensional de la molécula objetivo, es pocas veces posible, sobre todo por la dificultad de obtener cristales de las proteínas que constituyen las enzimas y los receptores.

Los métodos comunmente utilizados son NMR, cristalografía de rayos X y el cálculo teórico de las fuerzas que mantienen la configuración de un sistema: mecanica molecular y mecanica cuantica.

La cristalografía por rayos X es la técnica que proporciona, directamente, una representación de la estructura tridimensional, incluyendo distancias y ángulos de enlace, estereoquimica y configuración absoluta.

Los cristales están formados por unidades estructurales repetidas, que pueden ser analizadas, utilizando una longitud de onda apropiada tal como la de los rayos X cuya longitud de onda está alrededor de 0,75 Å, es decir, la mitad de la distancia C-C alifático.

El problema mayor, como hemos dicho, es obtener cristales apropiados. Técnicas adecuadas se pueden consultar en Macpherson 1982 y Feigelson 1985, que incluyen los métodos más utilizados; precipitación de soluciones salinas de disoluciones con disolventes orgánicos miscibles con soluciones buffer; microdiálisis o la difusión en fase vapor. Esta técnica permite obtener cristales con un miligramo o menos de material. En una

propuesta presentada al Meeting de la American Cristalographic Association, Philadelphia Junio-Julio 1.988, Snartzendaruber y Jones, describen el método automatizado: APOCALIPSE.

Son difíciles de tratar las moléculas grandes, pero en moléculas pequeñas la máxima resolución que puede conseguirse es de la mitad de la longitud de onda de la fuente de rayos X. Para moléculas de un peso molecular de mil o menos se puede llegar a una resolución hasta de 0,77 Å.

En la mayor parte de las macromoléculas se obtiene una resolución de 2-3 Å. Con una resolución de 5 Å se puede mapificar el contorno de la macromolécula. Con un mapa de 3 Å se puede determinar la localización de casi todas las cadenas laterales. El proceso de los datos obtenidos, si se hiciese manualmente, en el caso de un virus con 19,8 millones de puntos y 590.915 reflexiones, se necesitarían 156 millones de años según una cita de Perun 1989. La rápida evolución de la computación permite el uso de las supercomputadoras. En todo caso, segun J.A. Sillince y M. Sillince (1991), en la actualidad se conocen unas 14 mil proteínas; sin embargo solamente se han podido determinar en unas 900, su estructura terciaria. En este sentido es de de la mayor importancia la utilización de bancos de datos para el estudio estructural. Estos bancos de datos contienen las coordenadas atómicas, citaciones bibliográficas y otros tipos de información.

El Cambridge Structural DataBase (C.S.D.), fue iniciado por Olga Kennaro. Contiene las coordenadas de cerca de 2 millones de átomos, de los que el 50% han sido publicados desde 1.980. En Enero de 1.987 contenía 56.642 estructuras cristalinas.

El Brookhaven Protein Data Bank, es un banco de datos establecido en 1.971 y depositario de estructuras cristalinas de macromoléculas y contiene las coordenadas de estructuras de proteínas y ácido nucleicos.

Para el estudio de las interacciones de moléculas de peso molecular bajo con macromoléculas, es importante la Inorganic Cristal Structure Data Base (CRISTIN), en Karlruhe. El U.S. National Bureau of Standard Cristal Data File (CRISDAT), contiene datos de sólidos cristalinos, alrededor de 130.000 compuestos, según Abola, Berstein y Kuetzele, 1.988 Computational Molecular Biology and Sources and Methods for Secuence, University Press.

Recientemente, se ha establecido una base de datos para carbohidratos (C.C.S.D.).

El banco de datos de proteínas (PDB), llamado también CRISTPRO de Brookhaven, comprende unos 400 sets de coordenadas, determinadas con suficiente resolución; el número de macromoléculas cristalizadas es alrededor

de 1.200, la mayor parte son enzimas y no enzimas y también RNA y DNA. Mantiene una estrecha conexión con las revistas científicas, que envian sus datos, antes o simultáneamente a la publicación de los trabajos relacionados con el estudio de estructuras.

En todo caso, la Comisión Biological Macromolecules of International Union of Cristalography (C.B.M.I.U.C.), ha instaurado una policia de la verificación de datos, desde los primeros estudios y depósitos relativos a los estudios cristalográficas de macromoléculas biologicas; se exige,que los datos referentes a coordenadas atómicas y estructuras descritas en el trabajo,sean depositadas en el banco de proteínas de Brookhaven.

El Complex (Carbohidrate Structure Data Base (C.C.S.D.), recoge los datos sobre estructuras de carbohidratos. En 1.986 había reseñadas entre 6.000 y 8.000 estructuras, actualmente se publican unas 1.000 nuevas estructuras cada año, debido a los métodos de análisis cada vez mas refinados y al mayor interés que suscita su estudio, para el mejor reconocimiento de los procesos biológicos.

El punto clave es la relación entre las estructuras secuencial y tridimensional. La secuencia de los aminoácidos en una proteína (enzima o receptor), es posible conocerla, aún partiendo de cantidades muy pequeñas por métodos químicos o utilizando la técnica del DNA recombinante. Hulme 1.990, sin embargo es necesario conocer la estructura terciaria y las relaciones entre ambas. Hasta recientemente no se había organizado, convenientemente, el acceso, tanto a los datos primarios (secuencias y propiedades físico-químicas), a los datos secundarios (asignamiento de los residuos a hélices) y a los terciarios (interacción entre los elementos de los datos secundarios y las regiones). Una aproximación a esta interelación ha sido la Canadian Scientific Numeric Data Base Service (CAN/SND) de Wood y Col 1.989) que permite llegar a una gran variedad de bases de datos "on line", internacionales. Otro ejemplo que permite acceder a muchas de los data-bases de secuencias, son las NBRF Swissport Genbank y la Base de Estructuras de Brookhaven, y la llamada Integrates Structures (I.S.I.S.) desarrollada por Protein Engineering Club (Asking 1988).

La utilidad de I.S.I.S está en poder reconocer secuencias, que conducen a familias de proteínas que pueden llevar a encontrar similitudes entre diferentes proteínas. Por ejemplo: Thorton (1989), establece que 12 de 13 secuencias Gli-Gli cualquier aminoácido-Leucina, tienen una configuración X-X Beta, así mismo ofrece otros ejemplos de puentes disulfuros entre las hélices alfa.

Estas similitudes pueden tener consecuencias sorprendentes, así la secuencia entre la proteína de la leche, betaglobulina es similar a la proteina

de unión del retinol humana, lo que sugiere una posible función de la betaglobulina para facilitar la retoma de retinol en animales jóvenes, según Pervaiz y Brew 1.985; es posible asi mismo, estudiando similitudes entre las diversas proteínas, llegar a consecuencias sobre la evolución de una proteina determinada. Se establece el criterio de homologia y similitud; si las secuencias coinciden en un 25% o más, son homólogas y si son menores del 15% no lo son, entre el 15 y el 25% es necesario estudiar más profundamente cada caso. Una homologia puede considerarse como una similitud que tiene un siqnificado evolutivo, Doolittle 1.981, establece varios casos de similitud: la mioglobina de esperma de ballena y la hemoglobina de Lupin Leg, solo tienen 15% de similitud, pero ambas contienen el grupo hemo, unen oxigeno y tienen estructuras secundarias y terciarias similares, y pueden,según Doolittle considerarse como homólogos.

Puede ocurrir que perviva la misma proteina en diversos organismos, por ejemplo, el Citocromo C humano y de peces tienen el 80% de similitud, por lo que podría suponer un origen común.

Sin embargo el problema básico es cómo predecir la estructura tridimensional de una proteína, conociendo la secuencia. Anfinsen 1.961, mostró que la ribonucleosa podía ser desnaturalizada y volver a ser desplegada, sin pérdida de actividad encimática, esto implicaba que la secuencia de aminoácidos, contenía la suficiente información para definir una estructura tridimensional, que podría ser reconstruida.

Parece ser que la estructura tridimensional está descrita por la manera cómo están dispuestos los aminoácidos en la estructura primaria. Parece como si existieran unos aminoácidos determinados colocados en sitios adecuados, que servirían como lugares de unión para organizar las reacciones catalíticas, o la unión a los efectores característicos de la proteína considerada y que funcionarían de acuerdo con un entorno y con las cambios de estructura que se producen, cuando la proteína forma un complejo con ciertos átomos o moléculas. Existe un balance muy fino entre la reducción de la superficie accesible a los disolventes polares, con formación de enlaces de hidrógeno y la pérdida de entropía causada por una mayor organización de la estructura. Esto puede ser un importante punto de apoyo para la prediccion de estructuras . Es preciso tener en cuenta, así mismo, para entender los cambios conformacionales, la formación de estados intermedios durante el repliegue. Esta información es difícil de conseguir dado que estos intermedios son muy dinámicos, Roder 1.988, estudia la caracterización de los intermediarios en el repliegue del Citocromo C , utilizando el intercambio con isótopos de hidrógeno y NMR protónica.

Así mismo, se han utilizado reacciones, que implican enlaces disulfuros, para atrapar este intermediario.

En todo caso, llegar a determinar una estructura tridimensional, a partir de una secuencia de aminoácidos, es una cuestión de intuición y feliz idea, en gran parte. El uso de otros métodos, incluye, por ejemplo, los de reconocimiento de patrones que implican un sistema de probabilidades, Rawleings 1.987, en un trabajo sobre inteligencia artificial y predicción de estructura de proteínas, sirve una excelente fuente de información sobre esta cuestión. Así mismo, Lindsay, hace mas tiempo, en 1.980, puso a punto el sistema DENDRAL y en 1988 publicó un trabajo, sobre nuevas bases de datos para biología molecular en Nature 332-24.

Se puede partir, en principio, de unas bases sólidas, primero: que se conocen ya unas 400 estructuras tridimensionales, bien definidas, que pueden servir de punto de partida, para establecer analogías con frecuencias que vayan a ser estudiadas y segundo, que existen bien definidas, también, familias o grupos, que expresan ciertas peculiaridades, que se mantienen en la mayor parte de las estructuras, por ejemplo, diferentes valores de hidrofobicidad, que están relacionados con distintos aminoácidos en determinadas posiciones, pueden ser utilizadas para predecir regiones externas de una proteína, que estarían expuestas a un disolvente polar o regiones hundidas o enterradas, en la parte interna de la proteína, inaccesible al disolvente.

Arbarbanal 1.987, utilizando un algoritmo, que emplea un proceso de minimización, ha estudiado la hormona de crecimiento humano (HGH) y la interleukina-2. Hulme (1990) estudia también los receptores en función de la unión a los ligandos. Clarken en Proceeding AAAI. Simposum 1990, ha desarrollado un programa muy avanzado: PAPAIN (protein analisis and prediction using artificial inteligence).Ejemplos de predicción de estructuras proteínicas son las del interferon por Stemberg (1982). Interleukina-2 por Cohen (1986). Hormona de crecimiento; Cohen y Kuntz (1987), Receptor del factor de crecimiento epidermico humano por Fishleigh (1987), A-T Pasas transportadoras de cationes por Taylor y Green (1987), entre otras.

Las proteínas no son unidades estructurales estáticas. Un cristal adecuado para ser estudiado por rayos X, contiene unas 10 elevado a 20 moléculas de proteínas, es muy raro, que en un momento determinado, exista una sola molécula que presente la estructura promedio. Para estudiar las fluctuaciones atómicas en el sistema de una proteína, lo primero es determinar la naturaleza de esas fluctuaciones , analizar su magnitud, la extensión que abarca, su probabilidad, es decir, la frecuencia con que se dan y su escala temporal,cúanto dura. Una manera de estudiar la dinámica de las proteínas es considerar cada átomo como una partícula que sigue las leyes de la física de Newton.

Se puede suponer cada partícula como suspendida de un muelle; conocida la posición inicial y la velocidad, así como la dirección de la fuerza

que actúa en cada momento, se obtendrá la posición y velocidad en un tiempo posterior, utilizando las ecuaciones de movimiento. Sí el intervalo obtenido. es decir. el incremento de tiempo es suficientemente pequeño, se puede obtener la trayectoria de la partícula, con una serie de posiciones y velocidades en tiempos sucesivos, lo que significa una velocidad y una posición para cada incremento de tiempo.

Como la fuerza que ejercen los átomos entre si, solo debe modificarse muy poco, el incremento de tiempo ha de ser breve. Un incremento de tiempo sería un fentosegundo. Las trayectorias se siguen a lo largo de un período de 100 pico segundos.

En intervalos cortos, las fluctuaciones más importantes son movimientos locales, en que los grupos peptídos y las cadenas laterales, rotan alrededor de los enlaces covalentes; las colisiones de los grupos entre si y el disolvente, generan una trayectoria errática, análoga al movimiento Browniano.

Los efectos de fricción, que resultan de las colisiones entre los átomos de las proteinas y entre las moléculas del disolvente atemperan el movimiento; en el interior de la proteina, el denso empaquetamiento, hace que un átomo no pueda alejarse de su posición, al menos que también lo hagan los átomos cercanos. En la superficie de las moléculas, las limitaciones impuestas por el empaquetamientos son menores y los átomos llegan a desplazarse una mayor distancia que los átomos del interior, los de la superficie efectúan recorridos de hasta 2 Å y los átomos del interior solamente se desplazan como medio Å.

En la mioglobina, el oxigeno se enlaza de forma reversible a un átomo de hierro, situado en el centro de una molécula compleja: el grupo Hemo. El empaquetamiento es de tal densidad, que si los átomos de mioglobina se mantuvieran en las posiciones que señala la estructura cristalográfica por rayos X, el tiempo necesario para que se enlazara un átomo de oxigeno al grupo Hemo, seria excesivamente largo.

Las barreras energéticas se reducen, merced a la suma de los movimientos de las cadenas laterales. La proteina rigida presentaria barreras energéticas de hasta 100 kilocalorías por mol. Los obstáculos principales, parecen ser las cadenas laterales de 3 aminoácidos; histidina E7, treonina E10 y valina E11. Por simulación de la rotación de las cadenas laterales de estos aminoácidos, se calculó que basta una energía de 8,5 kilocalorias por mol, para que la barrera energética se redujera a 5 kcal por mol. lo cual permite el paso del oxigeno hacia el grupo Hemo.

Otro ejemplo, es el de la alcohol dehidrogenasa hepática, que oxida el alcohol etílico. La alcohol dexidrogenasa hepática está constituida por

dominios, conectados por filamentos de cadenas polipépticas, que actúan como bisagras, las deformaciones por flexión de la bisagra regulan el acceso al centro activo.

La alcohol dehidrogenasa es un dimero que consta de 2 monomeros, cada monomero posee 2 dominios. El monomero presenta 2 configuraciones; una de las estructuras, es abierta. La estructura abierta permite que el coenzima alcance su región de enlace, mientras que la cerrada, proporciona la posibilidad de que el sustrato y coenzima queden protegidas; con la apertura de los dominios, el producto de la reacción puede salir fuera y el enzima queda en disposición para un nuevo ciclo.

El equilibrio de las fuerzas de atracción y de repulsión, que se establecen entre los átomos que constituyen los aminoácidos, determina el comportamiento y la configuración de la molécula.

Este conjunto de atracciones y repulsiones es lo que constituye el campo de potencial, cuyas funciones pueden expresarse según T.S. Perun y C.L Prost (1989).

$$V=\frac{1}{2}\sum K_b(b-b_o)^2+\frac{1}{2}\sum k_\theta(\theta-\theta_0)^2+\frac{1}{2}\sum k_\phi(1+s\cos n\phi)$$
$$+\frac{1}{2}\sum k_x X^2+\sum\sum F'_{bb}(b-b_0)(b'-b_0)$$
$$+\sum\sum F_{0\theta'}(\theta-\theta_0)(\theta'-\theta'_0)+\sum\sum F_{b\theta}(b-b_0)(\theta-\theta_0)$$
$$+F_{\phi\theta\theta'}\cos\phi(\theta-\theta_0)(\theta'-\theta'_0)+\sum\sum F_{xx'}XX'$$
$$+\sum\left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}^{12}}-\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{6}}+\frac{e_i e_j}{r_{ij}^{2}}\right)$$

Esta ecuación refleja la energía necesaria para estirar los enlaces, doblar los ángulos de enlace desde los valores de referencia y generar tensión en los ángulos de torsión, por retorcimiento en torno a los enlaces.

K_b, K_0, K_ϕ, K_x, $F_{bb'}$, $F_{00'}$, $F_{b0'}$, $F_{\phi 00'}$ son las constantes de fuerza correspondientes a los estiramientos de los enlaces, el ángulo de enlace, barreras de torsión y deformación fuera del plano. La última suma de la ecuación contiene, así mismo, términos para la energía de los átomos no unidos directamente por enlaces y la energía electrostática.

En el capítulo correspondiente a la mecánica molecular se estudia convenientemente todo lo relativo al potencial del campo de fuerzas.

Otra descripción de la materia, es el tratamiento cuántico, basado en el principio de indeterminación de Heisenberg, según el cual no es posible conocer simultáneamente la posición y el momento de una partícula.

Es preciso pues abordar esta cuestión de manera estadística, es necesario hablar de la posibilidad de encontrar una partícula en un lugar determinado y en un tiempo dado.

Otro concepto fundamental de la mecánica cuántica es la introducción del concepto de que todas las cantidades dinámicas asociadas a cada partícula están cuantificadas. La energía de una partícula tiene un valor discreto, el cual es múltiplo de una energía básica, la constante de Plank. La ecuación fundamental es la ecuación de Schrödinger, en la que se asocia, según Broglie, una onda a una partícula. La ecuación de Schródinger para el átomo de hidrógeno es

$$\nabla^2\psi - \frac{8\pi^2 m}{h^2}(E + \frac{Z \cdot e^2}{r})\psi = 0$$

∇^2 es el operador diferencial, ψ es la función de onda, h es la constante de Plank, R la distancia electrón-núcleo.

Para átomos polielectrónicos, la ecuación de Schrödinger, no puede ser resuelta, pues no es posible la separación de variables. Es preciso acudir a la expresión de Hartree, que considera cada electrón independientemente, moviéndose en el campo del resto de los electrones y de los núcleos. Teniendo en cuenta el principio de Pauli, según el cual no pueden existir más de dos electrones en la misma órbita, con dos spin diferentes, se obtiene la expresión de Hartree - Fock; la cual expresada en forma analítica, no matricial, origina la ecuación de Roothaan, base de los métodos abinitio. Este cálculo, es decir el cálculo no empírico, según la ecuación de Roothaan, aún utilizando ordenadores de alta capacidad es demasiado laborioso, según el cuadro III:

CUADRO III

Molécula	orbitales	integrales monoelectrónicas	integrales dielectrónicas	total integrales
Hidrógeno	2	3	6	4
Metano	9	45	1635	1080
Benceno	36	666	222111	222777
Tetraciano-quinometano	84	3570	6374235	6377805

Son precisos, pues, métodos que, según Dirac (1929) puedan explicar las particularidades esenciales de los sistemas complejos, sin necesidad de recurrir a cálculos excesivamente complicados.

En la ecuación de Roothaan, los cálculos que exigen más tiempo de ordenador, son los relativos a los integrales de repulsión interelectrónica de Coulomb, así, para el metano, en el ejemplo anterior, es necesario resolver 1.035 integrales dielectrónicas y sólamente 45 monoelectrónicas y en el caso de la tetracianoquinodimetano, con 84 átomos, el número de integrales dielectrónicas a resolver serían de más de 6 millones.

En todo caso, para poder utilizar cálculos simplificados es necesario:

1.- Que sea suficientemente simple para poder calcular moléculas relativamente grandes.

2.- Es preciso así mismo, mantener los principales interacciones intermoleculares: atracción por los núcleos y repulsión entre los electrones.

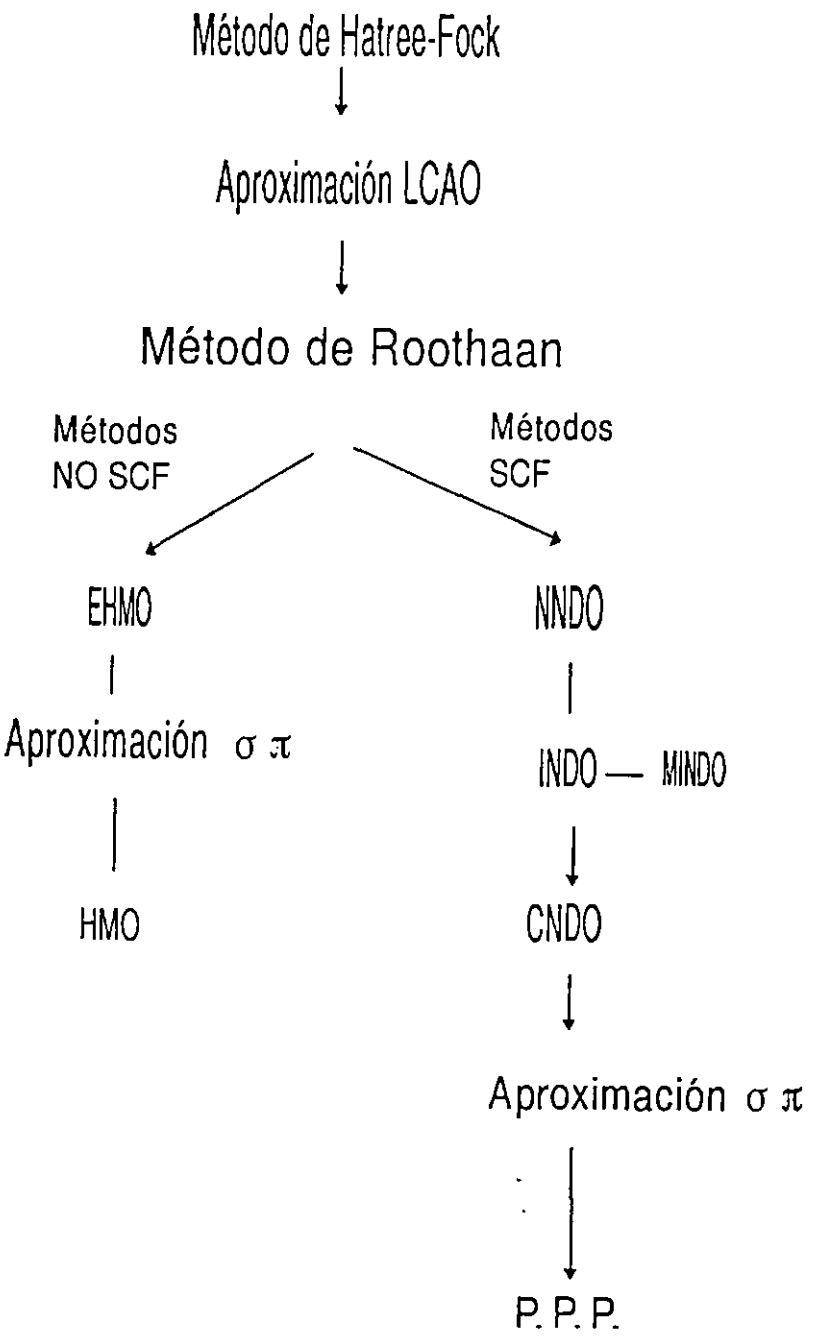
3.- Los resultados del cálculo podrán ser interpretados y permitirán construir los adecuados métodos cualitativos.

4.- Deberán compensar, por parametrización las insuficiencias del método Hartree-Fock.

Los métodos semiempíricos negliguen las integrales de solapamiento, no tienen en cuenta más que los electrones de valencia, considerando a los electrones internos, por ejemplo, los de la capa 1s del carbono como formando parte del corazón, núcleo no polarizable.

El orden cronológico de la aparición de los distintos métodos semiempíricos, es inverso a la complejidad del método, el primer método aplicado, el de Hückel fue primeramente utilizado en 1931. En 1935 el P.P.P., en 1965 el C.N.D.O.. Esto es lógico pues a medida que los ordenadores fueron haciéndose más capaces, los métodos se hicieron más complejos.
La jerarquía de los métodos cuánticos podría ser según el cuadro IV

De esta forma se logra reducir el número de integrales a calcular según el cuadro V en el caso del propano:


Método de Hatree-Fock
Aproximación LCAO
Método de Roothaan
Métodos NO SCF
Métodos SCF
EHMO
Aproximación σ π
HMO
NNDO
INDO — MINDO
CNDO
Aproximación σ π
P. P. P.

CUADRO IV

CUADRO V

Integrales	Método			
	CNDO	INDO	NDDO	Roothaan
Monocéntricas	11	26	173	368
Bicéntricas	55	55	568	6 652
Integrales a 3 4 centros	0	0	0	31 206
total	66	81	741	38 226

Según esto, la relación entre el tiempo de cálculo, tomando como unidad el tiempo necesario para calcular el sistema por el método C.N.D.O., sería 1:1,2, 1,1:580. Para moléculas más complejas las diferencias se hacen todavía mayores. Así en un ordenador, que realizara un millón de operaciones por segundo, el cálculo de la molécula del propano, llevaría un minuto en el método C.N.D.O., y 5 horas para el de Roothaan. Con los ordenadores más potentes, la relación se mantendría, aunque los tiempos serían menores. En el método C.N.D.O. se opera con los electrones de valencia, la diferencial de solapamiento se considera nula, se postula que los orbitales p, tienen una simetría esférica, como los orbitales s, para restablecer la invarianza perturbada, al negligir la diferencial de solapamiento y se reemplaza la repulsión real por la repulsión media entre los átomos.

Las características geométricas, calculadas por el método C.N.D.O. y las obtenidas por métodos experimentales se expresan en el cuadro VI:

CUADRO VI

Moleculas	Unión	Longitud de Enlace		Angulo de Valencia	Valor del ángulo en °	
		Calcul	Experiencia		Calcul	Experiencia
H_3C-CH_3	C-C	1,46	1,52	HCC	111,5	110,5
	C-H	1,12	1,10	HCH	106,5	107,8
H_2C=CH_2	C=C	1,320	1,338	HCC	123,3	122,3
	C-H	1,110	1,086			
HC≡CH	C-C	1,198	1,206	HCC	180,0	180,0
	C-H	1,093	1,058			
H_3C-NH_2	C-N	1,41	1,47	CNH	108,7	112,3
	C-H	1,12	1,09	HNH	104,2	105,8
	N-H	1,07	1,01			
HO-OH	O-O	1,22	1,47	OOH	105,0	94,8
	O-H	1,04	0,95			

V. Minkine, B. Simkine, R. Miniauev. Theorie de la Structure Moleculaire. Ed. MIR.1982, pg.373

Como se puede observar, el método C.N.D.O. satisface bien las características geométricas en los hidrocarburos.

La diferencia, respecto al valor medio, no se separó de 0,05 Å, siendo inferior a los valores experimentales. Para los ángulos de valencia, la separación es de 1,5 Å. En el caso de las moléculas con heteroátomos las diferencias son superiores.

Las barreras de rotación calculadas por el método de C.N.D.O., son inferiores a las obtenidas experimentalmente. cuadro VII.

CUADRO VII

Molécula	Cálculo		Experiencia A	
	Kcal/mol	KJ/mol	Kcal/mol	KJ/mol
$H_3C\text{-}CH_3$	2,32	9,7	2,93	12,3
$CH_3\text{-}OH$	0,78	3,3	1,07	4,5
$CH_3\text{-}NH_2$	1,57	6,6	1,97	8,3
HO-OH, *cis*	5,16	21,6	7,00	29,4
HO-OH, *trans*	0	0	1,10	3,6
$FHC{=}CHCH_3$, *cis*	0,93	3,9	1,06	4,4
$FHC{=}CHCH_3$, *trans*	1,30	5,5	2,20	9,2
$H_2N\text{-}NH_2$, *cis*	1,74	7,3	3,14	13,2
$H_2N\text{-}NH_2$, *trans*	2,23	9,3	---	---

Minkine, op. cit. pg. 374.

En el método EHMO, los elementos diagonales de la matriz son considerados iguales a los potenciales de ionización de los electrones de valencia correspondientes. Los elementos no diagonales se calculan con fórmulas empíricas de Wofsberg-Helmholtz o Cussack, en función de las integrales de solapamiento, que son determinadas a partir de los orbitales de Slater. El tener en cuenta los integrales de solapamiento es una diferencia entre el método EHMO y el HMO, más simple.

Como las integrales de solapamiento dependen de las distancias que separan los centros atómicos, así de como su orientación relativa, el método EHMO, es adecuado para el estudio de la geometría molecular.

En el cuadro siguiente se expresa la diferencia entre el método abinitio y EHMO, en el caso de los ángulos de valencia, para moléculas pequeñas. cuadro VIII.

CUADRO VIII

	Angulo en °			Angulo en °	
	*ab initio**	EHMO		*ab initio* *	EHMO
BeH_2	180	180	BeH_3	120	120
BeH_{2+}	180	180	CH_3^-	120	120
BeH_2^-	100	110	Li_2O	180	100
NH_2^+	120	120	F_2O	102	100
H_2O	110	150	LiOH	180	< 60
BeH_3^-	120	120	FOH	100	< 60

Minkine (obra citada).

Los cálculos abinitio, no difieren, para estas moléculas, más que el 2%, como máximo, de los datos experimentales.

Si el reparto de la carga es uniforme entre los átomos que constituyen la molécula, como en el caso del BeH_2, los resultados obtenidos para el cálculo de la energía y de la geometría, son aceptables. Si este reparto no es uniforme como en el caso de F_2O, son mucho peores.

Mas recientemente han sido publicadas por Dewar y su escuela (J. Am. Chem. Soc. 1977, 99. 15. 4849 y J. Am. Chem. Soc. 1985, 107. 3902) dos nuevas versiones semiempíricas del método de Roothaan, el método M.N.D.O. y el A.M.1.

Dewar y sus colaboradores desde hace tiempo han venido publicando diversos trabajos sobre métodos semiempíricos, sus trabajos previos estaban basados en modificaciones de los métodos propuestos por Pople y Beveridge (Approximate molecular orbital theory. McGraw Hill. N. York, 1970) singularmente el método I.N.D.O. En ellos el número de integrales de repulsión electrónica es reducido sustancialmente, utilizando un mínimo set de electrones de valencia y negligiendo todas las integrales que implican el solapamiento de orbitales atómicos, excepto las integrales de resonancia monocéntricas ($\beta\ \mu\eta$) y las integrales monocéntricas de canje ($\mu\eta$, $\mu\eta$).

Tanto en el C.N.D.O como en el I.N.D.O las integrales de repulsión entre orbitales atómicos del átomo A y cualquiera del átomo B, forman un set igual, tanto si son del tipo s, p, σ ó π, esta simplificación es esencial para que el cálculo sea invariante con relación a una rotación del eje de coordenadas. En el M.N.D.O esta suposición no se asume, considerándose un número de integrales bicéntricas adicionales que no se consideran en el C.N.D.O ni en el I.N.D.O. Así para cada par de átomos no similares, en el M.N.D.O es

preciso calcular 22 integrales, mientras que en C.N.D.O. o en el I.N.D.O. sólo hay que calcular una.

Los tiempos de computación, con procesador central de tiempo, en CDC 6600 para M.I.N.D.O./3, M.N.D.O. y los métodos ab initio 550-3G y 4-31G son los que se indican en el cuadro IX

CUADRO IX

Molécula	MINDO/3	MNDO	STO-3G	4-31G
CH_4	0,44	0,53	4,60	22,07
C_2H_6	1,65	1,98	26,09	155,91
C_3H_8	3,11	4,21	93,79	
	6,59	7,16	255,56	1759,8
	39,14	48,97	1279,0	

El tiempo utilizado es algo mayor (como un 20% en M.N.D.O. que en M.I.N.D.O./3 pero mucho menor que con los otros métodos SCF, que requieren unas 100 veces más tiempo con 4-31G que con M.N.D.O. o M.I.N.D.O.

Según Dewar, la mayor debilidad del sistema M.N.D.O. es el cálculo de energías de los enlaces de hidrógeno; parece ser que el nuevo AM1, mejora esta deficiencia, sin incrementar el tiempo de computación. Se estudian 167 moléculas y se proponen los parámetros más adecuados para C, H, O y N.

En todo caso tanto M.N.D.O. como M.I.N.D.O. son demasiado lentos para su utilización en el estudio de mecanismos de reacción en las moléculas que más interesan. Un cálculo del mecanismo de reacción usando computadoras standard tal como D.E.C. VAX 11-780 requiere un tiempo excesivo para moléculas con más de una docena de átomos distintos al hidrógeno. La utilización de computadoras más rápidas CDC 205 o CRAY no reduce el costo de estos cálculos pues aún cuando son más rápidas (varios centenares de veces más veloces) el costo del tiempo de computación es mucho mayor, algunos centenares de veces mayor también. Es preciso, pues, como indica Dewar en su trabajo citado, seguir intentando crear un método semiempírico eficaz. En todo caso el formalismo de AMI 1 es igual, esencialmente, al de M.N.D.O., las integrales monocéntricas de repulsión quedan sin cambiar, teniendo los valores que ya había propuesto Oleari y colaboradores (1966).

El tiempo de computación no se varía sustancialmente, comparado al de M.N.D.O. y se evitan los errores de este método en el cálculo de los enlaces de hidrógeno.

Curiosamente, se produjo posteriormente, una controversia entre Dewar y S.P. Stewart uno de sus colaboradores en el trabajo sobre el método AM1, con motivo del nuevo modelo PM3, una reparametrización de AM1, publicada por Stewart (J. Comp. Chem. 1984, 10, 221). Stewart daba cuenta en este trabajo de los mejores resultados obtenidos con el PM que con el AM1 y Dewar objetaba que estos mejores resultados eran debidos a la inclusión en el AM1 de elementos tales como A1.P.S. para los cuales el AM1 no era el sistema adecuado.

En la contestación de Stewart, publicada en el mismo número de la misma revista, se indica que el calor de formación, como medida de bondad del método AM1 y del PM3 , como propone Dewar, no es una guía aceptable y que el AM1 fue propuesto para corregir errores en el cálculo de enlaces de hidrógeno y que en este sentido el método PM3 es superior al AM1 (Dewar, J. Comp. Chem., vol. 11 nº 4, 541 y Stewart, J. Comp. Chem. vol. 11 nº 4, 543).

Han aparecido varios trabajos últimamente en los que se utilizan los modelos AM1 y M.N.D.O. para el cálculo de cargas electrostáticas, ángulos de rotación y el estudio del proceso de hidrólisis de antibióticos betalactámicos, entre otras aplicaciones.

Así en 1993, G. Ford y B. Wang publicaron el cálculo del potencial electrostático molecular (P.E.M.) por el AM1 y por el HF 6-31-G. Indican los autores que el método AM1 resulta muy económico en el gasto de tiempo de computación. Así para el par guanina-citosina el AM1 resulta 500 veces más rápido que el HF 6-31 G. Los peores resultados ocurren en el cálculo de moléculas inorgánicos sencillas como CO o CO.

En 1990 M. Orozco y G.J. Luque de la Universidad de Barcelona, utilizan el AM1 y el MNDO, para el cálculo de cargas electrostáticas y confirman los buenos resultados, prácticamente los mismos que con el más sofisticado y caro ab initio HF 6-31 G. El método AM1, parece que es menos adecuado que el MNDO. De la misma manera Ferenzy y colaboradores en 1990 obtienen resultados análogos.

En 1988 W. Fabian utiliza el modelo AM1 en el cálculo de las barreras rotacionales en 60 moléculas orgánicas. En comparación con los métodos ab initio considera que AM1 puede ser utilizado con éxito en los problemas conformacionales, aunque da valores bajos en el cálculo de las barreras de rotación.

Precisamente AM1 y el método ab initio STO-3G se comparan por Fragerbury en 1991. Los resultados obtenidos en el cálculo del enlace C-C en el dietilen acetato, se manifiestan en la figura 1.

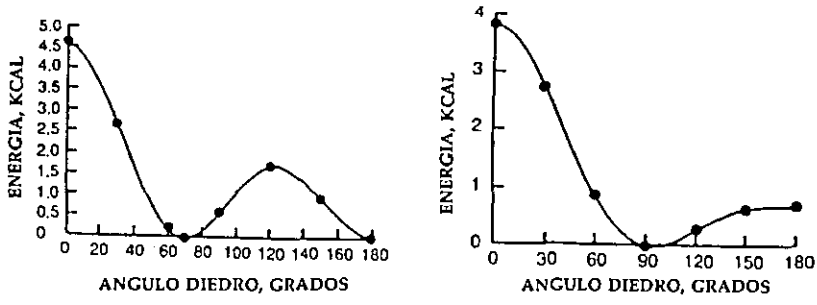


Figura 1.

Abinitio A.M.1

Se observa que en el método ab initio se obtienen mínimos en cerca de 60° (61,6 exactamente) y 180°, mientras que AM1 da unos mínimos diferentes, 90° y 180°. Klaus Gundertofte y colaboradores en 1991 comparan las energías conformacionales calculadas por métodos de mecánica molecular MM-2, Sybil 5.1, Sybil 5.21 y Chem X) con los semiempíricos AM1 y PM3. Los resultados se exponen en el cuadro X para Csp^3-Csp^3, Csp^2-Csp^3 y Csp^2-Csp^2.

Compuesto	ChemX	Sybil5.1	Sybil5.21	MM2	AM1	PM3	Exp.
Etano	2,9	2,9	3,8	2,7	1,2	1,4	2,88[a]
Metil rotación en propano	-1,4	1,6	1,3	2,1	0,6	0,7	1,98[b]
Metil rotacion en isopreno	3,8	0,4	1,4	2,6	1,0	0,4	2,71[c] 2,62[d]
Etil rotación en etilbenceno	1,9	0,7	1,6	1,1	0,5	1,1	1,67[e]
Isopropil rotación en 2,4,6-trimetil -isopropilbenceno	–	--	--	9,7	8,7	11,9	11,8[f]
Stireno	17,2	5,8	3,5	3,4	1,4	1,3	1,78[g] 3,27[h]

Las barreras de rotación obtenidas con AM1 y PM3 son menores que los valores experimentales, mientras que MM-2 da resultados que son comparables a los valores experimentales. En derivados de ciclohexano todos los métodos confirman que la posición ecuatorial es preferente. Asimismo estudia otros compuestos oxigenados (cetonas, ésteres) y nitrogenados y

halocicloexanos, compuestos con dobles enlaces como butadieno y sistemas cíclicos. En el cicloexano las energías de las conformaciones obtenidas confirman que la preferida es la conformación silla, Gundertofte, en este trabajo, indica que el único método que reproduce satisfactoriamente las barreras de rotación seleccionadas es el MM-2. Los métodos semiempíricos predicen generalmente barreras de rotación menores que los valores encontrados experimentalmente.

En 1992, los modelos AM1, MNDO y MINDO/3 son estudiados por Frau, Donoso, Muñoz y García Blanco, en la hidrólisis alcalina de antibióticos beta-lactamas. El MINDO/3 no predice correctamente las energías de anillos pequeños y como el MNDO, no detecta la presencia de puentes de hidrógeno y da estimaciones no fiables de las barreras de rotación. Los autores consideran el AM1 como el más adecuado para el estudio de la hidrólisis de los compuestos beta-lactamas.

Ya en 1950 Mulliken, definió una interacción entre unidades moleculares como la transferencia de un electrón de una molécula donadora a otra aceptora, que lo recibía, e introdujo el término transferencia de carga, para la descripción de este proceso, tan importante en los sistemas biológicos. Las moléculas aceptoras se caracterizan por una deficiencia en la densidad electrónica. En términos de orbitales moleculares, el electrón transferido salta del orbital molecular ocupado más alto (HOMO) del donador, al orbital vacío más bajo (LEMO) del aceptor, que pueden ser considerados, en un modelo simplificado como el de Hückel (HMO), como el potencial de ionización y la afinidad electrónica respectivamente. El potencial de ionización vendría descrito como la energía necesaria para arrancar un electrón de la molécula; cuando menor sea el potencial de ionización más fácil será arrancar el electrón.

En el método de Hückel, el proceso puede ser descrito como

$$E_{ct} = A_j - \alpha + X_i\beta$$

E_{ct} sería la energía de transición. α es la integral de Coulomb, β la integral de resonancia. Entonces la tendencia de la molécula a perder un electrón, puede ser medida por el cálculo de coeficiente β para HOMO, cuanto menor sea, más fácil puede actuar la molécula como donador.

Se expresan, en el cuadro XI la energía HOMO y LEMO, para un número de moléculas biológicamente importantes.

CUADRO XI

COMPUESTO	ENERGIA HOMO	ENERGIA LEMO
Purinas		
Adenina	0,486	-0,865
Guanina	0,307	-1,050
Hipoxantina	0,402	-0,882
Xantina (IV)	0,397	-1,197
Xantina (V)	0,442	-1,005
Pyrimidinas		
Uracilo	0,597	-0,960
Timina	0,510	-0,958
Citosina	0,595	-0,795
Alloxano	1,033	-0,757
Amino acidos		
fenilalanina	0,908	-0,993
Tirosina	0,792	-1,000
Histidina	0,660	-1,160
triptofano	0,534	-0,863
Cofactores		
Riboflavina	0,500	-0,344
Pteridina	0,864	-0,386
acido fólico	0,526	-0,647

según Pullman y Pullman

Se indican, así mismo, las potencias relativas de una serie de alucinógenos en función de los valores de HOMO (cuadro XII).

CUADRO XII

COMPUESTO	DOSIS, mg/kg	ACTIVIDAD	E_{HOMO} (β)
LSD	0,001	3700	0,2180
Psilocina	0,12	31	0,4303
6-Hydroxi-dietil-triptamina	0,15	25	0,4700
TMA-20,22	17	0,4810	
TMA	1,70	2,2	0,5357
Mescalina	3,75	1	0,5357

TMA.2 = 2,4,5-trimetoxi amfetamina
TMA = 3,4,5.trimetoxi amfetamina

se observa, como era de esperar, que la potencia, es tanto mayor, cuanto EHOMO es menor (Snyder 1965).

La considerable importancia de los métodos cuánticos en el terreno de la biología molecular y en el diseño de medicamentos, es algo que está fuera

de toda duda. Desde el tiempo que se publicaron los textos de B. Pullman y A. Pullman en 1963, y de W.C. Richards y Kier en 1971 han sido imnumerables los trabajos, publicaciones y simposios realizados.

Sin embargo existen muchas dificultades, algunas insalvables en el tratamiento de las interacciones biológicas y el estudio de los biosistemas por métodos cuánticos, lo que ha determinado el desarrollo de otros caminos; uno de ellos es el estudio de la relación de la estructura molecular y la actividad biológica utilizando modelos matemáticos tales como los de Hansch o de Free-Wilson.

El gran número de trabajos publicados y el éxito de las predicciones conseguidas por el método de Hansch-Fujita, demuestra el grado de interés conseguido por este procedimiento. Por el contrario los de Free.-Wilson no han tenido la popularidad de los de Hansch.

En el capítulo correspondiente se tratan estas cuestiones adecuadamente.

Los métodos de computación de Hopfinger (1985) que implican gráficas moleculares, análisis conformacionales, mecánica molecular y mecánica cuántica, han tenido en los últimos años un desarrollo explosivo como se indica en el capítulo correspondiente.

Sin embargo al lado de estos, una más simple aproximación al problema, basada en los conceptos de distancia, topología, teoría de grafos y conectividad, se ha desarrollado y ha ganado, en los últimos años, una cierta difusión y puede constituir un procedimiento muy útil en un primer Screening de selección de un camino para llegar al producto adecuado.

En Rumanía se ha creado una escuela, que revisa los conceptos de la diferencia mínima topológica (MID), por Balaban (1987).

Esta cuestión fue tratada ya, embrionariamente por Amoore y Palmieri (1967).

El primer método para obtener un mapa del receptor, a partir de la configuración de un grupo de moléculas efectoras, es el de MTD (Minimaltopologie difference) de Simón.Badilescu.Racovian (1976, 1977) que obtiene una red topológica, por la superposición de los átomos (excluyendo átomos de hidrógeno) y de los ejes que forman los enlaces covalentes de cada molécula. Esta, llamada por sus autores, hipermolécula nos indica la constitución de cada molécula, descrita como el vector de ocupación (x y j) definido como $X_{ij} = 1$ si el vértice de la red está ocupado por un átomo i de la molécula y

cero si no lo está. El número de variables necesarias, para describir una configuración molecular, queda reducido desde 3 Σ_1^N N_i coordenadas atómicas para N moléculas con n átomos cada una, a M vértices con los correspondientes Σj parámetros. Cada parámetro caracteriza la posición del vértice siendo, Σj = -1 si el vértice está dentro de la cavidad del receptor, Σ j = 0 si está fuera y Σj = 1 si se encuentra en la zona de separación. En el capítulo correspondiente a conectividad se desarrolla esta cuestión con la necesaria amplitud.

Diferente, aunque relacionado con el criterio de distancia de la escuela Rumana de Balaban, es la utilización del concepto de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition).

Patrón es el carácter que define una clase, por ejemplo el rasgo (o los rasgos) que diferencian la letra a de la letra o; puede considerarse como las propiedades invariantes, que definen un conjunto.

El proceso de reconocimiento de patrones consiste en establecer una línea de decisión que fije si un nuevo carácter pertenece o no a una clase.

El aspecto fundamental, es pues el desarrollo de una regla de decisión, es decir un clasificador.

El campo en que el reconocimiento de patrones es operativo, abarca muy numerosas actividades; reconocimiento de caracteres alfabéticos (diferencia entre las letras a y o, o entre la letra B y un 8 por ejemplo), reconocimiento auditivo para la identificación de una palabra o de un orador, investigación operativa, predicción de elementos macroeconómicos, aplicaciones meteorológicas y fundamentalmente para nosotros, el reconocimiento de estructuras comunes, que determinan la actividad biológica en un conjunto de moléculas. En el capítulo correspondiente se estudia esta cuestión adecuadamente.

Golender (1980) ha publicado un resumen del método propuesto por él, denominado Logic Structural Approach (L.S.A.), estableciendo las bases para un tratamiento lógico del problema del diseño de los nuevos productos activos. Esta lógica es esencialmente idéntica a las leyes de la lógica inductiva de Mill (1900), el método L.S.A. es un método puramente estadístico, basado en los siguientes principios:

1º la estructura química de los compuestos puede describirse formalmente.
2º Los compuestos pueden agruparse de acuerdo con su actividad en n clases.

3º Se definen ciertos fragmentos de la descripción de la estructura, cuya ocurrencia es indicativa de una probabilidad de que el componente sea activo.

El proceso comprende pues:

1º Descripción de la estructura.
2º Separación de los compuestos activos e inactivos, según el criterio que se adopte en cada caso (LD 50, etc.).
3º Estimación estadística de la ocurrencia de los distintos fragmentos en cada clase.
4º Análisis de los resultados estadísticos y aplicación al diseño de un nuevo compuesto.

La descripción de una estructura puede hacerse por una representación vectorial u otra matricial.

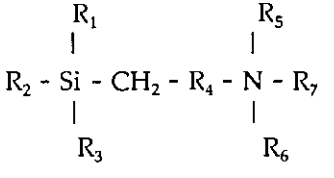
La representación vectorial se puede realizar con fragmentos elegidos de las estructuras o con los parámetros físicos-químicos (π. de Hansch, σ. de Hammett, E. de Taft, etc.).

La representación matricial, que ofrece una más detallada descripción de las estructuras, exige también un algoritmo más complejo y medios computacionales mayores.

Golender aplica este método lógico estructural al estudio de derivados de carbamatos acetilénicos como antitumorales. El conjunto comprende 62 compuestos, 44 de ellos tienen actividades frente al tumor C 1498 y 18 no son activos.

El proceso de selección se implementa con el STRAC, programa desarrollado por el Instituto de Síntesis Orgánica de Riga, Golender (1980), el cual ha sido utilizado para el análisis de nuevas clases de compuestos antimicrobianos derivados de alquilaminosilosanos.

La aplicación del sistema STRAC al análisis de una serie de órgano siliconaminas, ha sido objeto de un examen cuidadoso por Hiller y col (1976)



que han llegado a las siguientes conclusiones.

1º La suma total de átomos de carbono entre 8 y 13, indica una alta probabilidad de que los compuestos correspondientes sean activos.
2º Los compuestos más activos son los que contienen 3 grupos metilos localizados entre el átomo de silicio y el nitrógeno.
3º La actividad anti-microbiana tiende a decrecer desde compuestos saturados a etilénicos y acetilénicos.

Siguiendo estas predicciones, se han sintetizado 12 órgano silicón derivados de pirrolidina, piperidina y perhidroacepina; 3 de ellos se caracterizan por tener fragmentos inactivos en sus estructuras, los restantes los tenían todos activos. Los resultados de los compuestos en cuestión, fueron que los tres del primer grupo son inactivos y los 7 de los 9 del segundo grupo exhibieron una marcada actividad fungiestática.

Así mismo ha sido empleado STRAC en el estudio de indandionas, los mejores resultados, en cuanto a predicción, lo fueron en el grupo de derivados de las indandionas 1-3 piperacinas; se predijo la actividad de quince compuestos que fueron sintetizados.

La predicción de toxicidad se confirmó por ensayos biológicos, en 11 de los casos (75%) y la actividad solamente fue predicha en 5 compuestos, pues los restantes tenían estructuras no prometedoras. De los 5 sintetizados, la predicción fue correcta en 4 y equívoca en 1, que por otra parte, tenía una actividad muy próxima a la línea de discriminación.

En los próximos capítulos se tratan todas estas cuestiones con la adecuada amplitud.

BIBLIOGRAFÍA

AMOORE Y G. PALMIERI (1976) *Nature* 216, 1084.
ANFINSEN (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 47, 1304-1314.
ARBARBANAL (1987) *Chem. Inf. Bull.* 39, (2), 30.
ASKING (1988) *Nature* 335-735-738.
BADILESCU, TRACOBIAN (1977) *J. Theart. Biol.* 66, 485.
BALABAN, DUVAZ, S. SIMON (1987) *Act. Pharm. y ugsl.* 37-36.
BRUICE, KHARSCH Y WINZLER (1956) *Arch. Bioch. Biophys.* 62, 305.
COHEN, J.M., BLANEY, C., HUMBLET, G. FUND, D.C. BARRY (1990) *J. Med. Chem.* 33, 883.
COHEN (1986) *Science* 234, 349-352.
COHEN Y JUNTZ (1987) Proteins Structure 2, 162, 166.
DEWAR (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 99, 15, 4849.

DEWAR (1985) *J. Am. Chem. Soc.* 107, 3902
DEWAR (1985) *J. Comp. Chem.* Vol. 11, nº 4, 541.
DIRAC (1929) *Proc. Roy. Soc.* A 123, 614.
DOODLITTLE (1981) *Science* 214, 149-159.
FABIAN (1988) *J. Comp. Chem.* Vol. 9 nº 4, 369.
FELDER (1990)
FEIGELSON (1985) Protein Crystal Growth. Proceedeings of first conference on protein crystal Growth-Stanford University. North Holland. Amsterdam.
FERGUSON (1939) *Proc. Roy. Soc. ser.* B, 127, 387.
FISHLEIGH (1987) *Letters* 214 (2) 219.
FORD, G., WANG, B. (1993) *J. Comp. Chem.* vol. 14, nº 4, 1101.
FRAGERBURY (1991) *J. Comp. Chem.* Vol. 12, nº 6, 742.
FRAU, DONOSO, MUÑOZ Y GARCÍA BLANCO (1992) *J. Comp. Chem.* 13, 6, 681.
GABOSCKY (1991) Pharmaceutical Research and Development.
GOLENDER AND A.B. ROSENBLIT (1978) Computer Methods of Drug Design. Riga.
GOLENDER (1980) Drug Design, Vol. IX. Academic Press.
HAMMET (1956) *Chem. Rev.* 1, 125.
HANSCH (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1616.
HANSCH (1969) *Acc. Chem. Res.* 2, 232.
HANSCH. Drug Design, vol. 1 pg. 271-312. Academic Press.
HANSCH Y T. FUJITA (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1616.
HASSAL, C.H., KIOHN, A., MOODY, C.J., THOMAS, W.A. (1982) *Febs Lett.* 17, 175-179.
HILLER, V.E., GOLENDER, A.B., ROSENBLIT, RS. STURKOVICH, E. LUKEVIC (1976) *Khim-Farm. Zh* 10, nº 3: 29.
HOPFINGER (1985) *J. Med. Chem.* 28, 1133.
HOPFINGER (1985) *J. Med. Chem.* 28-2-229.
HULME (1990) Receptor Biochemistry. Oxford University Press.
KLAUS GUNDERTOFTE (19991) *J. Comp. Chem.* vol. 12, nº 2, 220.
KERWIN, I.D., KUNTZ, G.L., KEYTON (1991) *Med. Chem. Res.* 1361.
KUNTZ, J.M., BLANEY, S.J., OALLEY, R., LANGRIDGE, T.E. FERRIN *J. Mol. Biol. 161, 269.*
KUNTZ (1992) *Science* 257, 1078.
MCPHERSON (1982) Preparation and Analysis of Protein cristals. John Willey and sons. New York.
MENG B., SOICHET, I.D., KUNTZ (1992) *J. Comp. Chem.* 221, pg. 505.
MILL (1990) A System of logic, Rationative and inductive, Being a connected, View of the principles of Evidence and the Methods of Scientific Investigation 8th ed. harper. New York.
OROZCO, M., G.J. LUQUE (1990) *Journal of Computational Chemistry* vol. 11, nº 8, 909.

PERUM, C.L., PROPST (1989) Computer Aided Drug Design pg. 97.
PERVAIZ Y BREW (1985) *Science* 22, 335-337.
RODER (1988) *Nature* 335, 700-704.
ROWLINGS (1987) Proceedings of Biotechnology Information IRL Press. pg. 59-77.
RUSINKO Y COL. (1989) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 29, 251.
Scrip (1992) 1-14.
SILLINCE, M., SILLINCE (1991) Molecular data base for protein sequence and structure studies. Springer Verlag.
SIMON, Z. A CHIRIAL C. MOTOC (1976) *Studia Biophys.* 55, 217.
SOICHET, I.D., KUNTZ (1991) *J. Mol. Biol.* 221-327.
SOICHET, D.L., BODIAN, I.D., JUNTZ (1992) *J. Comp. Chem.* 13-380.
SNYDER, C.R., MERRIL (1965) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 54, 958.
STEMBERG Y COHEN (1982) *Inter. S. Biol. Macromol.* 41, 37-144.
STEWART (1984) *J. Comp. Chem.* 10, 221.
STEWART (1985) *J. Comp. Chem.* vol. 11, 543.
TAYLOR Y GREEN (1989) *Eur. J. Biochem*, 174, 241.
THORSETT, E.D., HARRIS, E.E., ASTER, S.D., PETERSON, E.R., TRISTAM, J., SNYDER, J.P., SPRINGER, J., PATCHETT, A.A. (1983) Proceedings of the 8th American Peptide Symposium, Tucson, AZ. may 22-27. Abstr. 6.
THORTON (1989) *Trend Biochm. Sci* 14, 300-304.
VERLOOP DRUG DESIGN Vol. VI Ed. Ariens. Academic Press.
WILSON (1964) *J. Med. Chem.* 7, 395.
WILSON (1972) Introduction to Graf theory. Logman.
WOOD AND COL. (1989) *J. Chem. Inf. Comp. Science* 29, 118-123.

Métodos Variacionales

MARIA FONT ARELLANO Y ANTONIO MONGE VEGA
Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada.
Universidad de Navarra

1.0 INTRODUCCION

El desarrollo de medicamentos cada vez más seguros, adecuados y efectivos en el tratamiento de enfermedades, es una tarea que requiere del esfuerzo coordinado e inteligente de un elevado número de personas de distinta formación y dedicación, en la que la capacidad de deducción, la intuición y en muchos casos, la suerte, han jugado un papel fundamental. Reconociendo la importante contribución del azar en el resultado positivo de este esfuerzo, es preciso matizar que su base está sólidamente anclada en un **diseño** inteligente y racional ya que solo acudiendo al azar, nunca se podrán obtener medicamentos eficaces y seguros.

En este capítulo se considerará de forma breve, con algunos ejemplos, la metodología de este diseño, las circunstancias y cadenas de hechos que llevan al descubrimiento de nuevos compuestos considerados como líderes o cabezas de serie, y su posterior desarrollo, la aplicación, en definitiva, de las técnicas que de forma general se conocen como "**Variaciones Estructurales**".

2.0 DESCUBRIMIENTO DEL COMPUESTO LIDER O CABEZA DE SERIE.

2.1. Antecedentes

La historia del medicamento se remonta a los orígenes de la sociedad humana. Desde los primeros tiempos el hombre ha acudido a la naturaleza para obtener sustancias que o bien le ayudaran a paliar su dolor, los síntomas de sus enfermedades... o bien le facilitaran la obtención del alimento (venenos para la caza), sus relaciones sociales y religiosas (estimulantes y alucinógenos)...etc. Esta circunstancia ha permitido disponer de una ámplia información, que sometida a observación atenta y estudio crítico, ha dado lugar al planteamiento de ideas que, debidamente desarrolladas, han llevado a la obtención de nuevos medicamentos, de sustancias líderes. Esta historia prévia es la causa de que en la actualidad el modelo de aproximadamente la mitad de los productos de que se dispone sea natural. Modelos que, obtenidos a partir de un organismo vivo, han sufrido diferentes modificaciones en el laboratorio, encaminadas a encontrar moléculas más potentes y menos tóxicas que las originales, las cuales en realidad no habian sido "diseñadas" para un tratamiento específico. Algunos compuestos naturales,

en pequeño número, se utilizan en la terapéutica actual, sin modificaciones adicionales.

El espectacular desarrollo experimentado por las técnicas aplicadas a la elucidación estructural en Química Orgánica, ha llevado al aislamiento, identificación y caracterización de los compuestos presentes en las preparaciones de origen natural, consiguiéndose de esta manera avanzar en el descubrimiento de nuevos líderes.

Simultáneamente se observa un aumento en el número de modelos de origen sintético, aumento ligado tanto al avance instrumental, como al de las técnicas de biología molecular, que han permitido tener un mayor conocimiento de las bases bioquímicas de la enfermedad y del punto concreto donde deben actuar los compuestos, los receptores.

2.2 Métodos y aproximaciones

Aunque en la búsqueda de un nuevo líder o cabeza de serie terapeútico se pueden aplicar un sinfín de métodos, dos son los más utilizados:

a.- Estudio de los productos activos presentes en drogas utilizadas en la medicina tradicional.
b.- Estudio "de novo" de nuevos compuestos, tanto de síntesis como naturales.

Ambos métodos requieren de la existencia prévia de un amplia bateria de ensayos biológicos cuidadosamente diseñados, que permitan determinar con rapidez y de manera inequívoca la actividad biológica de los nuevos compuestos. Estos ensayos deben ser fáciles de realizar y económicos ya que es preciso trabajar con un gran número de compuestos.

En el caso de los estudios de productos empleados en la medicina tradicional, es más facil, en principio, el diseño de la prueba biológica, ya que se cuenta con una información prévia de la actividad prevista; se trata de corroborar de manera científica el empleo popular. Sin embargo, cuando se desconoce la posible actividad, el diseño del ensayo ha de ser lo suficientemente amplio, en el intento de no perder ninguna información interesante. Lamentablemente los costos asociados a este tipo de estudios hace que estos se vean limitados en número y en el espectro de acciones biológicas.

Podemos citar entre otras aproximaciones:

1.- Aislamiento de los productos responsables de una acción biológica determinada y su posterior identificación y caracterización. Esta

aproximación, especialmente útil en productos de origen natural, se ha aplicado entre otros ejemplos, a las hormonas esteroideas, que llevaría a la identificación de los esteroides; al ácido araquidónico, que permitió el desarrollo de prostaglandinas y tromboxanos; a los ácidos penicilánico y cefalosporánico, bases para el desarrollo de antibióticos..etc.

2.- Detección y observación de efectos secundarios o acciones biológicas inesperadas, durante el empleo de compuestos activos. Como ejemplos válidos podemos citar la acción promotora del crecimiento del cabello en un antihipertensivo como el Minoxidilo; la acción antidepresiva, por la inhibición de monoaminooxidasa, de tuberculostáticos como la Iproniazida; la acción diurética de bacteriostáticos como la Acetazolamida, consecuencia de la inhibición de anhidrasa carbónica; la acción antiagregante de la Aspirina, resultante de la inhibición de la cicloxigenasa, enzima implicada en la síntesis de prostaglandinas, entre otros muchos.

3.- Por observación del metabolismo de los compuestos. El fármaco, introducido en el organismo sufre una serie de reacciones (oxidación, reducción, conjugación...), encaminadas a facilitar su eliminación y/o disminuir su potencial toxicidad. Ocasionalmente alguno de estos productos presentan, de por sí, una actividad interesante que puede ser superior a la del compuesto original o totalmente distinta. Esta aproximación ha permitido, por ejemplo, el desarrollo de compuestos como las sulfonamidas, consecuencia de la consideración del metabolismo del Prontosil, o de Paracetamol y N-acetilprocainamida en el estudio de los fenómenos de acetilación.

4.- El análisis de la actividad biológica en los productos intermedios de síntesis de un fármaco. Tal es el caso de las tiosemicarbazonas empleadas en la síntesis del Sulfatiadiazol, que provocaron una nueva estrategia en la terapia de la tuberculosis y el desarrollo de la Amiatizona.

A estas aproximaciones se pueden unir las informaciones obtenidas a partir del estudio del mecanismo de acción de los compuestos, así como las consideraciones relativas a la bioquímica de la enfermedad y procesos fisiológicos del organismo enfermo, sobre el que van a actuar los productos.

3.0 EL DESARROLLO DE UN COMPUESTO LIDER: LA VARIACION MOLECULAR

Una vez establecida la actividad biológica de un compuesto dado, es preciso plantearse ahora la posibilidad de modular su estructura con el fin de encontrar un producto mejor. Es necesario aceptar la actitud intelectual que considera que el mejor compuesto está siempre por preparar. El objetivo

que se propone es encontrar nuevos y mejores medicamentos, con superior actividad, mejor biodisponibilidad, menos toxicidad y mínimas reacciones secundarias. La técnica que con este fin se considera en este capítulo se conoce con el nombre de **"Variación Molecular"**.

En la finalidad de esta técnica se pueden distinguir:

1.- Mejora de la potencia del líder. En principio el aumento en potencia implica, al menos teóricamente, la posibilidad de afrontar hechos que aunque no siempre se dan, deben ser considerados: Mejor eficacia, disminución en efectos secundarios al poder reducir la dosis, mayor comodidad en la pauta de administración..etc.

2.- Eliminación de acciones secundarias no deseadas. Cualquier compuesto presenta un conjunto de acciones secundarias que acompañan a la acción principal. Según las características de esta acción, los efectos secundarios pueden tener muy distinta importancia, si bien en todo caso su eliminación o aminoramiento es necesario. Entre los numerosos ejemplos que pueden proponerse en este apartado, citaremos los efectos de caída de cabello o de vómito en la terapia anticancerosa y el efecto hipnótico presente en musculorelajantes.

3.- Potenciación de acciones secundarias deseadas. Es frecuente observar la presencia de acciones acompañantes de la principal que resulta de interés su exaltación, bien como complemento o ayuda de la acción principal, o bien por si mísma. Puede servir de ejemplo el desarrollo de las sulfamidas diuréticas comentado anteriormente.

4.- Eliminación o aminoramiento de efectos tóxicos. Si bien estos efectos son en realidad un tipo de reacción secundaria, no deseada, su relevancia hace que se consideren aparte. Cualquier compuesto tiene un grado de toxicidad: la relación entre la dosis tóxica y la dosis efectiva o Indice Terapeútico, ha de ser lo mayor posible para aumentar la seguridad del producto. Las modificaciones conducentes a la mejora del índice terapeútico, están presentes en muchos compuestos de uso habitual. Así, los efectos hepatotóxicos de las hidracidas inhibidoras de la enzima monoaminooxidasa son un ejemplo clásico.

5.- Separación de actividades en compuestos "multiacción". El reconocimiento de estructuras químicas básicas necesarias para la acción de un producto de este tipo es difícil, pero se justifica su necesidad ante la posibilidad de potenciar alguna de sus acciones sobre las demás, o eliminar alguna de ellas en beneficio de las otras. Así, es frecuente que muchos compuestos lleven asociado al efecto principal, una acción sobre el sistema nervioso central que es preciso

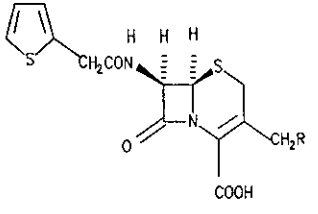
eliminar. Tal es el caso de la Reserpina con efecto hipotensor y sedante.

6.- Combinar actividades. Se trata de reunir en una única entidad actividades diferentes que puedan actuar en común frente a desórdenes asociados. Tal es el caso de compuestos vasodilatadores con actividad antiagregante asociada, de especial interés en los ancianos.

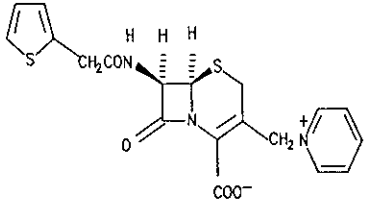
7.- Modificación de la biodisponibilidad del fármaco. El descubrimiento de un nuevo fármaco no termina con el establecimiento de su potencia y espectro de actividad, sino que es necesario conseguir que el compuesto ejerza su acción ahí donde se desea que actue, en condiciones adecuadas de concentración. Este objetivo, la mejora de la asequibilidad biológica, unicamente es alcanzable si se pueden modificar los aspectos estructurales que condicionan su distribución, sin afectar a los aspectos responsables de la manifestación de la actividad biológica de interés. Esta observación hace que circunstancias como la solubilidad, que en muchos casos no es prácticamente considerada por los químicos, tenga una importancia decisiva.

Para ejemplificar lo anterior, la Química Médica dispone de muchos ejemplos, entre los que podemos considerar:

a. Protección de la acción de sistemas enzimáticos. Tal es el caso de muchos antibióticos; así, la modificación en posición 3 de la Cefalotina, I, por desplazamiento del grupo acetoxi por piridina, para obtener



R = OAc I

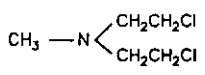


II

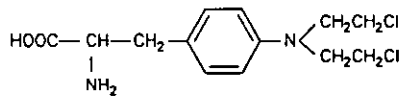
así Cefaloridina, II, con similares propiedades antibacterianas y resistentes a las estearasas de los mamíferos.

b. Incremento de la selectividad en la acción. Como ejemplo pueden citarse los trabajos realizados sobre las mostazas nitrogenadas, en la búsqueda de compuestos con actividad anticancerosa. El primer compuesto de este tipo, la N-metil-N,N-dicloroetinilamina, Mecloroetamina III, surge a partir del tristemente famoso gas mostaza empleado en la I Guerra Mundial. Su relativo éxito en la terapia anticancerosa hizo que se sintetizaran en el laboratorio muchos derivados, que se

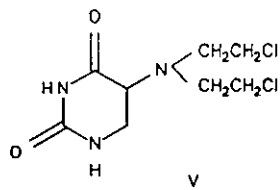
ensayaron a continuación en la clínica humana. La primera racionalización fue la de unir el resto de mostaza a un transportador que fuera fácilmente identificable por los posibles sustratos. De esta manera se desarrollaron por ejemplo la mostaza derivada de fenilalanina, Mefalan IV, y la de uracilo, V. Otro efecto que se logró con las citadas modificaciones fue el de la solubilidad que se incrementó notablemente.



III

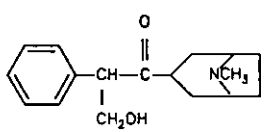


IV

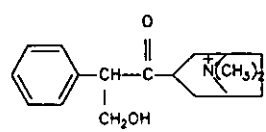


V

c. Modificaciones conducentes a alterar la distribución. Este tipo de modificación permite alterar la distribución entre los distintos compartimentos, consiguiendose la exclusión de algunos, o la localización selectiva en otros. Son clásicos los estudios realizados con la Atropina, VI, y sus sales de amonio, VII. La cuaternización del nitrógeno impide atravesar la barrera hematoencefálica, sin alterarse las acciones anticolinérgicas periféricas.



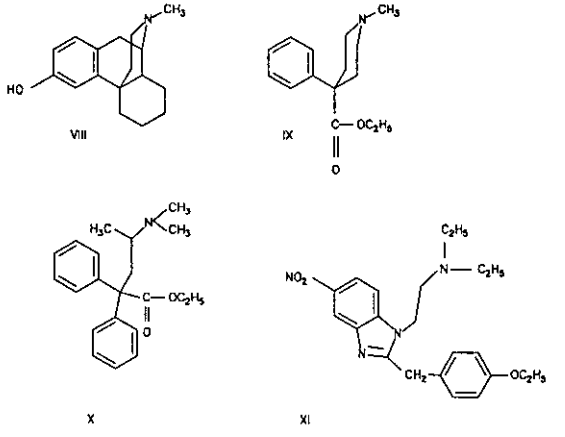
VI



VII

d. Simplificación de la molécula. Esta modalidad disyuntiva de la variación permite la simplificación estructural, eliminando de la molécula aquellas partes que no sean estrictamente necesarias para su actividad. Un ejemplo clásico lo constituye la Morfina, en donde las modificaciones se han dirigido fundamentalmente en dos direcciones, por un lado, lograr compuestos más simples que mantengan la actividad analgésica y por otro, conseguir que no presenten las propiedades de adicción. Levofenol, VIII, puede pertenecer a una primera generación en donde la relación con la morfina parece bastante evidente; Meperidina, IX, es un ejemplo de segunda generación en donde la

molécula queda dramáticamente simplificada. Metadona, X, es un tercer ejemplo en donde la relación con la Morfina es bastante más lejana, si bien su diseño, es consecuencia de los hallazgos obtenidos en las modulaciones anteriores. Finalmente, puede citarse el ejemplo de la Etoniazida, XI, que se encuentra ya muy lejos de la inicial Morfina pero que sin embargo es el resultado lógico del trabajo realizado en la modulación de la misma.



4.0 EL METODO VARIACIONAL. TIPOS DE APLICACION.

Las estrategias utilizadas para modificar un cabeza de serie con el fin de aumentar su eficacia y espectro de actividad, son muy numerosas y no resulta posible sumarizarlos en este capitulo. A título simplemente indicativo, se pueden citar algunos tipos de aplicación que son de reconocida utilidad y que han sido empleados con alguna generalidad.

4.1 Sustitución bioisóstera.

Cuando se analiza la estructura molecular de dos compuestos que presentan actividades biológicas relacionables, se puede observar en ellas una serie de similitudes que podrían, en principio, explicar su similar actividad. En un enunciado simplista de la cuestión, parece razonable que los compuestos con una misma actividad biológica, deban poseer también una misma estructura, o al menos puntos comunes en la parte o partes de la molécula responsables de la actividad.

Así por ejemplo, en Química Orgánica se establecen correlaciones entre las estructuras de benceno y tiofeno, de manera que las consideraciones

moleculares y de reaccionabilidad de uno pueden deducirse a partir del otro, en base a sus características comunes en cuanto a ser moléculas planas, similitud en distribución electrónica, de deslocalización orbital, etc. Si las dos moléculas presentan el mismo comportamiento frente a una serie de reactivos, en el laboratorio de Química Orgánica, parece lógico deducir que tendrán también el mismo comportamiento en un medio biológico y finalmente, se puede esperar para los dos una misma respuesta cuando se enfrentan a un organismo vivo. La conclusión que parece deducirse en consecuencia es que el átomo de azufre y el vinileno pueden ser equivalentes. Esta observación no es nueva, de hecho se encuentran referencias de este comportamiento desde finales del siglo pasado.

Los mismos razonamientos que permiten relacionar en un contexto de Química Orgánica, la reactividad de moléculas portadoras de átomos de Br y Cl frente a una sustitución nucleofílica, por ejemplo, permiten hacer planteamientos iniciales respecto a la forma en que se modificará la acción biológica en dos moléculas que mantienen estos átomos en su estructura.

El intercambio de grupos polares puede también ser un ejemplo si se considera que en un grupo carboxilo y sulfamida se tiene una distribución atómica bastante similar. Esta observación fue fundamental para descubrir que el ácido p-aminobenzoico y el p-aminosulfanilamino, podían ser substratos de la enzima necesaria en la síntesis del ácido tetrahidrofólico, una importante vitamina a la vez que un factor de crecimiento. La importancia del descubrimiento reside en que el ácido benzoico, actua como un substrato de la enzima, en tanto que la sulfanilamida, aparece como un antagonista, bloqueando la biosíntesis. Es evidente que la distribución de cargas y la disposición de enlaces, multiplicidades de los mismos y en definitiva aspectos electrónicos y estéricos de las moléculas han tenido importancia definitiva en la acción biológica.
En general, se utiliza el término **bioisosterismo** para todo el conjunto de analogías que se pueden establecer entre dos agrupaciones atómicas, incluyendo tanto elementos estéricos como electrónicos y, en general, todos cuantos sirvan para definir la estructura de una molécula.
De acuerdo con Friedman, serán **grupos bioisósteros** aquellos que introducidos sobre una molécula le aportan la misma influencia en los aspectos relativos a propiedades estéricas, electrónicas y de solubilidad.

4.1.1. Modelos relacionables

La importancia que aspectos como la solubilidad tienen en el diseño de fármacos, ha motivado que aparezcan otras aproximaciones paralelas que complementan y se apoyan a su vez en el bioisosterismo. Así, desde finales del siglo pasado quedó establecido que la actividad de numerosos hidrocar-

buros, compuestos halogenados, alcoholes y muchos otros compuestos que influían sobre la vida de las células, se encuentra muy relacionada con la capacidad de reparto entre agua y disolventes apolares. Con el tiempo se han establecidos modelos que relacionan los resultados en el reparto 1-octanol/agua con propiedades biológicas; un ejemplo de gran interés es la relación entre coeficiente y la capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. En este orden de cosas se puede considerar también a título de ejemplo que, como las membranas celulares consisten fundamentalmente en una capa de lípidos y proteínas, un compuesto que penetre estas membranas deberá tener un alto grado de lipofilia.

Otro modelo relacionable es el que surge de la interpretación de las relaciones entre estructura química y actividad biológica en base a propiedades físicas, utilizando los análisis estadísticos. De esta manera aparecen las relaciones cuantitativas entre estructura química y actividad biológica (QSAR). Esta técnica de estudio de las moléculas activas en un intento de encontrar compuestos más activos, se ha generalizado en todos los laboratorios donde se hace química médica.

4.2 Modulación.

Esta aproximación consiste, en esencia, en variar el compuesto líder tomado como modelo, con modificaciones limitadas, tanto en extensión, la molécula mantiene características iniciales, como en número, nunca se afecta a más de un grupo, con el fin de poder sacar conclusiones en los resultados. Sin embargo y pese a realizar las modificaciones con las condiciones anteriores, no es raro encontrarse con grandes diferencias en la actividad.

Nuevamente el planteamiento de esta modulación se relaciona muy estrechamente con las técnicas habituales de la Química Orgánica. Por ejemplo, cuando se estudia la solubilidad de una serie de hidrocarburos, se determina la influencia de la longitud de cadena (homología), de la formación de isómeros de cadena, estéricos, de saturación, la presencia de grupos solubles, etc. Todas estas consideraciones pueden ser aplicadas igualmente en la búsqueda de compuestos activos que mejoren al cabeza de serie.

De manera general se establecen tres tipos de actuaciones:

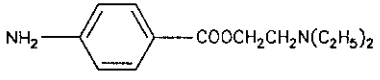
1. Modulación que comprende Isomerización, Homología, Alquilación, Ramificación, Desalquilación, Saturación, Insaturación, Cambio en la posición de la insaturación, Halogenación, Presencia y Tipo de sustituyentes, Cambio en la posición de sustituyentes, Desplazamiento de una función, Presencia, Sustitución o Eliminación de heteroatomos,

Introducción de sistemas ciclicos, Contracción o Extensión de ciclos, Sustitución de ciclos.

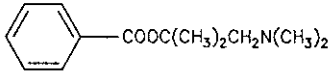
2. Simplificación: En ocasiones es necesario romper la molécula en un intento de encontrar que parte o partes de la misma son responsables de la actividad biológica que se está estudiando. Con este fin se diseñan compuestos más sencillos, que contengan aisladamente las partes antes mencionadas.

3. Unión de elementos activos: Se trata de unir en una molécula restos que han demostrado ser activos en otras estructuras.

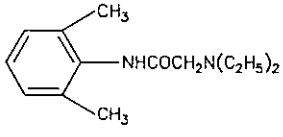
En las tablas siguientes (1-10) se reflejan algunos ejemplos de pretenden ilustrar estas aproximaciones aplicadas a diferentes series de compuestos, pertenecientes a diferentes grupos terapeúticos.



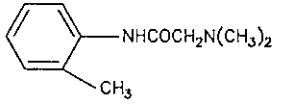
XII



XIII



XIV



XV

Tabla 1: Variaciones en series de anestésicos locales. XII: Procaina. XIII: Amilocaina. XIV: Lidocaina (Mayor estabilidad que los O-sustituidos). XV: 2-dimetilamino-2'-acetotoluidina.

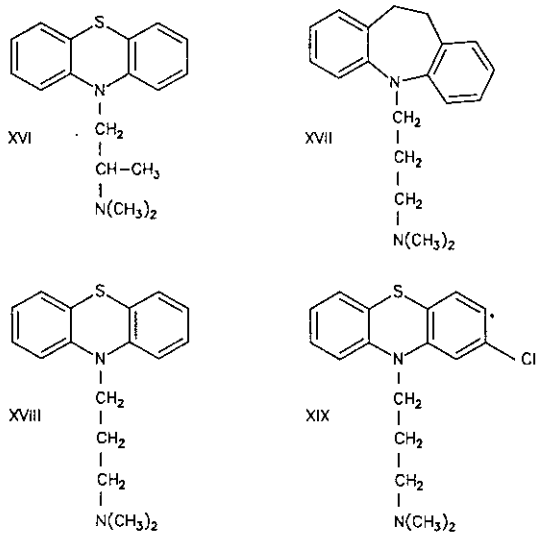
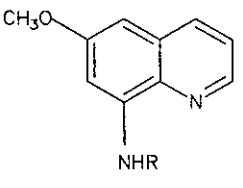
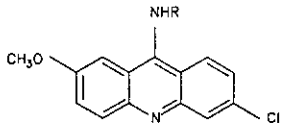


Tabla 2. Cambios en la actividad secundaria por variación estructural en tranquilizantes tricíclicos. XVI: Prometazina (Anti histamínico, sedante). XVII: Promazina (Antihistamínico, tranquilizante). XVIII: Imipramina (Antihistamínico, antidepresivo). XIX: Clorpromazina (Antihistamínico, sedación, efectos extrapiramidales).

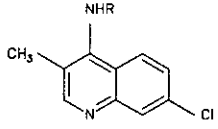


R=	$CH(CH_3)(CH_2)_3NH_2$	XX
	$(CH_2)_3CH(CH_3)NH_2$	XXI
	$CH(CH_3)(CH_2)_3NHCH(CH_3)_2$	XXII
	$(CH_2)_5NHCH(CH_3)_2$	XXIII

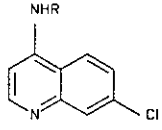
Tabla 3. Ejemplos de isomerización, alquilación y homologación en antimaláricos. XX: Primaquina. XXI: Quinicidina. XXII: Isopentaquina. XXIII: Pentaquina.



XXIV



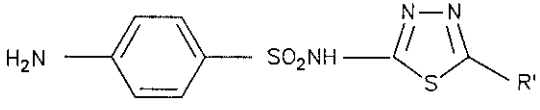
XXV



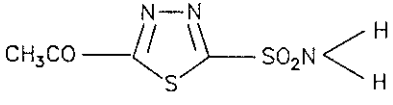
XXVI

R = $CH(CH_3)(CH_2)_3N(C_2H_5)_2$

Tabla 4. Ejemplos de simplificación por formación de sistemas con un ciclo menos. XXIV: Quinacrina. XXV: Sontoquina. XXVI: Cloroquina.

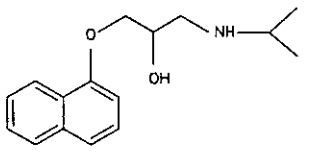


XXVII

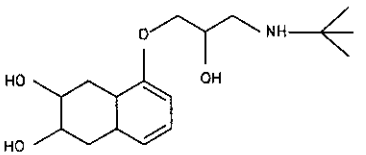


XXVIII

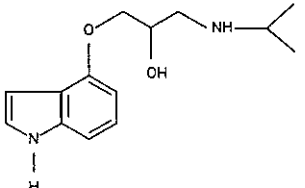
Tabla 5. Ejemplo de cambio de actividad en sulfonamidas. XXVII: Sulfonamida Hipoglucemiante. XXVIII: Diurético, Acetazolamida.



XXIX

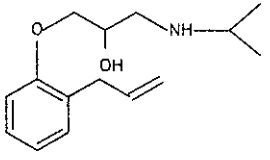


XXX

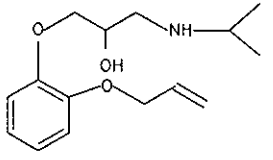


XXXI

Tabla 6. Modificación en sistema cíclico en agentes ß-bloqueantes. XXIX: Propranolol (ICI). XXX: Nadolol (Squibbs). XXXI: Pindolol (Sandoz).

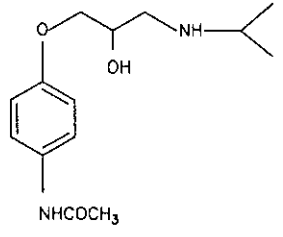


XXXII

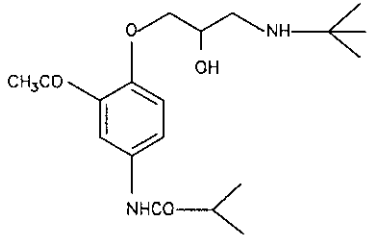


XXXIII

Tabla 7. Simplificación en ß-bloqueantes reduciendo un ciclo. XXXII: Alprenolol (Hassle). XXXIII: Oxprenolol (Ciba-Geigy).

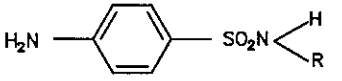


XXXIV



XXXV

Tabla 8. Efecto de modificación en sustitución en anillo en ß-bloqueantes. XXXIV: Practolol (ICI). XXXV: Acebutolol (May & Baker).



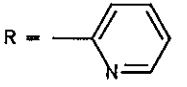
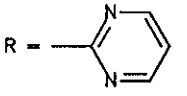
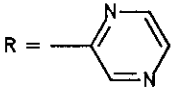
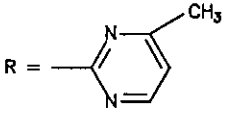
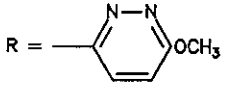
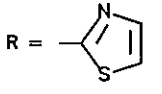
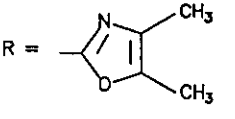
Cambio de heteroatomo	R = –C(=NH)–NH$_2$–	SULFAGUANIDINA
	R = $COCH_3$	SULFACETAMIDA
Adicion de heteroatomo en ciclo		SULFAPIRIDINA
		SULFADIAZINA
Cambio de posicion de heteroatomo		SULFAPIRAZINA
Alquilacion		SULFAMERAZINA
Cambio en la alquilacion		SULFAMETOXIPIRIDAZINA
Sustitucion de atomo por S		SULFATIAZOL
Cambio de heteroatomo y alquilacion		SULFADIMETOXAZOL

Tabla 9. Ejemplos de cambios en Sulfamidas bactericidas

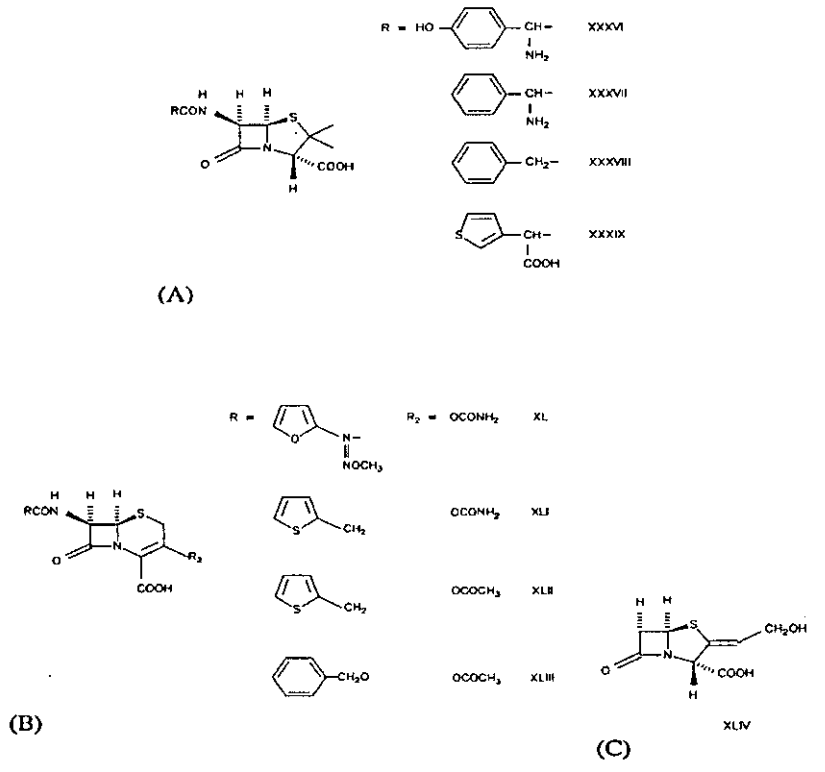


Tabla 10. Ejemplos de modificaciones estructurales en antibióticos. (A). Penicilinas: cambios en sustituyente aromático, XXXVI: Amoxicilina. XXXVII: Ampicilina. XXXVIII: Bencilpenicilina. XXXIX: Ticorcilina. (B). Cefalosporinas, cambios en heterociclo. XL: Cefuroxima. XLI: Cefoxitina. XLII: Cefalotina. XLIII: Cefaloran. (C). XLIV: Acido clavulánico.

5.0 LOS METODOS VARIACIONALES APLICADOS.

En la terapeútica actual se emplean numerosos compuestos con muy diferentes espectros de acción biológica, cuyo descubrimiento es un ejemplo claro de la aplicación de los métodos variacionales. Algunos de ellos, que son muestras destacables por el particular y original planteamiento de su desarrollo y la personalidad científica de sus descubridores, constituyen un auténtico tratado de la Química Médica.

Citaremos como ejemplos, acudiendo a las propias palabras de sus autores, el desarrollo de las benzodiacepinas de Sternbach (**Sternbach**, 1979) y a los trabajos de Black en el campo de los antagonistas de los receptores ß y de los receptores H_2 (**Black**, 1989).

5.1 El desarrollo de las benzodiacepinas.

La historia de las benzodiacepinas comienza en los años 50, como consecuencia de los trabajos de Leo H. Sternbach. Vamos a utilizar en este apartado la historia que relata su autor con ocasión de la obtención del Medicinal Chemistry Award de la American Chemical Society, en 1978.

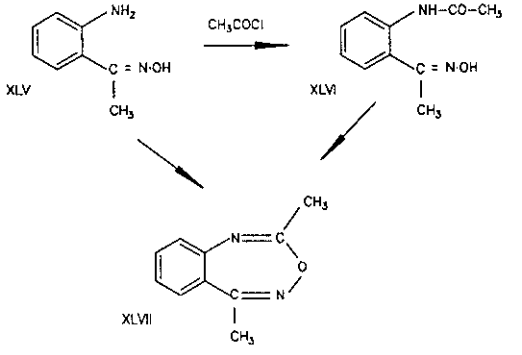
El propósito inicial del trabajo de Sternbach era estudiar un tipo de estructuras relativamente nuevo para aquella época, las 3,1,4-benzoxadiazepinas, de los que deseaba determinar sus posibilidades de las mismas en el campo de los tranquilizantes. Los compuestos elegidos por Sternbach reunían las siguientes características, aconsejables desde el punto de vista de la estrategia del diseño de nuevas moléculas:

1. Corresponder a estructuras relativamente poco exploradas. Esta aproximación permite, entre otras cosas, moverse con cierta facilidad en el campo siempre complicado de la propiedad industrial.
2. Ser relativamente accesibles. El inicio de una investigación sobre nuevas estructuras, nunca debe quedar condicionado por planteamientos sintéticos complicados, ya que estos impedirían acceder a las estructuras con la facilidad y rapidez necesarias para la comprobación de su actividad biológica, confirmando o no el interés de los nuevos compuestos.
3. Deberán presentar la posibilidad de realizar en ellas una gran cantidad de variaciones y transformaciones. Se parte de la premisa de que el mejor compuesto aparecerá como consecuencia de la modulación molecular realizada sobre una estructura líder, cuando se adecuen a los fines deseados parámetros fisicoquímicos, potencia de acción y efectos secundarios.
4. Presentar un problema químico interesante. Este planteamiento que admite inicialmente discusión, se basa en el reconocimiento objetivo de que los investigadores se interesan más en aquellos problemas que implican algún reto intelectual y práctico, que en la simple rutina.
5. Tener cierto "look" de estructuras activas. Cuando se lee con cuidado la justificación de muchos buenos trabajos de la especialidad, realizados por investigadores con sólidos conocimientos, queda subyacente una ligera impresión de que se está probando fortuna, pero no se debe olvidar que la Química Médica es una ciencia aún en desarrollo, que prepara compuestos para ser empleados en organismos vivos de los que todavía se sabe muy poco, y que el llamado Diseño Racional de Medicamentos, no es otra cosa que una aproximación utilizando conocimientos anteriores, que siempre son insuficientes. La intuición, basada en análisis rigurosos de estos datos, es una herramienta de trabajo de la que nunca se deberá prescindir.

Con estas premisas, en principio a Sternbach se le planteaban dos posibilidades:

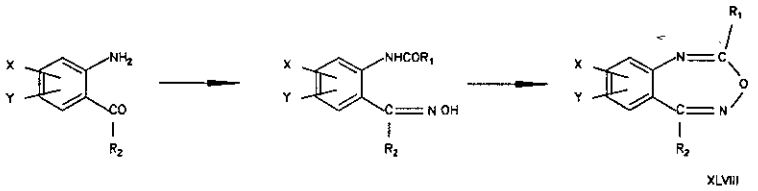
1. Modificación de compuestos ya existentes. Variación molecular de alguna estructura líder.
2. Buscar en un nuevo tipo de estructuras la acción biológica deseada. Búsqueda de un nuevo cabeza de serie.

Eligió como inicio la segunda de las posibilidades que después, ante el éxito obtenido, precisó de la variación molecular.

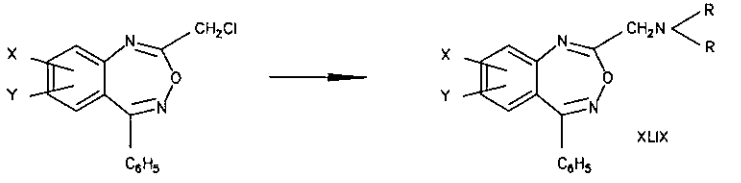


Sternbach empezó su trabajo con estructuras que ya conocía, las benzoheptoxacinas, XLVII, con las que préviamente había trabajado en la Universidad de Cracovia durante su tesis doctoral. Los trabajos de síntesis se iniciaron en el tratamiento de oximas derivadas de amino, XLV, o aceta-minoacetofenona, XLVI, con la llamada mezcla de Beckman. El trabajo original aparece firmado por Auwers y von Mayenburg en 1891 (Auwers and von Mayenburg, 1891). La elucidación estructural de los productos finales se estableció en 1924.

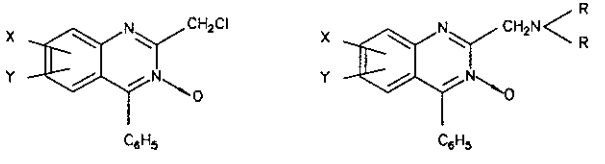
En el plan de trabajo inicial, Sternbach proponía el estudio de compuestos que permitieran la obtención de una cierta cantidad de derivados en la modulación molecular, XLVIII. En el desarrollo de estos compuestos uno de los objetivos fue la obtención de amino derivados en cadena lateral, XLIX. Se encontraron con la sorpresa de que los compuestos obtenidos no pertenecían a la estructura propuesta sino a óxidos de quinozalina, L y LI.



XLVIII



XLIX



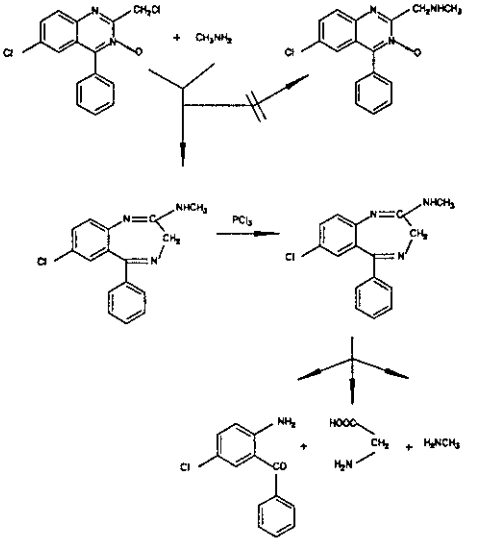
L LI

El trabajo de investigación de Sternbach se interrumpió en 1955, al no encontrarse la actividad biológica esperada en los compuestos preparados.

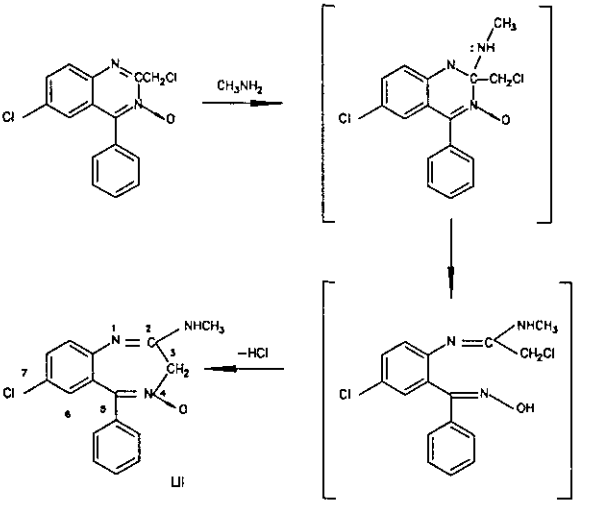
En 1957 se decide realizar la limpieza del laboratorio para iniciar nuevos proyectos. Entre los productos "perdidos" en el laboratorio, se encontró el que se obtuvo como resultado de una reacción de una metilencloroquinozalina con metilamina. Unos miligramos de este compuesto se envío a farmacología para su evaluación biológica, sin demasiado entusiasmo, en razón de los resultados tenidos con el resto de la serie.

En esta ocasión las noticias fueron muy distintas. L. Randall, responsable de los ensayos farmacológicos, encontró en aquella muestra unas extraordinarias e inusuales propiedades. Los resultados obtenidos, indicaban un magnifico comportamiento en la relajación muscular y sedación de los animales estudiados, así como actividad anticonvulsivante. La ausencia de propiedades hipnóticas era también una magnifica propiedad de estos compuestos. El producto, que tenía una toxicidad muy baja, se mostraba como un potencial medicamento del máximo interés.

Mientras el Dr. Randall y su equipo profundizaba en el estudio de estas actividades farmacológicas, el Dr Sternbach estudió la química de este inusual producto, encontrándose con una nueva sorpresa: la molécula no respondía al comportamiento esperado en la espectroscopía IR y UV.



Los estudios correspondientes a la degradación molecular, llevaron a la conclusión de que se estaba ante un sistema heterocíclico nuevo.

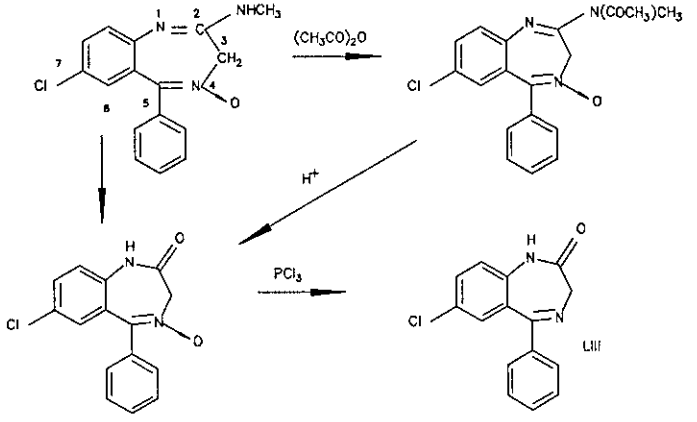


Por los datos obtenidos se llegó a la conclusión de que se estaba frente a una 1,4-benzodiacepina de la que se planteó inmediatamente el mecanismo por el que se obtuvo esta nueva estructura.

El producto que presentó tan interesante perfil, era el 7-cloro-2-(metilamino)-5-fenil-3H-1,4-benzodiacepin 4-oxido, que se presentó en 1960 con el nombre comercial de **Librium**, LII, aceptándose un nombre genérico de clorodiacepoxido. La patente había sido presentada en el mes de mayo de 1958, solicitándose la propiedad de compuestos relacionados con la estructura de 2-amino-1,4-benzodiacepin 4-óxidos con diferentes sustituyentes en los anillos de benceno y fenilo. Se concedió en 1959 sin mayor dificultad. El periodo de tiempo transcurrido entre el primer estudio biológico y su introducción en el mercado farmacéutico, fue solamente de dos años y medio.

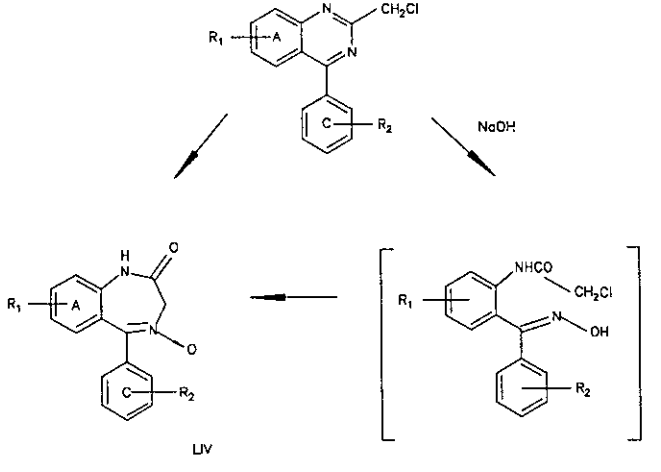
Con el descubrimiento del Librium no se terminó la investigación sobre las nuevas estructuras. En realidad empezaba una nueva carrera conducente a encontrar un compuesto aún mejor, obtenido ahora por variación estructural del nuevo cabeza de serie. En esta competición participaron diferentes empresas y laboratorios de investigación.

La primera modificación que se afrontó iba encaminada a la mejora de aspectos relativos a estabilidad o solubilidad, que son del máximo interés para que el compuesto pueda ser definitivamente utilizado por el enfermo. Cuando se decidió la preparación del Librium en forma de jarabe, se encontraron que sus características de presentar sabor amargo, y ser insoluble e higroscópico (características que hacen temblar a cualquier investigador que desarrolle un producto), hacian esta preparación extraordinariamente difícil. La variación estructural, permitió determinar que la responsabilidad del sabor amargo, se encuentra en el sustituyente en posición 2. También se encontró que el N- óxido que se consideraba imprescindible para la actividad que se buscaba, no tenía en realidad mayor importancia, más bien por el contrario, su supresión suponía un aumento en la actividad final del compuesto. Por aquellos momentos se determinó que en realidad, la única parte esencial de la molécula para la actividad que se estaba midiendo era el sistema de 1,4-benzodiazepina, con un átomo de cloro en la posición siete y un fenilo en la dos, LIII. Para su satisfacción también encontraron que el sustituyente en dos que aparecía como causante de inestabilidad se podía separar fácilmente por hidrólisis ácida. El producto así obtenido tenia la misma actividad que el Librium.



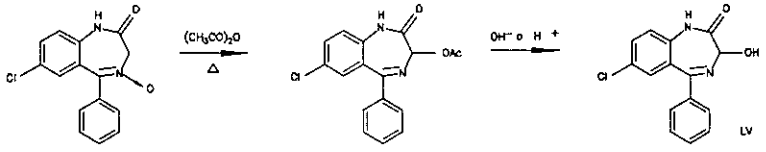
Como consecuencia de la aplicación del método de las variaciones es importante señalar que las dos piedras angulares del desarrollo de estos compuestos, el N-oxido y la función básica en 2, resultaron ser simples adornos innecesarios.

El paso siguiente en el desarrollo químico de estas series fue encontrar métodos más fáciles para preparar N-óxidos, sin cadena lateral en 2, LIV.

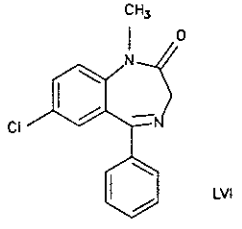


Los productos resultado de este planteamiento, no fueron interesantes desde el punto de vista biológico, sin embargo si lo fueron desde el punto de vista químico. Así uno de los tratamientos aplicados, con ácido ó anhidrido acético, posibilitó que mediante el reagrupamiento de Polonovsky,

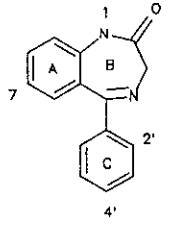
se obtuvieran los productos 3-acetoxi derivados, la hidrólisis de los cuales llevó a derivados hidroxilados en posición 3 que resultaron ser activos, LV.



El trabajo habia sido iniciado por Sternbach para la Roche. En la competición ya se habían implicado otros laboratorios como Wyeth, que obtuvieron la primera patente para el oxazepan, LV.



Ahora el reto se planteaba en la obtención de nuevos métodos de síntesis de compuestos sin el resto de N-óxido. Este programa llevó al descubrimiento del Diazepan, LVI, Valium, 7-cloro-5-fenil-2H-1,4-benzodiacepin-2-ona, significativamente mas potente que el clordiazepoxido y muy poco tóxico. Este compuesto fue introducido en el mercado en 1963. En menos de diez años se prepararon más de tres mil 1,4-benzo y heterodiazapinonas.
El altísimo numero de compuestos preparados ha permitido diseñar una serie de conclusiones estructurales que se sumarizan en el siguiente esquema:



Anillo A: (posición 7) generalmente, incrementada por grupos electroatrayentes como halógenos, NO_2 y CF_3, y disminuida por grupos electrodonantes como CH_3 y OCH_3. Disminuida por cualquier sustituyente en cualquier posición distinta de 7. Anillo B: incrementada por grupo metilo en posición 1; disminuida por sustituyentes más grandes; derivado tert-butilo es completamente inactivo. Anillo C: incrementado por halógenos en posición 2' (como Cl o F); fuertemente disminuida por sustituyentes en posición 4'.

La investigación en la serie de las benzodiazepinas continua en la actualidad, buena prueba de ello es el elevado número de patentes y publicaciones que aparecen constantemente en la literatura de la especialidad. A partir de modificaciones en la estructura básica, se han obtenido series de compuestos en los cuales se ha variado el espectro farmacológico relativo (ansiolíticos, sedantes, hipnóticos, anticonvulsivantes y miorrelajantes centrales), con compuestos más potentes y de actividad más específica. También se han modificado las propiedades farmacocinéticas que influyen de manera decisiva en la distribución del producto y la duración de su efecto.

5.2 El desarrollo de los antagonistas ß

Los trabajos de Black sobre los receptores ß-adrenérgicos (Black, 1989) tiene su inicio a finales de los años 50, cuando empezó su colaboración con la división farmaceútica de la Imperial Chemical Industries.

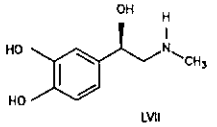
Su proyecto original estaba basado en una idea que reunía aspectos clínicos, terapeúticos, fisiológicos y farmacológicos, además de un profundo interés desde el punto de vista de la química médica. Este conjunto de elementos constituye un planteamiento sin duda eficaz y original que, hoy en día, se encuentra en la base del descubrimiento de medicamentos.
El objetivo claro de Black era la obtención de un compuesto antagonista de los receptores ß-adrenérgicos, que fuera capaz de reducir el ritmo cardíaco, tanto en reposo como durante el ejercicio, con la esperanza de que de esta manera se redujera la susceptibilidad de los enfermos a la angina.

Los datos clínicos, fisiológicos y terapeuticos de que se disponía, coincidian en afirmar la ventaja que para los enfermos con alteraciones en la circulación coronaria podía suponer el anular las acciones que las hormonas simpáticas, adrenalina y noradrenalina, tienen sobre el corazón. Así, clinicamente se conocía que situaciones de ansiedad y emoción precipitan la aparición de la angina y, de hecho, la aparición de dolor tras inyección de adrenalina se utilizaba como dato para el diagnóstico. También se conocía que la tiroidectomía parcial alivia la angina, independientemente de si está asociada o no a situaciones de hipertiroidismo.

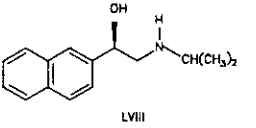
Desde el punto de vista de la terapeútica, el empleo de la Nitroglicerina provoca el alivio inmediato en un ataque de angina, atribuyendo este hecho al caracter vasodilatador sobre las arterias coronarias. Sin embargo se descubrió que vasodilatadores coronarios como Dipiridamol, eran ineficaces en la angina, lo cual constituyó un duro golpe en la estrategia al uso, que consideraba como productos potencialmente más eficaces para la angina a aquellos que aumentaran el flujo sanguíneo coronario.

En cuanto a la fisiología, cuando Black inicia sus trabajos se empieza a valorar el posible efecto "anoxizante" de la adrenalina, pero para él aún no es un factor conocido. En cualquier caso si conoce los trabajos de Smith y Lawson (Smith and Lawson, 1958) sobre la reducción de la incidencia de la fibrilación ventricular, asociada con la oclusión de arteria coronaria, por tratamiento con oxígeno hiperbárico, a 2 atmósferas, incluso cuando la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre unicamente se haya incrementado un 25 %. La cuestión planteada ahora por Black es si una pequeña disminución, equivalente, en la demanda de oxígeno del miocardio podría ser efectiva. Si el consumo miocárdico de oxígeno está determinado por el trabajo del corazón y es función de la presión arterial y el ritmo cardiaco, un descenso en la presión arterial podría reducir peligrosamente la presión de perfusión y el flujo sanguíneo a través de las arterias patológicas. Además el ritmo cardiaco, que está determinado en gran medida por el sistema nervioso autónomo, puede ser reducido por bloqueo simpático. En definitiva, con los datos de que ahora se dispone, la isquemia miocárdica, es la pieza responsable de la angina, y resulta del desequilibrio entre la demanda de oxígeno del miocardio y el aporte del mismo que la circulación coronaria puede proporcionar. Cualquier acción que modifique estos factores, en principio será efectivo en la angina.
Por otra parte, farmacológicamente, la drogas con efecto antiadrenalina constituían un grupo terapeútico bien conocido; característicamente disminuian la subida en presión arterial producida por la Adrenalina, LVII, pero no eran capaces de reducir la taquicardia asociada. Los trabajos de Konzett (Konzett, 1940) habían demostrado que la Isoprenalina, LIX, derivado isopropilo de Noradrenalina, produce taquicardia, vasodilatación y broncodilatación, efectos que los compuestos con actividad antiadrenalina no son capaces de suprimir. De ello, Ahlquist dedujo que se podia proponer la existencia de dos tipos de receptores, los α y los ß, responsables de mediar los efectos de la Adrenalina (Ahlquist, 1948). Según esto las drogas antiadrenalina que se estaban utilizando eran antagonistas de los receptores α, en tanto que la Isoprenalina era un estimulante selectivo de los receptores ß. De acuerdo con estos datos era razonable llegar a obtener compuestos antagonistas de receptores ß.

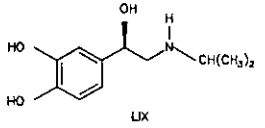
En cuanto al aspecto químico de la cuestión, el programa debía empezar de cero, ya que no se disponía de ningún compuesto de referencia capaz de anular la acción de la Adrenalina; solamente disponian del indicio, antes citado, de que la Isoprenalina era un estimulante selectivo de los receptores ß. El Profesor Black, según sus propias palabras, pensó que puesto que la N-sustitución de la Adrenalina con un grupo isopropilo podia producir un agonista selectivo, quizás la sustitución con un grupo distinto, más largo, podría producir un antagonista selectivo. Dedujo que análogos simétricos de la Isoprenalina, dibenziletilaminas, LXI, podrían ser interesantes



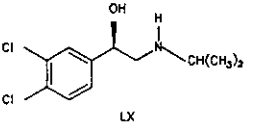
LVII



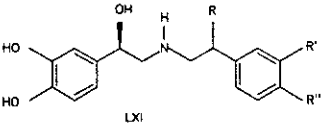
LVIII



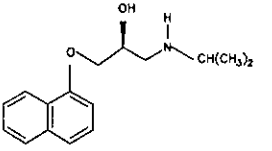
LIX



LX



LXI



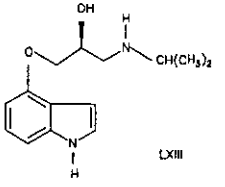
LXII

objetivos. Con esta base se empezaron a sintetizar compuestos, sin ningún éxito. En 1959 se publicaron las propiedades de la Dicloroisoprenalina, LX, DCI, (Powell and Slater, 1958) en la cual los grupos hidroxilo de la Isoprenalina habían sido sustituidos por dos átomos de cloro. Intentando encontrar un compuesto en el cual se exaltase la actividad broncodilatadora de Isoprenalina, los investigadores del grupo Lilly habian descubierto un compuesto que tenía propiedades opuestas a las de esta hormona. A este compuesto lo calificaron como antagonista de la Isoprenalina. Muy pronto después Moran y Perkins informaron de que DCI anulaba los efectos inotrópicos de la adrenalina en el corazón y clasificaron este compuesto como un antagonista de los receptores ß (Moran and Perkins, 1958).

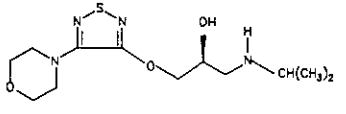
El grupo de Black inmediatamente empezó a trabajar sobre esta molécula, diseñando nuevos ensayos biológicos que les permitieran descubrir el mecanismo de acción íntimo de esta molécula, así como de las que se sintetizaron dentro de este programa. La observación de los resultados de estas pruebas les llevó a rechazar a DCI como producto líder. El tipo de diseño de los ensayos biológicos les facilitó una información parcial, distorsionada, que les impidió valorarla en su justa medida. Este hecho, como reconoce el propio Dr Black, constituyó una limitación que posteriormente se salvó. Hoy, DCI está clasificada como un Agonista Parcial,término no en el queda implícito la variedad de acciones de estas moléculas. La reacción del responsable de los aspectos de síntesis de este proyecto, John Stephenson, fue un claro ejemplo de la aplicación del método variacional: "Haremos el naftil-análogo de la isoprenalina". El sentido de esta nueva

aproximación se establece en que la presencia de un nuevo anillo de benceno fusionado, puede conferir a la molécula propiedades estéricas y electrónicas relacionadas con los dos átomos de cloro, a la vez que podría ser ventajoso la extensión del sistema π. Así se llegó a la síntesis del Pronetanol, LVIII, que resultó un antagonista sin ningún signo de actividad agonista ni tan siquiera tejido-dependiente. Los datos complementarios sobre la actividad biológica de esta nueva molécula se extendieron con amplitud, en un intento de confirmar si efectivamente se encontraban frente a una sustancia líder. En este punto aparecieron datos que confirmaron que Pronetanol era un buen prototipo pero no lo suficientemente bueno como para su puesta en el mercado. Esto llevó a que un importante equipo de química médica, dirigido por Dr Crowther, retomaran el objetivo de obtener un compuesto mejor que Pronetanol, tomado como cabeza de serie. Se realizó una nueva modificación que afectó ahora a la cadena lateral, con la introducción de un oxígeno eter, consiguiendose así un naftoxil-derivado de isopropilamina. Este producto, el Propranolol, LXII, resultó ser un potente antagonista ß.

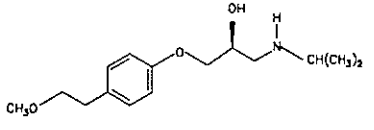
El posterior desarrollo de los métodos biológicos ha permitido comprobar que su actividad antagonista afecta tanto a los receptores $ß_1$ como a los $ß_2$.



LXIII



LXIV



LXV

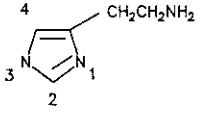
La investigación en el campo de los ß-bloqueantes ha continuado, obteniendose una gran variedad de compuestos que en su mayoria mantienen en la cadena lateral el resto isopropilo u otro de tamaño similar, que al parecer es el responsable de la afinidad por el receptor ß y un grupo

hidroxilo en el carbono ß; poseen también un anillo aromático más o menos modificado, con sustituiciones muy variadas y que al parecer facilita la fijación al receptor y establece su característica de agonista, antagonista o agonista parcial. Citaremos entre otros Pindolol (ß1 y ß2), LXIII, Timolol (ß1 y ß2), LXIV y Metoprolol (ß1), LXV.

5.3 Los antagonistas de receptores H_2

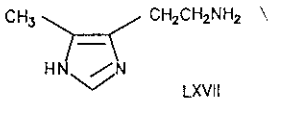
Los estudios de Black en el campo de los antagonistas de los receptores de la histamina se inician en el año 1964, cuando empezó a colaborar con los laboratorios Smith, Kline & French. La experiencia previa, obtenida con el proyecto de los antagonistas ß anteriormente citado, le sirvió como eficaz banco de pruebas para esta nueva investigación; como en el caso anterior acudió al estudio de las implicaciones clínicas, terapeúticas, fisiológicas y farmacológicas y además, planteó desde un primer momento la necesidad de un diseño más ajustado de las pruebas biológicas (Black, 1989). En este aspecto, para los ensayos "in vitro" se acudió a la preparación de musculo de íleon de cobaya, un sistema clásico para el estudio de la drogas con actividad antihistamina como la Mepiramina. Para los ensayos "in vivo" se eligió el método de Gohsh y Schild para la infusión en atrio estomacal de ratas anestesiadas (Gohsh and Schild, 1958) modificado por Parsons, miembro del equipo de Black (Parsons, 1969).

Nos centraremos en el aspecto químico del proyecto. Desde un primer momento el objetivo era la síntesis de análogos y derivados de la histamina, LXVI, haciendo particular énfasis en el anillo de imidazol terminal de la misma. Los primeros compuestos sintetizados con modificaciones en el anillo,

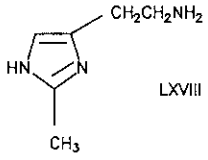


LXVI

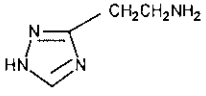
presentaban sustituyentes metilo en distinta posición; algunos de ellos tenían importante actividad, otros como los productos en los que se metilaban cualquiera de los átomos de nitrógeno del anillo, carecian de actividad. La sustitución en la posición 2 dió lugar a compuestos que eran mucho menos activos que la histamina, pero que tenían una clara actividad en el ensayo en íleon. El compuesto con un grupo metilo en 4 tenía una actividad sorprendente, ya que mientras mostraba una actividad de aproximadamente el 50 % de la de la histamina en el ensayo en atrio, era totalmente inactivo en íleon.



LXVII



LXVIII

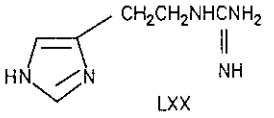


LXIX

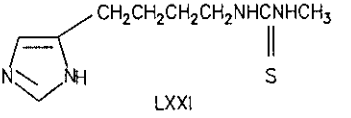
Inmediatamente pasaron a estudiar esta sugerente selectividad de acción "in vivo", llegandose a la conclusión de que la 4-metilhistamina, LXVIII, era un agonista selectivo, de manera similar a la isoprenalina respecto a los receptores adrenérgicos.

Esta observación cobró nueva importancia cuando se sintetizó el 1,2,4-triazol análogo de la histamina, LXIX, y se comparó su actividad con la de 2-metil y 4-metil- histamina. Utilizando una bateria de ensayos biológicos adicionales "in vitro" e "in vivo", se comprobó que el triazol era cláramente no selectivo, mientras que el derivado 2-metil mostraba selectividad en respuestas mepiramina-sensibles y el producto 4-metil era selectivo en respuestas mepiramina-refractarias. Se demostraba la existencia de más de un tipo de receptores para la histamina. Un gran número de compuestos fueron sintetizados, con diferentes sustituciones en el anillo y con fusiones del mismo con otros anillos, dando lugar a gran variedad de heterociclos. Sin embargo ninguno de ellos presentó actividad, lo que llevó a plantear un cambio en la estrategia de síntesis. Se decidieron a realizar modificaciones sobre la cadena amino lateral de la histamina. Paralelamente se habían realizado modificaciones en los ensayos biológicos, con el fin de detectar incluso antagonismos de corta duración que podian quedar enmascarados.

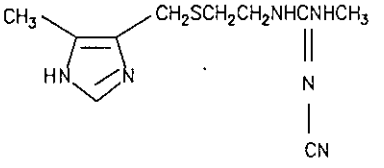
De los primeros compuestos con cadena lateral modificada, destacó la actividad mostrada por el guanilhistamin-derivado que resultó ser un agonista parcial, es decir, la N^{α}-guanilhistamina, LXX, era para los receptores de histamina lo que la Dicloroisopropilamina en los receptores ß. Este compuesto era el líder esperado. La primera modificación que sufrió consistió en el aumento de la longitud de la cadena lateral, de etilo a propilo, obteniéndose la Imidazolilpropilguanidina. En esta molécula se detectó actividad antagonista y se abrió la posibilidad de nuevas modificaciones, la primera de ellas, un nuevo aumento en la longitud de la cadena hasta cuatro carbonos. También se consideró conveniente sustituir el grupo guanidino, fuertemente básico, por un grupo neutro como la metiltiourea. La Burimami-



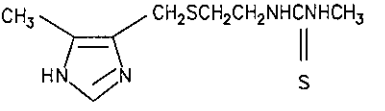
LXX



LXXI



LXXII



LXXIII

da, LXXI, así diseñada mostró una moderada actividad antagonista, pero con una potencia relativa baja y escasa biodisponibilidad por vía oral; en realidad era un nuevo prototipo. El camino a seguir ahora estaba claro. La presencia de la cadena lateral electrón donante y no básica de la Burimamida, en comparación con la cadena eletroatrayente y básica de la histamina, incrementaba el valor de pKa del anillo (7.2 para Burimamida, frente a 5.9 de la Histamina) y favorecía la presencia del tautómero con H en 3. La sustitución de uno de los metilenos de la cadena lateral por un tioeter electronegativo y la introduccción de un resto metilo en la posición 4 del imidazol, para favorecer la selectividad para los receptores H_2, permitió obtener Metiamida, LXXIII, de mayor potencia y mejor absorción que Burimamida.

Posteriormente se observó que la presencia del resto tiourea incrementaba la toxicidad. Para eliminar este problema se sustituyó el azufre de la tiourea por un grupo C=N-CN. Esta última modificación llevó a Cimetidina, LXXII, la primera solución terapeútica efectiva para los problemas de úlceras gastroduodenales.

6.0 EL FUTURO DE LOS METODOS VARIACIONALES

Hemos pretendido en este capítulo presentar con tres ejemplos de indiscutible interés, realizados por personas de reconocido prestigio en el campo de la Química Médica, cual ha sido la evolución del método de las variaciones.

De estos estudios se desprende una evolución en el peso relativo que las distintas ciencias implicadas en el diseño de nuevos medicamentos han

ido tomando. Se observa en primer lugar, un progresivo aumento en la importancia que los métodos biológicos tienen como elemento de apoyo y decisión en el planteamiento de las estrategias de síntesis, llegando a ser auténticas piezas clave y en muchos casos, por desgracia, fuentes de error y realmente cuellos de botella, si su diseño no es adecuado. También se deduce la necesidad de disponer de técnicas cada vez más avanzadas en el campo del análisis instrumental, como base para la elucidación estructural de los nuevos compuestos. Y siempre, como elemento fundamental, la colaboración estrecha entre investigadores de distinta formación y campo de trabajo que puedan ofrecer su experiencia desde diferentes perspectivas.

Los previsibles avances en el campo de la biotecnología, la biología molecular y ciencias afines, están dando un nuevo enfoque al diseño de nuevos fármacos. El método de las variaciones estructurales siempre estará como método de apoyo en el diseño de las estrategias de síntesis, formando parte de los equipos multidisciplinares decididos a encontrar los mejores medicamentos.

7.0 BIBLIOGRAFIA

. Ahlquist, R. P. (1948), *Am. J. Physiol.*, 153, 586.
. Auwers, K.; von Meyenburg, F. (1891), *Chem. Ber.*, 24, 2370.
. Black, J. W. (1989), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28, 886.
. Ghosh, M. N.; Schild, H. O. (1958), *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 13, 54.
. Konzett, H. (1940), *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.*, 197,27.
. Moran, N. C.; Perkins, M. E. (1958), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 124, 223.
. Parsons, M. E. (1969), *Ph. D. Thesis*, University of London.
. Powell, C. E.; Slater, I. H. (1958), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 122, 480.
. Smith, G.; Lawson, D. D. (1958), *Scott. Med. J.*, 3, 346.
. Sternbach, L. (1979), *J. Med. Chem.*, 22, 1.

Tecnicas QSAR en Diseño de Fármacos

M. PASTOR Y J. ALVAREZ-BUILLA
Departamento de Química Orgánica. Universidad de Alcalá.
E-28871 Alcalá de Henares. Madrid.

1.0 INTRODUCCION.

Los denominados métodos QSAR (relaciones cuantitativas estructura-actividad) también llamados métodos LFER (relaciones lineales de energía libre), han agrupado históricamente a todas las técnicas que han intentado establecer modelos empíricos de comportamiento sobre familias de compuestos biológicamente activos, en orden a obtener, de la manera mas eficaz posible, óptimos de actividad, a partir de los datos de comportamiento de un número limitado de productos.

La evolución de este tipo de métodos ha sido recogida por Craig en una revisión reciente (Craig, 1984). La primera vez que se habló de un modelo "aditivo" de relaciones estructura- actividad, tal como hoy lo entendemos, fue en un artículo de Bruice, Karasch y Winzler (Bruice, 1956), donde los autores describían la utilización de un modelo *de novo*. Por desgracia, el artículo se publicó en una revista de baja difusión, lo que hizo que no tuviera eco en los años siguientes. Pocos años después, Free y Wilson (Free, 1964) publicaron esencialmente el mismo método, sin que ni ellos ni los editores de la revista fueran capaces de detectar el trabajo anterior, y así el modelo ha sido conocido desde entonces como de Free-Wilson.

De manera simplificada, la técnica está basada en el uso de series de compuestos derivados de una estructura común, en los que se observan las alteraciones producidas en su actividad biológica en función de la presencia de sustituyentes diversos. A partir de estos datos, es posible calcular coeficientes aditivos *de novo* para cada sustituyente, con lo que es posible diseñar la mejor combinación de sustituyentes para alcanzar el óptimo de actividad.

Simultáneamente con el trabajo de Free y Wilson, otro trabajo fundamental para el desarrollo de las técnicas QSAR se estaba produciendo, por el grupo de Corwin Hansch, en el Pomona College (Claremont, California). C. Hansch era entonces un investigador con formación en química orgánica física, y estaba familiarizado con el trabajo de Hammett. El y Toshio Fujita, que fue a Pomona de año sabático a principios de los años sesenta, pusieron a punto el denominado modelo paramétrico -también

llamado modelo de Hansch- en el que se correlaciona la actividad biológica de series de productos con sus propiedades físico-químicas (Hansch, 1964). Ambos métodos constituyen la base para la optimización de actividades a partir de prototipos cabeza de serie, tal como se utiliza en la actualidad.

La metodología QSAR sigue, independientemente del modelo que se utilice, unos pasos comunes que se hallan sintetizados en la Fig. 1.1. El punto de partida en todos los casos implica la existencia de un **prototipo cabeza de serie**, que se define como un producto que muestra actividad en relación con

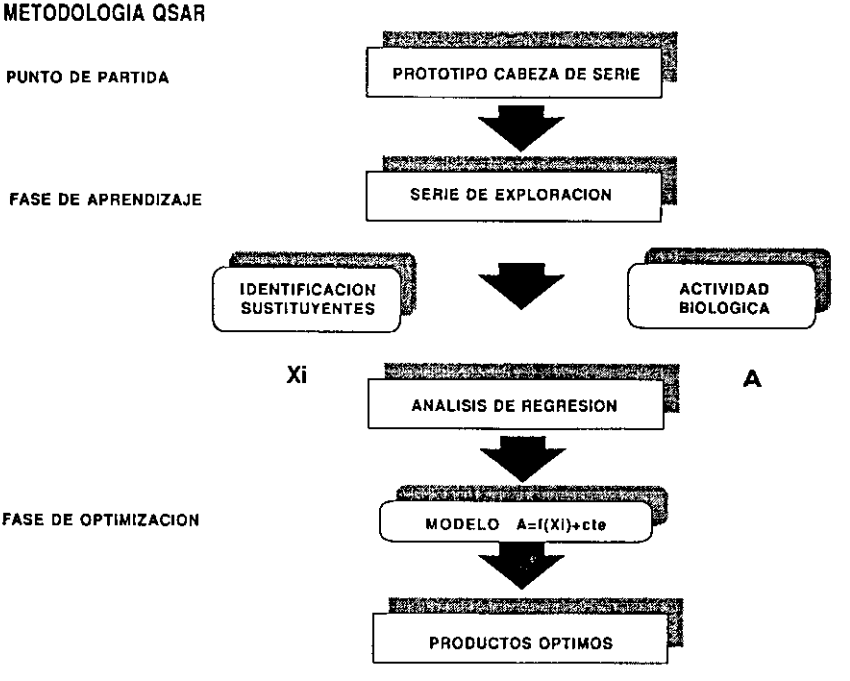


Fig. 1.1

el objetivo terapéutico buscado. Este producto, aunque reviste interés como modelo a desarrollar, no puede habitualmente ser utilizado como fármaco - debido a que tiene una actividad escasa, o una toxicidad elevada, o características farmacocinéticas inadecuadas..- y ha de ser optimizado en sus propiedades para pasar a ser un candidato a fármaco.

Cuando se dispone de un prototipo, es preciso diseñar una serie de exploración, que está constituida por un conjunto de productos análogos del prototipo, que permitan el establecimiento de las primeras relaciones estructura-actividad. Los miembros de la serie de exploración han de ser sintetizados y analizados en su actividad biológica.

Los miembros de la serie de exploración están constituidos por un núcleo común, y unos sustituyentes o fragmentos variables, que son característicos de cada producto de la serie. Dichos sustituyentes variables han de ser identificados por descriptores, que serán utilizados como variables independientes (Xi) en el modelo. Los descriptores son binarios -indicando simplemente presencia o ausencia del fragmento- en los modelos *de novo*, y son mayoritariamente escalares -es decir con valores numéricos diversos- en los modelos paramétricos. Por otra parte, los valores de actividad biológica -normalmente expresados en forma logarítmica- se utilizan como variable dependiente (A) en el modelo.

Una vez establecidos ambos conjuntos de valores Xi y A, se utilizan técnicas de regresión múltiple para obtener un modelo de la forma indicada en la eq. 1.1, donde la actividad está expresada en forma de una constante mas las contribuciones de los sustituyentes variables utilizados.

$$A = f(Xi) + cte. \qquad \text{(Eq. 1.1)}$$

El modelo ha de ser analizado en su calidad estadística, para evaluar su capacidad de predicción, y frecuentemente es utilizado -en una denominada fase de comprobación- para calcular la actividad de miembros de la familia de productos analizada. Cuanta mayor calidad estadística tenga el modelo, tanto mas fiables serán las predicciones de actividad obtenidas.

La fase de optimización implica que una vez obtenido un modelo de buena calidad, es posible calcular los productos con actividad óptima dentro de la familia estudiada, que habrán sido obtenidos con un mínimo de esfuerzo experimental. Por supuesto, esto no se consigue al primer intento, de hecho, el proceso de optimización de un prototipo es un proceso cíclico (Fig. 1.2), en el que la serie de exploración inicial produce un modelo de baja calidad, que es refinado por el diseño y la síntesis de series complementarias, hasta obtener un modelo de calidad suficiente para ser utilizado en el diseño de los productos óptimos.

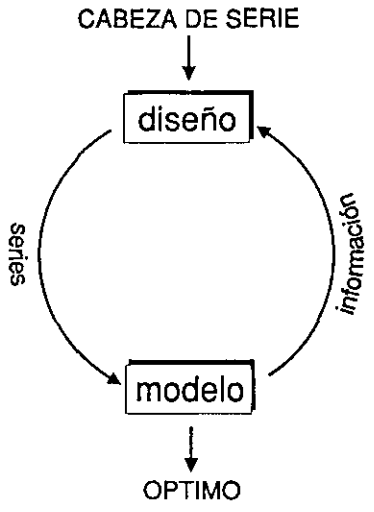


Fig. 1.2

2.0 MODELOS DE NOVO

2.1 La metodología de Free-Wilson (Kubinyi, 1990).

Todos los químicos implicados en desarrollo de fármacos siguen una metodología similar a la descrita en la Fig. 1.1. Partiendo de un prototipo, como el carbazol sustituido de la Fig. 2.1, se obtienen series de productos con

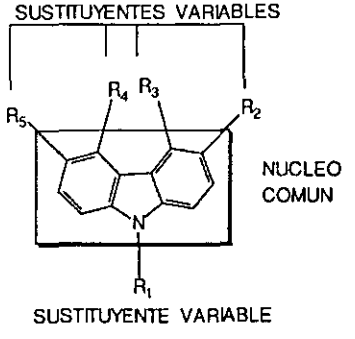


Fig. 2.1

modificaciones estructurales progresivas. Cada modificación puntual realizada produce un cambio definido en la actividad biológica, y como

primera aproximación, este cambio es fijo e independiente de las restantes modificaciones introducidas en la molécula. Expresado en términos matemáticos, la actividad biológica A, debe ser -en una familia de productos derivados del prototipo- función de la contribución del núcleo común a toda la serie (μ), y de las contribuciones (a_i) de los sustituyentes variables (X_i, variable binaria, que toma valor 1 cuando el sustituyente está presente en la molécula, y valor 0 cuando no está). El modelo de comportamiento está representado por la eq. 2.1, donde A es la actividad (Free,1964) -representada en forma logarítmica (log A ó log 1/C) en el modelo de Fujita-Ban, mas reciente (Fujita, 1971)- y μ es, bien la media de la actividad de los productos de la serie (Free, 1964), bien la actividad, calculada por el modelo de la contribución del núcleo común sin sustituyentes.

$$A = \Sigma a_i + \mu \qquad \text{(Eq. 2.1)}$$

El modelo de Free-Wilson en todas sus variantes es el único modelo auténtico de relaciones estructura-actividad ya que la contribución a la actividad de cada fragmento se calcula directamente por regresión múltiple. En la aproximación extratermodinámica se correlacionan propiedades fisico-químicas con la actividad, y no directamente fragmentos estructurales.

Por otra parte, la utilidad del análisis de Free-Wilson es mas limitada que la de los modelos extratermodinámicos. Mientras que éstos producen conclusiones generales acerca de la acción de un fármaco a nivel molecular, los modelos *de novo* permiten sólo una cuantificación de los efectos que los cambios estructurales producen sobre la actividad biológica.

2.2 El diseño de la serie de exploración.

Para poder utilizar técnicas QSAR en diseño de fármacos, el primer requisito es cuidar el diseño de la serie de exploración, en orden a conseguir que los productos sean congenéricos (Rekker, 1985), lo que significa: a) que todos los productos tengan el mismo esqueleto común, y b) que los sustituyentes se influencien sólo de manera aditiva -es decir que no interaccionen por puentes de hidrógeno, por conjugación o por efectos estéricos-.

Dado que en desarrollo de fármacos el coste del trabajo experimental -síntesis y análisis farmacológico- es mucho mas caro que el tratamiento estadístico de los datos obtenidos, es importante conseguir un diseño óptimo de la serie de exploración, para evitar las limitaciones derivadas de la falta de calidad de la muestra (Hudson, 1970).

El número mínimo de productos requeridos para un análisis de Free-Wilson es de uno por cada parámetro de la ecuación de regresión -uno para el producto de referencia, y uno por cada sustituyente diferente del correspondiente sobre el producto de referencia. Si hay j posiciones diferentes en de variación estructural, con n_i sustituyentes diferentes para cada posición, el mínimo número de análogos viene dado por la ecuación 2.2 (Martin, 1978), mientras que el número de análogos viene dado por la ecuación 2.3.

$$N_{min} = \Sigma_j (n_i - 1) + 1 \qquad \text{(Eq. 2.2)}$$

$$N_{max} = n_1 . n_2 . n_3 .....n_{j-1} . n_j \qquad \text{(Eq. 2.3)}$$

Así, para una serie con tres posiciones de sustitución en el prototipo, y cinco grupos diferentes para cada posición, el mínimo número de análogos para obtener un modelo de Free-Wilson será de 4+4+4+1 = 13 mientras que el número de derivados posibles será de 5x5x5x = 125. El número de análogos seleccionados para la síntesis y análisis farmacológico será siempre el resultado de un compromiso entre la accesibilidad sintética y los requerimientos estadísticos. Cuanto mayor sea la serie de exploración, mayor será el número de grados de libertad y mas fiables serán las predicciones del modelo final, pero de manera simultánea los costes y el esfuerzo aumentan con el número de análogos incluidos en dicha serie.

Todas las recomendaciones sobre el número de grados de libertad requeridos y sobre el número de análogos por cada parámetro son arbitrarios (Kubinyi, 1990), porque dependen del diseño de la serie, de que los sustituyentes estén distribuidos uniformemente o no, de la calidad de los datos de actividad biológica, etc. Normalmente, cada fragmento debe repetirse entre dos y cuatro veces en la serie, y deben estar presentes en frecuencias comparables. Dos tipos de problemas son frecuentes y deben ser evitados en el diseño de una serie de exploración: a) si un sustituyente aparece una sola vez en la serie, se produce una determinación de punto único, sin significación estadística y b) si dos sustituyentes aparecen siempre juntos, no es posible calcular la contribución individual de cada uno (Purcell, 1973) y deben ser tratados como un único sustituyente (Kubinyi, 1976) para evitar fracasos en el análisis de regresión por dependencia lineal en la matriz de sustituyentes.

Para obtener una serie de exploración de buena calidad con el mínimo número de derivados se han propuesto varios métodos. V. Austel ha descrito uno manual basado en el diseño 2^n factorial (Austel, 1985), y J.

Elguero y col. han descrito un método cuantitativo para extraer un conjunto óptimo de todos los análogos posibles, basado en la maximización del determinante de la matriz de sustituyentes (Cativiela, 1983).

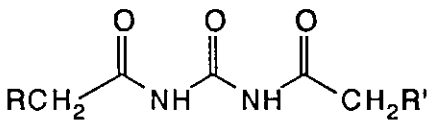
2.3 La elaboración de un modelo *de novo.*

Dejando aparte las versiones iniciales del modelo de Free-Wilson (Kubinyi, 1990), la modificación denominada de Fujita-Ban (Fujita, 1971) está basada en la utilización del modelo indicado en la ecuación 2.4, donde la constante μ está definida como la actividad calculada del producto no sustituido de la serie. Todas las contribuciones a la actividad b_{jk} están referidas al hidrógeno en la misma posición de sustitución.

$$\log A = \Sigma b_{jk} X_{jk} + \mu \qquad \text{(Ec.2.4)}$$

La metodología se muestra con facilidad sobre un ejemplo muy esquemático, desarrollado a partir de ureas substituidas con actividad hipnótica (Kubinyi, 1976a). La matriz de sustituyentes está representada en la Tabla 2.1, siendo una matriz peculiar, puesto que los valores que cada variable puede tomar serán 0, 1, ó 2, debido a la existencia de productos con sustitución simétrica. Para simplificar el cálculo de regresión, es necesario eliminar la dependencia lineal entre columnas relacionadas de la matriz -que son las referidas a sustituyentes alternativos sobre una misma posición- por lo que se elimina una entre cada conjunto de columnas relacionadas, como se indica en la columna de la variable X_1, que corresponde al sustituyente mas sencillo (H), cuya contribución se iguala a 0. Así pues, el producto con dos sustituyentes H -el diacetil derivado- es el que se toma como patrón, y su actividad determina el valor de μ en el modelo.

Tabla 2.1. Matriz de Fujita-Ban de N,N'-diacilureas con actividad hipnótica.



Comp	H	Me	Et	Pro	But	Pent	$N_1.N_2$	Log (1/C)
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6		
1	1	1	0	0	0	0	6	1,84
2	0	2	0	0	0	0	9	2,06
3	1	0	1	0	0	0	8	2,16
4	0	1	1	0	0	0	12	2,23
5	1	0	0	1	0	0	10	2,27
6	0	0	0	2	0	0	16	2,40
7	0	1	0	1	0	0	15	2,35
8	1	0	0	0	1	0	12	2,46
9	0	0	1	1	0	0	20	2,38
10	0	1	0	0	1	0	18	2,25
11	1	0	0	0	0	1	14	2,55
12	0	0	0	2	0	0	25	2,32
13	0	0	1	0	1	0	24	2,28

Nota.- El término de interacción N.N' se obtiene multiplicando el número de carbonos de los dos restos acilo en cada molécula.

La regresión múltiple sobre la Tabla 2.1, produce un modelo como el indicado en la ecuación 2.5, en el que aparecen todos los parámetros estadísticos habituales en los modelos QSAR. Lo primero de todo es que los coeficientes de las variables binarias han de presentarse indicando entre paréntesis los intervalos de confianza al 95%. Asimismo, la calidad del modelo empírico se define por medio del coeficiente de correlación, r^2 - a veces se utiliza r, según los autores- la desviación standard s, y el valor F (Kubinyi, 1990). El coeficiente de correlación es una medida relativa del ajuste de los datos al modelo, calculándose a partir de la varianza residual - varianza no explicada por el modelo- y la varianza total de los datos. Cuanto menor sea la varianza no explicada, tanto mayor será r^2, tendiendo su valor a 1. La desviación standard s es una medida absoluta del ajuste de los datos al modelo, dependiendo solamente de la varianza no explicada y del número de grados de libertad del modelo. El valor tiende a cero en los modelos de

mejor calidad. La significación de un modelo de regresión se prueba por su valor F, que correlaciona la varianza explicada (r^2) por el número de grados de libertad, con la varianza no explicada ($1-r^2$) por el número de variables del modelo. Cuanto mas alto es el porcentaje de varianza explicada por el modelo, mayor será el valor de F, mientras que la existencia de variables con baja contribución a la explicación de la varianza, tenderán a disminuir dicho valor, que tiende a infinito en los mejores modelos.

Volviendo a la ecuación 2.5, es posible comprobar como explica un pequeño porcentaje de la varianza observada, que mejora ostensiblemente cuando se incorpora a la regresión un término de interacción no lineal de Bocek-Kopecky (Bocek, 1964) (Kubinyi, 1990) $N_1.N_2$, que representa el producto del número de carbonos presentes en ambos restos acilo de cada producto, y que está diseñado arbitrariamente para representar efectos no lineales dependientes de la longitud de cadena de los grupos acilo. En el segundo modelo -ecuación 2.6- los parámetros estadísticos son claramente de mejor calidad, y el citado termino de interacción tiene una contribución negativa a la actividad, a medida que aumenta la longitud de las cadenas. La variable X_6 se marca con un asterisco, debido a que su contribución está calculada a partir de un único producto, por lo que su valor es solamente orientativo.

$$\text{Log } 1/IC = 2{,}039\ (\pm\ 0{,}34) - 0{,}003\ (\pm\ 0{,}22)\ X_2 + 0{,}149\ (\pm\ 0{,}22)\ X_3 + 0{,}186\ (\pm\ 0{,}23)\ X_4 + 0{,}242\ (\pm\ 0{,}29)\ X_5 + 0{,}511\ (\pm\ 0{,}47)\ X_6^* \qquad \text{(Ec. 2.5)}$$

$$n = 13 \quad r^2 = 0{,}676 \quad s = 0{,}135 \quad F = 2{,}93$$

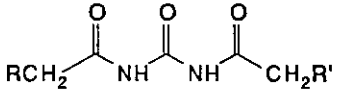
$$\text{Log } 1/IC = 1{,}930\ (\pm\ 0{,}13) + 0{,}430\ (\pm\ 0{,}17)\ X_2 + 0{,}910\ (\pm\ 0{,}28)\ X_3 + 1{,}249\ (\pm\ 0{,}39)\ X_4 + 1{,}487\ (\pm\ 0{,}45)\ X_5 + 1{,}813\ (\pm\ 0{,}49)\ X_6^* - 0{,}085\ (\pm\ 0{,}03)\ N_1.N_2 \qquad \text{(Ec. 2.6)}$$

$$n = 13 \quad r^2 = 0{,}964 \quad s = 0{,}049 \quad F = 26{,}59$$

Una vez establecido el modelo, es fácil conocer la contribución de cada fragmento considerado, que corresponde al valor del coeficiente de cada variable X. Así, considerando el modelo 2.6 es fácil comprobar como existe, en el intervalo estudiado, una relación lineal entre la contribución de un fragmento y su longitud, resultando el de contribución mayor el X_6 -con las limitaciones citadas en relación con este valor- que corresponde a la presencia de un grupo heptanoilo, que tiene un coeficiente positivo de 1,813. El encontrar un producto óptimo, sin embargo, no es tan sencillo, puesto que existe el término de interacción $N_1.N_2$, con un coeficiente negativo (0,083) que crece con el producto del número de carbonos de los dos restos acilo, y que explica la reducción de actividad de los compuestos simétricos. Por ello, los

óptimos calculados a partir del modelo, representados en la Tabla 2.2, corresponden mayoritariamente a productos con un sustituyente largo y otro corto. En este caso, dado que el modelo es muy sencillo, y el número de derivados posibles es de 6^2 y se ha preparado un tercio del conjunto, varios óptimos han sido ya preparados en la serie de exploración, lo que no ocurre en el caso de series y modelos mas complejos.

Tabla 2.2. Algunos óptimos del modelo 2.5.



R	R'	Log $(1/C)_{calc}$	Log $(1/C)_{exp}$
H	Pent	2,553	2,55
H	But	2,397	2,46
Et.	Et	2,390	2,40
Me	Pent	2,388	-
Me	But	2,317	2,25
Pro	Pro	2,303	2,32
Me	Me	2,025	2,06
But	But	1,844	-
Pent	Pent	1,391	-

2.4 Alcance y limitaciones del análisis de Free-Wilson.

Usos del análisis de Free-Wilson en diversos campos y en combinación con otras técnicas QSAR se han revisado recientemente (Kubinyi, 1990), mostrando la flexibilidad y utilidad de la técnica. Especialmente en las primeras fases de la optimización de un prototipo, la técnica produce con gran facilidad buenos resultados, mostrando las diferentes contribuciones de los fragmentos utilizados, cuando hay términos de interacción no lineal, y abriendo en general la vía para la elaboración de modelos paramétricos mas sofisticados, todo ello siempre que se haya partido de una serie de exploración bien diseñada..

La principal limitación de la técnica radica, en que al establecer relaciones entre la actividad y la contribución de determinados grupos funcionales, no da ninguna información acerca de contribuciones de otros grupos no estudiados -a diferencia de los modelos paramétricos, que establecen relaciones entre la actividad y la contribución de ciertas propiedades físico-químicas de los grupos funcionales-, por ello lo que se obtiene

como óptimo es la mejor combinación entre los grupos funcionales estudiados en la serie de exploración.

3.0 MODELOS PARAMETRICOS.

3.1 La metodología extratermodinámica (Fujita, 1990).

Los fármacos producen sus efectos en los sistemas biológicos a través de procesos complejos, en los cuales intervienen fenómenos de absorción, distribución en diferentes compartimentos, interacción con biomoléculas etc... Los tratamientos prácticos del problema deben evitar la necesidad de efectuar una descripción microscópica de cada uno de los pasos, si quieren mantenerse dentro de una simplicidad razonable. Uno de los primeros tratamientos que cumplía este requerimiento fue el desarrollado por C. Hansch y su equipo, al que hoy suele hacerse referencia con el nombre de metodología extratermodinámica (ME) ó método de Hansch.

La ecuación fundamental de la ME.

La acción del fármaco puede describirse como una serie de procesos encadenados (Hansch, 1973a) como se indica en la Fig. 3.1.

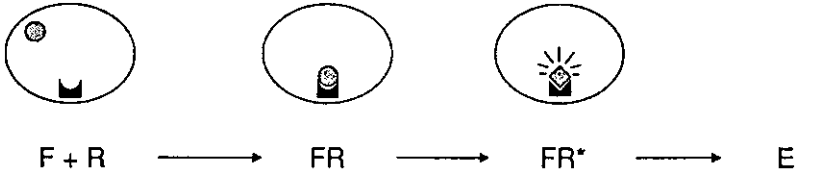


Fig. 3.1

Se asume que la velocidad del proceso es controlada por el paso III, el cual puede representarse más detalladamente como en la Fig. 3.2.

El fármaco (F) se une al receptor (R) para formar un complejo activado (FR*), responsable del efecto (E). K_g es la constante de equilibrio del proceso y engloba constantes de equilibrio de otros posibles procesos intermedios. A partir del equilibrio se obtiene que

$$[FR^*] = K_g\,[F][R] \qquad \text{(Ec. 3.1)}$$

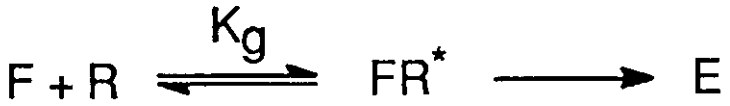


Fig. 3.2

como [R] >> [F], su concentración permanece aproximadamente constante, por lo cual puede incluirse en K_g, quedando la ecuación anterior en la forma

$$[FR^*] = K_G[F] \qquad \text{(Ec. 3.2)}$$

donde

$$K_G = K_g\,[R] \qquad \text{(Ec. 3.3)}$$

Por otra parte, la actividad ó potencia del fármaco suele cuantificarse en términos de dosis efectiva cincuenta (DE_{50}) o dosis equipotentes. Un fármaco es tanto más activo cuanto menores son estas dosis y por tanto

$$A = 1/[F] \qquad \text{(Ec. 3.4)}$$

y substituyendo [F] por su valor en la ecuación 3.2

$$A = K_G/[FR^*] \qquad \text{(Ec. 3.5)}$$

Para una determinada dosis de fármaco administrada, $[FR^*]$ es una constante, por lo cual

$$A = K_G\ \text{cte} \qquad \text{(Ec. 3.6)}$$

lo cual suele expresarse más comúnmente en forma logarítmica

$$\ln A = \ln K_G + \text{cte} \qquad \text{(Ec. 3.7)}$$

Así pues, el cambio de energía libre que se produce en la interacción F-R, se obtiene directamente como

$$\Delta G = -RT \ln K_G \qquad \text{(Ec. 3.8)}$$

Un postulado básico de la ME es que ΔG puede ser descompuesto en varios términos, cada uno de los cuales tiene en cuenta la contribución al cambio de energía libre que producen diferentes tipos de interacciones

fármaco-receptor (hidrofóbicas, electrónicas y estéricas). Esto puede expresarse como

$$-RT \ln K_G = \Delta G_h + \Delta G_e + \Delta G_s \qquad \text{(Ec. 3.9)}$$

o también

$$\ln K_G = f_h(x_h) + f_e(x_e) + f_s(x_s) \qquad \text{(Ec. 3.10)}$$

donde las funciones $f_h(x_h)$, $f_e(x_e)$ y $f_s(x_s)$ definen el modo en el que las características fisico-químicas del fármaco, cuantificadas por los parámetros x_h, x_e, x_s, influyen en su interacción con el receptor.

Por último, combinando la ecuaciones 3.7 y 3.10 se obtiene la ecuación básica de la ME,

$$\ln A = f_h(x_h) + f_e(x_e) + f_s(x_s) + cte \qquad \text{(Ec. 3.11)}$$

que establece la existencia de una relación entre la actividad de un fármaco y sus características fisico-químicas.

El término *extratermodinámica* que se aplica a esta metodología expresa el hecho de que las relaciones se describen en términos termodinámicos (como ΔG), aunque no se deducen de sus leyes (Martin, 1978).

El paradigma de Hansch.

Las asunciones fundamentales de la ME pueden formalizarse en una serie de puntos, la mayoría de los cuales se extraen de la ecuación fundamental (Unger, 1980):

1. La actividad biológica es función de la estructura del fármaco.
2. La estructura del fármaco implica ciertas propiedades globales como la hidrofobicidad, carga neta, solubilidad etc... y ciertas propiedades locales como la distribución de la hidrofobicidad, carga y volumen en determinadas posiciones de la molécula.
3. Estas propiedades globales y locales pueden ser cuantificadas mediante ciertos parámetros.
4. Siempre existe una función que relaciona los cambios en la actividad biológica con los cambios en las propiedades locales y globales, aunque puede que no sea ni sencilla ni evidente.

Modelos paramétricos.

Las funciones estructura-actividad que propone la ME constituyen un método mediante el cual se pueden buscar los productos mas activos de entre un conjunto de candidatos. Habitualmente, se utiliza para buscar los óptimos de actividad de entre los posibles derivados (serie de exploración) de una molécula prototipo ó cabeza de serie, puesto que si se estudiaran moléculas estructuralmente muy distintas, raramente estarían implicados mecanismos de acción similares.

La ME postula la existencia de una función que relaciona la actividad (A) de un fármaco con sus propiedades fisico-químicas (x_h, x_e, x_s), pero no proporciona ningún método para calcularla. Para ello se han venido utilizado técnicas estadísticas de modelado empírico, que requieren llevar a cabo un proceso, en el que se distinguen las siguientes fases, ya indicadas en la Fig. 1.1:

1. Prototipo cabeza de serie.
2. Diseño de una serie de exploración de análogos del prototipo. Síntesis de los productos.
3. Caracterización fisico-química (x_h, x_e, x_s) y biológica (A) de cada uno de los productos de la serie.
4. Búsqueda mediante análisis de regresión de un modelo que relacione las constantes fisico-químicas y la actividad ($A = f(x_h, x_e, x_s)$).

3.2 Parámetros.

Para caracterizar en una molécula las propiedades fisico-químicas que aparecen en la ecuación fundamental de la ME, se utilizan lo que se denominan *parámetros extratermodinámicos*, variables que representan características fisico-químicas globales o locales de la molécula que influyen, desde un punto de vista energético, en la interacción de dicha molécula con el receptor. Estos parámetros se obtienen mediante distintos métodos, en general cuidadosamente diseñados para que representen características puras (hidrofóbicas, estéricas ó electrónicas) de la molécula o del sustituyente considerado. Sin embargo, raramente puede decirse que un parámetro represente solamente una característica de la molécula, en parte porque ciertas propiedades de las moléculas suelen presentarse asociadas, en mayor o menor medida.

La búsqueda de parámetros que representen propiedades puras, adecuados para relaciones estructura-actividad ha sido objeto de intensa investigación en los últimos años. Hoy en día, a la hora de caracterizar las

moléculas es posible escoger de entre la multitud de parámetros descritos en la literatura, cada uno de los cuales presenta ventajas e inconvenientes en su utilización (Waterbeemd, 1987).

Una clasificación que debe establecerse entre los parámetros es la que separa los referidos a propiedades de la molécula completa -parámetros moleculares- de los referidos a la contribución a una propiedad de un sustituyente o fragmento -parámetros fragmentarios-.

Parámetros moleculares.

Estos parámetros generalmente se obtienen mediante algún ensayo experimental que debe llevarse a cabo sobre cada una de los productos de la serie de exploración. Suelen representar propiedades globales de la molécula. En la Tabla 3.1 se han incluido algunos ejemplos:

Tabla 3.1. Algunos parámetros moleculares (Waterbeemd, 1987).

Símbolo	Descripción	Tipo[1]	Referencia
log P	logaritmo del coeficiente de partición.	H	Hansch, 1979.
MR	refractividad molar molecular.	Es	Hansch, 1973b.
pK_a	constante de ionización.	El	Martin, 1978.
μ	momento dipolar.	El	Lien, 1982.
δ	desplazamiento químico (RMN).	El	Ciajolo, 1983.
υ	frecuencias (IR).	El	Lebedev, 1982.
K	constantes de equilibrio ó cinéticas.	-[2]	-

[1]H = hidrofóbico, El = electrónico, Es = estérico; [2] Depende del proceso estudiado.

Este tipo de parámetros tiene el inconveniente de que es necesario obtener las moléculas de la serie de exploración, y medirlos sobre cada una de ellas, por lo que no son adecuados en la fase de diseño experimental. Por otra parte, las metódicas pueden ser laboriosas y no siempre es posible llevarlas a cabo.

Posiblemente, el parámetro molecular más utilizado es el logaritmo del coeficiente de partición (log P), que expresa la hidrofobicidad global de la molécula. Suele determinarse mediante disolución del producto en un medio bifásico, habitualmente agua/*n*-octanol, agitación del sistema hasta alcanzar la situación de equilibrio y medida de la concentración de soluto en cada una de las fases. Este método, pese a ser el más aceptado, es muy laborioso. Para evitarlo se han propuesto multitud de procedimientos alternativos (Leo, 1971; Martin, 1978; Purcell, 1973; Rekker, 1979), incluyendo métodos computacionales, como los programas PRO-LOGP (Darvas, 1987) ó CHEMICALC-2 (Suzuki, 1990; 1991) que permiten un calculo aproximado del coeficiente de reparto sin necesidad de medidas experimentales.

Parámetros fragmentarios.

Habitualmente la parametrización suele efectuarse sobre un conjunto de derivados de un producto cabeza de serie -la serie de exploración- en el que solo varía la sustitución en una/varias posiciones de la molécula. Entonces, es posible caracterizar los miembros de dicha serie mediante parámetros que hacen referencia únicamente a los sustituyentes variables.

De este modo pueden caracterizarse propiedades locales de la molécula, pero también propiedades globales, si se efectúa la aproximación de considerar que cada parte de la molécula hace una contribución aditiva al valor de la molécula completa. La utilización de parámetros fragmentarios hace innecesaria la síntesis previa de los productos a caracterizar, por lo cual es muy adecuada en la fase de diseño experimental.

Los parámetros fragmentarios suelen obtenerse a partir de medidas experimentales, que se llevan a cabo sobre moléculas preparadas por la unión de un núcleo estándar con el sustituyente y se escalan frente al valor del núcleo estándar sin substituir. Así por ejemplo, el parámetro hidrofóbico de sustituyente π_X (Fujita, 1964) se obtiene

$$\pi_X = \log P_{RX} - \log P_{RH} \qquad \text{(Ec. 3.12)}$$

a partir de los valores de log P de un núcleo estándar R (generalmente benceno) substituido con X (log P_{RX}) y sin substituir (log P_{RH}).

Otra aproximación consiste en medir un parámetro experimental para una extensa serie de moléculas, considerar los fragmentos que los constituyen y someter los datos a un análisis estadístico que revele como contribuye cada uno de estos fragmentos al valor obtenido para la molécula completa. Un

ejemplo de este tipo de tratamiento son las constantes fragmentarias de Rekker (Nys, 1973; Rekker, 1977) o las de Hansch-Leo (Leo, 1975).

En la tabla 3.2 se han incluido algunos ejemplos de parámetros fragmentarios. Los valores, para la mayoría de los substituyentes habituales en química orgánica, pueden encontrarse tabulados en la literatura (Hansch, 1979; Waterbeemd, 1987).

Tabla 3.2. Algunos ejemplos de parámetros fragmentarios (Waterbeemd, 1987).

Símbolo	Nombre, descripción	Tipo[1]	Referencia
π	constante hidrofóbica de sustituyente.	H	Fujita, 1964.
f	constante hidrofóbica fragmentaria.	H	Nys, 1973.
f',Fr	constante hidrofóbica fragmentaria.	H	Leo, 1975.
σ	constante de Hammett.	El	Hammett, 1940.
$\mathcal{F},\mathcal{R}$	constantes de efecto inductivo y resonante.	El	Swain, 1968.
F,R	constantes posicionales de efecto inductivo y resonante.	El	Williams, 1976.
Es	parámetro estérico de Taft.	Es	Taft, 1956.
MR	refractividad molar de sustituyente.	Es	Hansch, 1973b.
$L,B1,...,B5$	parámetros STERIMOL.	Es	Verloop, 1976.

[1]H = hidrofóbico, El = electrónico, Es = estérico.

Otros tipos de parámetros.

No todos los parámetros tienen un origen experimental. También se pueden obtener a partir de :

1. Modelado molecular: parámetros STERIMOL (Verloop, 1976; Verloop, 1987).
2. Cálculos mecano-cuánticos: energía de HOMO y LUMO etc...

3. Estructura molecular: índices de conectividad (Kier, 1976; Kier 1983), peso molecular etc...

Mención aparte merecen las variables indicadoras, de tipo binario, que permiten combinar en una sola ecuación modelos obtenidos para series de moléculas ligeramente diferentes (Franke, 1984).

3.3 Diseño de la serie de exploración.

El diseño de la serie de exploración es la primera etapa de cualquier estudio de relaciones estructura-actividad. En este momento:

1. Se define el alcance de la variación estructural en los productos.
2. Se seleccionan los parámetros que caracterizarán los productos.
3. Se elige cada una de las moléculas a incluir en la serie de exploración.

La etapa de diseño es la que determina la *cantidad de información* que se introduce en el estudio. Es por ello que el éxito o fracaso de todo el proceso depende en gran medida de esta etapa. En ocasiones, es muy tentador intentar obtener modelos estructura-actividad a partir de series preexistentes, no diseñadas racionalmente. En estos casos, el éxito está condicionado a que la serie -de manera fortuita- contenga información suficiente, lo que no es habitual ni siquiera para series muy extensas.

Al plantearse el diseño de una serie experimental aparece la siguiente paradoja: para diseñar una serie experimental es necesario conocer el modelo, no obstante, el modelo no se conoce hasta que no se analiza la serie. La única posibilidad razonable es un procedimiento iterativo como el que se ilustra en la figura 1.2. Se diseña la serie partiendo de una hipótesis acerca del modelo, obteniéndose un modelo que puede ó no ajustarse a las expectativas iniciales, pero que produce información útil para mejorar el diseño en una nueva etapa de investigación.

Variación estructural.

Los estudios estructura-actividad suelen llevarse a cabo sobre un conjunto de derivados del prototipo cabeza de serie. En esta etapa se definen las posiciones de la molécula sobre las que se va a llevar a cabo la variación estructural, las cuales se eligen en función (a) de la influencia de los sustituyentes en estas posiciones sobre la actividad y (b) la accesibilidad sintética de los derivados.

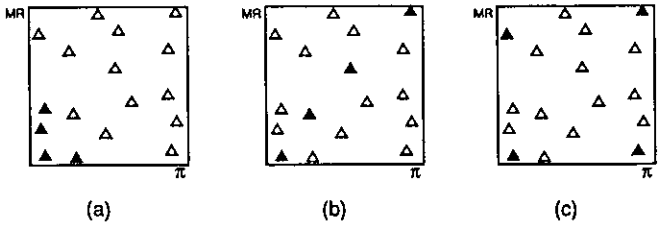


Fig. 3.3

Es importante explicitar la variación estructural emprendida. El conjunto de todos los posibles derivados del prototipo de partida constituye lo que se denomina *espacio experimental*. Cualquier modelo de relaciones estructura-actividad que se obtenga solo tiene validez, como máximo, dentro del espacio experimental utilizado y si se obtiene un óptimo será el producto más activo de este espacio experimental.

Criterios de selección de parámetros.

No existe ningún criterio simple ni único, para seleccionar qué parámetros deben utilizarse en un estudio de relaciones estructura-actividad. Ante un problema nuevo se debe comenzar por buscar en la literatura trabajos previos efectuados sobre el mismo tipo de productos y de no encontrarse, sobre productos parecidos o con la misma actividad etc... En general, en esta primera etapa, cualquier información puede ser orientativa respecto a las características fisico-químicas que más intervienen sobre la actividad y los parámetros más adecuados para describirlas.

Es frecuente, no obstante, encontrar situaciones en las que no existe ninguna información previa. En estos casos, la única posibilidad es un compromiso inteligente; seleccionar unos pocos parámetros, cada uno representativo de una característica fisico-química diferente y de carácter lo más general posible. Por ejemplo, es recomendable un análisis de Hansch clásico, utilizando un parámetro hidrofóbico (p.ej. π de Hansch), un parámetro estérico (p.ej. MR) y otro electrónico (p.ej. σ de Hammett). La serie diseñada conforme a estos parámetros es lo suficientemente informativa como para indicar (a) qué tipo de parámetros son significativos y (b) que tipo de dependencia existe, y así orientar sucesivas etapas de la investigación.

Elección de la serie.

El modelo se obtiene a partir de un pequeño conjunto de productos (la serie de exploración). Si se pretende que el modelo sea aplicable a todo el espacio experimental, la serie debe ser representativa de dicho espacio. Así pues, deberá ser suficientemente *informativa* para que las conclusiones que se deriven del modelo puedan aplicarse fuera de la propia serie.

La calidad de una serie de exploración viene definida principalmente por dos aspectos (Pleis, 1990; Pastor, 1991):

1. *Disimilaridad de la serie.* Los productos de la serie deben ser, respecto de los parámetros elegidos, diferentes entre sí. No tiene sentido intentar estudiar cómo influye una característica sobre la actividad si solo se estudian productos similares respecto a esta característica. Además, puesto que la serie debe ser una muestra del espacio experimental, el rango de variación de las características dentro de dicha serie debe ser equiparable al que existe en el espacio experimental.
2. *Ortogonalidad de la serie.* Los productos deben escogerse de tal forma que la variación en las características se produzca de manera independiente. Si la variación de una propiedad x_1 viene siempre acompañada de la variación en otra propiedad x_2, no es posible conocer si el cambio de actividad de unos a otros productos se debe al cambio en la propiedad x_1 ó en la propiedad x_2. En estas situaciones se dice que las propiedades x_1 y x_2 se encuentran *correlacionadas* en la serie. Una serie en la cual las correlaciones entre los parámetros son mínimas se dice que es *ortogonal*.

En diseño es frecuente ilustrar estas cualidades mediante gráficos bi o tridimensionales como los de la figura 3.3, en los que se sitúan los productos según los valores de sus parámetros, cada uno representado por un eje. En los gráficos de la figura 3.3 cada triángulo vacío indica un posible derivado del cabeza de serie de manera que el conjunto de todos ellos representa al espacio experimental. Los triángulos llenos señalan productos seleccionados para la serie de exploración.

La figura 3.3a muestra el ejemplo de una serie constituida por productos muy parecidos entre sí (serie poco disimilar). En la figura 3.3b se puede observar cómo la variación de ambos parámetros se produce de modo simultáneo: un valor alto de π viene siempre acompañado por un valor alto de MR (serie poco ortogonal). La serie representada en la figura 3.3c constituye un diseño correcto (serie disimilar y ortogonal).

Para lograr una selección correcta de los productos de la serie, una de las aproximaciones posibles es la aplicación de técnicas clásicas de diseño experimental, tales como el diseño factorial, el análisis de superficie de respuesta y técnicas de diseño óptimo (Box, 1971), ya sea de forma directa o adaptándolas a las características del problema. El lector interesado puede encontrar una amplia discusión de estos y otros métodos en una revisión eciente (Pleiss, 1990).

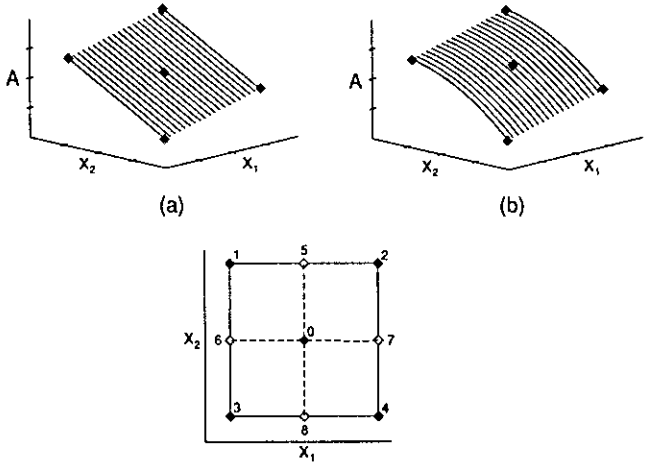


Fig. 3.4

Una cuestión previa a la elección del método de diseño es prever el tipo de modelo que se espera obtener -efectuar una hipótesis sobre el modelo-. En el área que nos ocupa suelen obtenerse modelos que pueden contener términos (a) lineales, $a_i x_i$; (b) rectangulares, $a_i x_i x_j$ y (c) cuadrados, $a_i x_i^2$ .De entre ellos, los más frecuentes con diferencia son los lineales; los cuadrados solo suelen aparecer en parámetros hidrofóbicos -debido a la compleja influencia de la hidrofobicidad sobre la actividad del fármaco- mientras que los términos rectángulares son infrecuentes. Lo ideal sería diseñar series de exploración que permitieran el estudio de cualquier tipo de modelo, pero esto conduciría a series muy extensas. Una aproximación mucho más racional consiste en preparar, en un primer momento, una serie adecuada para un tipo de modelo frecuente. Si a partir de su análisis se sospecha un modelo mas complejo, pueden añadirse nuevos productos a la serie inicial.

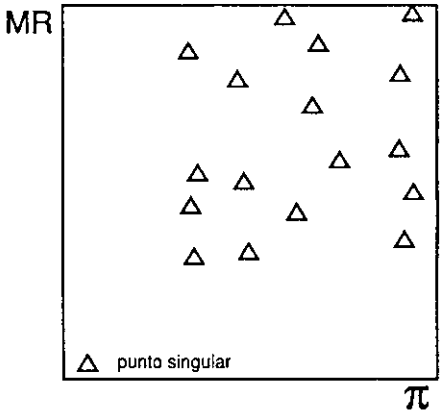


Fig. 3.5

En la Figura 3.4 se representa una situación hipotética en la que la actividad (A) es función de dos parámetros (x_1 y x_2). Si se sospecha un modelo compuesto solo por términos lineales ($A = a_1x_1 + a_2x_2 + b$, Fig. 3.4a), bastaría con un diseño factorial (puntos 1 a 4) o incluso factorial fraccionario (puntos 1 y 2, ó puntos 3 y 4). Este diseño no permite detectar la presencia de términos cuadrados ($A = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_2^2 + b$, Fig. 3.4b) por lo que es conveniente introducir al menos un punto central (punto 0).

Si tras analizar los datos se sospecha la existencia de términos cuadrados, el punto central no sería suficiente para caracterizar el modelo y deben estudiarse series más completas, por ejemplo un diseño compuesto central (puntos 0 a 8). Los términos rectángulares pueden ser estudiados a partir de series obtenidas mediante diseños factoriales completos.

Otro aspecto importante del diseño es la elección los productos candidatos a ser incluidos en la serie. Es frecuente que entre los productos incluidos en el espacio experimental se encuentren algunos *puntos singulares*, productos de características tan especiales que son responsables de gran parte de la varianza de un parámetro en el espacio experimental (Figura 3.5). Suelen tener valores extremos para alguno/varios de los parámetros y como consecuencia tienden a ser incluidos en las series experimentales.

Estos productos, que suelen ser derivados con grupos cargados, o muy voluminosos etc... tienen frecuentemente comportamientos biológicos atípicos -no son absorbidos, son tóxicos, inactivos, etc..- por lo cual no es recomendable incluirlos en la serie de exploración. Se han propuesto diferentes métodos para evitar su influencia negativa en el diseño (Orozco, 1989; Pastor, 1991).

Los autores, conscientes de la importancia del diseño de series y de su dificultad han desarrollado los programas EDISFAR (Pastor, 1991) para asistir al investigador en esta tarea. Los programas EDISFAR se utilizan sobre ordenadores personales (PC-compatibles) y ofrecen, en un entorno de apariencia estándar (manejo con ratón, menús de persianas, datos en ventanas, etc...) el acceso a métodos de diseño especialmente adaptados a la generación de series de moléculas. Incluyen métodos de diseño D-óptimo (Mitchell, 1974) junto con métodos factoriales, factoriales fraccionales y compuestos, utilizando técnicas basadas en la metodología de Austel (Austel 1982a; 1982b; 1983). Evidentemente, la utilización de un programa no sustituye el conocimiento de los métodos que se utilizan, pero facilita el trabajo al evitar los cálculos y presentar al instante los gráficos e índices estadísticos que, de otro modo, hubieran requerido ser procesados mediante otros programas.

Ejemplo práctico.

El objetivo de este estudio de simulación es obtener derivados de 2-fenil-oxazolo[4,5]piridina I (Figura 3.6) que presenten actividad antiinflamatoria óptima (Pastor, 1991).

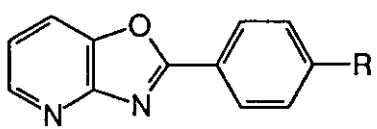


Fig. 3.6

La serie consta de derivados I con diferentes sustituyentes R en la posición *para* del fenilo. Se parametrizan con dos parámetros de sustituyente clásicos; π de Hansch (que describe hidrofobicidad) y σ de Hammett (que describe características electrónicas). En un estudio real la elección de los descriptores debería ser justificada, bien por estudios previos, bien como una tentativa inicial, como ya se expuso anteriormente.

Los sustituyentes candidatos a ser incluidos en el diseño se toman de la base de sustituyentes de EDISFAR; MONOBASE. En total hay 181 sustituyentes parametrizados, que se han representado en la Figura 3.7, con respecto a sus valores de π y σ. Siguiendo una aproximación sencilla, se considera el estudio de un modelo lineal del tipo

$$A = a_1\pi + a_2\sigma + b \qquad \text{(Ec. 3.13)}$$

para el cual un diseño factorial del tipo 2^2 es idóneo. Se incluye un punto central para comprobar si el modelo lineal es correcto (Box, 1971).

Una vez tomadas estas decisiones el resto del trabajo es realizado por EDISFAR. El usuario solo debe introducir el nombre de la base de parámetros -MONOBASE- y el modelo. Tomando las opciones por defecto el programa lleva a cabo un diseño factorial, de la siguiente manera:

1. Toma a partir de MONOBASE, de todos los sustituyente para los que estén descritos los parámetros que utiliza el modelo (π y σ).
2. Normaliza entre 0 y 1 las escalas de los parámetros (Figura 3.7a).
3. Sitúa unos puntos marcadores (PM) en el espacio, que representan posiciones ideales para la serie (Figura 3.7b).
4. Presenta al usuario un listado con los substituyentes mas próximos a estos puntos marcadores, utilizando como criterio la distancia euclidiana normalizada (DEN) (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Diseño propuesto por EDISFAR

PM	π	σ	DEN	PM	π	σ	DEN
0	0	0		3	-	+	
SH			0.01	1-tetrazolil			0.04
$NCCl_2$			0.01	$PO(OCH_3)$			0.04
NNN			0.01	SOC_2H_5			0.04
2-piridil			0.02	5-Cl-1-tetrazolil			0.05
CH_2Cl			0.04	$COCH_3$			0.06
1	-	-		4	+	+	
$NHCONH_2$			0.06	CF_2CF_3			0.03
OH			0.06	SCF_3			0.06
NHOH			0.07	$C{=}O(OC_6H_5)$			0.08
$NHCOOCH_3$			0.11	NNC_6H_5			0.10
OCH_3			0.13	SF_5			0.10
2	+	-					
OC_4H_9			0.04				
$CH_2Si(CH_3)_3$			0.05				
$C(CH_3)_3$			0.05				
$CH(CH_3)_2$			0.08				
C_4H_9			0.08				

Como se aprecia en la figura 3.7, el espacio experimental contiene puntos singulares. Para evitar el efecto negativo de estos puntos -generalmente puntos aislados correspondientes a sustituyentes con propiedades inhabituales-, EDISFAR sitúa el punto central del diseño sobre el valor medio

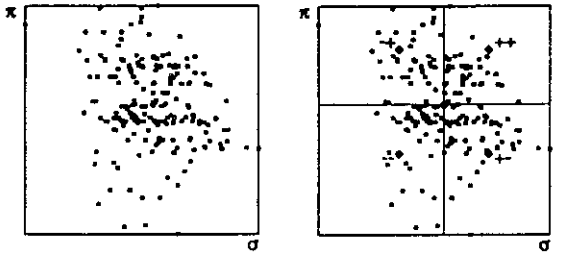


Fig. 3.7

de cada parámetro, y los puntos marcadores a una distancia del punto central que resulta de multiplicar un coeficiente (1,2 por defecto) por el valor de la desviación estándar del parámetro. De este modo el diseño se realiza correctamente sin necesidad de eliminar de la base los puntos singulares.

De entre los substituyentes presentados por EDISFAR para cada punto marcador, el experimentador puede seleccionar para la serie exploratoria definitiva aquellos más accesibles sintéticamente, o que sospeche más estables etc... Las características de calidad de la serie seleccionada son presentadas de inmediato por EDISFAR (Tabla 3.4). Por este orden aparecen:

1. Varianza relativa media. Indice de disimilaridad que compara la dispersión -varianza- de la serie con la del espacio experimental. Un valor superior a 1 indica que la serie puede considerarse una muestra representativa del espacio experimental.
2. Matriz de correlación y su determinante. Son índices de ortogonalidad, el primero indica la correlación existente entre cada par de parámetros y el segundo es un índice global de la ortogonalidad de la serie. Una serie ortogonal debe presentar elementos de la matriz pequeños y un determinante próximo a 1.

3. Autovalores. Son también índices de ortogonalidad, sus valores deben ser parejos. Si los últimos autovalores son pequeños (explican menos del 5% de la varianza) la serie está demasiado correlacionada.

Tabla 3.4 Serie de exploración obtenida mediante EDISFAR.

PM	π	σ	sustituyente		DEN
0	0	0	SH	0.01	
1	-	-	$NHCONH_2$		0.06
2	+	-	OC_4H_9	0.04	
3	-	+	1-tetrazolil		0.04
4	+	+	CF_2CF_3	0.03	

Disimilaridad de la serie.

Varianza relativa media (VRM) = 1.4263

Ortogonalidad de la serie.

Matriz de correlación y autovalores.

	π	σ	Autovalor	%Var.	%Cum.
π	1.0000		1.0324	51.62	51.62
σ	0.0324	1.0000	0.9676	48.38	100.00

Determinante de la matriz de correlación (DMC) = 0.9989

3.4 Análisis de regresión.

Una vez diseñada la serie, se preparan los productos, se evalúa la actividad biológica de cada uno de ellos y se parametrizan según lo planeado. En este momento se dispone de dos tipos de información:

1. Información que debe ser explicada por el modelo -la actividad biológica-, que constituye la *variable dependiente*.
2. Información que explica -los parámetros-, que constituye el conjunto de *variables independientes*.

Ambos tipos de información se relacionan a través de una función matemática cuyo tipo se supone de antemano, puesto que el diseño se ha realizado considerando ese determinado tipo de función. En modelos estructura-actividad suelen encontrarse modelos lineales de la forma

$$A = a_1x_1+a_2x_2+...+a_nx_n+b \qquad \text{(Ec. 3.14)}$$

independientemente de que x_i pueda corresponder a un parámetro al cuadrado o a un producto de parámetros. Para calcular los valores de los coeficientes a_i y el término constante b lo más frecuente es utilizar técnicas de *análisis de regresión lineal múltiple* -generalmente abreviada como MLR- (Draper, 1981). No introduciremos aquí el fundamento del método, puesto que en la práctica este análisis se suele llevar a cabo mediante algún programa de ordenador. Mucho más importante es destacar la necesidad de comprobar la calidad del modelo obtenido.

Aparte de MLR también pueden utilizarse otras técnicas. El lector interesado puede encontrar una discusión general en (Waterbeemd, 1987) y un tratamiento bastante riguroso en (Draper, 1981).

Validación de modelos

Es casi una regla general que los datos que se obtienen mediante un ordenador suelen ser aceptados sin discusión, especialmente si no se conoce en profundidad el método implicado. No obstante, el modelo que se obtiene según el procedimiento descrito puede tener diferentes tipos de vicios y su calidad debe comprobarse.

El método de MLR proporciona los valores para los coeficientes que hacen que la función matemática propuesta explique al máximo como varían las actividades. Siempre existirá alguna variación no explicada -los residuales-, que corresponde a errores en la medida de los datos de actividad y a posibles efectos no incluidos en el modelo -parámetros no considerados, posibles efectos parabólicos, etc...-. La utilidad de un modelo depende de que la varianza explicada sea mucho mayor que la no explicada. En caso contrario podría ocurrir que el modelo no refleje ninguna relación real, sino que sea fruto púramente del azar. Esto puede contrastarse mediante el análisis de la varianza y test de F (Draper, 1981), y cuando el modelo no lo satisface se dice que es *no significativo*. Algo parecido ocurre para las variables, cuya intervención en un modelo explicando la actividad, puede ser significativa o no, contrastándose en este caso mediante un test de T. Encontrar variables no significativas ó incluso modelos completos no significativos no es preocupante, proporciona unas información valiosa indicando qué propiedades fisico-químicas no intervienen en la actividad.

Esto nos permite, en próximas etapas de la investigación diseñar las series respecto a un menor número de parámetros ó respecto a parámetros diferentes.

Otro posible problema es que el modelo no sea *predictivo*, es decir que la función propuesta no se cumpla para productos no incluidos en la serie de exploración. También esto puede comprobarse mediante los adecuados análisis estadísticos, como por ejemplo mediante validación cruzada (*crossvalidation*) (Wold, 1991).

No todos los autores están de acuerdo respecto a qué es un modelo de buena calidad ni respecto a los criterios que estos deben cumplir (Mager, 1992). Lo que sí parece claro es que siempre deben establecerse unos criterios de validación y cumplirse, independientemente de que sean más o menos restrictivos .

Optimización

Para que el estudio de relaciones estructura-actividad se concluya con éxito debe obtenerse un modelo significativo y predictivo. Aun así, la validez del modelo estará siempre limitada al rango de parámetros explorado por la serie de exploración, fuera del cual nunca debe considerarse válido. De hecho, esta es la principal restricción a la hora de buscar el óptimo de actividad predicho por un modelo. Cuando el modelo contiene sólo términos lineales basta con buscar substituciones que maximicen los términos con coeficientes positivos y que minimicen los términos con coeficientes negativos, siempre considerando que no se deben rebasar los valores mínimos y máximos de la serie experimental. Cuando los modelos son complejos y contienen términos rectángulos, cuadrados, etc... pueden utilizarse métodos automatizados (Takayama, 1983 ; Pastor, 1991). EDISFAR es capaz de realizar búsquedas automatizadas del óptimo, presentando un índice que indica el alejamiento del óptimo respecto del área explorada por la serie de exploración.

4.0 AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a la Comunidad de Madrid la concesión de una beca predoctoral (M.P.) y a la Comisión Interministerial de Investigación Científica y Técnica (CICYT) la financiación recibida (Proyecto PB90-0256). Los programas EDISFAR se distribuyen gratuitamente a cualquier institución sin ánimo de lucro que lo solicite.

5.0 BIBLIOGRAFIA.

Austel, V. (1982) *Eur, J. Med. Chem.* 17, 9.

Austel, V. (1982) *Eur, J. Med. Chem.* 17, 339.

Austel, V. (1983) *Quant. Struct.-Act. Relat.* 2, 59.

Austel, V. (1985) "*QSAR and Strategies in the Design of Bioactive Compounds. Proceedings of the Fifth European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationships*" J. K. Seydel Ed., VCH, Weinheim, p. 247.

Bocek, K; Kopecky, J.; Krivukova, M.; Vlachova, D. (1964) 20, 667.

Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S. (1971) "*Statistics for Experimenters*", Wiley, New York.

Bruice, T. C.; Kharash, N.; Winzler, R. J. (1956) *Arch. Biochem. Biophys.* 56, 305.

Cativiela, C.; Elguero, J.; Mathieu, D.; Melendez, E.; Phan Tan Luu, R. (1983) *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* 18, 344.

Ciajolo, M. R.; Leij, F.; Tancredi, T.; Temussi, P. A.; Tuzi, A. (1983) *J. Med. Chem.* 6, 1060.

Craig, P. N. (1984) *Drug Inform. J.* 18, 123.

Darvas, F.; Erdos, I.; Teglas, G (1987) "*QSAR in Drug Design and Toxicology*", Elsevier. Amsterdam.

Delgado, F.; Santiesteban, I.; Vega, J. A.; Minguez, J. M. (1993) *Resultados sin publicar.* El modelo corresponde a un ejercicio de Doctorado.

Draper, N. R.; Smith, H.(1981) "*Applied Regression Analysis*", Wiley, New York.

Franke, R. (1984) "*Theoretical Drug Design Methods*", Elsevier, Amsterdam.

Free, S. M. y Wilson, J. W. (1964) *J. Med. Chem.* 7, 395.

Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 36, 1031.

Fujita, T.; Ban, T. (1971) *J. Med. Chem.* 14, 148.

Fujita, T.(1990) "*The Extrathermodynamic Approach to Drug Design*" en "*Comprehensive Medicinal Chemistry*" C. Hansch Editor. Pergamon Press, Oxford. Vol. 4, pag. 497.

Hammett, L. P. (1940) "*Physical Organic Chemistry*", McGraw-Hill, New York.

Hansch, C.; Fujita, T. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1616.

Hansch, C. (1973a) "*International Enciclopedia of Pharmacology and Therapeutics*", Vol. I, Ed. Cavallito.

Hansch, C.; Leo, A.; Unger, S. H.; Kim, K. H.; Nakaitani, D.; Lien, E.J. (1973b) *J. Med. Chem.* 16, 1207

Hansch, C.; Leo, A. (1979) "*Substituent Constants for Correlation Analisys in Chemistry and Biology*", J. Wiley, New York.

Hudson, D. R.; Bass, G. E.; Purcell, W. P. (1970) *J. Med. Chem.*13, 1184.

Kier, L. B.; Hall, L. H. (1976) "*Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research*", Academic Press, New York.

Kier, L. B. ;Hall, L. H. (1983) *J. Pharm. Sci.* 72, 1170.

Kubinyi, H.; Kehrhahn, O.-H (1976) *J. Med. Chem.* 19, 578 .

Kubinyi, H.; Kehrhahn, O.-H (1976) *J. Med. Chem.* 19, 1040.

Kubinyi, H. (1990) *"The Free-Wilson Method and its Relationship to the Extratermodinamic Approach"* en *"Comprehensive Medicinal Chemistry"* C. Hansch Editor. Pergamon Press, Oxford. Vol. 4, pag. 589.

Lebedev, R. S.; Lebedeva, I. R.; Lebedeva, L. A. (1982) *Khim. Farm. Zh.* **16**, 1081.

Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. (1971) *Chem. Rev.* **71**, 525.

Leo, A; Jow, P.C.Y.; Silipo, C.; Hansch, C. (1975) *J. Med. Chem.* **18**, 865.

Leo, A.; Hansch, C.; Jow, P. Y. C. (1976) *J. Med. Chem.* **19**, 611.

Lien, E. J.; Guo, Z. R.; Li, R. L.; Su, C. T. (1982) *J. Pharm. Sci.* **71**, 641.

Martin, Y. C. (1978) *"Quantitative Drug Design. A Critical Introduction"*, Dekker, New York.

Mitchell, T. J. (1974) *Technometrics.* **16**, 203.

Nys, G. G.; Rekker, R. F. (1973) *Eur. J. Med. Chem.* **8**, 521.

Orozco, M; Sanz, F. (1989) *An. Quim.* **85**, 27.

Pastor, M.; Alvarez-Builla, J. (1991) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **10**, 350.

Pleiss, M. A.; Unger, S.H. (1990) *"Comprensive Medicinal Chemistry"* Vol 4, 561, Pergamon Press, Oxford.

Purcell, W. P.; Bass, G. E.; Clayton, J. M. (1973) *"Strategy of Drug Design; a Guide to Biological Activity"*, Wiley, New York.

Rekker, R. F. (1977) *"The Hidrophobic Fragmental Constant: Its Derivation and Application. A means of Characterizing Membrane Systems"*, Elsevier. Amsterdam.

Rekker, R. F. (1979) *Il Farmaco Ed. Sci.* **34**, 346.

Rekker, R. F. (1985) *Pharmacochem. Libr.* **8**, 3.

Suzuki, T.; Kudo, Y. (1990) *J. Comp.-Aided Mol. Design.* **4**, 155.

Suzuki, T. (1991) *J. Comp.-Aided Mol. Design.* **5**, 149.

Swain, C. G.; Lupton, E. C. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 4328.

Taft, R. W. (1956) *"Steric Efects in Organic Chemistry"*, 556, Wiley, New York.

Takayama, C.; Miyashita, Y.; Sasaki, S.; Yoshida, M (1983) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **2**, 121.

Unger, S. H. (1980) *"Drug Design"*, Vol IX. Academic Press, New York.

Verloop, A.; Hoogenstraaten, W.; Tipker, J. (1976) *"Drug Design"*, Vol VII. Academic Press, New York.

Verloop, A . (1987) *"The STERIMOL Approach to Drug Design "*, Dekker, New York.

Waterbeemd, H. V.; Testa, B. (1987) *"Advances in Drug Research"*, Vol 16, Academic Press, London.

Williams, S. G.; Norrington, F. E. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 508.

Wold, S. (1991) *Quant. Struct.-Act. Relat.* **10**, 191.

Mecánica Molecular

MARIA SELMA ARIAS PEREZ
Departamento de Química Orgánica.- Universidad de Alcalá.
28871 Alcalá de Henares.- Madrid.

1.0 INTRODUCCIÓN.

En el siglo pasado se entendía la **estructura molecular** de un compuesto como el conocimiento de la unión de los átomos entre sí y el establecimiento de las fórmulas bidimensionales. Sin embargo, a partir de 1930 los estudios de espectroscopia vibracional, la difracción de rayos X o de electrones dieron un significado más profundo al término estructura, considerándose como tal el conocimiento más o menos detallado no sólo de las conectividades de los átomos, sino tambien de las longitudes de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos de torsión de una molécula (Radom, 1982). Desde entonces la determinación de la estructura molecular ha tenido un papel decisivo para la interpretación tanto de las propiedades físicas de un compuesto como de su reactividad química y más recientemente de su actividad biológica, dado que estos aspectos derivan, en último término, de la misma.

Aunque en la actualidad existen numerosos métodos experimentales para la determinación de la estructura molecular, la rápida evolución de los ordenadores y el notable desarrollo de la química computacional han propiciado la incorporación de modelos teóricos para el tratamiento de todos aquellos problemas relacionados con la geometría y la energía molecular. En general, los métodos de cálculo teóricos han supuesto una notable contribución en el campo de la investigación experimental, tanto para la interpretación de los resultados obtenidos y la planificación de futuros trabajos, como para deducir información no asequible experimentalmente.

En principio se pueden considerar tres tipos de métodos de cálculo teóricos: métodos de orbitales moleculares *ab initio* y semiempíricos así como los métodos de mecánica molecular o campos de fuerzas empíricos. La elección de uno u otro método depende de una serie de factores tales como el tamaño de la molécula, el tipo de información y el tiempo requeridos. En este contexto los cálculos de mecánica molecular, en general, requieren tiempos considerablemente menores que los mecano-cuánticos, se pueden aplicar a compuestos de mayor magnitud y complejidad y reproducen los valores experimentales referentes a geometrías y energías con buena precisión. Resulta, por tanto, justificado que en los últimos años la mecánica molecular se halla convertido en una popular y versátil herramienta para el estudio de la estructura molecular y las propiedades con ella relacionadas.

2.0 CONSIDERACIONES GENERALES.

La expresión **mecánica molecular** se emplea ampliamente para definir un método de cálculo basado en la mecánica clásica y diseñado para obtener *a priori* las estructuras y las energías de las moléculas (Engler,1973;Altona,1974;Burkert, 1982; Berg,1989). Muchos de los términos e ideas básicas de este método, puramente empírico, tienen su origen en los formalismos fundamentales de la espectroscopía vibracional y se remontan al año 1930. La idea central es que los enlaces poseen unos valores de longitudes y ángulos ideales o *naturales*, los cuales van a condicionar la geometría molecular.

El desarrollo del método de la mecánica molecular se produce, realmente, a partir de 1946 como consecuencia de la publicación de varios trabajos sobre el empleo de las interacciones de van der Waals conjuntamente con las deformaciones de las longitudes y los ángulos de enlace para obtener, mediante un proceso de minimización, la estructura y la energía de sistemas tensionados y explicar, a partir de las mismas, propiedades relacionadas. En este sentido, la justificación de las velocidades relativas de racemización de algunos bifenilos halosustituidos propuesta por Westheimer se considera como la contribución más importante y con frecuencia el término *método de Westheimer* se aplica como sinónimo de método de la mecánica molecular. Por otra parte, la introducción de los ordenadores y la evolución en el campo de la informática han sido de vital importancia para el desarrollo a nivel práctico de este método, desde 1950 hasta el momento actual, en que es uno de los métodos más utilizados en el área de la química estructural.

La mecánica cuántica establece que las propiedades moleculares quedan descritas en su totalidad por la ecuación de Schrödinger para cada estructura molecular considerada. Sin embargo, la función de onda que describe una molécula tiene infinitos términos por lo que es necesario recurrir a aproximaciones para su resolución. La aproximación de Born-Oppenheimer desdobla la ecuación de Schrödinger en dos partes independientes: una que representa los movimientos de los electrones y otra que considera los movimientos de los núcleos, y se aplica en dos sentidos diferentes. Así, para el estudio de la estructura electrónica frecuentemente se determinan las posiciones de los núcleos correspondientes a un mínimo energético y se mantienen fijas durante los cálculos de la distribución electrónica. El método de la mecánica molecular utiliza la opción contraria, se centra simplemente en el estudio de la disposición de los núcleos y asume que los electrones se distribuirán óptimamente alrededor de ellos. La energía de la molécula en el estado electrónico fundamental es una función de las posiciones nucleares y la superficie de Born-Oppenheimer es una superficie multidimensional que describe la energía de la molécula en términos de las

posiciones de los núcleos. En mecánica molecular se designa generalmente como superficie de energía potencial.

Los métodos de mecánica molecular utilizan un conjunto de ecuaciones, obtenidas empíricamente y variables según los autores, para reproducir la superficie de energía potencial (Engler,1973; Altona,1974; Burkert,1982; Berg,1989). A este conjunto de ecuaciones, cuya forma matemática deriva de la mecánica clásica, se denomina campo de fuerzas (force field) y contiene un conjunto de parámetros ajustables, optimizados de forma que se obtenga la mejor concordancia posible entre las propiedades moleculares, tales como geometrías, energías conformacionales relativas, calores de formación, reactividades, etc., experimentales y calculadas. La filosofía básica de la mecánica molecular reside en la consideración del campo de fuerzas como un modelo computacional para describir la superficie de energía potencial en función de todos los grados de libertad de una molécula. En sentido estricto cada molécula posee su propio campo de fuerzas, sin embargo la interpolación y, a veces, la extrapolación de los datos existentes es, generalmente, una metodología válida. Por esta razón, se asume que el conjunto de ecuaciones y parámetros se puede transferir de una molécula a otra, es decir, la parametrización se efectúa para un grupo de moléculas y los valores así establecidos se utilizan para calcular otros compuestos estructuralmente relacionados. La parametrización del campo de fuerzas es uno de los puntos fundamentales y requiere una elección cuidadosa de los datos experimentales, dado que el grado de fiabilidad del método está limitado por la precisión de los mismos.

Puesto que la mecánica molecular sólo considera el movimiento nuclear, prescindiendo de los electrones, una molécula se puede representar mediante un modelo mecánico, como un conjunto de masas (los átomos) unidas (a través de los enlaces) por fuerzas armónicas o elásticas. Estas fuerzas se pueden describir como funciones de energía potencial de los parámetros estructurales tales como longitudes y ángulos de enlace, ángulos diedros, interacciones no enlazantes, etc. La combinación de las funciones de energía potencial es el campo de fuerzas y la energía, E, de la molécula surge como resultado de las desviaciones de estos parámetros de los valores ideales. De acuerdo con esta suposición, la energía del sistema se puede desglosar en una suma de términos energéticos que representarán todas las interacciones posibles: deformaciones de los enlaces por elongación, plegamiento o rotación, interacción entre masas,etc.(Engler,1973; Altona,1974; Burkert,1982; Berg,1989) (ecuación /1/):

$$E = E_r + E_\theta + E_\omega + E_{VDW} + E_D + E_H + \ldots\ldots \qquad /1/$$

Cada uno de los términos de la ecuación /1/ tiene unas posiciones de equilibrio preferentes, asociadas con unos valores *naturales* o ideales de los parámetros estructurales y unas constantes de fuerza, conocidas experimentalmente o estimadas teóricamente, que permiten evaluar las contribuciones energéticas de cada tipo de desviaciones presentes en una estructura determinada. Así, E_r, tiene en cuenta las deformaciones de las longitudes de enlace - alargamiento o acortamiento del enlace -, E_θ está asociada con las distorsiones de los ángulos de enlace, E_ω es la energía de torsión debida a la modificación de los ángulos diedros por rotación de los enlaces, E_{VDV}, E_D y E_H consideran las contribuciones de las interacciones de van der Waals, las repulsiones electrostáticas y las asociaciones por puentes de hidrógeno, respectivamente.

El sumatorio de todas las componentes conduce a la energía total de la molécula que se denomina *energía estérica*. Este valor no tiene sentido físico por si mismo, es solamente una medida de las tensiones intramoleculares con respecto a una situación hipotética. Sin embargo, las diferencias de energía para distintas geometrías de la misma molécula proporciona la estabilidad relativa de las mismas y constituye una magnitud apropiada para la comparación con propiedades observables experimentalmente, tales como las poblaciones conformacionales o las barreras rotacionales. Es importante señalar que la energía estérica es, en general, una magnitud dependiente del número de átomos de la molécula y, por tanto, no se puede utilizar para comparar moléculas diferentes (Engler,1973; Altona,1974; Burkert,1982; Clark,1985; Berg,1989).

3.0 DESARROLLO DE LOS CAMPOS DE FUERZAS.

En la práctica, el proceso de desarrollo de un campo de fuerzas (Engler,1973; Altona,1974; Burkert,1982; Clark,1985; Berg,1989) consta de las siguientes etapas:

1. Suposición de un conjunto de ecuaciones para expresar las funciones de energía potencial que componen la ecuación /1/.
2. Parametrización de esas ecuaciones.
3. Retoque y reparametrización de esas ecuaciones hasta llegar a una concordancia aceptable entre los valores calculados y los datos experimentales.

La evolución en el proceso de desarrollo de los distintos campos de fuerzas ha sido constante. Desde la aparición de los primeros programas se han introducido numerosas modificaciones y reparametrizaciones, con el fin de reproducir más fielmente la estructura y las propiedades de los diferentes tipos de moléculas.

En un sentido general, no existen reglas estrictas sobre el número y el tipo de las funciones de energía potencial que debe contener un campo de fuerzas. Los campos de fuerzas más sencillos poseen tan solo las cuatro primeras componentes de la ecuación /1/. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado diferentes campos de fuerzas mediante la selección de unas ecuaciones imprescindibles y un número variable de otras ecuaciones que no parecen tan dicisivas, pero cuya inclusión o no permite un tratamiento más correcto de sistemas concretos o la interpretación de propiedades determinadas, condicionando de este modo su aplicabilidad. A modo de ejemplo, en la tabla I se citan algunos de los programas diseñados para efectuar cálculos de mecánica molecular, así como su campo de aplicación.

Tabla I. Programas para cálculos de mecánica molecular.

Programa	Aplicación
QCFF/PI (Warshel,1970)	Hidrocarburos. Incluye sistemas conjugados.
ECEPP (Mormany,1975)	Péptidos.
MM1/MMP1 (Allinger,1973)	Hidrocarburos. La versión MMP1 es la extensión a sistemas conjugados.
MCA (Warshel,1974)	Cálculo del empaquetamiento en cristales.
BIGSTRN (Mislow,1976)	Hidrocarburos.
UNICEPP (Nemethy,1983)	Péptidos. Versión optimizada del ECEPP.
PCK5/PCK6 (Williams,1977)	Cálculo de estructuras cristalinas.
MM2 (Allinger,1976,1977)	Hidrocarburos y moléculas orgánicas con heteroátomos. Ultima versión MM2(91).
BIGSTRN-2 (Dougherty,1979)	Versión optimizada del BIGSTRN.
MMP2 (Sprague,1987)	Extensión del MM2 a sistemas conjugados.
AMBER (Weiner,1981,1986)	Péptidos y ácidos nucléicos.
CHARMM (Brooks,1984)	Péptidos y ácidos nucléicos.
PCMODEL,MMX (Gajewski,1990)	Compuestos orgánicos e inorgánicos. Basado en los programas MM2 y MMP1.
MM3 (Allinger,1989)	Hidrocarburos. Revisión del MM2. Cálculo de estructuras, frecuencias vibracionales, propiedades termodinámicas y datos cristalográficos.
UFF (Rappé,1992)	Compuestos orgánicos e inorgánicos.

Estos programas, con la excepción del UFF, son asequibles a partir de : Molecular Design (MM3), Polygen (CHARMM), Serena Software (PCMODEL,MMX), Universidad de California (AMBER) y QCPE (Quamtum Chemistry Program Exchange) en los restantes casos.

El desarrollo del campo de fuerzas continúa siendo uno de los mayores problemas en la expansión del espectro de aplicación a ciertas áreas como la química médica, la química organometálica, la espectroscopía

vibracional o el cálculo de estructuras cristalinas. Entre otras razones, se pueden considerar:

- La gran variedad de grupos funcionales complejos presentes en una misma estructura.
- La insuficiencia de parámetros. Las moléculas que contienen grupos funcionales o elementos que no están parametrizados en los campos de fuerzas existentes requieren la estimación de nuevos parámetros específicos para cada tipo de nuevo enlace, ángulo de enlace o ángulo de torsión (Hopfinger,1984).
- La falta de algoritmos que resuelvan satisfactoriamente algunas de las funciones de energía potencial.
- El hecho de que no todos los parámetros y constantes de fuerza son realmente transferibles de un programa a otro.

Son de destacar las optimizaciones realizadas recientemente por Allinger y *col.* en el campo de fuerzas MM3 (Allinger,1989) con objeto no sólo de optimizar el cálculo de hidrocarburos (Allinger,1989), sino también de reproducir frecuencias vibracionales, propiedades termodinámicas y datos cristalográficos (Lii,1989a,b), así como por Rappé y *col.* que proponen un campo de fuerzas universal (UFF) (Rappé, 1992) aplicable a todas las posibles combinaciones de los elementos del sistema periódico (Rappé,1992; Casewit,1992a,b). En estos trabajos está presente la idea de una mayor generalidad y la necesidad de una convergencia entre los diferentes programas de cálculo que conduzca a un modelo computacional único.

Otro aspecto importante surge al considerar que el establecimiento de la estructura molecular exige la minimización de la energía del sistema (Engler,1973; Altona,1974; Burkert,1982; Clark,1985; Berg,1989). En primer lugar se selecciona una geometría de prueba para la molécula objeto de estudio mediante unas coordenadas atómicas iniciales, expresadas en forma de coordenadas internas (distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros con unos valores ideales) o coordenadas cartesianas (cada átomo viene caracterizado por sus coordenadas x,y,z), que constituyen los datos de entrada del programa, y se calcula un valor inicial de la energía estérica. El paso siguiente consiste en la optimización completa de la geometría a través de un proceso iterativo de minimización de la energía. Todos los parámetros que definen la geometría del sistema se modifican en pequeños incrementos hasta que la energía global alcanza un mínimo, es decir, se tienen en cuenta todos los grados de libertad.

El objetivo es alcanzar el punto o puntos de mínima energía de la superficie de energía potencial en el menor tiempo posible. Existen diferentes procedimientos matemáticos para llevar a cabo el proceso de minimización (Burkert,1982; Clark, 1985). Algunos programas consideran la primera derivada de la función de energía con respecto a cada una de las coordena-

das, mientras que otros métodos más sofisticados tienen en cuenta la primera y segunda derivadas de dicha función para localizar el mínimo energético. Sin embargo, ninguno de los métodos garantiza que el punto alcanzado corresponda a la estructura de menor energía absoluta, es decir al mínimo global. La minimización de la energía se detiene en el primer mínimo local encontrado, aunque sean posibles otros mínimos de mayor estabilidad. La localización del mínimo global requiere el examen de todas las posibles conformaciones mediante la rotación de todos los enlaces.

Por otra parte, el proceso de minimización de la energía puede efectuarse en coordenadas internas o cartesianas y, en general, se considera que la primera opción presenta la ventaja de simular mejor los movimientos cooperativos de varios átomos o grupos y, adicionalmente, reducir el riesgo de que las moléculas queden atrapadas en un falso mínimo.

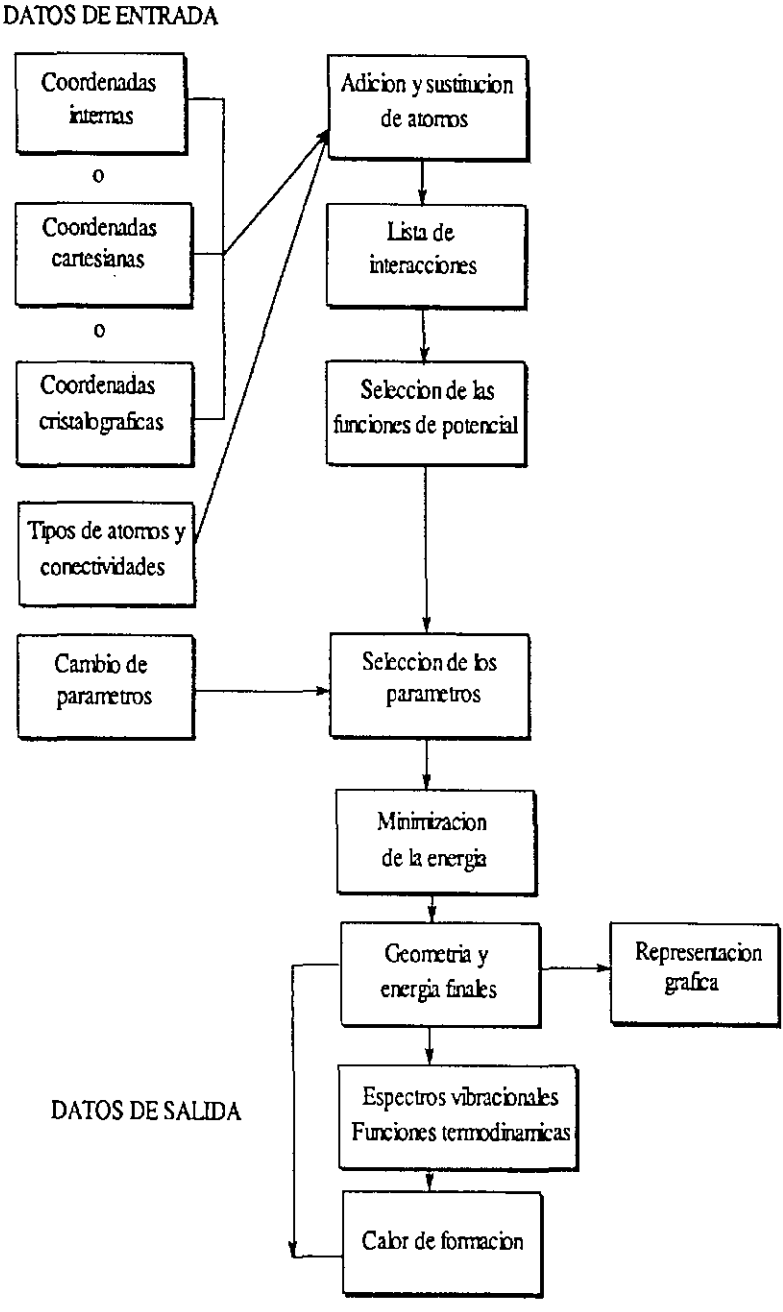
En el esquema 1 se recoge el organigrama de un programa general de mecánica molecular, donde se representa esquemáticamente el proceso de cálculo así como la interrelación entre los datos de salida.

4.0 COMPONENTES DEL CAMPO DE FUERZAS.

Como se ha indicado previamente todos los métodos de mecánica molécular presentan una filosofía común pero difieren en el número y el tipo de las funciones de energía potencial que componen el campo de fuerzas. De este modo, cada autor escoge su propio campo de fuerzas y no es posible un tratamiento general. Por esta razón, se ha centrado la discusión de este apartado en uno de los campos de fuerzas más ampliamente utilizado: el MM2 (Allinger,1976,1977; Burkert,1982).

4.1 Deformaciones de las longitudes y los ángulos de enlace.

Los valores de equilibrio o naturales de las longitudes (r_o) y los ángulos de enlace (0_o) están perfectamente establecidos en un gran número de casos. Así, para un alcano las longitudes de los enlaces C-C son del orden de 1,53 Å y los ángulos de enlace C-C-C se encuentran comprendidos entre 109 y 114 º, de modo que cualquier desviación de estos valores aumentará el contenido energético del sistema. Teniendo en cuenta que en mecánica molécular una molécula se describe como un conjunto de masas (los átomos) unidas por muelles (los enlaces), la variación energética producida por la deformación de la longitud o del ángulo de un enlace se podrá calcular mediante una función de Morse. Esta función posee un mínimo para los valores de equilibrio (r_o,0_o) y la energía aumenta a ambos lados de ese punto, de forma más rápida para valores de $r < r_o$ ó $0 < 0_o$ y con una pendiente menor para la situación contraria: $r > r_o$ ó $0 > 0_o$.



Esquema 1. Proceso de calculo en un programa general de mecanica molecular.

No obstante, las funciones de Morse generalmente no se utilizan en los campos de fuerzas de mecánica molecular debido a que requieren tiempos de cálculo excesivamente largos. En su lugar se recurre a funciones de potencial armónicas, que siguen la ley de Hooke, como las indicadas en las ecuaciones /2/ y /3/.

$$E_r = \frac{1}{2} k_r (r-r_o)^2 \qquad /2/$$

$$E_\theta = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_o)^2 \qquad /3/$$

En estas expresiones k_r y k_0 son las constantes de fuerza relacionadas con la deformación de las longitudes de enlace (acortamiento o alargamiento del enlace) y de los ángulos de enlace, r y θ son los valores reales que presentan las distancias y ángulos de enlace, r_o y θ_o los correspondientes valores de equilibrio.

Estas funciones armónicas tendrán validez en las proximidades de la posición de equilibrio (valores cercanos a r_o y θ_o), sin embargo para deformaciones muy acusadas se producirán desviaciones notables y el comportamiento del sistema se reproducirá mejor mediante una función potencial más general como la función exponencial de Morse. Para evitar estos problemas y el tiempo excesivo de cálculo que exige el empleo de funciones de Morse se utilizan diferentes aproximaciones. Una opción sencilla consiste en modificar la función cuadrática armónica mediante la adición de términos de orden superior. Una función potencial de este tipo que incluye un término cúbico, como la indicada por la ecuación /4/, permite reproducir las propiedades deseadas en un cierto rango y el

$$E_r = \frac{1}{2} k_r (r-r_o)^2 + k'_r (r-r_o)^3 \qquad /4/$$

comportamiento del sistema a longitudes de enlace inusualmente largas, pero presenta tambien serios inconvenientes. Así, cuando se parte de una geometría muy alejada de la realidad y los valores de r (ó θ) son excesivamente grandes, existe el riesgo de que la molécula se *rompa* puesto que la energía disminuye constantemente. En consecuencia, la utilización de este término requiere un control cuidadoso de los datos de entrada o bien introducir una orden para que el programa asigne, automáticamente, un valor $k' = 0$ cuando $r >> r_o$. En caso contrario, sólo debe utilizarse en los últimos pasos de la minimización. En general, los efectos de las deformacio-

nes de las longitudes de enlace son más críticos que los producidos por las distorsiones de los ángulos de enlace para valores de $0 > 0_o$.

La forma de estas funciones de potencial que emplea el campo de fuerzas MM2 se representa en las ecuaciones /5/ y /6/:

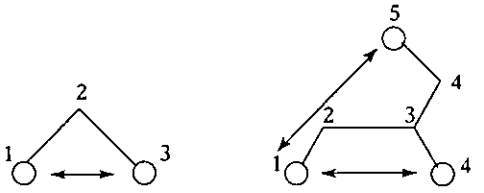
$$E_r = \frac{1}{2} k_r [(r-r_o)^2 - k'_r(r-r_o)^3] \qquad /5/$$

$$E_\theta = \frac{1}{2} 3.046 \cdot 10^{-4} \cdot k_\theta(0-\theta_o)^2 + k'_\theta(0-\theta_o)^4 \qquad /6/$$

Es un hecho bien conocido que la deformación de la longitud de un enlace requiere un aporte energético considerablemente mayor que la distorsión de un ángulo de enlace, por lo que para una molécula distorsionada siempre es de esperar que el mayor grado de deformación corresponda a los ángulos de enlace. Este aspecto se contempla en las funciones de potencial que utilizan los campos de fuerzas a través del valor de las constantes de fuerza k_r y k_0, de modo que siempre se cumple que $k_0 < k_r$. Así, en el campo de fuerzas MM2 los valores asignados a estas constantes son $k_r = 4.40$ para un enlace C-C y $k_0 = 0.450$ para un ángulo de enlace C-C-C (Allinger,1976,1977; Burkert,1982).

Un aspecto adicional se presenta en aquellos compuestos con un plegamiento acusado de los ángulos de enlace ($0 << 0_o$), como es el caso de los sistemas cíclicos de tres o cuatro eslabones, de los que el ciclobutano constituye un ejemplo característico, para los que se observa que una disminución del ángulo de enlace conlleva un aumento de las longitudes de los dos enlaces asociados con dicho ángulo. La consideración de este hecho físico supuso una adaptación del campo de fuerzas y condujo a una significativa mejora de los datos calculados. Si bien un posible tratamiento sería la introducción de parámetros específicos en el término que considera las deformaciones de las longitudes de los enlaces, E_r, generalmente se utilizan una de los dos alternativas siguientes:

1) Asignar un valor de equilibrio a la distancia entre dos átomos unidos a un átomo común para evaluar las interacciones no-enlazantes, del tipo de van der Waals, que se originan entre los átomos en disposiciones relativas 1,3 (esquema 2). Los campos de fuerzas que utilizan esta opción incluyen un término específico para las interacciones 1,3 y se denominan campos de fuerzas de Urey-Bradly.



Interaccion 1,3 Interacciones 1,4 y 1,5

Esquema 2

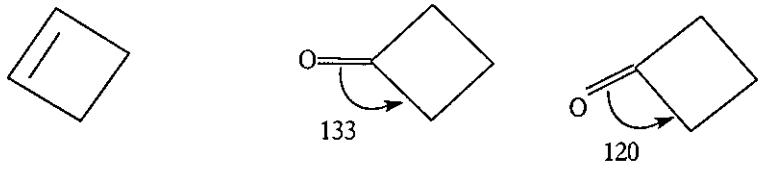
2) Introducir una función cruzada (E_r/E_0) para reproducir la deformación de las longitudes de enlace como consecuencia de las distorsiones angulares. En el campo de fuerzas MM2 se utiliza esta última opción y las interacciones no enlazantes 1,3 se evalúan a través de un término cruzado que viene dado por la ecuación /7/.

$$E_{r/\theta} = \frac{1}{2} k_{r\theta} (r-r_o)(\theta-\theta_o) \qquad /7/$$

Tambien se obtiene un mayor grado de refinamiento de los cálculos para los átomos trivalentes, que presentan el mínimo de energía para una geometría plana (por ejemplo los átomos de carbono olefínicos o carbonílicos), mediante la diferenciación en la función de energía potencial E_0 de las deformaciones de los ángulos de enlace que tienen lugar en el plano definido por los tres átomos unidos al átomo trigonal y las deformaciones perpendiculares a dicho plano (equivalentes a las flexiones en el plano y fuera del plano, empleando la terminología de la espectroscopia vibracional). Este punto es especialmente importante para la descripción de moléculas como la ciclobutanona y el ciclobuteno (esquema 3), en los que los ángulos de enlace del ciclo son menores de 120º y, como consecuencia, el valor del ángulo de enlace con el átomo exocíclico es anormalmente alto (ángulo C-C=0 de 133º en la ciclobutanona). Si no se diferencian ambos tipos de deformaciones angulares el átomo exocíclico (O ó H) se desvía en gran extensión del plano del anillo con objeto de aproximarse al valor de equilibrio de 120º.

4.2 Interacciones no enlazantes.

Desde los primeros tratamientos de la mecánica molecular, las interacciones no enlazantes se han considerado de forma explícita a través de un término que, generalmente, se denomina energía potencial de van der Waals.



Esquema 3

La mayoría de los campos de fuerzas consideran que el término de van der Waals debe contener todas aquellas interacciones entre átomos en disposiciones relativas 1,4 ó superiores (esquema 2), puesto que las interacciones 1,3 están implícitamente consideradas en las deformaciones angulares, a través de un término específico, término de Urey-Bradley, o de un término cruzado $E_{r/0}$ como se ha discutido en el apartado anterior. Se asume que las interacciones no enlazantes intramoleculares e intermoleculares siguen las mismas leyes y las funciones de potencial utilizadas en mecánica molecular se corresponden con las ecuaciones más sencillas establecidas por la teoría de las interacciones intermoleculares, desarrollada en gran extensión en los últimos años.

Las interacciones no enlazantes entre pares de átomos se tratan como una función de la distancia entre los núcleos (r). La forma general de una función de potencial de van der Waals es el resultado de dos componentes: una atractiva a distancias largas y otra repulsiva a distancias cortas. La curva de energía potencial se caracteriza fundamentalmente por: la distancia a la que corresponde un mínimo de energía, r_o, (relacionada con los radios de van der Waals de los átomos), una determinada profundidad del pozo de potencial (relacionada con la polarizabilidad) y la pendiente de la parte repulsiva (asociada con la *dureza* atómica o capacidad de penetración en el interior del radio de van der Waals).

Las fuerzas atractivas a considerar dependen de la naturaleza de las moléculas objeto de estudio. Las moléculas no polares, al igual que los gases nobles, interaccionan a través de los momentos eléctricos inducidos y la atracción es debida a fuerzas dispersivas de London. Las interacciones dipolo-dipolo inducido instantáneas predominan netamente a distancias largas y la energía asociada se describe generalmente como una función de r^{-6}. Las atracciones electrostáticas entre iones deben tratarse, sin lugar a

dudas, mediante el potencial de Coulomb (ecuación /8/), mientras que en moléculas no cargadas pero polares, con momentos dipolares permanentes, lo más correcto es tener en cuenta las interacciones dipolo-dipolo. La energía de estas interacciones se puede calcular por la fórmula de Jeans (ecuación /9/):

$$E_Q = \frac{q_i \cdot q_j}{D \cdot r_{ij}} \qquad /8/$$

$$E_D = \frac{\mu_i \cdot \mu_j}{D \cdot r_{ij}^3} (\cos\chi - 3\cos\alpha_i\alpha_j) \qquad /9/$$

En la ecuación /9/ D es la constante dieléctrica (efectiva), χ el ángulo entre los dos dipolos μ_i y μ_j, α_i y α_j los ángulos que forman los dipolos con el vector que los conecta.

A distancias suficientemente cortas las interacciones resultantes serán lógicamente repulsivas, debido a que los átomos están *demasiado* próximos. La forma exacta de la función potencial correspondiente no responde a una ley general y se basa en la experiencia.

La energía potencial total debida a la interacción de un par de átomos es, por lo tanto, la suma de las energías resultantes de las fuerzas atractivas y repulsivas. Las funciones de potencial de Lennard-Jones (ecuación /10/) y de Buckingham (ecuación /11/) conducen a buenos resultados para el tratamiento de las interacciones no enlazantes en moléculas neutras.

$$E_{LJ} = A(\frac{r_o}{r})^{12} - B(\frac{r_o}{r})^6 \qquad /10/$$

$$E_B = C\, e^{D(r_o/r)} - E(\frac{r_o}{r})^6 \qquad /11/$$

En ambas expresiones la parte atractiva se describe del mismo modo, mediante un término dependiente de r^{-6}, sin embargo el tratamiento de las interacciones repulsivas es diferente. El potencial de Lennard-Jones asume una dependencia de r^{-12}, mientras que el potencial de Buckingham considera que la pendiente aumenta de forma exponencial. Allinger en el programa

MM2 (Allinger,1976,1977; Burkert,1982) utiliza la ecuación de Hill (ecuación /12/), bastante similar al potencial de Buckingham.

$$E_{VDW} = 2.90 \cdot 10^5 \, \varepsilon \, e^{-12.50 r_o/r} - 2.25 \, \varepsilon \left(\frac{r_o}{r}\right)^6 \qquad /12/$$

En la ecuación /12/ ε define la dureza atómica y caracteriza la profundidad del pozo de potencial de una pareja de átomos y r_o es la distancia a la que corresponde el mínimo de energía, dada como la suma de los radios de van der Waals de los átomos que interaccionan.

Las funciones de potencial indicadas se han obtenido por medida de las distancias de contacto entre átomos en estado sólido de hidrocarburos, diamante y grafito y utilizando radios de van der Waals para los átomos de los gases nobles. Los parámetros necesarios para los restantes átomos del sistema periódico se han estimado por interpolación o extrapolación sobre la base de comportamientos conocidos, y por comparación de los resultados obtenidos en los cálculos de mecánica molecular con los datos experimentales. Adicionalmente, se asume que las interacciones entre dos átomos son independientes de los restantes átomos de la molécula y aditivos.

Este tratamiento de las interacciones no enlazantes, tanto desde un punto de vista general, como de la mecánica molecular, en particular, ha sido ampliamente criticado. Uno de los problemas más importantes reside en la consideración de los átomos como esferas que no es válida para el caso de moléculas, si bien la introducción de las polarizabilidades de los átomos constituye un factor corrector. Esta descripción es más adecuada para los átomos grandes que para los pequeños como el hidrógeno, en cuyo caso la desviación de un modelo esférico centrado en el núcleo es muy acusada. El procedimiento adoptado por algunos campos de fuerzas como el MM2 (Allinger,1976,1977; Burkert,1982) para el tratamiento de este problema consiste en considerar el átomo como una esfera en la que el centro se encuentra desplazado con respecto a la posición del núcleo. Esta aproximación reproduce mejor, en general, las interacciones de van der Waals.

La consideración de los átomos de oxígeno y nitrógeno como no esféricos en el potencial de van der Waals es otra aproximación muy útil que se incluye en el campo de fuerzas MM2 (Allinger,1976,1977; Burkert,1982). El hecho de que las repulsiones del átomo de oxígeno, por ejemplo, deberían ser mayores en las direcciones de los pares de electrones sin compartir se simula mediante la introducción de los pares de electrones sin compartir como pseudoátomos, con unos potenciales de van der Waals propios.

4.3 Energía potencial de torsión.

Todos los intentos realizados para diseñar campos de fuerzas de mecánica molecular prescindiendo de este término condujeron a resultados contradictorios. Así, la modificación de los parámetros de van der Waals para reproducir las barreras de rotación conduce a valores ilógicos de otras propiedades. Algunos autores interpretan este término energético como una corrección de la anisotropía de las repulsiones de van der Waals, sin embargo la racionalización más extendida considera que es el resultado de las interacciones entre enlaces no incluidas en las interacciones de van der Waals. La función de energía potencial de torsión describe los cambios de la energía molecular producidos por la rotación alrededor de los enlaces y se expresa generalmente como una función del ángulo diedro ó de torsión (ω).

La espectroscopía vibracional describe, normalmente, la rotación alrededor de un enlace como una expansión de una serie de Fourier (ecuación /13/), en la cual los seis primeros términos, algunas veces, se pueden determinar experimentalmente a partir de los sobretonos.

$$E_\omega = \sum_j \frac{1}{2} V_j [1 - \cos(j\omega)] \qquad /13/$$

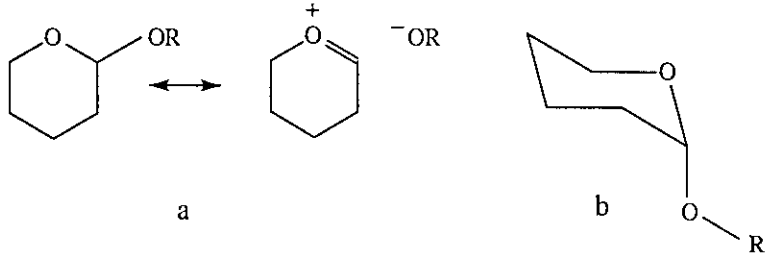
En la mayoría de los casos, los campos de fuerzas de la mecánica molecular consideran los tres primeros términos de esta serie y los parámetros V_1, V_2 y V_3 (ecuación /14/) se estiman sobre la base de una buena concordancia entre las conformaciones calculadas y las observadas experimentalmente, para un grupo de moléculas de prueba.

$$E_\omega = \frac{1}{2} V_1 (1 + \cos\omega) + \frac{1}{2} V_2 (1 - \cos 2\omega) + \frac{1}{2} V_3 (1 + \cos 3\omega) \qquad /14/$$

Desde un punto de vista físico, los términos torsionales de la ecuación /14/ representarían: la interacción dipolo-dipolo (V_1), la hiperconjugación (en alcanos) o la conjugación (en sistemas insaturados) (V_2) y el impedimento estérico (V_3).Los dos primeros términos (V_1 y V_2) tienden a ser mayores, numéricamente, en los sistemas que contienen heteroátomos que en los hidrocarburos. Una de las principales diferencias entre los programas de mecánica molecular MM1 (Allinger,1973; Wertz,1974) y MM2 (Allinger,1976,1977; Burkert,1982) es la inclusión, en este último, de valores de V_1 y V_2 distintos de cero para las rotaciones alrededor de algunos enlaces sencillos.

Los sistemas que presentan interacciones 1,4 entre pares de electrones sin compartir constituyen ejemplos muy significativos de la importancia de

los términos en V_1 y V_2. Así, la interpretación del efecto anomérico (Stoddard,1971), de gran importancia no sólo en los carbohidratos sino también en los acetatos cíclicos y acíclicos, en general, como es el caso de los 2-alcoxitetrahidropiranos, ha dado lugar a diferentes aproximaciones. Aunque su justificación es compleja (Stoddard,1971), se puede atribuir, al menos en parte, a una interacción hiperconjugativa del orbital p_z del oxígeno cíclico y el orbital σ^* del enlace C-O contiguo, es decir, a la deslocalización por retrodonación de un par de electrones no enlazantes, np, de un oxígeno en el orbital σ^* del enlace C-O adyacente (a, esquema 4).Esta interacción orbitalaria compensa la reducción de la densidad electrónica σ del átomo de carbono, causada por la polarización de los enlaces C-O y justifica la preferencia por una disposición axial del grupo OR y una disposición sesgada alrededor del enlace O(ciclo)-C-O-R (b, esquema 4) (Noerskov-Lauritsen,1984).



Esquema 4

En otros sistemas la hiperconjugación es menos importante pero decisiva, dado que la consideración de las interacciones no enlazantes no es suficiente para la obtención de resultados razonables. Es el caso de los fragmentos CCOC y CCNC, cuyo comportamiento se puede reproducir bien teniendo en cuenta los términos rotacionales V_1 y V_2.

El potencial de torsión alrededor de un doble enlace está determinado fundamentalmente por el término V_2 y en algunos casos se incluye un cuarto término en la ecuación /14/ (V_4) para el tratamiento de estos sistemas. La situación es más compleja para sistemas muy tensionados como las transcicloolefinas o los dobles enlaces que presentan sustituyentes muy ramificados, debido a las desviaciones de la planaridad producidas por las deformaciones angulares fuera del plano, que destruyen la simetría alrededor del doble enlace. En estos casos, el potencial de torsión es función, principalmen-

te, de la disminución del grado de solapamiento de los orbitales π. Las deformaciones angulares fuera del plano originan un cambio de la hibridación de los átomos de carbono implicados y se consideran separadamente.

Los sistemas conjugados que contienen electrones π deslocalizados se tratan de manera distinta y el potencial de torsión alrededor de dobles enlaces parciales es una de las principales diferencias.

Adicionalmente, las interacciones torsionales generales son insuficientes para el tratamiento de sistemas cíclicos con una elevada tensión anular como el ciclobutano. El comportamiento particular del ciclobutano es debido a las deformaciones de las longitudes de enlace asociadas a distorsiones elevadas de los ángulos de enlace, discutidas anteriormente en el apartado 4.1., y en mecánica molecular se ha tratado de reproducir a través de diferentes aproximaciones. Una posibilidad supone el empleo de un término cruzado E_θ/E_ω, que incluye las interacciones torsionales y las deformaciones angulares (ecuación /15/). Este término sólo es efectivo para deformaciones grandes de los ángulos de enlace, y tiene un efecto pequeño para los restantes sistemas. Otra alternativa, que conduce a mejores resultados, consiste en asignar un valor diferente (mayor) a la constante torsional V_3 (ecuación /14/) para anillos de cuatro miembros.

$$E_{\theta\omega} = k_{\theta\omega}(\theta-\theta_o)(\omega-\omega_o) \qquad /15/$$

4.4 Otros términos.

En la mayoría de los campos de fuerzas las interacciones no enlazantes para los hidrocarburos saturados o insaturados se representan exclusivamente por la ecuación de van der Waals (ecuación /12/) debido a que los momentos dipolares de los enlaces son pequeños y, en general, se consideran como compuestos no polares. Sin embargo en compuestos más polares, con cargas o momentos dipolares permanentes, las interacciones electrostáticas adquieren una notable importancia y su consideración, tal y como se ha indicado en el apartado 4.4.2., exige tratamientos diferentes.

Las dos aproximaciones más utilizadas son el modelo de cargas puntuales, en el que las cargas se tratan como puntos geométricos, y el modelo dipolar que emplea un conjunto de momentos dipolares de enlace junto con los momentos de los pares de electrones sin compartir, para reproducir los momentos dipolares observados en las moléculas con un

grupo funcional, más frecuentes. Para las moléculas que contienen dos o más dipolos suficientemente separados, los momentos dipolares totales y la energía de las interacciones electrostáticas correspondientes se pueden calcular aproximadamente a través de la ecuación de Jeans (ecuación /9/). Sin embargo, los resultados obtenidos en los restantes casos son poco satisfactorios. En estos métodos, la efectividad de las interacciones electrostáticas depende de la constante dieléctrica del medio existente entre las cargas o dipolos interaccionantes (denominada constante dieléctrica efectiva) y su estimación es otro de los problemas a tener en cuenta.

La evaluación de los efectos del disolvente y/o de las interacciones intermoleculares, como los puentes de hidrógeno, es otro aspecto de las interacciones electrostáticas. Los cálculos de mecánica molecular se llevan a cabo para las moléculas aisladas, es decir, en fase gaseosa. Para los hidrocarburos y algunas moléculas no polares las propiedades conformacionales y estructurales no dependen en gran extensión de la fase, aunque con frecuencia los ángulos de torsión, cuya deformación requiere, en general, un aporte energético pequeño, varían considerablemente. La situación es mucho más compleja en moléculas que contienen más de un enlace polar o de dos átomos con una fracción de carga elevada. Los efectos del disolvente se han tratado en muchos casos a través de la constante dieléctrica efectiva del mismo. Sin embargo, esta aproximación no es muy adecuada y presenta numerosos inconvenientes como la estimación de la constante dieléctrica efectiva del disolvente, que no tiene el mismo sentido que la constante dieléctrica medida experimentalmente y, a escala molecular, puede ser sustancialmente diferente. En general, estos efectos exigen un tratamiento más complejo y detallado (Burkert,1982; Ivanov,1986).

4.5 Calores de formación.

Aunque el calor de formación no es una función que esté formando parte de lo que se conoce como campo de fuerzas, su cálculo es una posibilidad adicional de los programas de mecánica molecular de indudable proyección práctica, dado que es una magnitud fundamental para establecer la estabilidad relativa de diferentes moléculas, que no sean entre sí isómeros conformacionales (Burkert,1982; Osawa,1982,1983). Generalmente, el método de determinación experimental implica la medida del calor de combustión de un compuesto y, para compuestos no gaseosos, del calor de vaporización (o sublimación). Con frecuencia, el error en la determinación de los calores

de vaporización es elevado e introduce un grado de incertidumbre considerable en el valor del calor de formación experimental.

En mecánica molecular los calores de formación se calculan mediante un sumatorio de diferentes contribuciones, debidas a las energías de formación de los enlaces, las tensiones de la molécula, representadas por la energía estérica, y un conjunto de contribuciones de tipo estadístico relacionadas con los niveles vibracionales, los equilibrios conformacionales, etc. En el programa MM2 (Allinger,1976,1977; Burkert,1982) algunos de los términos estadísticos se engloban en las contribuciones de los enlaces y se consideran no sólo las debidas al número y tipo de los enlaces existentes (cuyas energías de formación se evalúan a temperatura ambiente), sino tambien las originadas por el tipo de agrupamientos presentes y que hacen referencia a los rasgos estructurales propios de cada molécula.

Los calores de formación obtenidos para hidrocarburos saturados son excelentes y muy superiores a los que proporcionan otros métodos de cálculo. La desviación standard para un conjunto de cuarenta y dos compuestos es de 1.76 kJ/mol, mientras que el error experimental medio es de 1.67 kJ/mol (Burkert,1982).

A pesar de esta excelente concordancia en los hidrocarburos saturados, la precisión disminuye para los alquenos y es menos satisfactoria para compuestos polares conteniendo heteroátomos (Burkert,1982). Estos resultados reflejan también la necesidad de un mayor grado de refinamiento de las funciones del campo de fuerzas para reproducir las interacciones electrostáticas, más importantes en estos compuestos, así como de un mayor número de parámetros para evaluar los calores de formación.

5.0 RELACIONES CON LA MECÁNICA CUÁNTICA. SISTEMAS CONJUGADOS.

Como se ha indicado previamente, tanto los métodos mecano-cuánticos como los de mecánica molecular utilizan la aproximación de Born-Oppenheimer y consideran los movimientos nucleares y electrónicos, aunque con puntos de vista diferentes. En los cálculos mecano-cuánticos se deben asumir diferentes posiciones de los núcleos y determinar el mínimo de energía total con respecto a las posiciones internucleares, antes de estudiar la distribución tridimensional de los electrones alrededor de los núcleos. La mecánica molecular trata los núcleos y los electrones asociados como

unidades interconectadas por las funciones de potencial; los electrones no se consideran de forma explícita pero se contemplan como la causa del campo de potencial en el que se encuentran inmersos los núcleos. Por tanto, todos los cálculos referentes a las geometrías y las energías conformacionales, ya sean cuánticos ó clásicos, deberían conducir a resultados similares.

En los cálculos mecano-cuánticos *ab initio* que emplean la aproximación del campo autoconsistente (Hartree-Fock) el nivel de precisión depende de las funciones de onda atómicas utilizadas para la resolución de la ecuación de Schrödinger (ecuación /16/). La base mínima es la STO-3G, en la que los orbitales, de tipo Slater, se representan por tres funciones

$$H\psi = E\psi \qquad /16/$$

gaussianas, y conduce a resultados razonablemente buenos, aunque con una precisión del orden de diez veces menor que los obtenidos por mecánica molecular. Estos resultados se pueden optimizar aumentando la extensión de las funciones de onda de la base escogida, pero los tiempos de cálculo necesarios son considerablemente más largos. En general, un cálculo mecano-cuántico requiere un tiempo proporcional a la cuarta potencia del número de orbitales considerados, mientras que uno de mecánica molécular es proporcional a la tercera potencia del número de átomos. La razón principal de la mayor rápidez de cálculo de los métodos de mecánica molecular es que la energía se obtiene como una simple suma de términos para cada conjunto de coordenadas atómicas. No obstante, es necesario tener en cuenta que los cálculos *ab initio* se pueden efectuar para cualquier molécula o fragmento y no requieren ninguna información experimental relacionada con el sistema. Por el contrario, en los cálculos de mecánica molecular están implicados un gran número de parámetros cuyos valores se establecen en función de los estudios previos sobre compuestos relacionados, lo que supone una limitación drástica para el estudio de moléculas realmente nuevas, que no existe en los cálculos *ab initio*.

Por otra parte, los métodos mecano-cuánticos semiempíricos suponen una simplificación de los cálculos *ab initio*, mediante la omisión de algunas integrales correspondientes a las interacciones electrónicas lo que supone una reducción notable del tiempo de cálculo, pero tambien una menor precisión. Estos métodos utilizan la aproximación de introducir una serie de parámetros para compensar las integrales omitidas, cuyos valores numéricos se estiman (de forma similar a como lo hace la mecánica molecular) a través de la

concordancia entre los resultados obtenidos y los determinados experimentalmente o los calculados por otros métodos. Los tiempos de cálculo requeridos son del orden de 10^2 veces menores que los de los métodos *ab initio*, pero, en cualquier caso, superiores a los de mecánica molecular.

A pesar de la filosofía básica de los métodos de mecánica molecular, existen situaciones en las que los electrones se consideran explícitamente. Así, al describir los campos de fuerzas se ha aludido a la consideración de los pares de electrones sin compartir como pseudoátomos con un radio de van der Waals propio, aproximación muy útil para el tratamiento de éteres y aminas, pero que no parece ser tan crítica para otros heteroátomos o para los átomos de oxígeno y nitrógeno que participan en otros tipos de grupos funcionales como grupos carbonilo ó amidas (Burkert,1982; Noerskov-Lauritsen,1984). Otros casos se han planteado al describir la energía potencial de torsión y las interacciones electrostáticas, especialmente importantes en moléculas con grupos muy polares. La consideración de los momentos dipolares asociados a los enlaces presenta la ventaja adicional de poder generar, a través del programa de cálculo, los momentos dipolares moleculares, que pueden ser muy útiles para algunos compuestos (Burkert,1982).

Los sistemas π conjugados han supuesto un problema especial para los métodos de mecánica molecular y para su tratamiento se recurre a la mecánica cuántica. El mayor inconveniente que presentan estos sistemas, desde el punto de vista de la mecánica molecular, es debido a que la reproducción correcta de las estructuras de las moléculas conjugadas exige la consideración de los efectos de la variación del orden de enlace en diferentes moléculas, que no permiten generalizar los parámetros estimados para un grupo de compuestos. Las diferentes soluciones propuestas suponen la incorporación de un tratamiento de orbitales moleculares para el sistema π (Burkert,1982).

La aproximación utilizada por los programas de cálculo MMP1 (Allinger,1973; Wertz,1974) y MMP2 (Sprague,1987) supone la incorporación de términos adicionales a los programas MM1 (Allinger,1973; Wert,1974) y MM2 (Allinger,1976,1977; Burkert,1982) que permiten realizar el cálculo de los orbitales moleculares del sistema π mediante los métodos del campo autoconsistente VESCF y SCF, respectivamente. En ambos casos, a partir de una geometría inicial se lleva a cabo el cálculo del sistema π, admitiendo siempre una disposición plana, y a continuación se establecen los órdenes de enlace mediante los valores de los coeficientes de las funciones de onda

obtenidas. El paso siguiente consiste en asumir que existen relaciones lineales entre los órdenes de enlace y las siguientes magnitudes: la longitud de equilibrio del enlace, la constante de fuerza del término de potencial que considera las deformaciones de las longitudes de enlace, k_r, y las barreras de torsión. Las constantes de fuerza y las longitudes de enlace se calculan a través de estas relaciones y se introducen en el campo de fuerzas de mecánica molecular. El programa efectúa de forma iterativa y secuencial los cálculos de mecánica cuántica y de mecánica molecular hasta obtener un conjunto consistente de longitudes y órdenes de enlace.

A través de esta metodología se obtienen las longitudes de enlace correctas no sólo para moléculas conjugadas planas como el naftaleno, sino también para sistemas distorsionados con desviaciones moderadas de la planaridad. Estos resultados se pueden atribuir a que, en estos programas, no es necesario asumir que los sistemas π y σ se pueden tratar de forma independiente para las moléculas no planas, aproximación que sólo es válida para sistemas planos. En la aproximación de Allinger y *col.* (Allinger,1973; Wertz,1974; Burkert,1982; Sprague,1987) se admite que la separación σ-π es válida y las constantes de fuerza se obtienen para el sistema plano. Si la geometría de la molécula se desvía de la disposición plana el cálculo cuántico se lleva a cabo para una geometría plana ideal y la constante de fuerza no cambia, simplemente se considera que se ha producido un desplazamiento a una posición diferente de la curva de energía potencial.

Los programas MMP1 y MMP2 difieren en el tratamiento de la relación entre el orden de enlace y la función de potencial torsional, así como en el cálculo de la energía de conjugación, además del método utilizado para los cálculos mecano-cuánticos, mencionado previamente. En general, la versión MMP2 ha supuesto una optimización del método original (programa MMP1), particularmente útil para el cálculo de los calores de formación de sistemas conjugados y no conjugados, magnitud que no se puede reproducir con el programa MMP1.

Resulta por tanto evidente que los métodos de la mecánica molecular se pueden refinar mediante la incorporación de ciertas características propias de la mecánica cuántica y/o parámetros calculados a través de ésta aproximación teórica. Por otra parte, dado que la mecánica molecular supone una interpolación de los datos experimentales existentes, generalmente predice geometrías moleculares muy similares a las que se pueden obtener por métodos experimentales. Estas geometrías optimizadas por mecánica

molecular se pueden utilizar como datos de entrada para los cálculos mecano-cuánticos y constituyen una aportación de la mecánica molecular a la mecánica cuántica, que está adquiriendo un alto grado de aceptación en los últimos años.

6.0 APLICACIONES.

A pesar de las drásticas simplificaciones y asunciones que llevan impícitas los métodos de la mecánica molecular, la facilidad de optimización y reparametrización de las funciones de energía potencial de los campos de fuerzas ha dado lugar a un notable desarrollo de este método, y a una buena concordancia entre los valores experimentales y los calculados de un gran número de propiedades moleculares.

Dado que la mecánica molecular se ha convertido en una herramienta habitual para explicar y predecir numerosas propiedades moleculares de tipo estático y dinámico, la consideración detallada de sus posibles aplicaciones es sumamente amplia, por lo que sólo se van a comentar, a título orientativo, algunas de ellas. Para un tratamiento exhaustivo se pueden consultar las diferentes revisiones y trabajos publicados a este respecto (Burkert,1982; Osawa,1982,1983; Allinger,1989; Lii,1989a,b; Rappé,1992; Casewit,1992a,b).

Para el estudio estructural y, particularmente, de los aspectos esteroquímicos de los diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos es deseable la utilización de tantos métodos como sea posible, aunque la información obtenida no es igualmente útil en todos los casos. En la actualidad existen numerosos métodos experimentales para la determinación de la estructura molecular: difracción de rayos X, métodos espectroscópicos, etc. Aunque el método de difracción de rayos X es capaz, en principio, de proporcionar una información completa de la estructura de un compuesto, con frecuencia presenta serios inconvenientes. En general, es necesario que el compuesto se pueda obtener en forma cristalina y la geometría de la molécula, en estado sólido, puede estar influida por los efectos de campo en el cristal y no reflejar exactamente las propiedades del compuesto aislado y/o en disolución. Este último aspecto es particularmente crítico para el caso de moléculas flexibles que pueden adoptar con relativa facilidad varias conformaciones. La conformación observada en estado cristalino puede ser la que describa mayoritariamente la molécula en disolución (medio en el que tienen lugar un gran número de reacciones químicas y el habitual en sistemas biológicos), o bien puede haber una contribución importante de otras conformaciones.

Los métodos espectroscópicos, tales como la resonancia magnética nuclear (RMN), adquieren una gran importancia para la elucidación no sólo

de la constitución, sino también de los aspectos configuracionales y conformacionales en disolución. La evolución en el campo de la espectroscopía de RMN (Derome,1987) a nivel instrumental (equipos de alta resolución) y metodológico (métodos de pulso, transformación de Fourier, métodos bi y tridimensionales) ha supuesto una notable contribución para la química estructural y, además, en otros campos como la medicina y la biología.

La determinación de la estructura molecular mediante cálculos teóricos, como los de mecánica molecular, es fundamental cuando la aplicación de los métodos experimentales no proporciona la información deseada.

Teniendo en cuenta la naturaleza de los métodos de mecánica molecular resulta evidente que una de sus aplicaciones más importantes sea el análisis conformacional en sus dos aspectos, estático y dinámico. El estudio conformacional es fundamental para comprender no solo las propiedades físicas de las moléculas sino tambien la reactividad química o la actividad biológica.

El análisis conformacional estático estudia la molécula en sus mínimos energéticos, globales o locales, es decir en las conformaciones más estables que puede adoptar. Por ejemplo, es un hecho bien conocido que el ciclohexano puede adoptar tres conformaciones distintas (esquema 5): **silla** (la más estable), **bote distorsionado** y **bote**, que no es un mínimo energético, sino un estado de transición entre dos conformaciones de bote distorsionado. La situación es similar cuando en la molécula existe un heteroátomo; sin embargo, la presencia de sustituyentes en el anillo puede modificar la estabilidad de estas conformaciones en función de su naturaleza, número y posiciones relativas, y el confórmero más estable puede ser una silla distorsionada o incluso un bote con mayor o menor grado de deformación.



silla bote distorsionado bote

Esquema 5

La mecánica molecular es una técnica eficaz a la hora de establecer la geometría de las conformaciones que puede adoptar una molécula

determinada, así como el orden de estabilidad de las mismas. También permite evaluar el contenido energético de interacciones estéricas entre grupos, uno de los aspectos más conflictivos del análisis conformacional estático. No obstante, conviene recordar en este punto que a partir de una geometría inicial el programa no busca automáticamente todos los posibles mínimos de la superficie de energía potencial y tampoco alcanza directamente el mínimo global, sino que se detiene en el primer mínimo local encontrado. La localización del mínimo global requiere el exámen de todas las posibles disposiciones geométricas que puede adoptar la molécula por rotación alrededor de todos los enlaces. Algunos programas como el MM2 o el PCMODEL incorporan diferentes opciones para facilitar el cálculo, como son la posibilidad de rotación simultánea de dos enlaces (de gran interés en sistemas cíclicos) o de giro simultáneo de varios enlaces a intervalos de 120º (útil para sistemas acíclicos, en los que es posible obtener todos los rotámeros alternados minimizados). La metodología de los programas de dinámica molecular resuelve de forma más eficiente la situación al ser capaz de remontar barreras energéticas pequeñas. Por esta razón, recientemente algunos programas de mecánica molecular (las versiones MM2(91) y PCMODEL(90)) incorporan tambien una opción de dinámica molecular que permite comprobar si el punto alcanzado corresponde realmente a un mínimo de la superficie de energía potencial.

El análisis conformacional dinámico se centra en el estudio de aquellas propiedades moleculares que no se pueden explicar en función de las diferencias de estabilidad entre confórmeros estáticos, y requieren la consideración de conformaciones en equilibrio. Un confórmero es siempre un mínimo energético con un significado estático, mientras que una conformación es un punto cualquiera de la superficie de energía potencial, lo que implica que la molécula puede adoptar esa disposición espacial durante un tiempo más o menos breve, es decir, se trata de una concepción dinámica de una molécula en movimiento.

Dentro del análisis conformacional dinámico se pueden incluir todos los procesos que presupongan un cambio, más o menos rápido, de la conformación. Por ejemplo, se puede dirigir al estudio de las barreras de rotación alrededor de un enlace y la geometría de los estados de transición implicados, así como las causas (interacciones) que originan dicha barrera.

Otro aspecto hacia el que se puede orientar el estudio dinámico son las propiedades magnéticas derivadas de la resonancia magnética nuclear (RMN), en particular las constantes de acoplamiento vecinal ^{1}H -^{1}H, ^{1}H - ^{13}C y ^{13}C-^{13}C, debido a la relación existente entre la magnitud del acoplamiento y el ángulo diedro definido por los enlaces correspondientes. Desde el punto de vista de la RMN los equilibrios conformacionales por rotación alrededor

de enlaces se pueden considerar como procesos de intercambio internuclear de posiciones magnéticas (Becker,1980; Derome,1987). Se trata, por tanto, de fenómenos dependientes del tiempo y se puede presentar una amplia gama de posibilidades entre dos situaciones extremas con respecto a la escala de tiempos de la RMN:

a) Régimen lento: la resonancia de los núcleos de cada conformación se observa separadamente, siendo posible establecer los párametros magnéticos de las diferentes conformaciones presentes.
b) Régimen rápido: las señales de cada núcleo de las diferentes conformaciones colapsan en una única señal y el valor observado para cualquier parámetro magnético será una media ponderada de los valores del mismo en cada una de las especies individuales.

Esta última situación es muy frecuente para moléculas flexibles, por lo que el valor observado, para una constante de acoplamiento vecinal, vendrá dado por la ecuación /17/ (Becker,1980):

$$J^{obs} = \sum_{i=1}^{n} N_i \cdot J_i^{\circ} \quad ; \quad \sum_{i=1}^{n} N_i = 1 \qquad /17/$$

donde J^{obs} es el valor experimental de la constante, N_i es la población conformacional expresada como fracción molar de la conformación i y J_i° es el valor de la constante para dicha conformación, cuya estimación se puede realizar a través de diversas relaciones empíricas propuestas por diferentes autores (Haasnoot,1980; Altona,1989) conociendo la geometría de las diferentes conformaciones.

Los cálculos de mecánica molecular ofrecen dos tipos de datos fundamentales para la elucidación de las preferencias conformacionales de un compuesto determinado: por un lado se obtiene una descripción detallada de la geometría de las diferentes conformaciones posibles, que incluye los valores de los ángulos diedros; por otra parte es posible hacer un cálculo de las poblaciones, en función de la energía estérica de cada confórmero de la molécula. A partir de las geometrías de las diferentes conformaciones deducidas es posible calcular los valores de las constantes de acoplamiento vecinal en cada una de ellas y, con estos datos y las poblaciones conformacionales, estimar un valor de dichas constantes para el compuesto estudiado. La comparación entre los valores calculados y observados experimentalmente permitirá corroborar los resultados obtenidos. Asimismo, esta sistemática es válida para la asignación de configuraciones relativas de compuestos con varios átomos de carbono asimétricos y/o dobles enlaces con isomería geométrica, y se ha aplicado exhaustivamente para el estudio de compuestos orgánicos de naturaleza muy diversa.

Adicionalmente, los cálculos teóricos de mecánica molecular sobre las preferencias conformacionales permiten conocer los contenidos de energía de las diferentes conformaciones que puede adoptar la molécula por distorsión de la conformación de mínima energía, y que sean más acordes con los requerimientos geométricos de un receptor o de una reacción determinados. A partir de los valores de las diferencias de energía con respecto a la conformación más favorable energéticamente, se puede deducir si la conformación activa o reactiva es o no fácilmente accesible y, por tanto, preveer si una molécula puede llegar a presentar una actividad específica o su comportamiento en una reacción determinada.

Otro campo de aplicación deriva de las relaciones entre la mecánica molecular y la espectroscopía vibracional. Como se ha indicado previamente, la mecánica molecular ha adoptado del análisis vibracional las funciones de potencial para las coordenadas individuales, como las longitudes y los ángulos de enlace, pero sólo una parte de su formalismo. La espectroscopía vibracional se centra en el estudio de las fuerzas que mantienen unidas las moléculas mediante un análisis de coordenadas normales. El campo de fuerzas de la mecánica molecular no es un campo de fuerzas en el sentido de un análisis de coordenadas normales, sino un conjunto de funciones de potencial análogas a las de los campos de fuerzas vibracionales. La diferente filosofía de ambos tipos de campos de fuerzas se pone de manifiesto en el tratamiento de numerosos aspectos, como por ejemplo: 1) el análisis vibracional se basa en coordenadas independientes, mientras que la mecánica molécular considera todas las posibles coordenadas internas; 2) los campos de fuerzas utilizados en espectroscopía no incluyen específicamente las interacciones no enlazantes de orden superior a 1,3 y sus efectos se evalúan indirectamente, a través del ajuste de las constantes de fuerza para moléculas individuales; 3) la asunción de parámetros transferibles, por tanto, está más restringida en espectroscopía vibracional y las constantes de fuerza utilizadas, generalmente, no presentan los mismos valores numéricos.

A partir de las funciones de potencial de la mecánica molecular se pueden derivar un campo de fuerzas para el análisis vibracional y las coordenadas normales, mediante el establecimiento de la matriz de las segundas derivadas de la energía potencial. Por esta razón, la introducción de un mayor grado de refinamiento de las funciones y de los parámetros del campo de fuerzas de la mecánica molecular, conduciría a una situación óptima: el mismo campo de fuerzas sería capaz de reproducir: estructuras y sus energías relativas, frecuencias vibracionales, propiedades termodinámicas, datos cristalográficos, reactividades, etc. En este sentido, Allinger y *col.* (Allinger,1989; Lii,1989a,b) diseñaron el programa MM3 para hidrocarburos.

Si se conoce la posición de equilibrio y la superficie de energía potencial en la proximidad de cada átomo, tambien se pueden calcular los niveles vibracionales correspondientes a mínimos de energía y, de este modo, las frecuencias características de los espectros vibracionales (espectros infrarrojos y Raman, incorporando las reglas de selección para descartar las transiciones prohibidas), así como las poblaciones de los estados fundamental y excitados, utilizando una distribución de Boltzmann. Se puede, entonces, determinar el punto cero de energía y la energía vibracional de cada conformación. Adicionalmente, el contenido de energía de todo el sistema se puede establecer considerando una distribución de Boltzmann de todas las conformaciones y a partir de sus poblaciones se pueden determinar la entropía del mismo y las funciones termodinámicas que dependan de las variaciones de las poblaciones con la temperatura.

Las aplicaciones de la mecánica molecular a los diferentes aspectos de las reacciones químicas - reactividad molecular - son más limitadas (Burkert,1982; Osawa,1982,1983). El hecho de que la reactividad molecular sea función de la estructura electrónica exige la incorporación de cálculos mecano-cuánticos para el establecimiento de los orbitales moleculares. No obstante, los cálculos de mecánica molecular se aplican a la resolución de numerosos problemas de reactividad.

La mecánica molecular se puede aplicar, directamente, para predecir las proporciones de estereoisómeros formados en procesos que transcurran en condiciones de control termodinámico. El equilibrio químico entre estereoisómeros se trata de forma análoga a los equilibrios conformacionales. El cálculo de las velocidades de reacción requiere el establecimiento de la geometría y la energía de un modelo del estado de transición, de acuerdo con la teoría de Eyring. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la información disponible sobre los estados de transición no es suficiente para una parametrización fiable de un campo de fuerzas completo. Por esta razón, muchos estudios se basan en la consideración de los intermedios de reacción y los campos de fuerzas se optimizan de forma que se obtenga la mejor concordancia con las velocidades de reacción experimentales.

Mediante la utilización de diferentes aproximaciones se han estudiado las velocidades de reacción de los procesos de sustitución nucleófila bimolecular (mecanismo S_N2) de halogenuros de alquilo, reacciones de solvolísis e isomerizaciones a través de iones carbenio como intermedios, reacciones radicálicas, de hidrogenación (como la predicción de la facilidad

de hidrogenolísis de diferentes enlaces carbono-carbono en sistemas cíclicos tensionados) y de oxidación de alcoholes a cetonas, el control de la selectividad diastereofacial de los procesos de adición nucleófila a compuestos carbonílicos quirales o proquirales y reacciones electrocíclicas, entre otras.

7.0 VENTAJAS Y LIMITACIONES.

A lo largo de este capítulo se han descrito, brevemente, la filosofía y los aspectos básicos de la mecánica molecular con la obligada mención de algunas de las ventajas y limitaciones inherentes al propio método. Puesto que la mecánica molecular es un método empírico, basado en datos experimentales, cabría preguntarse: ¿para qué calcular las estructuras y las energías de las moléculas si se pueden determinar experimentalmente?. Existen, al menos, dos motivos que lo justifiquen: uno de tipo práctico que es la rapidez para obtener la información deseada. La determinación experimental implica la síntesis, separación y purificación del compuesto deseado así como la selección del método adecuado y su aplicación. Pero además hay una razón científica, puesto que los cálculos teóricos pueden ser una ayuda valiosa para la mejor comprensión de los hechos experimentales. Entonces, se podría formular la pregunta inversa: ¿para qué realizar determinaciones experimentales si se pueden obtener los mismos resultados, con menor esfuerzo, mediante cálculos teóricos?. La respuesta es que el grado de fiabilidad de los métodos de mecánica molecular está limitado por la precisión de los datos experimentales seleccionados para su parametrización, de modo que si se extrapola en demasía, los resultados obtenidos pierden precisión y fiabilidad.

Los métodos de la mecánica molecular no se pueden usar indiscriminadamente como consecuencia intrínseca de su origen. La consideración de sus limitaciones permitirá eliminar o, al menos, minimizar muchos errores. En este sentido conviene recordar que la mecánica molecular se ha diseñado para calcular moléculas estables y, aunque se puede aplicar a estados de transición de reacciones químicas y a otras especies inestables, estas aplicaciones conllevan mayor dificultad. La mecánica cuántica es la mejor aproximación para el estudio de aquellas propiedades moleculares que dependan, fundamentalmente, de los efectos electrónicos. Por otra parte, el tratamiento de moléculas con grupos funcionales o átomos no parametrizados en los campos de fuerzas existentes, solo es posible si se estiman los parámetros necesarios. Adicionalmente, es importante la selección del campo de fuerzas a utilizar en función de la naturaleza de las moléculas y las propiedades a determinar (véase la tabla 1). Así, los programas MM2/MMP2 son los más utilizados para moléculas de pequeña o moderada magnitud molecular, mientras que los programas AMBER ó CHARMM, standard para macromoléculas, sólo conducen a resultados cualitativos. El programa

AMBER emplea un campo de fuerzas híbrido y se aplica, principalmente, para el estudio de las interacciones entre moléculas pequeñas y macromoléculas.

Teniendo en cuenta estas limitaciones y valorando en su justa medida los resultados procedentes del cálculo teórico, la mecánica molecular ofrece un gran número de ventajas: conceptualmente es más asequible que la mecánica cuántica, como consecuencia de basarse en la mecánica clásica, y los programas diseñados son de fácil manejo y de una gran versatilidad. En muchos casos, se incluye un soporte gráfico y la opción de expresar las geometrías calculadas en diferentes formatos, lo que permite su utilización directa, como datos de entrada, para otro tipo de cálculos como los mecanocuánticos. Estas ventajas, junto con la rápidez de cálculo y la bondad de los resultados son las principales razones de su amplia utilización.

8.0 BIBLIOGRAFIA.

Allinger, N. L.; Sprague, J. T. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* 95, 3893.
Allinger, N. L. (1976) *Adv. Phys. Org. Chem.* 13, 1.
Allinger, N. L. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8127.
Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J. H. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8551.
Altona, C.; Faber, D. H. (1974) *Top. Curr. Chem.* 45, 1.
Altona, C.; Ippel, J. H.; Westra Hoekzema, A. J. A.; Erkelens, C.; Groesbeek, M.; Donders, L. A. (1989) *Magn. Reson. Chem.* 27, 564.
Becker, E. D. (1980) " *High Resolution NMR. Theory and Chemical Applications*", Academic Press, New York, 2ª Ed.
Berg, U.; Sandström, J. (1989) *Adv. Phys. Org. Chem.* 25, 2.
Brooks, B. R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. (1984) *J. Comput. Chem.* 5, 486.
Burkert, U.; Allinger, N. L. (1982) " *Molecular Mechanics*", ACS Monograph 177. American Chemical Society. Washington, D. C.
Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Rappé, A.K. (1992 a) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10035.
Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Rappé, A.K. (1992 b) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10046.
Clark,T. A. (1985) " *A Handbook of Computational Chemistry*", Wiley, New York.
Derome, A. E. (1987) " *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*", Pergamon Press, Oxford.
Dougherty, D. A.; Mislow, K. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* 101, 1401.
Engler, E. M.; Andose, J. D.; Schleyer, P. von R. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* 95, 8005.

Gajewski, J. J.; Gilbert, K. E.; Mckelvey, J. (1990) " *Advances in molecular Modelling*", Editor Liotta, D., JAI Press, Greenwich, CT, vol 2, p. 65.
Hassnoot, C. G. A.; de leevw, F. A. A. M.; Altona, C. (1980) *Tetrahedron*, 36, 2783.
Hopfinger, A. J.; Pearlstein, R. A. (1984) *J. Comput. Chem.* 5, 486.
Ivanov, P. M. (1986) *J. Mol. Struct.* 140, 359.
Lii, J. H.; Allinger, N. L. (1989 a) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8566.
Lii, J. H.; Allinger, N. L. (1989 b) *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8576.
Momany, F. A.; McGuire, R. F.; Burgess, A. W.; Scheraga, H. (1975) *J. Phys. Chem.* 79, 2361.
Mislow, K. (1976) *Acc. Chem. Res.* 9, 26.
Nemethy, G.; Pottle, M. S.; Scheraga, H. A. (1983) *J. Phys. Chem.* 87, 1883.
Noerskov Lauritsen, L.; Allinger, N. L. (1984) *J. Comput. Chem.* 5, 326.
Osawa, E.; Musso, H. (1982) *Top. Stereochem.* 13, 117.
Osawa, E.; Musso, H. (1983) *Angew. Chem. Inter. Ed. Engl.* 22, 1.
Radom, L. (1982) " *Molecular Structure and Conformation*", Editor Csizmadia, I. D., Elsevier. Amsterdam.
Rappé, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard III, W. A.; Skiff, W. M. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10024.
Sprague, J. T.; Tai, J. C.; Yuh, Y.; Allinger, N. L. (1987) *J. Comput. Chem.* 8, 581.
Stoddard, J, F. (1971) " *Stereochemistry of Carbohydrates*" Wiley Interscience, New York.
Warshell, A.; Lifson, S. (1970) *J. Chem. Phys.* 53, 582.
Warshell, A.; Huler, E.; Rabinovich, D.; Shakked, Z. (1974) *J. Mol. Struct.* 23, 175.
Weiner, P. K.; Kollman. P. A. (1981) *J. Comput. Chem.* 2, 287.
Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. (1986) *J. Comput. Chem.* 7, 230.
Wertz, D. H.; Allinger, N. L. (1974) *Tetrahedron* 30, 1579.
Williams, D. E.; Starr, T. L. (1977) *J. Comput. Chem.* 1, 173.

Análisis conformacional

ENRIQUE GALVEZ RUANO E ISABEL IRIPENA CANALDA
Universidad de Alcalá de Henares

1.0 INTRODUCCION

En 1937 se encontró experimentalmente que la entropía del etano era ligeramente más baja que la calculada para una molécula en la cual los grupos metilos podían rotar libremente alrededor del enlace C-C. Este hecho se enterpretó en el sentido de que los grupos metilos tenían reducida libertad en sus movimientos. Experimentos posteriores han confirmado que la estructura eclipsada del etano es 3 Kcal/mol^{-1} más alta en energía que la estructura alternada. Estas dos estructuras se representan en la Fig. 1.

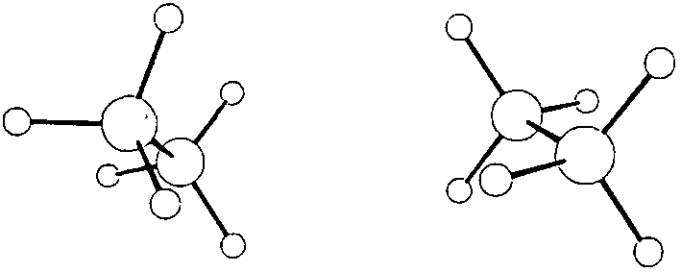


Fig. 1.- Estructuras eclipsada y alternada del etano

Las estructuras que difieren sólamente en la rotación de uno o más enlaces sencillos se definen como conformaciones de un compuesto. Con objeto de representar dichas conformaciones de manera tridimensional se emplean dos sistemas generalmente. En la Fig. 2 se representan las conformaciones eclipsada y alternada del etano en la forma denominada "silla de montar".

Las proyecciones de Newman de las formas eclipsada y alternada del etano se muestran en la Fig. 3.

Una proyección de Newman consiste en una vista de la molécula en dirección frontal y coaxial con respecto al eje C-C (en el caso del etano que estamos considerando). El átomo de carbono próximo al observador se representa por un punto. Los otros tres grupos unidos a este átomo de carbono se representan unidos al mismo por tres líneas existiendo entre las mismas el mismo ángulo de ciento veinte grados; el átomo de carbono más alejado del observador se representa con un círculo y los agrupamientos

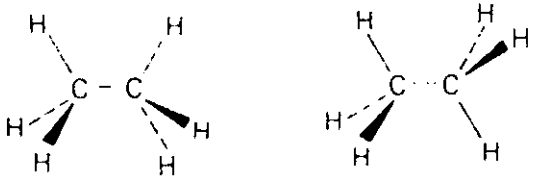


Fig. 2.- Conformaciones eclipsada y alternada del etano en la forma "silla de montar".



Fig. 3.- Proyecciones de Newman de las formas eclipsada y alternada del etano.

unidos a él, a través de tres líneas que irradian de dicho círculo formando también ángulos de ciento veinte grados. Se denomina ángulo diedro al formado por tres enlaces consecutivos (en el caso del etano estamos considerando que el ángulo diedro sería H-C-C-H). Estas proyecciones muestran que una rotación de sesenta grados sobre el eje C-C transforma una forma eclipsada en alternada, si se gira nuevamente otros sesenta grados se vuelve a una conformación eclipsada. En la Fig. 4 se representa una gráfica de la energía potencial (en ordenadas) frente al ángulo diedro (en abcisas) de la molécula del etano.

De esta manera una rotación de sesenta grados, es decir el paso de una conformación alternada a otra eclipsada, representa una barrera energética de 3 Kcal/mol^{-1}. La menor estabilidad de la forma eclipsada resulta de la repulsión interelectrónica entre los orbitales moleculares C-H. La distancia internuclear H-H en el confórmero alternado es de 2.55 Å mientras que en la forma eclipsada es de 2.29 Å. Así, cuando dicha distancia

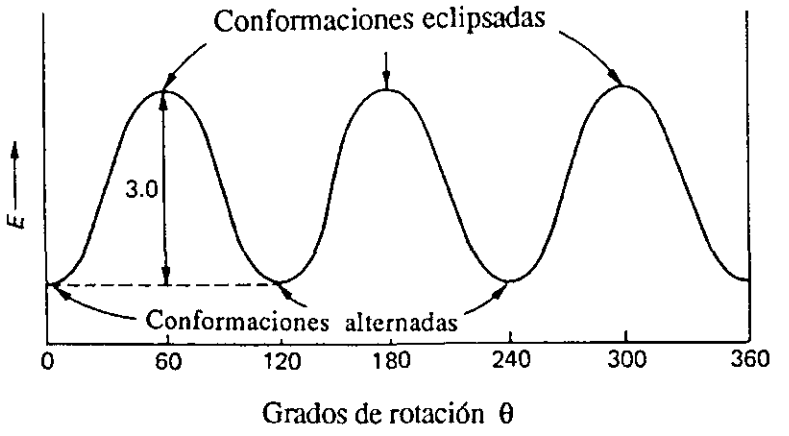


Fig. 4.- Energía potencial del etano en función del grado de rotación alrededor del enlace C-C.

es menor aumenta la repulsión. La magnitud de dicha repulsión es pequeña aproximadamente de 1 Kcal/mol^{-1} por cada par de hidrógenos, pero sin embargo, la suma de estos valores en una molécula orgánica tiene sus consecuencias a nivel estructural.

En el propano, la barrera de rotación en el enlace C-CH_3 es ligeramente más alta en energía 3.4 Kcal/mol^{-1}. En la Fig. 5 se ilustra la conformación más estable que como era de esperar es la completamente eclipsada.

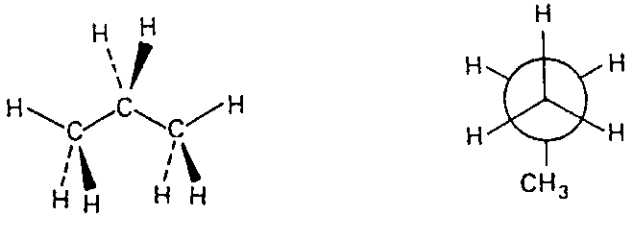


Fig 5.- Conformación más estable del propano.

En la Fig. 6 se representa una gráfica que, como en el caso anterior relaciona la energía potencial de la molécula (n-butano) con respecto al valor

de un ángulo diedro, en este caso el ángulo formado por los cuatro carbonos del esqueleto. Es de notar que existen dos conformaciones alternadas *anti* en las cuales los dos grupos metilos unidos a los carbonos dos y tres se encuentran en la posición geométrica más alejada posible, y dos formas *gauche* en la cual esos dos metilos son adyacentes. Estas dos conformaciones alternadas tienen diferentes energías; la conformación *anti* es más estable que la *gauche* en 0.9 Kcal/mol^{-1}. A temperatura ambiente, el butano es una mezcla de 72% de confórmero anti y 28% de confórmero gauche.

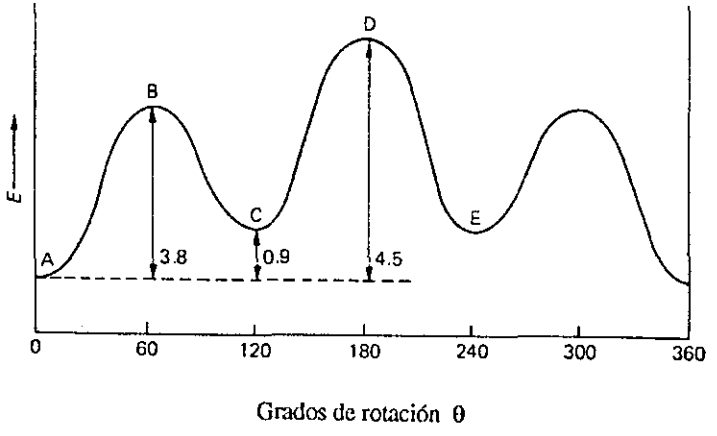


Fig. 6.- Energía potencial del butano en función del grado de rotación alrededor del enlace 2-3.

Si estados dos estructuras se pudiensen aislar tendrían propiedades físicas diferentes tales como la densidad, propiedades espectroscópicas, punto de fusión, etc. Sin embargo, la barrera energética que las separa es pequeña, sólamente 3.8 Kcal/mol^{-1}. Una barrera de tal magnitud es demasiado pequeña para permitir el aislamiento de ambas conformaciones a temperatura ambiente. Para separar estas dos especies, sería necesario trabajar a temperaturas de aproximadamente -230° C.

Se debe notar también que existen en este caso dos tipos de conformaciones eclipsadas. En una de ellas hay dos interacciones CH_3-H y una H-H. Esta conformación es 3.8 Kcal/mol^{-1} menos estable que la conformación *anti*. La otra conformación eclipsada tiene una interacción CH_3-CH_3 y dos interacciones H-H. Esta conformación es aproximadamente 4.5 Kcal/mol^{-1} menos estable que la conformación *anti*. Dichas conformaciones se representan en la Fig. 7.

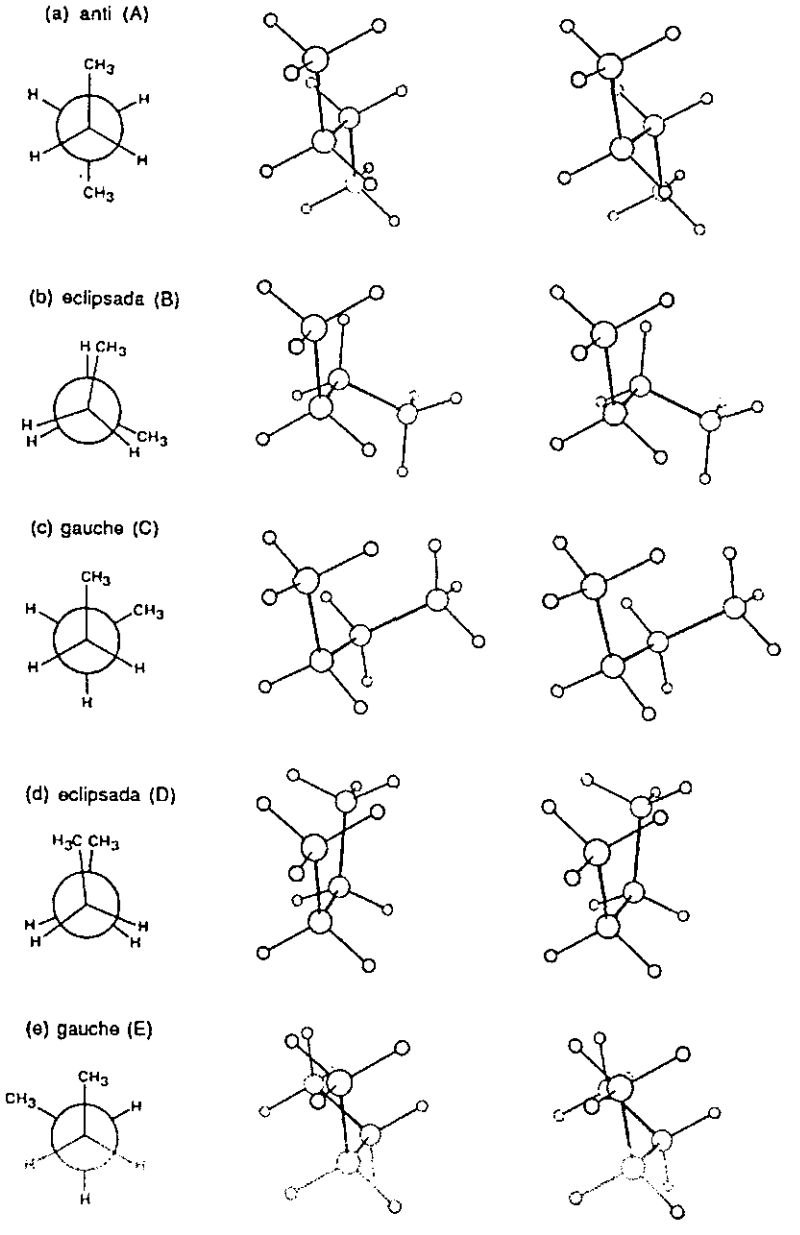


Fig. 7.- Conformaciones del butano

En general los mismo razonamientos que se han hecho anteriormente son aplicables a los alcanos superiores y por extensión a las moléculas orgánicas más complejas; es decir, normalmente cuando éstas están en estado gaseoso, líquido o en disolución se encuentran preferentemente en conformaciones en las cuales los grupos más voluminosos están alejados al máximo entre sí. No obstante hay que tener en cuenta que en la mayoría de los casos el requerimiento energético necesario para pasar de una conformación a otra ligeramente menos estable es pequeño.

Desde un punto de vista farmacéutico, cuando se considera el acoplamiento de un fármaco con el receptor correspondiente, una pequeña barrera conformacional se puede compensar y de hecho así ocurre, con la energía que se desprende en dicho acoplamiento. Esta afirmación es la base de la teoría del acoplamiento inducido de Koshland. Un ejemplo de dicha teoría se debe a Leger y colaboradores (Leger 1980). Utilizando datos cristalográficos para agonistas β-adrenérgicos, estos autores han mostrado que la distancia del anillo aromático de un determinado agonista al átomo de nitrógeno cargado y al oxígeno es crítica para la actividad farmacológica. Si ello fuese necesario, la molécula se plegaría para mantener su conformación óptima, que se ha encontrado que no es ni la que adopta en estado cristalino ni en disolución.

Hay que tener mucho cuidado al proponer hipótesis acerca de las conformaciones de un fármaco y su correlación con la estructura del receptor. Se han propuesto técnicas para establecer mapas de receptores basadas en las distancias entre los átomos principales (en general heteroátomos) o grupos funcionales en fármacos, mediante largos cálculos químico-cuánticos de conformaciones preferidas. De una manera análoga se ha basado el diseño de una serie de fármacos en teorías más o menos dudosas acerca del acoplamiento fármaco-receptor, todas ellas basadas en el análisis conformacional. Estas teorías han sido criticadas desde hace tiempo (Martin, 1978).

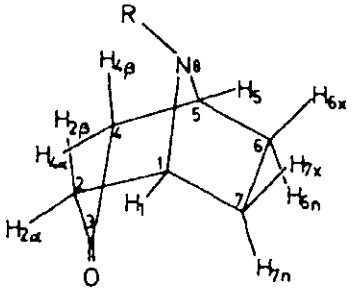
Se puede afirmar, en general, que en el caso de moléculas no completamente rígidas es posible deducir no sólo la conformación preferida de las mismas, tanto en molécula aislada como en disolución sino las barreras energéticas de interconversión entre las distintas conformaciones. Para ello se pueden utilizar diferentes técnicas como espectroscopía IR, RMN de ^{1}H y ^{13}C, cálculos químico-cuánticos, etc. No obstante en la mayoría de los casos este conocimiento no deja de ser una aproximación, pues no siempre la conformación más estable es la que adopta el fármaco para su unión al receptor correspondiente.

A continuación, se describe el estudio conformacional de una serie de esqueletos carbonados de reconocido interés farmacéutico.

1.1. Sistema del tropano

El sistema de N-metil-8-azabiciclo[3.2.1]octano (tropano) es de reconocido interés farmacéutico, razón por la cual es uno de los seleccionados para su estudio conformacional. En este caso nos referiremos al estudio conformacional por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN de ^1H y ^{13}C) de una serie de cetonas de naturaleza de nortropan-3-ona, N-sustituidas).

Los escasos precedentes bibliográficos de estos compuestos se refieren a desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de N-metil (Daum, 1975 y Wenkert, 1974) y N-bencilderivados (Daum, 1975). En este trabajo (Arias., 1986) se profundiza en el estudio de los espectros de RMN de ^1H a 360 MHz y ^{13}C a 20 MHz de las azabicicloctanonas 1-5(Esquema 1), empleando deuterocloformo ($CDCl_3$) como disolvente.



1 , R ≡ CH_3 (1')

2 , CH_2Ph (1')

3 , CH_2(1')-CH_2OH(2')

4 , CH_2(1')-CH_2(2')-CH_2OH(3')

5 , CH(1')(CH_3(2'))(CH_3(3'))

Esquema 1.

1.1.1. Análisis espectroscópico

Los espectros de los compuestos 1-5 presentan una gran similitud. La asignación de las señales se ha efectuado teniendo en cuenta los datos descritos en la bibliografía para 1 y 3 (Daum, 1975, Wenkert, 1974).

^1H RMN

Todas las señales del sistema tropánico corresponden a dos protones, observándose claramente diferenciadas las debidas a H1(5); H2(4)α; H2(4)β;

H6(7)x y H6(7)n. Los acoplamientos a largo alcance entre los protones con una disposición en W: JH2α-H4α, JH2β-H7x o JH4β-H6x no se observan en las condiciones de registro de los espectros utilizadas. Como es frecuente para estos sistemas tropánicos, los protones situados en los carbonos cabeza de puente (H1(5)) aparecen como un singlete ancho (W1/2 11.5 Hz), no siendo posible la estimación de los acoplamientos en los que participan dichos protones sobre esta señal. H2(4)α aparece como un doblete (W1/2 de cada línea ~3.5-4.2 Hz) como consecuencia del acoplamiento geminal con H2(4)β; sin embargo, no se detecta el acoplamiento vecinal con H1(5) que debe ser de pequeña magnitud y para el que se ha estimado un valor límite menor de 2 Hz en función de la anchura media de las líneas del doblete.

H2(4)β aparece como un cuadruplete y se ha considerado como uno de los subespectros AB del sistema de tres espines del tipo ABC constituido por los protones H1, H2α y H2β (o H5, H4α y H4β) cuyo análisis se ha efectuado por aplicación del programa de cálculo LAOCOON III para la optimización de los parámetros magnéticos protónicos correspondientes a H2(4)β: δH2(4)β, ^{2}JH2(4)α-H2(4)β, ^{3}JH2(4)β-H1(5) que se recogen en las Tablas I y II junto con los errores más probables deducidos de este análisis.

TABLA I

Desplazamientos químicos de ^{1}H de Azabiciclooctanonas 1-5

Desplazamientos químicos[a] δ(ppm)	1	2	3	4	5
H-1(5)	3.45	3.48	3.55	3.64	3.79
H-2(4)β	2.69	2.68	2.66	2.66	2.67
H-2(4)α	2.20	2.20	2.25	2.25	2.14
H-6(7)x	2.108 (0.005)	2.11	2.05	2.07	2.01
H-6(7)n	1.610(0.005)	1.62	1.65	1.63	1.60
H-1'	2.50 (s)	3.74 (s)	2.76 (t)	2.84 (t)	2.91 (m)[b]
H-2'			3.68 (t)	1.79 (m)[b]	1.21 (d)
H-3'			.	3.90 (t)	1.21 (d)
OH			3.10[c]	5.20[c]	
C_6H_5		7.33 (m)[b]			

TABLA II

Constantes de acoplamiento (Hz) deducidas del análisis de los espectros de ^{1}H-RMN de los compuestos 1-5

Constantes de acoplamientos[a,b] J(Hz)	1	2	3	4	5
H2(4)α-H2(4)β	-15.95 (0.05)	-16.01 (0.05)	-16.06 (0.05)	-16.19 (0.05)	-15.86 (0.05)
H2(4)β-H1(5)	4.20 (0.05)	4.34 (0.05)	4.10 (0.05)	3.97 (0.05)	4.00 (0.05)
H6x-H6n	-13.22 (0.06)				
H6x-H7x	12.47 (0.08)				
H6x-H7n	4.90 (0.06)				
H6n-H7n	8.30 (0.08)				

[a] ^{3}JH6x-H6n = ^{3}JH7x-H7n; ^{3}JH6x-H7n = ^{3}JH6n-H7x; ^{3}JH2(4) H1(5) y ^{3}JH6(7)n-H1(5) es muy pequeña y solo se ha observado un ligero ensanchamiento de las respectivas señales. ^{3}JH6(7)x-H1(5) no se pudo establecer.

[b] Las constantes de acoplamiento en los fragmentos R se midieron directamente de los espectros **4d** JH1'-H2' = 5.4 Hz; **4e** JH1'-H2' = 5.8 Hz y JH2'-H3' = 5.2 Hz; **4b**, JH1'-H2' = 6.2 Hz. Error ± 0.3 Hz.

La asignación y análisis de las señales correspondientes a H6(7)x y H6(7)n en el caso del compuesto 1 se ha llevado a cabo mediante experimentos de doble resonancia (DR) y la utilización como referencia de los datos descritos para norbornanos diferentemente sustituídos (Marshall, 1976, Abraham, 1985 y Marchard, 1982).

La saturación de la señal a 1.61 ppm sólo modifica la señal a 2.10 ppm que colapsa a un singlete ancho (W1/2 = 10 Hz),, por lo que se pueden asignar inequivocamente dichas señales a H6(7)n y H6(7)x. La saturación de la señal de H1(5) a 3.45 ppm no modifica de forma apreciable las señales a 2.20 ppm (H2(4)α) y a 1.61 ppm que presentan mayor resolución, con líneas más estrechas que en el espectro normal. La señal a 2.69 ppm (H2(4)β) se transforma en un doblete aparente, observándose sólamente la constante de acoplamiento ^{2}JH(4)$_\alpha$-H2(4)$_\beta$ = 15.9 Hz. Estos hechos confirman las consideraciones anteriores respecto a H2(4)α, H2(4)β y H1(5). La señal a 2.10 ppm se simplifica adoptando una forma simétrica a la que aparece a 1.61 ppm, si bien con menor resolución, de lo que cabe deducir que los protones que originan esta última señal presentan un acoplamiento de una magnitud muy pequeña con H1(5) y se ha asignado a H6(7)n, mientras que la señal a 2.10 ppm se ha atribuido a H6(7)x. De acuerdo con los datos descritos para sistemas norbornánicos (Wiseman, 1975 y Marshall, 1976) se ha admitido un valor del orden de 0.55 Hz para ^{3}JH6(7)n-H1(5), suficientemente pequeño para justificar el hecho de que la señal de H6(7)n no se modifique de forma apreciable al saturar la señal de H1(5) pero presente mayor resolución en estas condiciones.

Al saturar la señal de H1(5) los protones H6(7)x y H6(7)n constituyen un sistema de cuatro espines del tipo AA'BB' cuya resolución mediante la aplicación del programa de cálculo LAOCOON III (Castellano, 1963) permitió optimizar los valores de los parámetros magnéticos: δH6(7)x, δH6(7)n, ^{3}JH6x-H7x, ^{3}JH6x-H7n = ^{3}JH6n-H7x, ^{2}JH6n-H6x = ^{2}JH7n-H7x y ^{3}JH6n-H7n recogidos en las tablas I y II así como los errores más probables deducidos de este análisis.

El valor de la constante de acoplamiento ^{3}JH6(7)x-H1(5) no se ha podido determinar debido a la pequeña resolución de la señal de H6(7)x que no permite un análisis fiable de la misma.

Teniendo en cuenta la similitud de los espectros de 1-5 se puede considerar que las constantes de acoplamiento de los protones del puente etilénico H6(7)x y H6(7)n tienen, prácticamente, la misma magnitud en todos los casos. En este sentido los valores obtenidos para 4 se pueden proponer como valores promedio para el análisis de estos sistemas.

^{13}C RMN

Los desplazamientos químicos de los compuestos 1-5 se encuentran recogidos en la Tabla III. Los efectos estéricos y electrónicos en los desplazamientos químicos de ^{13}C así como la multiplicidad de las señales obtenidas en los espectros parcialmente acoplados han sido tenidas en cuenta.

TABLA III

^{13}C Desplazamientos químicos de los compuestos 1-5 (ppm)[a]

Desplazamientos δ(ppm)	1	2	3	4	5
C-6(7) (t)	27.80	27.89	27.89	27.59	28.74
C-2(4) (t)	47.57	48.24	47.86	47.75	45.48
C-1(5) (d)	60.84	58.65	59.22	58.98	55.79
C-3 (s)	208.85	209.50	209.40	208.94	209.09
C-1	38.29 (q)	55.20 (t)	52.69 (t)	50.09 (t)	45.66 (d)
C-2			60.20 (t)	30.16 (t)	22.17 (q)
C-3				63.11 (t)	22.17 (q)

[a] Medidos directamente de los espectros.Error ± 0.05 ppm. Multiplicidad de señal obtenida en los espectros desacoplados de "off-resonance".
[b] Carbonos aromáticos: C1(s) 139.49 C2(6) (d) 128.35[c,d] C8(5)(d) 128.41[c,d] 127.09[d]
[c] Los valores pueden ser intercambioados.
[d] Esta señal se asignó en los espectros acoplados de protón.

Los espectros de ^{13}C totalmente acoplados presentan señales muy complejas. Su análisis de primer orden (Werhli, 1988; Breitmaier 1987 y

Marshall, 1983) ha permitido deducir las constantes de acoplamiento a un enlace de todos los átomos de carbono ^{1}JC-H, así como algunas constantes de acoplamiento ^{2}JC-H y ^{3}JC-H. Los valores obtenidos para las constantes de acoplamiento de los carbonos del sistema tropánico son prácticamente los mismos en la serie estudiada. Los principales valores ^{1}JC1-H1 = 145.0 Hz, ^{1}JC2-H2 = 129.0, ^{1}JC6-H6 = 132, ^{2}JC3-H2(4) = 6.5, ^{3}JC3-H1 = 7.5 Hz pueden ser propuestos.

Teniendo en cuenta la gran similitud de los parámetros magnéticos protónicos y de ^{13}C deducidos para los compuestos **1-5** se puede considerar que su estructura viene descrita mayoritariamente por la misma conformación en todos los casos, independientemente de la diferente naturaleza del radical unido al átomo de nitrógeno. Dicha conformación presenta los anillos de pirrolidina y piperidona con una conformación de sobre plegada en N8 y de silla aplanada en C3.

Estas conclusiones vienen avaladas por los siguientes datos experimentales. En los espectros de ^{1}H RMN la anchura media de la señal correspondiente a los protones cabeza de puente es del orden de 11.5 Hz que corresponde a un sistema tropánico con el anillo piperidinico en conformación de silla aplanada (Trigo, 1981 y Gálvez, 1983). ^{3}JH2(4)β-H1(5) ~ 4.12 Hz es mayor que ^{3}JH2(4)α-H1(5) < 2 Hz y, en consecuencia el ángulo diedro H2(4)β-C-C-H1(5) es menor que H2(4)α-C-C-H1(5) que debe estar próximo a 90° de acuerdo con la relación de Karplus (Haasnoot, 1980), y están de acuerdo con una conformación de silla aplanada para el anillo de piperidónico. La práctica constancia de acoplamiento ^{3}JH2(4)β-H1(5) confirma que la forma y volumen del agrupamiento unido al átomo de nitrógeno no modifica sensiblemente la conformación del anillo piperidónico.

En base a las consideraciones anteriormente expuestas, tanto los desplazamientos químicos como las constantes de acoplamiento referidos a H6(7)x y H6(7)n no se modifican apreciablemente al variar la naturaleza del anillo unido al átomo de nitrógeno, por lo que cabe pensar que la conformación de dicho anillo también permanece invariable a efectos prácticos. Al igual que en norbornanos diferentemente sustituidos ^{3}JH6(7)n-H1(5) es menor que ^{3}JH6(7)x-H1(5) y muy próxima a 0 por lo que el ángulo diedro H6(7)n-C-C-H1(5) debe ser del orden de 90°. Asimismo, ^{3}JH6x-H7x es mayor que ^{3}JH6n-H7n por lo que su interacción con el enlace del grupo oxo no sería significativa, ,lo que avala una conformación de silla aplanada del anillo piperidónico y una interacción preferente de los enlaces exo y endo con el átomo de nitrógeno.

La conformación de silla adoptada por el anillo de piperidona se confirma en el espectro de ^{13}CRMN por los desplazamientos químicos de los

C2(4). Para una conformación de bote, las señales correspondientes a estos carbonos estarían desplazadas a campo más alto a causa del efecto de comprensión estérica debido al eclipsamiento entre los átomos de hidrógeno H2(4)β-H1(5). La variación de los desplazamientos químicos de C1(5) en los compuestos **1-5** está de acuerdo con el efecto γ-apantallante ejercido por el agrupamiento unido al átomo de nitrógeno.

Los desplazamientos químicos de C6(7) no se afectan considerablemente por la variación de los sustituyentes unidos al átomo de nitrógeno. En el caso de **1,3-5** los desplazamientos químicos de C2(4) se pueden considerar constantes, con un valor medio de 47.85 ppm, observándose un apantallamiento de 2.37 ppm en **2**. Estos hechos se pueden justificar teniendo en cuenta que el confórmero con el sustituyente del nitrógeno en posición axial con respecto al anillo de piperidona en el equilibrio de inversión del nitrógeno A B (Fig. 8) es el más favorable, lo cual parece ser debido a que el aplanamiento del anillo de piperidona para adaptarse a la hibridación sp^2 del carbono carbonílico disminuye las interacciones 1,3-diaxiales.

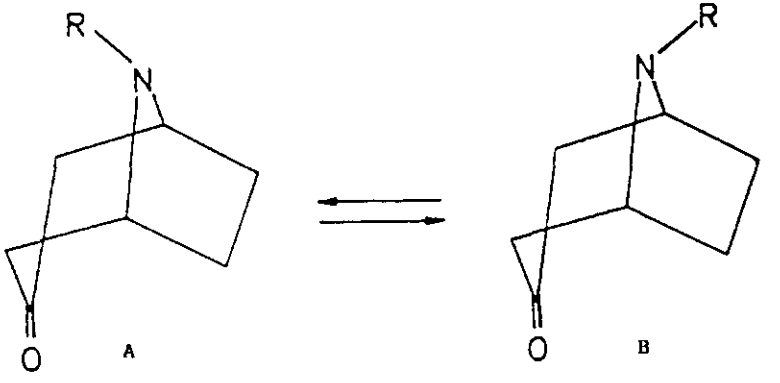


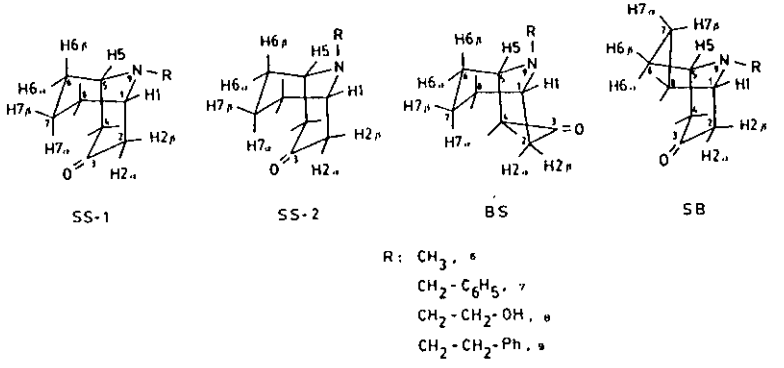
Figura 8.

Por tanto, la estructura de los compuestos **1-5** viene descrita preferentemente por una conformación de sobre plegado y silla aplanada para los anillos de pirrolidina y piperidona, con un ligero predominio del confórmero que situa el sustituyente sobre el átomo de nitrógeno en disposicióon axial con respecto al anillo de piperidona.

1.2. Sistema del granatano

El estudio conformacional de 9-azabiciclo[3.3.1]nonan-3-onas-9-sustituidas (norgranatanonas N-sustituidas) resulta de interés por la influencia que sobre la conformación preferida ejercen los diferentes sustituyentes. Los parámetros espectroscópicos de ^{1}H y ^{13}CRMN han sido ampliamente utilizados para el análisis conformacional de estos sistemas bicíclicos (Wiseman, 1977; Barrelle, 1978 y Senda, 1981). Sin embargo, debido a la complejidad de los espectros de ^{1}H RMN los parámetros magnéticos protónicos no se han detallado suficientemente.

A continuación, se describe el estudio conformacional de los compuestos 6-9 (Esquema 2) por espectroscopía de ^{1}H RMN (360 y 500 MHz) y ^{13}C RMN (20 MHz) (Arias, 1989). También se describe el análisis de las constantes de acoplamiento vecinal ^{1}H-^{1}H mediante la aplicación de la ecuación empírica propuesta por Altona (Haasnoot 1980) para deducir las conformaciones preferidas de los compuestos 6-9 en $CDCl_3$.



Esquema 2.

1.2.1.- Análisis espectroscópico.

Los espectros ^{1}H y ^{13}C RMN de los compuestos 6-9 presentan una gran similitud. El compuesto 6 se ha estudiado más detalladamente por ^{1}H RMN (500 MHz), espectro de correlación homoescalar, modalidad COSY 45 y técnicas de doble resonancia (DR).

Las asignaciones de los desplazamientos químicos de ^{13}C RMN se han realizado teniendo en cuenta los efectos estéricos y electrónicos ejercidos

por los diferentes sustituyentes, las multiplicidades obtenidas en los espectros parcialmente acoplados y los espectros totalmente acoplados.

Espectros de ^1H RMN

Las señales correspondientes a H1(5), $H2(4)_\beta H6(8)_\beta$ y las debidas a los protones de los sustituyentes unidos al átomo de nitrógeno, aparecen bien diferenciadas en todos los casos. La región del espectro a campo más alto es más compleja y corresponde a las señales de los protones H6(8)α, H7β y H7α las cuales aparecen muy próximas y con solapamientos parciales. La señal debida a H1(5) aparece como un singlete ancho (W1/2 13-14 Hz) y la de $H2(4)_\beta$, como doblete de dobletes. La señal de $H2(4)_\alpha$ aparece como un doblete debido al acoplamiento general con $H2(4)_\beta$, no observándose acoplamiento vecinal con H1(5) que debe ser de pequeña magnitud y para el que se ha estimado un valor límite de 2Hz en función de W1/2 de las líneas del doblete.. Los protones H6(8)β aparecen aparentemente como triplete de tripletes; por eso |2JH6(8)α-H6(8)β|~ ^{3}JH6(8)β-H7α y ^{3}JH6(8)β-H1(5) ~ ^{3}JH6(8)β-H7β.. Los acoplamientos de largo alcance entre los protones con una disposición en W no se observan en las condiciones de registro de los espectros utilizadas.

Para el compuesto 6 se ha realizado el espectro de ^{1}H RMN (500 MHz) aplicando la multiplicación de Gauss para aumentar la resolución, el espectro de correlación homoescalar COSY 45 (Fig. 9) y técnicas de doble resonancia.

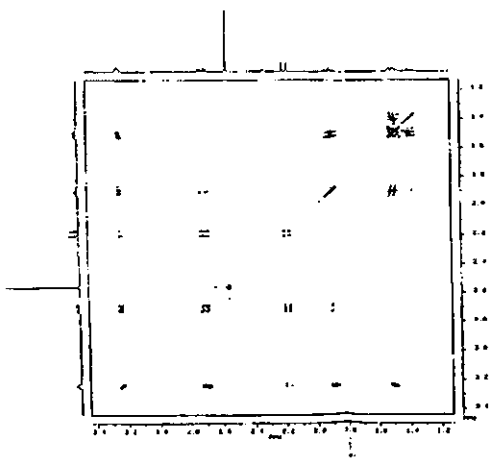


Fig. 9

Del estudio de las correlaciones cruzadas, observadas en el espectro, se llega a la conclusión de que las señales a 3.24, 2.70 y 1.90 ppm pueden asignarse inequívocamente a los protones H1(5) H2(4)βH2(4)α y H6(8)β,

respectivamente. La consideración de estas correlaciones permite establecer los siguientes hechos:

- El multiplete a campo más alto centrado aproximadamente 1.40 ppm no se correlaciona con los protones H1(5) y debe corresponder a los protones H7α o H7β. No obstante, debido a su forma, puede ser asignado, en principio a H7α.
- El multiplete centrado a 1.50 ppm se correlaciona con H1(5), H6(8)β y con la señal a 1.40 ppm y debe corresponder a H6(8)α.
- La señal correspondiente a $H2(4)_\alpha$ presenta una débil correlación con la de H1(5). Esto concuerda con un valor pequeño para $^3JH2(4)\alpha$-H1(5).

- La débil correlación observada entre H2(4)β y H6(8)β pone de manifiesto un acoplamiento a largo alcance entre estos protones debido a su disposición en W.
- Las señales correspondientes a los protones H7β y H6(8)α que aparecen a 1.45 ppm se encuentran parcialmente solapadas.

Estas suposiciones fueron corroboradas mediante técnicas de doble resonancia.

El análisis de los espectros de ^1H RMN en $CDCl_3$ a 360 MHz de los compuestos 7-9 se ha llevado a cabo utilizando como referencia los datos deducidos previamente para 6 y se describen en las Tablas IV y V

TABLA IV

Desplazamientos químicos de ^1H-RMN de 9-azabiciclo [3.3.1]nonan-3-onas 9-sustituidas, δ (ppm).

Desplazamientos químicos[a]	6	7	8	9
H1 (5) (s,a)	3.24, W 1/2 13.0 Hz	3.32, W 1/2 13.0 Hz	3.37, W 1/2 14.0 Hz	3.40 W 1/2 13.5 Hz
$H2(4)_\beta$ (dd)2.70	2.74	2.70	2.68	
$H2(4)_\alpha$ (d aparente)	2.19	2.26	2.29	2.25
$H6(8)_\beta$ (m) 1.90 (0.01)	1.95	1.92	1.92	
$H6(8)_\alpha$ (m) 1.51 (0.01)	2.52[c]	1.60[c]	1.54[c]	
$H7_\beta$ (m)[b]	1.48 (0.01)	1.6	1.5	1.5
$H7_\alpha$ (m)	1.39 (0.01)	1.45	1.46	1.46
H1'	2.56 (s)	3.91 (s)	2.91 (t)	2.92 (0.01) (m)[d]
H2'			3.63 (t)	2.82 (0.01) (m)[d]
Ph (m)		7.33 (m)[c]		7.26 (m)[c]
OH (s,a)			4.83	

[a] Abreviaturas: a, ancho; d, doblete; dd, doblete de dobletes; m, múltiples; s, singlete; t, triplete. Los valores de δ se han deducido del análisis de primer orden de los correspondientes protones con un error de ± 0.05 ppm, excepto para los casos indicados (en paréntesis) donde se han calculado por aplicación del programa LAOCOON III. [b] Esta señal está parcialmente oculta por la señal de $H6(8)_\alpha$. [c] Multipletes de baja resolución; el desplazamiento químico tabulado corresponde al centro del multiplete. [d] H1' y H2', protones metilénicos del grupo fenetilo aparecen como un sistema de cuatro espines AA'BB'.

TABLA V

Constantes de acoplamiento deducidas del análisis de los espectros de ^{1}H-RMN de 9-aza-biciclo[3.3.1]nonan-3-onas 9-sustituidas, J (Hz)

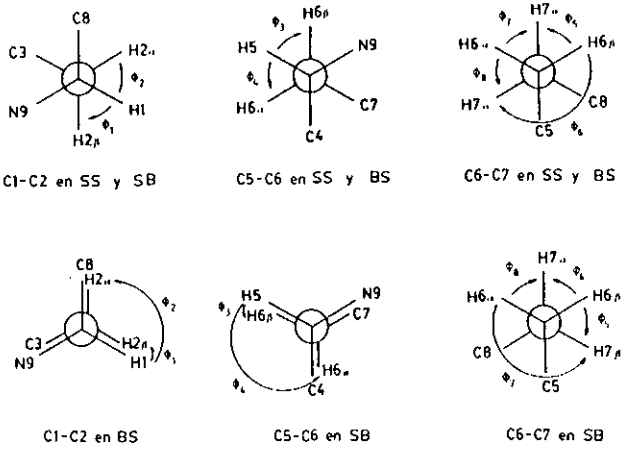
Constantes de acoplamiento[a]	6[b]	7	8[d]	9[e]
$H2(4)_\alpha$-$H2(4)_\beta$	-16.8	-16.6	-16.7	-16.7
$H2(4)_\alpha$-H1(5)[c]	< 2	< 2	< 2	< 2
$H2(4)_\beta$-H1(5)	6.3	6.6	6.6	6.5
$H6(8)_\alpha$-$H6(8)_\beta$	-13.61 (0.03)	-13.6	-13.6	-13.6
$H6(8)_\alpha$-H1(5)	2.12 (0.05)	f	f	f
$H6(8)_\alpha$-$H7_\alpha$	4.64 (0.05)	f	4.6	4.6
$H6(8)_\alpha$-$H7_\beta$	2.10 (0.05)	f	f	f
$H6(8)_\alpha$-H1(5)	4.78 (0.03)	4.6	4.6	4.6
$H6(8)_\beta$-$H7_\alpha$	13.71 (0.03)	13.6	13.6	13.6
$H6(8)_\beta$-$H7_\beta$	4.48 (0.03)	4.6	4.6	4.6
$H7_\alpha$-$H7_\beta$	-14.86 (0.05)	f	-15.0	-14.8

[a] Valores deducidos del análisis del primer orden de los correspondientes sistemas de protones, con un error de ± 0.5 Hz, excepto para los casos indicados (en paréntesis) dende han sido calculados por aplicación del programa LAOCOON III. [b] El análisis del multiplete $H6(8)_{ax}$ de la cetona 6 (500 MHz) señala una constante de acoplamiento a larga distancia (disposición en W) ^{4}J $H2(4)_{ax}$-$H6(8)_{ax}$ = 0.87 ± 0.05 Hz. [c] Los protones metilénicos H1'(AA') y H2'(BB') del grupo fenetilo aparecen como un sistema de cuatro espines AA'BB' que han sido analizados por aplicación del programa LAOCOON III: ^{2}J HA-HA' = -12.56 ± 0.09 Hz; ^{3}J HA-HB = ^{3}J HA'-HB' = 5.90 ± 0.05 Hz; ^{3}J HA-HB' = ^{3}JH HA'-HB = 9.4 ± 0.05 Hz; ^{2}J HB-HB' = -12.51 ± 0.09 Hz.[d] La constante de acoplamiento en el fragmento R se ha medido directamente en el espectro ^{3}J H1'-H2' = 5.4 ± 0.5 Hz. [e] ^{3}J $H2(4)_\alpha$-H1(5) es muy pequeña y sólo se puede estimar un valor aproximado. [f] Estas constantes de acoplamiento no se han podido determinar debido a la baja resolución y/o al solapamiento de las correspondientes señales.

1.2.2.- Estudio conformacional

Sin tener en cuenta la forma mas desfavorable bote-bote, el sistema de granatanona puede adoptar cuatro conformaciones representadas en el esquema 2: dos formas silla-silla (SS-1 y SS-2) interconvertibles por inversión através del átomo de nitrógeno y dos formas silla-bote (BS y SB).

Los parámetros de protón más significativos para el estudio conformacional son las constantes de acoplamiento vecinal para los sistemas rotacionales C1-C2 (o C5-C4), C5-C6 (o C1-C8) y C6-C7 (o C8-C7) y el valor de W1/2 para la señal correspondiente a H1(5). Para establecer la distribución conformacional y deducir la conformación preferida adoptada por los compuestos 6-9, se han aplicado las siguientes ecuaciones (Eliel, 1965 y Jackman, 1978).



Esquema 3

$$J^{obs}=\sum_{i=1}^{n} N_i J_i^{o} \qquad (1)$$

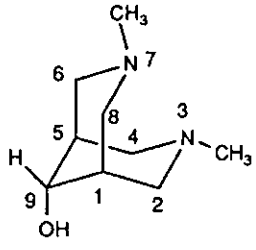
$$\sum_{i=1}^{n} N_i=1 \qquad (2)$$

Donde J^{obs} es el valor experimental de la constante de acoplamiento, N_i es la fracción molar del i-ésimo confórmero y J_i^{o} es el valor del mencionado parámetro para este confórmero.

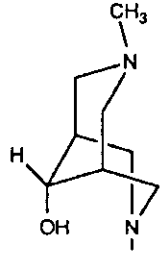
La aplicación de estas ecuaciones a las constantes de acoplamiento vecinal ^1H-^1H observadas para los sistemas rotacionales C1-C2, C5-C6 y C6-C7, supone una evaluación previa de los acoplamientos (J_i^{o}) de los confórmeros SS-1, SS-2, BS y SB. Esta evaluación se ha llevado mediante la ecuación empírica propuesta por Altona y col, que relaciona las constantes de acoplamiento entre los protones de un fragmento H-C-C-H con los valores

de los ángulos diedros, la electronegatividad de los sustituyentes unidos al sistema rotacional y sus orientaciones con respecto a los protones acoplados.

En el esquema 3 se definen los ángulos diedros (ϕ_{ij}) de los fragmentos H-C-C-H. Los cálculos de las constantes de acoplamiento modelo ($J_i°$) se han llevado a cabo Haciendo uso de la escala de Huggings (Huggins, 1953) para calcular las electronegatividades de los sustituyentes (ΔX_i) y teniendo en cuenta para la geometría de los confórmeros dos hipótesis alternativas:
a) Una geometría ideal para las conformaciones sillas y botes de los ciclos de seis miembros (valores para los ángulos diedros de 0°, 60°, 120° o 180°.
b) Una geometría distorsionada para los confórmeros silla-silla con aplanamiento de los ciclos de piperidina y piperidona.



10a



10b

Esquema 4.

Los resultados se recogen en la tabla VI.

Asumiendo la hipótesis b se han considerado diferentes grados de distorsión por cambio de los respectivos ángulos diedros.

La serie de valores recogidos en la Tabla VI (entradas 2, 5, 8, 11, 14, 17 ,20, 23) son aquellos que reproducen con éxito las constantes de acoplamiento del compuesto 6.

La participación del confórmero SB con el ciclo de piperidina en conformación bote puede descartarse por comparación de las constantes de acoplamiento experimentales y las calculadas para el sistema rotacional C6-C7, considerando una conformación silla o bote (geometría ideal, hipótesis a) para este ciclo. La aplicación de las ecuaciones (1) y (2) a ^{3}JH6β-H7β y ^{3}JH6α-H7α conduce a valores de ^{3}J que no concuerdan con los observados,

mientras que si se tiene en cuenta ^{3}JH6β-H7α se deduce una participación del 2% para dicho confórmero SB.

Si asumimos una conformación de silla aplanada para el ciclo de piperidina (Tabla VI, entradas 8, 11, 14, 17, 20, 23) las constantes de acoplamiento concuerdan con las calculadas.

Aplicando un tratamiento similar a ^{3}J-H1-H2β y ^{3}JH1-H2α se puede establecer una contribución del 40% aproximadamente, para el confórmero BS con el ciclo de piperidona en una conformación de bote ideal. Sin embargo, si esto fuera cierto la ^{3}JH1-H2α debería tener un valor de 3.5 Hz, mayor que se ha estimado experimentalmente (valor límite de 2Hz). De todo lo anterior se deduce, que los valores experimentales están más en concordancia con una conformación de silla aplanada para el ciclo de piperidona.

De la aplicación de la ecuación de Altona se puden estimar los valores de los ángulos diedros H1(5)-C-C-H2(4)β(ϕ_1) y H1(5)-C-C-H2(4)α(ϕ_2) en aproximadamente, 40° y 70° respectivamente (Tabla VI, entradas 2 y 5).

Teniendo en cuenta la similitud de los parámetros protónicos de los compuestos 6-9, se puede suponer un comportamiento similar y pueden describirse como dos confórmeros silla-silla aplanadas SS-1 y SS-2 en equilibrio. La mayor distorsión del ciclo de piperidona puede atribuirse,, como en el caso de las tropinonas, a la presencia de un carbono carbonílico con hibridación sp2 que facilita el aplanamiento del ciclo.

En los espectros de ^{13}C RMN se han observado pequeñas diferencias en los desplazamientos químicos en los carbonos del sistema bicíclico. La variación de los desplazamientos químicos de C1(5) está de acuerdo con el efecto γ-apantallante ejercido por los sustituyentes unido al átomo de nitrógeno (Tabla VII). Los valores de δC6(8) no se afectan por la variación de los sustituyentes sobre el átomo de nitrógeno. La sustitución del grupo metilo de 6 por un bencilo (7), hidroxietilo (8) y fenetilo (9) ejerce un desplazamiento a campo más bajo en la señal correspondiente a C2(4) de 0.92, 1.08 y 0.7 ppm respectivamente, lo cual se atribuye a efectos estéricos δ. Estos efectos desapantallantes indican que las conformaciones con el sustituyente sobre el átomo de nitrógeno en posición axial respecto al ciclo de piperidona, SS-1, son las preferidas frente a las conformaciones con el sustituyente en posición axial respecto al ciclo de piperidona, SS-1 son las preferidas frente a las conformaciones con el sustituyente axial respecto al ciclo de piperidina. Esta preferencia es probablemente el resultado de la presencia de un carbono trigonal en el ciclo de piperidona, conduciendo a un mayor aplanamiento de este ciclo y al consiguiente desplazamiento de los átomos H2(4)β para alejarse lo más posible del sustituyente en posición axial sobre el átomo de nitrógeno.

TABLA VI

Constantes de acoplamiento vecinal modelo calculadas a partir de la ecuación de Altona[a]

Entrada	Confórmero	Angulo diedro	(°)	Constantes de acoplamiento	J_i^o (Hz)	J^{obs} (Hz)
1	SS, SB		60		3.39	
2	SS, SB	ϕ_1	41	H1-C1-C2-H2$_\beta$	6.25	6.3
3	BS		0		9.82	
4	SS, SB		-60		2.62	
5	SS, SB	ϕ_2	-70	H1-C1-C2-H2$_\alpha$	1.63	<2
6	BS		-120		4.62	
7	SS, BS		60		3.39	
8	SS, BS	ϕ_3	51	H5-C5-C6-H6$_\alpha$	4.70	4.78
9	SB		0		9.82	
10	SS, BS		-60		2.62	
11	SS, BS	ϕ_4	-64	H5-C5-C6-H6	2.17	2.12
12	SB		-120		4.62	
13	SS, BS		-60		3.11	
14	SS, BS	ϕ_5	-53	H6β-C6-C7-H7β	4.42	4.48
15	SB		60		2.99	
16	SS, BS		180		13.92	
17	SS, BS	ϕ_6	186	H6β-C6-C7-H7α	13.80	13.71
18	SB		-60		2.97	
19	SS, BS		60		2.63	
20	SS, BS	ϕ_7	65	H6α-C6-C7-H7β	2.20	2.10
21	SB		180		13.92	
22	SS, BS		-60		3.71	
23	SS, BS	ϕ_8	-51	H6α-C6-C7-H7α	4.70	4.64
24	SB		60		3.11	

[a] ^3J HH = 13.22 $\cos^2\phi$ - 0.99 $\cos\phi$ + $\Sigma\Delta x_i[0.87\text{-}2.46\cos^2(\xi_i\phi + 19.9\,|\Delta x_i|)]$ (3 sustituyentes) para las entradas 1-12.

^3J HH = 13.89 $\cos^2\phi$ - 0.98 $\cos\phi$ + $\Sigma\Delta x_i[1.02 - 3.40\cos^2(\xi_i\phi + 14.9\,|\Delta x_i|)]$ (2 sustituyentes) para las entradas 13-24.

TABLA VII

Desplazamientos químicos de ^{13}C-RMN de 9-azaciciclo[3.3.1]nonan-3-onas 9-sustituidas

Desplazamientos químicos δ (ppm)[a]	6	7	8	9
C7 (t)	16.03	16.57	16.38	16.48
C6(8) (t)	29.52	29.38	29.72	29.62
C2(4) (t)	41.85	42.77	42.93	42.57
C1(5) (d)	55.68	53.52	54.24	54.12
C3 (s)	210.29	211.06	210.68	210.84 (t)
C1'	41.06 (c)	57.01 (t)	54.50 (t)	54.84 (t)
C2'			58.89 (t)	35.49 (t)
C1'' (s)[b]		139.26		140.28
C2''(6'') (d)[b,c]		128.30		128.72
C3''(5'') (d)[b,c]		128.30		128.26
C4'' (d)		127.07		126.00

[a] Medidos directamente de los espectros; error ± 0.05 ppm; Multiplicidad de la señal obtenida de los espectros off-resonance; d, doblete; c, cuadruplete; s, singlete. [b] Carbonos aromáticos. [c] Estas señales se asignaron en los espectros acoplados de protón.

En consecuencia con todo lo dicho hasta ahora, se puede establecer que, en disolución de deuterocloroformo los compuestos 6-9 se encuentran en equilibrio entre dos conformaciones silla-silla aplanadas por inversión através del átomo de nitrógeno. El ciclo de piperidona está más aplanado que el de piperidina y existe una ligera preferencia por la forma con el sustituyente sobre el átomo de nitrógeno en posición axial con respecto al ciclo de piperidona.

En conformidad con los resultados obtenidos por aplicación de la ecuación de Altona se puede afirmar que la contribución de los confórmeros con los ciclos de piperidina o piperidona en conformación bote, debe ser pequeña.

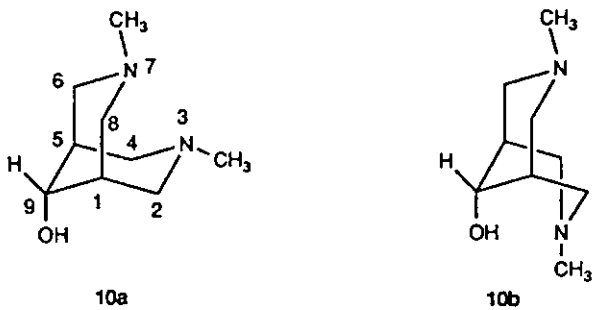
1.3 Sistema de la bispidina

Como representante de este sistema se ha seleccionado en 3,7-dimetil-3,7-diazabiciclo[3.3.1]nonan-9-ol (10, esquema 4).

1.3.1.- Análisis espectroscópico

Espectros infrarrojos

Como se deduce del estudio de Rayos X (Gálvez, 1985), este compuesto critaliza con dos moléculas de agua y una de etanol, en su espectro infrarrojo en KBr se observa una banda ancha de absorción entre



Esquema 4

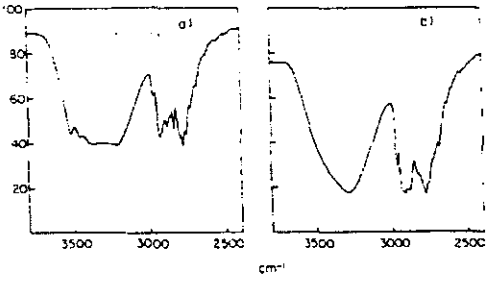
3600 y 3100 cm^{-1} debido a la existencia de diferentes enlaces por puente de hidrógeno; las bandas a 3520 y 3480 cm^{-1} se atribuyen al agua de cristalización y la absorción entre 3400 y 3200 cm^{-1} al grupo OH de la molécula asociado con moléculas de disolvente (Figura 10).

La forma cristalina **10b**, cristaliza sin moléculas de agua. En el espectro infrarrojo en estado sólido se observa en la región del OH un máximo de absorción a aproximadamente 3300 cm^{-1} (Figura 10). La posición de este máximo no varía cuando el espectro se registra en $CDCl_3$ o CCl_4, lo que indica la existencia de enlaces intramoleculares O-H...N y por tanto una disposición bote para uno de los anillos de piperidina.

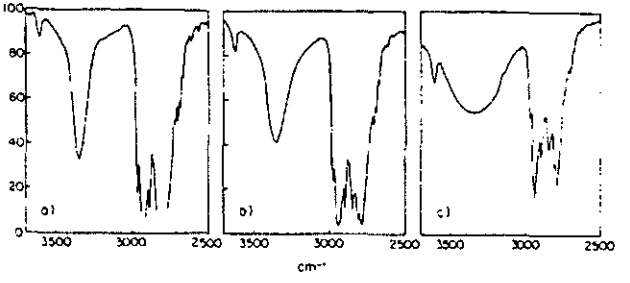
No se observan diferencias significativas entre los espectros infrarrojos de la forma **10a** y **10b**, lo cual sugiere que en **10a** los pares de electrones no compartidos de ambos nitrógenos están implicados en enlaces. De hecho, los estudios de difrección de Rayos X muestran que ambos nitrógenos están unidos por puente de hidrógeno bien con moléculas de agua o de alcohol. Si esto no fuese así, la intensidad de las bandas de infrarrojo en la región 2850-2600 cm^{-1}, bandas de Bolhmann (Bolhmann, 1975), debía ser mayor en **10a** que en **10b**. Sin embargo, la intensidad total de las bandas de Bolhmann es algo mayor en **10a** (conformación silla-silla).

Se ha observado, además, que los dos confórmeros **a** y **b** del alcohol **10**, están presentes en las disoluciones del mismo y la forma predominante depende de la polaridad del disolvente.

Así del estudio del espectro IR de este alcohol en distintos disolventes (Tabla VIII) se deduce que en CCl_4 y CS_2 predomina la conformación silla-bote como indica la fuerte absorción a 3350 cm^{-1} debidas a enlaces intramoleculares, mientras que a 3620 cm^{-1} aparece una banda poco intensa



Espectro IR del compuesto **10** en KBr (a) **10a**; (b) **10b**



Espectro IR de **10** (a) en disolución 0.002 M de CS_2 (l = 2 cm); (b) en disolución 0.001 M de CCl_4 (l = 4 cm); (c) en disolución 0.12 M de $CDCl_3$ (l = 0.5 mm)

Figura 10

debida a los grupos OH libres correspondientes a la forma silla-silla.

En solución de deuterocloroformo, de nuevo coexisten las dos formas como indica la presencia de una banda ancha intensa centrada a 3280 cm^{-1} (enlace O-H...N intramolecular) y la de una banda débil a 3605 cm^{-1} (OH libre).

En $(CD_3)_2SO$ predomina la conformación silla-silla, puesto que a 3345 cm^{-1} aparece una banda ancha que se asigna a los grupos OH asociados con el disolvente, y además, también se observa en este caso un aumento de la absorción correspondiente a las bandas de Bolhmann.

TABLA VIII

Frecuencias de vibración del OH (cm^{-1}) para el 3,7-dimetil-3,7-dimetil-3,7-diazabiciclo[3.3.1]nonan-9-ol (10)

Compuesto	Medio	Libre	Intra	Inter
10a	KBr			3520
			3482	
			3380	
			3280	
10a	$(CD_3)_2So$			3345
10b	KBr		3280	
10b	CCl_4	3620	3350	
10b	CS_2	3608	3350	

Espectros de RMN

Los datos de ^1H y ^{13}C RMN de **10** se muestran en las tablas X-XI.. Los acoplamientos en el espectro de protón se han deducido por un análisis de primer orden de los espectros a 360 MHz.

Para el compuesto 10 en $(CD_3)_2SO$, la conformación preferente es la de silla-silla con el anillo de piperidina que contiene el grupo OH en posición axial más aplanado, para evitar las interacciones 1,3-sindiaxiales con los protones H2(4) axial. Estas conclusiones se basan en lo siguiente:

- La señal correspondiente a H1(5) aparece como un singlete ancho.
- ^{3}JH(8)ax-H1(5) ~ ^{3}JH6(8)ec-H1(5) ~ 2 Hz corresponde a un anillo de piperidina ligeramente aplanado (Casy, 1974).
- ^{3}JH2(4)ax-H1(5) es mayor que ^{3}JH2(4)ec-H1(5) y por tanto el ángulo diedro H2(4)ax-C-C-H1(5) es menor que H2(4)ec-C-C-H1(5).
- La señal de H2(4)ax aparece a campo menor que la correspondiente a $H6(8)_{ax}$ debido al desapantallamiento de H2(4)ax por su proximidad al grupo hidroxilo y a la disminución de la trans coplanaridad con respecto al par de electrones no compartido del átomo de nitrógeno. Estos mismos efectos hacen que la señal correspondiente a C2(4) aparezca a campo más alto que la de C6(8).

Para el compuesto 10 en $CDCl_3$ la conformación preferida es la silla-bote estabilizada por enlaces de hidrógeno intramoleculares.

La conformación bote para uno de los anillos de piperidina está avalada por los siguientes resultados: (a) El desapantallamiento ($\Delta\delta$ = 0.3 ppm) de H2(4)ec (bote 10b) con respecto a $H6(8)_{ec}$ (silla 10a) y (b) el

desapantallamiento ($\Delta\delta$ = 0.4 ppm) de H1(5) de **10b** con respecto a H1(5) de **10a**. Ambos hechos son debidos al desplazamiento de la densidad electrónica de los correspondientes enlaces C-H hacia los respectivos átomos de carbono; este desplazamiento también explica el apantallamiento ($\Delta\delta$ = 4.5 ppm) de la señal correspondiente a C2(4) de **10b** con respecto a la de C6(8). La señal correspondiente a H1(5) (doblete) y la correspondiente a H2(4)ec (triplete) muestran un acoplamiento (~ 10 Hz) que es típico de protones vecinales eclipsados en sistemas piperidínicos (Casy, 1974).

1.3.2 Métodos Teóricos

En el compuesto **10a** se ha llevado a cabo el estudio teórico por el método semiempírico AM1 implementado en el programa AMPAC (Dewar, 1986; Liotard, 1989) para predecir su estructura, (Alcolea, 1991). Para la evaluación de la exactitud de la geometría punto de partida anterior a los cálculos, y para revisar las geometrías optimizadas después de los cálculos, se aplicó el programa DRAW (Storch, 1984).

TABLA IX

Desplazamientos químicos de ^{1}H-RMN en $CDCl_3$ y $(CD_3)_2SO$ para el 3,7-dimetil-3,7-diazabiciclo[3.3.1]nonan-9-ol (10)

δ (ppm)	10$CDCl_3$	10$(CD_3)_2SO$
H1(5) (d)	2.05	1.68
H2(4)ec	3.00 (t)	2.46 (d)
H6(8)ec	2.70 (d)	2.77 (dd)
H2(4)ax	2.54 (m)	2.54 (dd)
H6(8)ax	2.10 (m)	2.12 (dd)
H9	3.47 (t)	3.44 (t)
N-CH_3	2.23 (s)	2.03 (s)

TABLA X

Constantes de acoplamiento del 3,7-dimetil-3,7-diazabiciclo[3.3.1]nonan-9-ol (10).

J (Hz)	10	
	$CDCl_3$	$(CD_3)_2SO$
H2(4)ax-H2(4)ec	10	10.6
H6(8)ax-H6(8)ec	10.8	11.6
H9-H1(5)	1.8	3.5
H2(4)ax-H1(5)		3.3
H6(8)ax-H1(5)		2.2

TABLA XI

Desplazamientos químicos de ^{13}C-RMN en $CDCl_3$ del 3,7-dimetil-3,7-diazabiciclo[3.3.1]nonan-9-ol (10)

δ (ppm)	10
C1(5)	35.57
C2(4)	54.88
C6(8)	60.14
C9	70.89
CH_3	45.37
CH_3	46.01

Optimización de la geometría

Los valores óptimos de longitudes de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros se muestran en las tablas XII, XIII y XIV. Los cálculos se hicieron sin fijar ningún parámetro. Así todos los datos geométricos se variaron y optimizaron.

TABLA XII

Longitudes de enlace optimizadas (en Å) para el compuesto 10a

Longitudes de enlace	AM1	Experimental	
		Molécula A	Molécula B
r C(1)-C(2)	1.5301	1.572	1.560
r C(2)-C(3), C(4)-C(6)	1.5309, 1.5314	1.528, 1.520	1.500, 1.493
r C(1)-C(4)	1.5297	1.522	1.548
r N(5)-C(3), C(6)-N(5)	1.4554, 1.4540	1.451, 1.453	1.452, 1.482
r C(2)-C(7), C(4)-C(8)	1.5317	1.560, 1.510	1.482, 1.485
r N(9)-C(7), C(8)-N(9)	1.4538, 1.4534	1.442, 1.475	1.447, 1.445
r C(10)-N(5), N(9)-C(11)	1.4456, 1.4445	1.480, 1.481	1.466, 1.503
r O(12)-C(1)	1.4197	1.409	1.371
r H(13)-C(1)	1.1272		
r C(2)-H(14), C(4)-H(15)	1.1228, 1.1235		
r C(3)-H(16), C(6)-H(17)	1.1315, 1.1325		
r C(8)-H(18), C(7)-H(19)	1.1322		
r C(3)-H(20), C(6)-H(21)	1.1264, 1.1268		
r C(8)-H(22), C(7)-H(23)	1.1270, 1.1272		
r C(10)-(H(24) or H(26))	1.1213		
r C(11)-(H(27) or H(29))	1.1213		
r C(10)-H(25), C(11)-H(28)	1.1256, 1.1259		
r H(30)-O(12)	0.9643		
r N(5)····N(9)	3.0149	2.892	

TABLA XIII
Angulos de enlace (en grados) para 10a

Angulos de enlace	AM1	Experimental	
		Molécula A	Molécula B
C(1)-C(2)-C(3)	109.88	110.3	106.2
C(2)-C(1)-C(4)	106.95	106.1	103.1
N(5)-C(3)-C(2)	114.62	112.3	113.9
C(6)-C(4)-C(1)	109.82	110.9	104.9
C(6)-N(5)-C(3)	114.73	114.1	110.6
N(5)-C(6)-C(4)	114.46	113.1	116.8
C(7)-C(2)-C(1)	108.29	103.9	111.6
C(7)-C(2)-C(3)	112.87	113.7	117.7
C(8)-C(4)-C(1)	108.65	108.1	113.3
C(8)-C(4)-C(6)	112.69	112.7	114.7
N(9)-C(7)-C(2)	114.81	117.2	112.4
N(9)-C(8)-C(4)	114.82	115.6	111.3
C(8)-N(9)-C(7)	115.51	109.6	109.3
C(10)-N(5)-C(3)	112.03	107.1	111.8
C(10)-N(5)-C(6)	112.00	110.5	112.0
C(11)-N(9)-C(7)	112.29	110.3	111.3
C(11)-N(9)-C(8)	112.21	112.3	108.0
O(12)-C(1)-C(2)	108.06	108.3	108.5
O(12)-C(1)-C(4)	113.09	112.4	111.8
H(13)-C(1)-(C(2),C(4))	110.30, 109.95		
H(13)-C(1)-O(12)	108.46		
C(1)-C(2)-H(14)	109.75		
H(14)-C(2)-(C(3),C(7))	107.69, 108.32		
C(1)-C(4)-H(15)	110.16		
H(15)-C(4)-(C(6),C(8))	107.63, 107.85		
C(2)-C(3)-(H(16),H(20))	107.08, 108.70		
N(5)-C(3)-(H(16),H(20))	111.31, 106.82		
C(4)-C(6)-(H(17),H(21))	107.09, 108.78		
N(5)-C(6)-(H(17),H(21))	111.45, 107.03		
C(4)-C(8)-(H(18),H(22))	107.48, 108.57		
N(9)-C(8)-(H(18),H(22))	111.41, 106.76		
C(2)-C(7)-(H(19),H(23))	107.59, 108.46		
N(9)-C(7)-(H(19),H(23))	111.40, 106.78		
H(20)-C(3)-H(16)	108.13		
H(21)-C(6)-H(17)	107.84		
H(22)-C(8)-H(18)	107.55		
H(23)-C(7)-H(19)	107.55		
N(5)-C(10)-(H(24),H(26))	108.74, 108.79		
H(25)-C(10)-N(5)	113.48		
H(25)-C(10)-(H(24),H(26))	108.48, 108.49		
H(26)-C(10)-H(24)	108.76		
N(9)-C(11)-(H(27),H(29))	108.79, 108.80		
H(28)-C(11)-N(9)	113.41		
H(28)-C(11)-(H(27),H(29))	108.49, 108.48		
H(29)-C(11)-H(27)	108.77		
H(30)-O(12)-C(1)	106.79		

TABLA XIV
Angulos de torsión (en grados) para 10a

Angulos de torsión	AM1	Experimental	
		Molécula A	Molécula B
C(3)-C(2)-C(1)-C(4)	−60.36	−58.7	−70.1
C(7)-C(2)-C(1)-C(4)	63.34	63.5	59.4
C(3)-C(2)-C(1)-O(12)	61.69	62.2	171.1
C(7)-C(2)-C(1)-O(12)	−174.61	−175.6	−59.4
C(1)-C(2)-C(3)-N(5)	53.36	55.9	61.8
C(1)-C(2)-C(3)-(H(16),H(20))	−70.63, 172.77		
C(1)-C(4)-C(6)-N(5)	−53.86	−56.3	−59.0
C(1)-C(4)-C(6)-(H(17),H(21))	70.20, −173.50		
C(1)-C(2)-C(7)-N(9)	−53.76	−59.2	−63.1
C(1)-C(2)-C(7)-(H(19),H(23))	70.86, −173.08		
C(1)-C(4)-C(8)-N(9)	52.97	58.7	58.0
C(1)-C(4)-C(8)-(H(18),H(22))	−71.59, 172.34		
C(2)-C(1)-C(4)-C(6)	60.62	58.6	67.4
C(2)-C(1)-C(4)-C(8)	−63.05	−65.4	−58.4
C(2)-C(3)-N(5)-C(6)	−44.89	−51.6	−48.0
C(2)-C(3)-N(5)-C(10)	−174.03	−174.3	−173.5
C(2)-C(7)-N(9)-C(8)	43.10	50.6	56.5
C(2)-C(7)-N(9)-C(11)	173.52	174.7	175.8
C(3)-N(5)-C(6)-C(4)	45.10	51.6	47.7
C(3)-N(5)-C(6)-(H(17),H(21))	−76.60, 165.71		
C(3)-C(2)-C(7)-N(9)	68.11	60.7	60.1
C(3)-C(2)-C(7)-(H(19),H(23))	−167.26, −51.20		
C(3)-N(5)-C(10)-(H(24),H(25))	−55.27, 65.55		
C(3)-N(5)-C(10)-H(26)	−173.57		
C(4)-C(6)-N(5)-C(10)	174.25	172.4	173.1
C(4)-C(8)-N(9)-C(7)	−42.62	−48.8	−53.9
C(4)-C(8)-N(9)-C(11)	−173.07	−171.7	−175.2
N(5)-C(3)-C(2)-C(7)	−67.62	−60.4	−64.1
N(5)-C(3)-C(2)-H(14)	172.87		
N(5)-C(6)-C(4)-C(8)	67.41	65.0	65.9
N(5)-C(6)-C(4)-H(15)	−173.80		
C(6)-C(4)-C(1)-O(12)	−58.22	−59.7	−176.2
C(6)-N(5)-C(3)-(H(16),H(20))	76.82, −165.35		
C(6)-C(4)-C(8)-N(9)	−68.98	−64.2	−62.4
C(6)-C(4)-C(8)-(H(18),H(22))	166.46, 50.40		
C(6)-N(5)-C(10)-H(24)	174.18		
C(6)-N(5)-C(10)-(H(25),H(26))	−65.00, 55.88		
C(7)-C(2)-C(3)-(H(16),H(20))	168.39, 51.79		
C(7)-N(9)-C(8)-(H(18),H(22))	79.85, −162.99		
C(7)-N(9)-C(11)-(H(27),H(28))	54.53, −66.30		
C(7)-N(9)-C(11)-H(29)	172.89		
C(8)-C(4)-C(1)-O(12)	178.11	176.4	58.0

TABLA XIV (CONTINUACIÓN)

Angulos de torsión	AM1	Experimental	
		Molécula A	M
C(8)-C(4)-C(6)-(H(17),H(21))	−168.53,	−52.23	
C(8)-N(9)-C(7)-(H(19),H(23))	−79.50,	163.35	
C(8)-N(9)-C(11)-H(27)	−173.39		
C(8)-N(9)-C(11)-(H(28),H(29))	65.79,	−55.03	
N(9)-C(7)-C(2)-H(14)	−172.74		
N(9)-C(8)-C(4)-H(15)	172.37		
C(10)-N(5)-C(3)-(H(16),H(20))	−52.32,	65.51	
C(10)-N(5)-C(6)-(H(17),H(21))	52.55,	−65.13	
C(11)-N(9)-C(7)-(H(19),H(23))	50.92,	−66.23	
C(11)-N(9)-C(8)-(H(18),H(22))	−50.60,	66.55	
H(13)-C(1)-C(2)-(C(3),C(7))	−179.90,	−56.20	
H(13)-C(1)-C(2)-H(14)	61.86		
H(13)-C(1)-C(4)-(C(6),C(8))	−179.62,	56.71	
H(13)-C(1)-C(4)-H(15)	−61.23		
H(13)-C(1)-O(12)-H(30)	74.43		
H(14)-C(2)-C(1)-(C(4),O(12))	−178.60,	−56.54	
H(14)-C(2)-C(3)-(H(16),H(20))	48.88,	−67.72	
H(14)-C(2)-C(7)-(H(19),H(23))	−48.12,	67.94	
H(15)-C(4)-C(1)-(C(2),O(12))	179.01,	60.17	
H(15)-C(4)-C(6)-(H(17),H(21))	−49.74,	66.56	
H(15)-C(4)-C(8)-(H(18),H(22))	47.80,	−68.26	
H(30)-O(12)-C(1)-(C(2),C(4))	−166.00,	−47.81	

La numeración de los átomos se representa en la figura 11. El punto de partida para la optimización de la geometría fueron los datos de la estructura cristalina (Gálvez, 1985) y aparecen en las tablas XII, XIII y XIV. Los diferentes tipos de estructura molecular de 10a que aparecen en el cristal, moléculas a y b, se relacionan también en estas tablas. Sin embargo, el método AM1 sólamente simula la molécula 10a aislada.

en general se encuentra una buena concordancia entre los resultados del método AM1 y los datos de difracción de Rayos X, especialmente en la molécula a. Sin embargo, se han notado las siguientes diferencias relevantes.

La distorsión encontrada en la conformación silla-silla que se refleja en el valor de r N(5)...N(9) (2.892 Å) que es debida a la fuerte interacción estérica entre los pares de electrones no compartidos (Gálvez, 1985), es aún mayor en la deducida por el método AM1 (3.014 Å), lo cual se atribuye a los efectos de empaquetamiento en la red cristalina.

Los valores descritos por difracción de Rayos X para la molécula **a** concuerdan mejor con los deducidos por el método de AM1 que los valores descritos para la molécula **b**. En este caso, se observa una diferente conformación para el átomo de oxigeno O(12). En consecuencia todas las comparaciones que se exponen a continuación se han llevado a cabo en la molécula **a**.

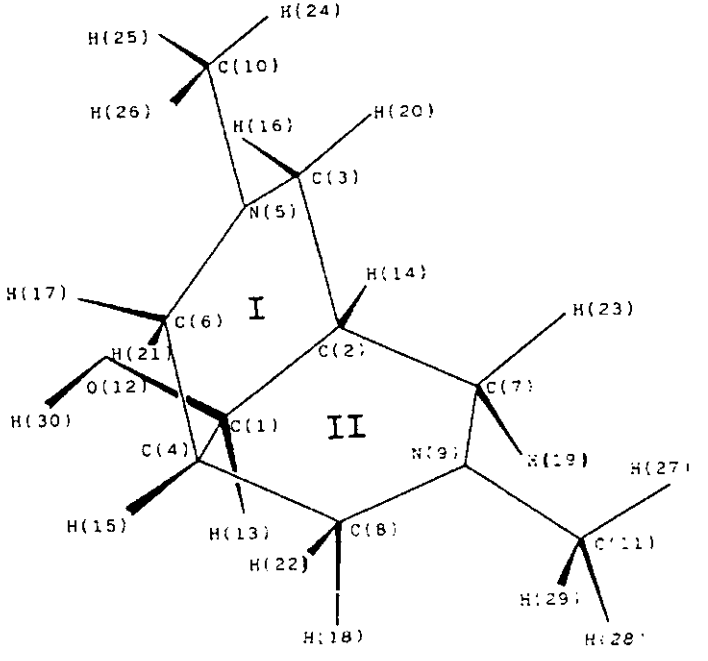


Figura 11.

El valor experimental de r C(1)-C(2) es más largo que r C(1)-C(4), y los valores teóricos deducidos de AM1, en aproximadamente 0.04 Å. También, la distancia experimental r C(2)-C(7) es más larga que la correspondiente distancia deducida por AM1. Asimismo, la distancia experimental r C(2)-C(7) es más larga que la r C(4)-C(8) y que la correspondiente a los datos obtenidos por AM1. Por consiguiente se deduce una estructura distorsionada

en el cristal a nivel de C(2) con respecto a la forma casi simétrica predicha por el método AM1. Los valores experimentales de los ángulos C(1)-C(2)-C(7) y C(2)-C(7)-N(9) difieren de los correspondientes deducidos del método AM1 (aproximadamente 4° más bajo en el primero, y aproximadamente 2° más grande en el segundo). El ángulo C(7)-N(9)-C(8) es aproximadamente 6° más pequeño que el obtenido por AM1.

Los valores de los ángulos diedros a nivel de C(2) obtenidos por el método AM1 también difieren de los deducidos por Rayos X. Así, son menores con respecto a los datos experimentales en C(1)-C(2)-C(7)-N(9), C(1)-C(2)-C(3)-N(5), C(2)-C(3)-N(5)-C(6) y C(2)-C(7)-N(9)-C(8), en aproximadamente -5°, 3°, -7° y 7° respectivamente y se incrementan en C(3)-C(2)-C(7)-N(9) y N(5)-C(3)-C(2)-C(7) en aproximadamente 7° y -7° respectivamente.

En la figura 12 se representan los valores teóricos de carga y densidad.

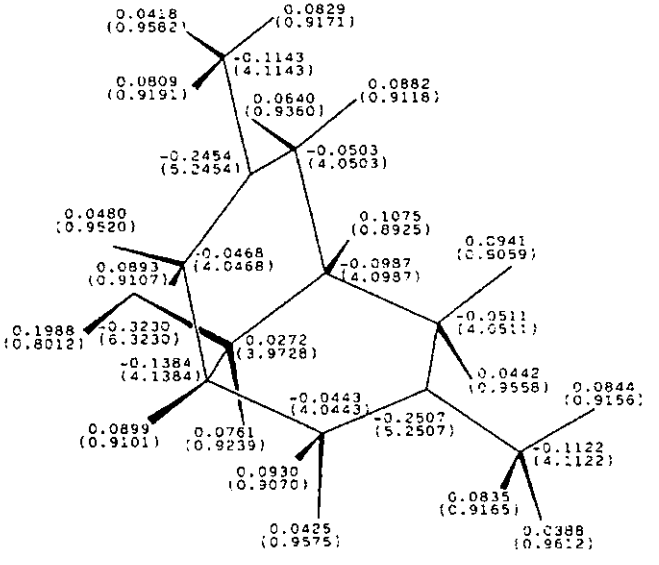


Figura 12

2.0 BIBLIOGRAFÍA

Abraham, R.J. y Fischer, J. (1985) *Magn. Reson. Chem.* 23, 856.
Alcolea, M.; Fernández, M.; Gálvez, E.(1991) *J. Mol. Struct.* 249, 313.
Arias, M.S.; Gálvez, E.; Izquierdo, M.L. y Burgos, C. (1986) *J. Mol. Struct.* 147 381.
Arias, M.S.; Iriepa, I.; Gálvez, E. y Lorente, A. (1989) *J. Mol. Struc.* 193, 161.
Barrelle, M.; Apparu, M. y Gey, C. (1978) *Can. J. Chem.* 56, 85.
Bohlman, F. y Zeisberg, R. (1975) *Chem. Ber.* 108, 1043.
Breitmaier, E. y Voelter, W. (1987) "^{13}C-NMR Spectroscopy, High-Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry", Verlag Chemie, Weinheim.
Eliel, E.L.; Allinger, N.L.; Angual, S.J. y Morrison, G.a. (1965) "Conformational Analysis", Wiley Interscience, New York.
Castellano, S. y Bothner-By, A.A. (1963) *J. Chem. Phys.* 41, 3863.
Casy, A.F. y Coates, J.E. (1974) *Org. Magn. Reson.* 6, 441.
Deward, M.J.S. y Stewart, J.J.P. (1986) *Q.C.P.E. Bull.* 6, 506.
Gálvez, E.; Martínez, M.; González, J.; Trigo, G.G.; Smith-Verdier, P.; Florencio, F. y García-Blanco, S. (1983) *J. Pharm. Sci.* 72, 881.
Gálvez, E.; Arias, M.S.; Bellanato, J.; García-Ramos, J.V.; Florencio, F.; Smith-Verdier, P. y García-Blanco, S. (1985) *J. Mol. Struct.* 127, 185.
Haasnoot, C.A.G.; de Leeuw, F.A.A.M. y Altona, C. (1980) *Tetrahedron.* 36, 2783.
Huggins, M.L. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4123.
Jackman, L.M. y Sternhell, S. (1978) "Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry", Pergamon, Oxford.
Leger, J.M.; Gadret, M. y Carpy, A. (1980) *Mol. Pharmacol.* 17, 339.
Liotard, D.A.; Healy, E.F.; Ruiz, J.M. y Deward, M.J.S. (1989) "Manual AMPAC, Versión 2.1" Universidad de Texas.
Marchan, A.P. (1982) "Stereochemical Applications of NMR Studies in Rigid Bicyclic System". Verlag Chemie Weinmheim.
Marshall, J.L.; Walter, S.R. Barfiels, M.; Marchand, A.P.; Marchand, N.W. y Segre, A.L. (1976) *Tetrahedron.* 32, 537.
Marshall, J.L. (1983) "Carbon-Carbon and Carbon-Proton NMR Couplings: Applications to Organic Stereochemistry and Conformational Analysis", Verlag Chemie International, Deerfield Beach, Fl.
Martin, Y.C. (1978) "Quantitave Drug Design", Marcel Dekker, New York.
Senda, Y.; Ishiyama, J.I. y Imaizumi, S. (1981) *J. Chem. Soc., Perkin Trans* 2, 90.
Trigo, G.G.; Martínez, M. y Gálvez, E. (1981) *J. Pharm. Sci.* 70, 87.
Wehrli, F.W.; Marchand, A.P. y Wehrli, S. (1988) "Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra", John Wiley, New York.

Wenkert, J.S.; Bindra, C.J.; Chang, C.J.; Cochran, D.W. y Shell, F.M. (1974) *Acc. Chem. Res.* 7, 46.
Wiseman, J.R. y Krabbenhoft, H.O. (1975) *J. Org. Chem.* 40, 3222.
Wiseman, J.R. y Krabbenhoft, H.O. (1975) *J. Org. Chem.* 42, 2240.

Interacción Agonista-Receptor. Estructura de los Receptores.

ALBERTO GIRALDEZ
De la Real Academia de Farmacia

1.- INTRODUCCION

Desde la antigüedad el hombre ha distinguido lo que es un alimento, esto es, una sustancia que al ingresar en el organismo se transforma en el propio ser que lo ha ingerido, y aquellas otras sustancias que cuando penetran en el organismo lo que hacen es modificar algunas de las funciones de éste, en un sentido u otro. Si el efecto es negativo para el ser viviente, se les ha contemplado como sustancias perjudiciales o tóxicas; en cambio, si el efecto ha mejorado las condiciones del organismo, especialmente si éste sufría una disfunción, se las ha venido a considerar como fármacos.

Resulta sorprendente el que el hombre no se haya parado a reflexionar, hasta tiempos muy cercanos, el que si una droga (fármaco si es de efecto beneficioso o tóxico si es perjudicial) tiene influencia sobre las funciones vitales de un individuo es porque indefectiblemente ha reaccionado con él, esto es, en algún lugar del mismo.

Más aún, desde siempre ha sido claro que las sustancias que así actúan no suelen tener un efecto generalizado sobre la totalidad del organismo, sino que su efecto se manifiesta preponderantemente en un determinado sistema, órgano o tejido, lo que abunda en la obviedad de que el producto tiene lugares específicos donde allí es capaz de surtir un determinado efecto.

Lo cierto es que a la Humanidad le interesaba más el hecho empírico de cómo actuaba una droga globalmente, en términos generales, sobre el organismo, que cuál era su mecanismo último de acción y en qué punto exacto actuaba.

Sólo al llegar la época moderna en que la medicina va saliendo de su empirismo para ir desentrañando los múltiples porqués que plantea el mismo hecho de la vida, es cuando ante el fenómeno de las actividades de las drogas empieza a preguntarse el cómo y dónde actúan.

Aquí, una vez más, entran en ayuda del hombre sus compañeros de viaje en el planeta: los animales, en este caso, los que pueden ser empleados en un laboratorio. Efectivamente, al ir pasando del empirismo al cientifismo,

el hombre, que ya había aprendido a mirarse en los animales como en un espejo para conocer su propia anatomía y aún su fisiología, ante los enormes avances de ésta promovidos en el siglo pasado - especialmente en su segunda mitad - comienza a utilizar el animal de laboratorio como el mejor interlocutor que le puede ir contestando las preguntas recientemente planteadas de cómo y dónde tiene lugar el efecto de las sustancias capaces de modificar la fisiología de los seres vivos superiores.

Es entonces, pues, cuando nace la farmacología experimental, y se van formado las primeras escuelas, encabezadas por los grandes maestros de finales del siglo pasado y principios de éste. Experiencias, por ejemplo, como la del H. Dale (1096; Barger G. y Dale H.H., 1910) demostrando que se podía invertir el efecto farmacológico de una sustancia - la adrenalina - si previamente se había tratado al animal con otra - extraída del cornezuelo del centeno -, planteaban claramente el interrogante de cómo podía explicarse un fenómeno tan paradójico. De ahí, que con el tiempo viniera a darse como explicación el que la adrenalina había actuado en un determinado lugar cuando se comportaba como vasoconstrictor y en otro al producir el efecto inverso después del tratamiento con derivados del cornezuelo.

Con esta interpretación empieza a concretarse el que existe un lugar de acción del fármaco, lo que unido a la idea de Erlich (1898) de "la llave que abre la cerradura" para explicar fenómenos inmunológicos y bacteriológicos, lleva a formularse conceptos como el de Langley (1878, 1906) de la "sustancia receptora" como un hipotético elemento orgánico imprescindible para que el fármaco entre en combinación con el organismo desencadenando el pertinente efecto.

Nace así la hipótesis de los receptores de A. J. Clark (1933) y de la combinación de éstos con las sustancias químicas (drogas) siguiendo la ley de "Acción de Masas"; al irse confirmando esta hipótesis, por múltiples experiencias, en la primera mitad del presente siglo, llega a definirse ya como una teoría, y a emplearse en tal sentido por autores como R.P. Ahlquist (1948), desarrollándose desde entonces cada vez con más base experimental.

A partir de tales conceptos, la teoría que los sustenta se va reafirmando ya que se conocen sustancias con acciones muy definidas en determinados puntos del organismo, acciones que desaparecen o se impiden mediante otras sustancias de estructura química muy semejante, como el caso de la isoprenalina cuyo derivado clorado bloqueó su acción, por lo que se comprendió que moléculas muy similares eran capaces de reaccionar con una determinada estructura del organismo, pero siendo unas hábiles en producir un efecto fisiológico, propiedad de que carecían las otras. Este hecho dio lugar a que se acuñaran los conceptos de agonista y antagonista, ambos tipos

de sustancias compitiendo por un mismo lugar de acción, con lo que se estableció como segura la teoría de que los fármacos tienen la propiedad de reconocer y reaccionar con los puntos de la biofase que se denominaron receptores o lugares de anclaje.

La teoría fue ampliamente confirmada no sólo mediante experimentación animal, sino - de manera incontrovertible - por métodos "in vitro" en los que por separación y concentración de un material rico en receptores se pueden estudiar los ligandos que son capaces de fijarse en tales estructuras.

Finalmente, la evidencia de la existencia de los receptores se ha logrado al poder aislar a éstos, purificarlos y analizarlos, lo que ha permitido conocer su estructura y , más aún, el sintetizar moléculas de configuración química semejante las cuales manifiestan las mismas propiedades que el receptor.

Pero el hecho de que existan unos receptores capaces de reaccionar con sustancias exógenas produciendo determinados efectos biológicos, hace presuponer que su presencia en los órganos y tejidos sólo se explica porque su función no es otra que reconocer y reaccionar, de forma semejante, ante sustancias endógenas producidas, por lo tanto, por el propio organismo y cuya misión es precisamente estimular tales receptores para conseguir las respectivas respuestas biológicas.

Ese discurso es el que se siguió hace unas décadas respecto a qué sustancias endógenas eran las que debían reaccionar con los receptores sobre los que actúa uno de los fármacos más potentes y plurivalentes: la morfina; ello llevó al descubrimiento de las endorfinas y encefalinas, con todo el inmenso horizonte de sus varias acciones biológicas y la diferenciación de los tipos de receptores a través de los cuales actúan; hubo que pagar tributo, eso sí, al plurimorfismo de la Naturaleza, que en este caso pareció burlarse de la racionalidad humana, ya que ésta, por medio de multitud de investigadores, buscó intensamente por más de diez años en los líquidos y tejidos biológicos una sustancia de estructura química semejante a la morfina; pero el esfuerzo fue vano pues el ligando que la Naturaleza ha diseñado para los receptores opiáceos, aunque reacciona con éstos mediante una configuración como la de la morfina, su estructura global es muy distinta, ya que resultó ser de tipo peptídico, como demostró un investigador - el Prof. H.W. Kosterliz (1975) - ya jubilado, que seguía trabajando por pura afición, desde hacía ya años, lo que da todavía un matiz más irónico a uno de los mayores adelantos de la bioquímica: el descubrimiento de los opioides endógenos.

Efectivamente, es claro - ahora, pero no antes de la teoría de los receptores - que cualquier mensaje transmitido en un organismo vivo para

relacionar entre sí sistemas, órganos, tejidos o células mediante una sustancia endógena, necesariamente precisa de un lugar específico de anclaje para tal sustancia, fijándose en el cual pone en marcha la ejecución del mensaje. Por lo cual, hoy día se han ido definiendo y multiplicando un número casi infinito de receptores, ya que éstos, que fueron primeramente descritos en el Sistema Nervioso Autónomo y posteriormente en el Sistema Nervioso Central, están en realidad omnipresentes en el organismo, reconociendo sustancias endógenas y siendo activados por las mismas, las cuales pueden ser:

a/ de origen neurógeno, liberadas por neuronas: neurotransmisores.
b/ secretadas en algún lugar (glándula endocrina) distante del lugar de acción : hormonas.
c/ sintetizadas y liberadas "in situ" por células no neuronales: autacoides.
d/ señales intercelulares, como los factores de crecimiento y los tisulares (p.e., endotelinas).
A lo que habría que sumar:
e/ de origen exógeno, tanto bióticos como xenobióticos, tales como los fármacos o los tóxicos.

El hombre, para mejor manejo de los datos, conceptos, seres, objetos o artículos que conoce, tiende siempre a clasificarlos; también le llegó ese turno a los receptores. Podrían haberse clasificado según fueran activados por los diversos tipos de sustancias antes enumeradas, pero resultó más ordenado, inicialmente, acudir a definirlos sencillamente por el agonista específico que reconocen, subdividiéndolos según el tipo de respuesta que integran al ser estimulados.

A guisa de ejemplo, en la siguiente tabla se enumeran algunos de los receptores mejor conocidos, con el agonista principal al que responden, un agonista específico y algún antagonista también específico (Smith K. ha elaborado una completa nomenclatura de los receptores en: TIPS Receptor Nomenclature Supplement 1993).

TABLA I.

Receptores: principales agonistas y antagonistas

Receptor	Agonista	Antagonista
α_{1A}	Adrenalina, Noradrenalina	Prazosín
α_{1B}	Adrenalina, Noradrenalina	Prazosín
α_{2A}	Adrenalina, Noradrenalina	Yohimbina
α_{2B}	Adrenalina, Noradrenalina	

β_1	Adrenalina, Isoprenalina	Propranolol, Bisoprolol
β_2	Adrenalina, Isoprenalina, Salbutamol	Propranolol, ICI 118.551
n_1 y n_2	Acetilcolina, Nicotina	Tubocurarina, Pancuronio
M_1	Acetilcolina	Pirenzefina, Atropina
M_2	Acetilcolina	Atropina, Metoctramina
M_3	Acetilcolina	Atropina, pF-HHSiD
5-HT_{1A}	Serotonina, 5-Me-Urapidilo	NAN 190
5-HT_{1B}	Serotonina, RU 24969	Cianopindolol
5-HT_{1C}	Serotonina, α-Me-5-HT	Metergolina
5-HT_{1D}	Serotonina, 5-CT	Metiotepina
5-HT_2	Serotonina, DOI	Pirenperone
5-HT_3	Serotonina, 2-Me-5-HT	Zacopride
5-HT_4	Serotonina, Cisapride	ICS 205930
D_1	Dopamina, SKF 38393	SCH 23390
D_2	Dopamina, Quinpirole	S-Sulpiride
H_1	Histamina, Tiazoliletilamina	Clorfeniramina
H_2	Histamina, Impromidine	Cimetidina
H_3	Histamina, Metilhistamina	Tioperamide
A_1	Adenosina, Fenilisopropiladenosina (PIA)	1,3,Dipropilciclopentilxantina (DPCPX)
A_2	Adrenosina, Etilcarboxamino adenosina	Derivados de pirazolo-pirimidina
P_{2x}	ATP y derivados	Suramina
P_{2y}	ATP y derivados	Azul reactivo 2 (RB2), Suramina
P_{2T}, P_{2z}	ATP y derivados	
V_1, V_{1A}	Vasopresina, Ornipresina	Pmp^1-$Tir(Me)^2$-AVP
V_2	Vasopresina, Desmopresina	SKF 105494
OT	Oxitocina	Pmp^1-$Tir(Me)^2$-AVP
B_1	Bradikinina, $Desarg^9$BK	Leu^8-$desArg^{10}$BK
B_2	Bradikinina, $Ti^{5,8}$-D-Fen^7BK	2-Lis-Hip^3-$T^{5,8}$-D-Fen^7BK
ET-1,ET-2,ET-3	Endotelinas	
EDRF	EDRF (NO)	Hemoglobina reducida
ANF	Factor Natriurético Atrial	
C-ANF	Factor Natriurético Atrial (captación)	
Y_1	Neuropéptido Y, Péptido PP, (Pro^{34}) NPY	
Y_2	Nueropéptido Y, Péptido PP, NYP 13-36	
AgII-1	Angiotensina II	Saralasina, DuP 753
AgII-2	Angiotensina II	Saralasina, WL-19
CEI	Inhibidores Convertasa (Captopril,...)	
T-R	Trombina	Hirudina
F-R	Fibrinógeno	Péptidos RGD
PAF-R	Factor Activador de Plaquetas	RO 19.3704
VIP-R	Péptido Intestinal Vasoactivo	D-Fen^2-VIP
NK-1-R	Neurokinina, $(Sar^9, Met(O_2)^{11})$SP	Glaxo-37
NK-2-R	Neurokinina, (βAla^8)NKA	R-396
NK-3-R	Neurokinina, $(MeFen^7)$NKB	
BB_1	Bombesina, Neuromedina B	
BB_2	Bombesina	$AcGRP_{(20\text{-}26)}OCH_3$
CCK_A	Colecistokinina, CCK-8 sulfato	Devasepide
CCK_B	Colecistokinina, CCK-8 no sulfato	L365260
CT	Calcitonina	
CGRP	Péptido Relacionado Genéticamente con Calcitonina	
DP	Prostaglandina D_2, BW245C	BWA 868C

EP_1	Prostaglandina E_1, Sulprostrone	AH6809
EP_2	Prostaglandina E_2, Butaprost	
EP_3	Prostaglandina E_3, Enprostil	
IP	Prostaglandina I_2, Iloprost	
FP	Prostaglandina $F_{2\alpha}$, Fluprostenol	
TP	Tromboxano A_2, U-46619	GR3219
LTB_4-R	Leucotrieno B_4	LY-223982
LTC_4-R	Leucotrieno C_4	
LTD_4-R	Leucotrieno D_4	LY-170680
LTE_4-R	Leucotrieno E_4	MK-571
Cd-R	Calmodulina	Trifluorperazina
μ	Morfina, Endorfinas, PLO17	Naloxona, CTOP
δ	Morfina, Endorfinas, DPDPE	Naloxona, Naltrindol
K	Morfina, Endorfinas, PD117302	Naloxona, Norbinaltorfimina
$GABA_A$	GABA, Muscimol	Bicuculina
	Benzodiacepina	Flumazenil
	Barbitúricos	Picrotoxina
$GABA_B$	GABA, Baclofeno	Ac.5-aminovalérico
NMDA	Glutamato, N.Metil-D-Aspartato (NMDA)	CGS-19755
	Glicina	Ac. Clorokinurético
AMPA	Glutamato, α-Amino-3OH-5Me-isoxazol-Propionato (AMPA)	CNQX
KA	Glutamato, Kainato	
AP-4	Glutamato, 2-Amino-4-Fosfobutanoato	
IL-1α, IL-1β IL-2, IL-6,...	Interleuquinas	
IFN-α,-β,-τ	Interferones	
MCFS	Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos	
GCSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos	
ER	Estrógenos	Tamoxifeno
PR	Progesterona	
AR	Anabolizantes	
GR	Glucocorticoides	
MR	Mineralcorticoides	ZK-91587
$VITD_3$	Vitamina D_3	

Así y todo, no conviene olvidar que existen otros muchos tipos de receptores, generalmente menos conocidos, como los de fijación e internalización (p. e. de LDL), y los denominados "silenciosos" que cuando reaccionan con una sustancia no integran ninguna respuesta, como son los de transporte, que cumplen la importantísima función de fijación de sustancias a las proteínas circulantes, lo que permite la distribución de las mismas por el organismo. En el presente capítulo estos receptores no serán tratados, lo que no implica el que dejen de ser definidos como tales.

Pero hoy día, en que empieza a conocerse en profundidad la estructura íntima de los receptores mediante técnicas de aislamiento, caracterización molecular y purificación, resulta posible el establecer una clasificación no funcional sino estructural, que de momento puede resumirse

-para los receptores de membrana- en tres grupos; esta clasificación tiene la ventaja de que el conocer a qué grupo pertenece un receptor ya orienta para escoger la conveniente estrategia de solubilización, purificación y caracterización molecular.

Los aludidos tres grupos tiene las siguientes características:

Grupo 1: Receptores con un único segmento transmembranal.
- Generalmente tienen como ligando una hormona de acción metabólica o factores de crecimiento o supervivencia.
- Muchos de ellos, pero no todos, tienen actividad tirosina-quinasa.

Grupo 2: Receptores oligoméricos que incorporan un canal iónico.
- Presentan subunidades, de las que numerosas variantes dan lugar a diversas características farmacológicas.
- Sus ligandos son neurotransmisores que integran respuestas rápidas.

Grupo 3: Receptores que ejercen su acción a través de proteínas G.
- Con siete segmentos transmembranales
- Activan proteínas ligadas a GTP
- Gran variedad de ligandos: neurotransmisores (respuesta menos rápida), hormonas, autacoides, estímulos externos (luz, olor), ..

El establecimiento de tales grupos, según el estado actual de la ciencia, no excluye que en el futuro puedan ser ampliados, ya que aunque se prevé que un buen número de los receptores todavía no completamente caracterizados podrán ser incluidos con toda propiedad en uno u otro de los grupos descritos, parece que algún tipo de receptor, como el de la IgE, pueda no tener características comunes a ninguno de ellos.

De momento, la presente clasificación puede quedar recogida en la Tabla II.

TABLA II

Receptores de membrana, según su estructura

Grupo	Receptor	Función
1	Insulina (IR)	Tirosina-quinasa
	Factores de crecimiento tipo-insulina (IGFR)	"
	Factor de crecimiento epidermal (EGFR)	"
	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR)	"
	Péptido Natriurético Atrial (ANPR)	Guanilil-ciclasa
	Recaptación de LDL (LDLR)	Internalización
	Factor de Crecimiento Nervioso (NGFR)	-
	Interleuquina-2 (IL-2R)	-
2	Acetilcolina nicotínico (nAChR)	Canal Na^+/K^+
	Ac. Gamma Amino Butírico ($GABA_AR$)	Canal Cl^-
	Glicina (GlyR)	"
3	Adrenérgicos: α_1 (α_1AR)	Activación de proteínas unidas a GTP
	α_2 (α_2AR)	
	$ß_1$ ($ß_1AR$)	
	$ß_2$ ($ß_2AR$)	
	Acetilcolina muscarínico (mAChR)	
	Serotonina ($5\text{-}HT_{1A,1C,2}R$)	
	Angiotensina II (Ag_2R)	
	Dopamina (D_1 y D_2R)	
	Adenosina (A_1 y A_2R)	
	Ac. Gamma Amino Butírico ($GABA_{ii}R$)	
	Sustancia P (SPR)	
	Sustancia K (SKR)	
	Encefalinas, Endorfinas,....	
	Rodopsina	

2. ESTUDIO DE LIGANDOS

Desde que ha sido posible obtener preparados con una alta concentración en receptores, se ha abierto un amplio camino para el estudio de la reacción ligando-receptor. El método básicamente consiste en incubar el concentrado de receptores con un ligando marcado mediante un radionúclido, separando a continuación el complejo ligando-receptor del ligando que permanece libre después de la incubación y midiendo la radioactividad de ambas fracciones, lo cual permite cuantificar exactamente la cantidad de complejo formado.

Sobre esta base se han realizado infinitas modificaciones y variantes lo que le ha dado al método una versatilidad que permite un enorme campo de aplicaciones. En la literatura inglesa estas técnicas basadas en la obtención

"in vitro" del complejo ligando-receptor aparecen con el nombre de "binding" palabra que coloquialmente ha contaminado nuestro idioma, pudiéndose en realidad expresar en éste con toda propiedad como técnicas de fijación o , mejor, de ligandos.

Mediante tales técnicas se puede conseguir muy variada información sobre multitud de aspectos relativos al mecanismo por el cual los receptores son capaces de reconocer a sus ligandos y reaccionar con ellos; las principales aplicaciones que se han encontrado a estas técnicas son:

- estudios de la cinética de la reacción ligando-receptor
- establecimiento de las constantes de asociación y disociación
- conocimiento de la población de receptores en un determinado tejido
- distribución y mapeo de receptores en tejidos y órganos
- distribución en distintos tipos de células
- localización celular de los receptores
- número de lugares de anclaje en un receptor
- definición de subtipos de receptores
- especificidad de los ligandos
- escala de actividad relativa de una serie de agonistas
- cinética de la competitividad entre agonistas y antagonistas
- desarrollo ontogenético de los receptores
- mecanismos por los cuales las células regulan la síntesis, acoplamiento, degradación y reciclaje de los receptores.

Por tanto, el acercar la información al conocimiento de la naturaleza y mecanismo de la interacción entre el receptor y el ligando, permite el estudio de la farmacología molecular de las sustancias biológicamente activas. El impacto del uso de los métodos de ligandos sobre el conocimiento de los mecanismos íntimos de acción de los fármacos ha sido excelentemente recogido en las revisiones de Cuatrecases P. y Hollenberg M., en 1976, y más recientemente en la de Yamamura H.I., Enna S.J. y Kuhar M.J., en 1985.

En cuanto a la descripción de las metódicas relativas a la técnica de ligandos, se hallan recogidas de forma exhaustivamente detallada, en los libros editados por E.C. Hulme entre los años 1990 y 1992, en la prestigiosa colección "The Practical Approach Series" (Hulme 1990, 1992). Según el autor, los principios básicos en los que se asientan tales pruebas, pueden resumirse como:

2.1. Escoger el tejido que contenga los receptores sobre los que se desee investigar y obtener una preparación en la que éstos se hallen concentrados.

La preparación conteniendo los receptores puede proceder tanto de un animal entero, como - más frecuentemente- de un tejido completo o de un corte de dicho tejido; así y todo, cada vez es más frecuente el realizar la preparación a partir de una suspensión de células o, mejor, de fracciones subcelulares, principalmente de membranas; hoy día, debido a los avances en los métodos de solubilización y purificación de receptores, este tipo de preparaciones son también objeto de la aplicación del método de ligandos.

Por lo tanto, los tipos de preparaciones iniciales, pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellos en los que la superficie de la membrana permanece total o localmente intacta (preparados a partir de tejidos, células o fracciones subcelulares) y aquellos otros en los que la membrana ha sido eliminada mediante solubilizantes y en los que, por tanto, los receptores se encuentran libres.

Ahora bien, lo más usual cuando se acude a las técnicas de ligandos en la selección y estudio de nuevos fármacos - objeto del interés del presente capítulo- es la utilización de preparados que provienen de alguna de las múltiples variantes del empleo de membranas celulares aisladas. De esta forma se suprimen muchos de los lugares de unión inespecífica del ligando en niveles submembranales, lo que permite un más riguroso estudio de la relación: fijación específica/no específica, del ligando en el receptor y su entorno cercano.

Además, al haber aislado las membranas celulares pueden suprimirse, por lavado, agonistas y mediadores endógenos que pudieran interferir en la reacción pura ligando-receptor. Incluso, frecuentemente quedan bien preservados otros factores de la membrana que pueden estar relacionados con el acoplamiento del ligando al receptor, como son sustancias (p.e.: proteínas unidas a GTP) que pertenecen ya a la cadena de sucesos receptor-efector.

En cambio, en los preparados de fracciones de membrana sí se pierden los gradientes iónicos y las diferencias de potenciales transmembranales, que pudieran tener un efecto imponderable en la función del receptor; si bien, parece que los factores que más inciden en ésta no son los del medio exterior o el interior de la célula, sino los de la propia bicapa lipídica de la membrana, por lo que las preparaciones de fragmentos de membrana parecen mantener preservada la especificidad farmacológica de los receptores; su

obtención es, habitualmente, por centrifugación en gradiente de concentraciones o por filtración.

2.2. Selección de los ligandos marcados con un radionúclido.

Por supuesto que para el estudio de la reacción ligando-receptor tiene singular importancia la elección del radioligando que va a emplearse; los conocimientos básicos de farmacología ya orientarán cuál o cuáles son los ligandos que deben ser usados ante un determinado tipo de receptor, pero en la elección también es fundamental el tener en cuenta los radioligandos que se encuentran comercialmente disponibles. Aparte de la información que facilitan las casas proveedoras resulta de suma utilidad el consultar algunas excelente tablas que han sido confeccionadas como revisiones por diferentes autores; a este respecto son muy recomendables las de Watson A. y Abbott A. (1991), McFarthing K. (1992) y Young R.L. (1992) en las que para cada clase de receptor se especifican los radioligandos disponibles, con su tipo de actividad (agonista o antagonista), la actividad específica, e, incluso, el número o siglas del catálogo de la casa comercial que los facilitan; en alguna de esas tablas se añade, además, un corto comentario sobre la aplicación o uso del reactivo.

Conviene, en cada caso, no tener en cuenta únicamente las características físicas del radioisótopo y la naturaleza de su emisión (electromagnética o en partículas), sino también otras propiedades como pueden ser: la semivida, máxima energía, el producto de decaimiento, la actividad específica máxima y la eficacia en la lectura.

La inmensa mayoría de los radioligandos están marcados con tritio o iodo-125, si bien, también se han usado marcajes con carbono-14, azufre-35 y fósforo-32, entre otros. El iodo-125 al tener una corta semi-vida precisa del empleo del reactivo en un espacio corto de tiempo e introducir en los cálculos un factor de corrección que tenga presente el decaimiento de la actividad radiactiva, inconvenientes que no presenta el tritio, pero como contrapartida éste posee una muy inferior actividad específica; sin embargo, la incorporación del iodo-125 a una molécula, puede modificar la estructura y función biológica de ésta, pues propiamente ya no se tratará del ligando sino de un análogo de éste; en cambio, el marcaje con tritio, prácticamente no produce ninguna alteración en las propiedades biológicas de la molécula marcada. Por otra parte, al investigador le es más sencillo marcar ciertos tipos de ligandos (proteínas y péptidos) con iodo-125 usando métodos basados en la oxidación con cloramina-T o mediante el reactivo de Bolton-Hunter, mientras el marcaje con tritio resulta mucho más complicado y requiere instalaciones especiales o la síntesis del producto a marcar.

En las pruebas en que se usan varios ligandos habrá que tener en cuenta el tipo de interacción entre ellos, que podrá ser:

- Competición específica por el mismo lugar de anclaje.
- Antagonismo no específico por unión a un lugar distinto de la subunidad del receptor a la que se fija el agonista.
- Interacción con otra subunidad del receptor.
- Interacción con una molécula de la cadena efectora, lo que puede alterar la unión del ligando al efector.

Sin embargo, el tipo de efecto producido al añadir competidores o moduladores, que modifican la cinética de la reacción, suele apreciarse claramente en los resultados que se obtienen.

2.3. Incubación de los receptores con los radioligandos.

La dilución de los receptores que se puede considerar óptima para ser incubada con su respectivo ligando, es la décima parte de la constante de disociación de éste; si bien, la concentración de receptores a emplear podría variar según el tipo de los mismos, las características del ligando o el objetivo de la prueba que se realiza, p.e.: podrá ser de la mitad de la constante de disociación del ligando si éste es extremadamente puro, en cambio, podrá ser hasta diez veces el valor de dicha constante cuando se pretenda únicamente conocer la concentración total de receptores, en condiciones cercanas a la saturación de los receptores por el ligando; en tal circunstancia, es apropiada una concentración de receptores de 0.1 - 1 pmol/ml.

La concentración mínima de ligandos marcados con tritio (80 Ci/mmol.) está alrededor de 5 $x10^{-11}$M. y cuando la marca es con iodo-125 (2.000 Ci/mmol) la concentración mínima de radioligando es de $2x10^{-12}$M.

Es evidente que la temperatura a la que se realiza la incubación tiene influencia sobre la velocidad de interacción del ligando con el receptor y sobre la constante de equilibrio, una vez formado el complejo; una revisión del efecto de la temperatura sobre dichas constantes ha sido hecha por Molinoff P.B. y sus colaboradores en el año 1981.

La cinética de la asociación y la disociación del complejo ligando-receptor es un proceso multiexponencial, por lo que habitualmente se programan las lecturas según una progresión geométrica, aproximadamente p.e.: 5, 10, 20, 45, 60 segundos, 2, 3, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 240, 360 y 480 minutos; de esa forma se obtiene información de los procesos rápidos iniciales y de los posteriores, más lentos. En los pasos siguientes de las pruebas de ligandos, sobre todo si los tiempos de cada paso son largos,

puede comenzar el proceso de la disociación del complejo ligando-receptor, por lo que es conveniente realizarlos con la máxima rapidez.

2.4. Separación del ligando fijado en el receptor, del que ha quedado libre.

El caso más habitual en el estudio de nuevos fármacos mediante pruebas de ligando es, como se expresó anteriormente, trabajar con preparados de fracciones de membranas, por lo que los receptores se hallan en partículas; el ligando que haya quedado fijado al receptor estará, pues, unido a la partículas, mientras que el ligando libre permanece en solución; de hecho, sólo un porcentaje muy bajo de ligando (alrededor de un 10%) se fija en los receptores.

El paso siguiente a la incubación será, por lo tanto, la separación de ambas fracciones del ligando; ya que la fracción fijada de éste se halla en las partículas, los métodos a seguir son, principalmente, dos: filtración y centrifugación.

2.4.1.- Filtración.

Desde que P.Cuatrecasas estableció este método en 1969, ha sido adoptado por un gran número de investigadores, ya que presenta una importante serie de ventajas como son: gran rapidez (minimizando así los procesos de disociación), alta eficacia (separación muy exacta de las fase líquida y sólida), bajas tasas de unión no específica y facilidad de realización.

La elección de los filtros, de los que existen multitud en el mercado, se suele realizar por tanteo, escogiendo aquél que mejor haya separado el ligando unido específicamente, del que lo está en lugares no específicos.

Los tipos de filtros más frecuentemente usados son de fibra de vidrio, y los tamaños de poro oscilan entre 0.6 y 1.2 µm. Por supuesto, la filtración se ayuda con vacío.

2.4.2. Centrifugación.

Para este método se requiere una microcentrífuga que alcance las 12.000 - 14.000 g, con lo que el ligando unido sedimentará y se separará del libre, que permanece en el sobrenadante.

Hay que tener en cuenta que una pequeña porción de ligando libre (alrededor del 1%, para una suspensión de 1 mg de proteínas de membrana/ml) queda atrapado en el sedimento, por lo que éste deberá ser lavado;

sin embargo , el hecho de la presencia de ligando libre en solución en el seno del sedimento, presenta la ventaja de asegurar el equilibrio del proceso de unión ligando-receptor.

Aunque en el estudio de nuevos fármacos las pruebas de ligandos se suelen realizar con preparados de fracciones de membranas, como se comentó anteriormente, no hay que olvidar que se pueden realizar pruebas de ligandos con receptores que se hallen en solución, por lo que para separar el complejo ligando-receptor, una vez formado, del ligando libre, habrá que recurrir a otros métodos de separación como son:

2.4.3. Diálisis de equilibrio.

Su uso ha ido decayendo, ya que se poseen mejores métodos, como los que figuran a continuación.

2.4.4. Gel- filtración.

En columnas capaces de separar el complejo ligando-receptor (de alto peso molecular), del ligando libre, normalmente se trata de columnas del tipo Sephadex G_{50}.

2.4.5. Precipitación.

Mediante moléculas de alto peso molecular, como el polietilenglicol que al unirse al complejo ligando-receptor precipitan, separándose luego del ligando libre por filtración o centrifugación.

2.4.6. Adsorción en carbón.

El carbón activo es capaz de adsorber el ligando libre; después de centrifugación se recupera el complejo ligando-receptor, esta vez en solución.

2.4.7. Adsorción en filtro de intercambio iónicos.

Mediante filtros pretratados, p.e.: con polietilenimina, que retienen por adsorción el complejo ligando-receptor.

Wang J.X. y colaboradores (1992) han confeccionado una tabla comparativa de las diversas características de los distintos procedimientos de separación del ligando libre y del unido al receptor.

TABLA III

Método	Separación	Simplicidad	Tiempo	Relación Fijación específica/ no específica	Reproductibilidad de resultados
Filtración	muy buena	muy buena	segundos	alta	muy buena
Centrifugación	buena	buena	minutos	buena	buena
Diálisis	pobre	pobre	días	baja	pobre
Gel filtración	buena	buena	minutos	alta	buena
Precipitación	buena	buena	minutos	buena	buena
Adsorción	buena	buena	minutos	buena	pobre

2.5. Medida de las fracciones de ligando: libre y unido al receptor.

Por supuesto, la lectura de la radiactividad del radioligando se realiza en el aparataje adecuado, según el trazador esté marcado con tritio u otro radionúclido beta-emisor, o bien, si lo está con iodo-125 u otro radionúclido gamma-emisor. El hecho es que se mide tánto la radiactividad correspondiente a la fracción de ligando libre, como a la del complejo ligando-receptor, después de la oportuna separación.

2.5.1. Medida de la concentración de ligando libre.

Esta medida es necesaria para detectar las pérdida de material radiactivo que puedan producirse a lo largo de la manipulación de las muestras, ya que el dato obtenido de la cantidad de ligando libre sumado al de ligando unido a receptor deberá coincidir con la cantidad de radiactividad de la que se ha partido inicialmente.

En el caso de que se efectúe la separación mediante centrifugación, para la medida del ligando libre se podrá ir tomando muestras del sobrenadante, lo que será válido siempre y cuando la separación del ligando unido al receptor sea completa. Si se usa el método de filtración es recomendable hacer una centrifugación suplementaria para poder determinar con exactitud la concentración de ligando libre.

2.5.2. Ligando unido al receptor.

La radiactividad que aparece en el sedimento de la centrifugación o en el retenido por el filtro, corresponde al ligando unido al receptor.

2.5.3. Medida de la concentración total de receptores.

Para conocer la concentración total de receptor se mide la radiactividad de la fracción ligando-receptor cuando se ha empleado en la prueba una alta concentración de ligando capaz de saturar la totalidad de los receptores presentes, realizando la prueba por cuadruplicado y determinando la cantidad de unión no específica, lo que se lleva a cabo en una prueba paralela preincubando la preparación con un ligando competitivo a alta concentración para desplazar al radioligando de la ocupación de receptores; ya que esta preincubación se hace en frío, conviene prolongar dicho período, p.e.: hasta 60 minutos; la concentración del ligando empleado para conocer la unión no específica debe de ser más de 100 veces superior a las del radioligando y para asegurar el desplazamiento se escogerá un ligando de alta afinidad.

2.6. Adición de competidores o moduladores no marcados.

Es de gran utilidad en este tipo de pruebas el estudiar el comportamiento del ligando en estudio cuando se halla en presencia de otros ligandos competidores u otro tipo de sustancias que pueden modular o interaccionar con la reacción de fijación ligando-receptor.

Para ello se realizan las pruebas comentadas, pero añadiendo -bien en un período de preincubación o bien conjuntamente con el radioligando en el momento de la incubación- el ligando competitivo o el modulador, exentos de marcaje. Hay que tener en cuenta que la presencia de éstos puede modificar la velocidad con que se consigue el estado del equilibrio, por lo que habrá que estudiar la cinética de la reacción en ausencia y en presencia del competidor o modulador.

Los criterios que se siguen en todas estas operaciones pueden resumirse según Hulme E.C. (1992) en:

- La velocidad de unión, tánto del radioligando como del ligando competitivo, debe ser suficientemente rápida como para alcanzar el estado de equilibrio durante el tiempo en que se realiza la prueba.
- La unión del radioligando al receptor debe ser completamente reversible.
- Una cierta proporción de la unión del radioligando debe ser desplazada por el ligando competitivo, para poder definir la unión específica y la no específica.
- La unión específica deber ser saturable, demostrando un número limitado de lugares de anclaje.
- Debe existir una relación cuantitativa entre las afinidades determinadas en las pruebas de ligandos y los ensayos farmacológicos.

De esta forma se conseguirá la adecuada información de las pruebas de ligandos cuyos principales objetivos son:

- Establecer el tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio, en una escala de diferentes concentraciones del ligando.
- Demostrar que un componente de la unión del ligando es específica.
- Medir la unión del radioligando con la suficiente exactitud, a distintos tiempos, lo que permite conocer cuantitativamente los parámetros cinéticos, tanto de asociación como de disociación.
- Asegurar que los datos obtenidos son válidos evitando los artefactos.
- Calcular los oportunos parámetros cinéticos, acompañados del correspondiente tratamiento estadístico.
- Según el comportamiento del radioligando en presencia de competidores o moduladores no marcados, se obtendrá información sobre las propiedades cinéticas y de equilibrio de éstos.

2.7. Análisis de los datos.

A fin de obtener los resultado cuantitativos de: constante de afinidad, número total de receptores, unión específica y no específica, velocidad de la reacción,... se acude a cálculos en los que las medidas de radiactividad realizadas son convertidas en concentraciones molares, con las que se pueden construir curvas de saturación enfrentando las concentraciones de ligando libre y de complejo ligando-receptor, lo que visualiza las tasas de unión específica y no específica y su saturación.

En la clásica representación de Scatchard en la que se enfrentan la relación de radioligando unido /radioligando libre, con la concentración del ligando unido, la recta trazada a través de los puntos resulta de pendiente negativa y permite determinar, en un análisis preliminar, las constantes de afinidad y disociación, así como el número total de receptores (si existen puntos suficientemente cercanos al eje de abcisas); esta representación gráfica lineal facilita una buena visualización del proceso, p.e.: si la línea obtenida es recta se puede interpretar como un población uniforme de lugares de anclaje sin interacción de otros elementos.

En cambio, una curvatura hacia arriba formando una curva convexa puede indicar que existe una cooperación positiva entre los lugares de anclaje en una estructura oligomérica. Si bien, también puede deberse a un artefacto motivado por el hecho de que a las concentraciones más bajas no se ha alcanzado completamente el equilibrio o por una sobreestimación de la

fracción libre del ligando, lo que puede darse si el complejo ligando-receptor se ha disociado parcialmente o por otras causas.

Si la línea resulta una curva cóncava puede ser debido a la existencia de una cooperación negativa entre los lugares de anclaje en una estructura oligomérica, o bien, por la presencia de varias poblaciones de receptores con distintas afinidades respecto al ligando empleado o, incluso, por la interacción de algún elemento del complejo receptor-efector, como en el caso de proteínas G. Por supuesto, también puede ser debido a un artefacto.

En realidad el proceso es más complejo por lo que es necesario, para hallar rigurosamente los parámetros, introducir una serie de correcciones como las derivadas del fenómeno de la depleción que se da cuando la concentración del complejo ligando-receptor llega a alcanzar una elevada proporción respecto al total de la concentración de ligando. Más complejidad en los cálculos se presenta aún, cuando se ha realizado la experiencia añadiendo un ligando competitivo, con lo que la velocidad de equilibrio se hace más lenta y, además, los fenómenos de depleción pueden distorsionar seriamente las condiciones de equilibrio. Otros fenómenos pueden exigir mayor complejidad en los cálculos, como pueden ser: la presencia de varias poblaciones de receptor o de varios lugares de anclaje con diversas cinéticas de unión al ligando; o bien, la existencia de enantiómeros en el ligando; o, incluso, la isomerización de los receptores.

La mayoría de los cálculos que deben aplicarse para una correcta interpretación de los datos, se encuentran en las revisiones efectuadas por E.C.Hulme y N.J.M. Birdsall (1992) y por J.W.Wells (1992).

2.8. Relación de los parámetros deducidos de las pruebas de ligandos, con la actividad farmacológica.

Mediante las pruebas de ligandos se deducen una serie de parámetros que relacionan los productos en estudio, frecuentemente sustancias originales diseñadas como potenciales nuevos productos activos, con su receptor específico; especialmente la constante de afinidad y su inversa la constante de disociación, van a caracterizar, en un primer estadio de selección de productos, a las nuevas substancias permitiendo elegir aquéllas que, en principio, aparecen como de más interés para su posterior desarrollo.

Este tipo de estudios representa una importante aproximación a la farmacología molecular ya que informan directamente del comportamiento del nuevo fármaco frente a la biofase en la que va a actuar; estas pruebas se alejan, por lo tanto, de la clásica farmacología experimental "in vivo" en las que es más complejo el poner de manifiesto el mecanismo íntimo de acción

del fármaco, mecanismo que queda más patente en cualquier estudio de farmacología molecular.

Incluso, la gran limitación que para la experimentación pre-clínica representa la siempre dudosa transposición a la especie humana de los resultados obtenidos experimentalmente, se soslaya -en gran parte- con la farmacología molecular, ya que lo que sucede "in vitro" entre un determinado ligando y su receptor específico, va a suceder exactamente en el ser vivo (cualquiera que sea) cuando dicha sustancia se encuentre con idéntica población de receptores; la diferencia interespecífica no será, pues, de comportamiento en sí de la sustancia, sino de la concentración a que se halle (dependiendo ésta de su cinética, metabolismo, paso a través de barreras,...) y de la población de receptores a la que tenga acceso, que son las condiciones que varían de una especie animal a otra.

Además de esa gran ventaja en la información suministrada por las pruebas de ligandos, en los trabajos "in vitro" se suman otra serie de característica muy ventajosas: la rapidez y sencillez, que permite efectuar una serie de pruebas en paralelo (estudiar más productos en menos tiempo); la exactitud de sus resultados que, en general, reducen la variabilidad biológica interindividual; el muy importante ahorro de producto, lo que es singularmente interesante cuando se trata de series de productos de primera síntesis; la reducción del consumo de animales, no sólo por razones éticas sino por el elevado coste de éstos, de las instalaciones para albergarlos debidamente y del mantenimiento de las mismas; incluso, en las pruebas "in vitro" existe una particularidad esencial que las diferencia de la clásica experimentación animal y es que puede ser utilizado material humano -lo cual es muy aconsejable- procedente de resecciones quirúrgicas.

Por todo ello, las pruebas de ligandos resultan ser de elección en la selección de nuevos fármacos que vayan a actuar a través de receptores específicos y en otras fases del desarrollo del producto en las que sea el objetivo el conocer y definir el mecanismo íntimo de acción de éste a nivel molecular.

Así y todo, dado que en el organismo completo existen una serie de barreras que deberá atravesar el fármaco para distribuirse y alcanzar su biofase específica y dado que mientras llega a ésta va a sufrir una metabolización, será imprescindible, por ahora, que en algún momento de la fase preclínica de experimentación ésta se realice "in vivo" en animales de laboratorio, con la finalidad -entre otras- de establecer una relación entre la información aportada por las pruebas de ligandos realizadas "in vitro" a nivel molecular y los resultados farmacológicos observados en los seres vivos.

A este respecto es aconsejable el comenzar la farmacología experimental clásica del nuevo producto seleccionado mediante las pruebas de ligandos, complementando con experiencias realizadas también "in vitro" en baño de órganos sobre preparados de órganos aislados, en las cuales es posible relacionar perfectamente las concentraciones del fármaco con los efectos farmacológicos que produce, obteniéndose parámetros cuantitativos bien definidos, como el pD_2 para los agonistas o el pA_2 y pD_2' para los antagonistas competitivos y no competitivos, respectivamente. Estos parámetros, a su vez, podrán ser comparados con los obtenidos anteriormente en las pruebas de ligandos. De esta forma se relaciona el proceso ligando-receptor con el receptor-efector, ya que en las experiencias en órgano aislado se estudia el efecto farmacológico deducido de la activación de los receptores presentes por la concentración de fármaco añadido al baño.

En una fase ulterior se administrará ya el nuevo producto a animales vivos en los que es importante no sólo observar y cuantificar el efecto farmacológico esperado, sino cualquier otro síntoma o efecto secundario que aparezca. En cuanto a la actividad farmacológica principal o primaria del producto, es importante relacionar dos parámetros hallados "in vivo" con los datos obtenidos en las pruebas de ligandos:

- La DE50 relativa al efecto farmacológico esperado, midiendo éste a varios niveles de dosis (una de las cuales produzca un efecto máximo) para obtener la correspondiente recta de regresión.
- La concentración plasmática (o mejor, si fuera posible en la biofase) del producto cuando se ha administrado la DE50, para obtener el nivel plasmático terapéutico, parámetro que, por cierto, casi nunca se está determinando en la experimentación pre-clínica.

Además de que técnica y farmacológicamente las pruebas de ligandos sean recomendables en múltiples estudios, entre ellos la selección (lo que en la literatura anglófona aparece como "screening") de nuevos productos, existe una obligación ética de adoptarlas, ya que la legislación sobre buen trato y protección de los animales de experimentación, tánto la española como la de la Comunidad Europea y los tratados internacionales suscritos por la mayoría de las naciones investigadoras, dispone claramente que no deben llevarse a cabo experiencias con animales siempre que éstas puedan ser sustituidas por técnicas alternativas, como es el caso de la selección de potenciales fármacos que actúen a través de receptores específicos conocidos. De tal forma se da cumplimiento a la ya antigua regla recomendada por W.R.S. Russel y R.L. Burch (1959), llamada la regla de las 3 Rs ("Remplazamiento, Reducción, Refinamiento") encaminada a disminuir el consumo de seres vivos para la experimentación, ya que el uso de técnicas alternativas cae de pleno en el

concepto "Remplazamiento" y lleva a la "Reducción" en forma muy importante, del sufrimiento y sacrificio de animales.

3.- AISLAMIENTO DE RECEPTORES

Las pruebas de ligandos permiten conocer una serie de características de la unión ligando-receptor, por lo tanto, del sistema de relación intercelular, que se da por medio de los que han venido a llamarse "primeros mensajeros"; así mismo, dan información de las propiedades que presentan las sustancias exógenas que aprovechan dicho sistema para ejercer alguna acción sobre la célula, esto es, los fármacos, si la acción es deseable o beneficiosa para el organismo, o bien, los tóxicos si el efecto es perjudicial.

Mediante las pruebas de ligandos, se pone de manifiesto la capacidad de los receptores para reconocer las sustancias de acción farmacológica, bien sean agonistas o, contrariamente, antagonistas de primeros mensajeros endógenos y ello permite, mediante modificaciones moleculares, mejorar las propiedades de la unión a receptores de las nuevas sustancias diseñadas con potencial actividad biológica.

Pero ese tipo de pruebas no aporta información sobre la estructura misma del receptor, ni del mecanismo íntimo de su función transductora de una señal extracelular al interior de la célula, ni mucho menos pueden aportar datos sobre lo que se desencadena en ésta cuando la señal es internalizada, es decir, de qué forma se difunde el mensaje hasta llegar al efector y cómo actúa sobre éste, por lo tanto, cuál es el mecanismo de acoplamiento receptor-efector.

Ahora bien, los avances tecnológicos habidos en el campo de la bioquímica molecular están permitiendo el adentrarse en el estudio de la estructura íntima de los receptores, paso previo para llegar a conocer el modo cómo realizan su función transductora.

Para la caracterización molecular de los receptores se sigue una estrategia -con todas las variantes que requieran los distintos materiales de procedencia, los diversos tipos de receptores y otras circunstancias- que en términos generales suelen incluir las siguientes etapas de estudio.

3.1.- Solubilización de los receptores

Los receptores al ser separados de la membrana plasmática y, por lo tanto, de los componentes submembranales, suelen perder la capacidad de respuesta cuando se unen a sus ligando específicos, pero ésta vuelve a

presentarse si se reconstruyen convenientemente en una bicapa lipídica. Por tanto, es condición indispensable que al ser solubilizados los receptores conserven la propiedad de unirse a sus ligandos.

Dado que los receptores son glicoproteínas transmembranales, la primera etapa de su purificación consiste en la dispersión de la bicapa lipídica, lo que se lleva a cabo mediante detergentes.

Los detergentes tienen una zona hidrófilica y otra hidrofóbica, en forma de "cabeza" y "cola" o de dos caras por lo que son muy útiles para separar moléculas hidrosolubles de su entorno lipídico; su efecto como solubilizante depende no sólo de sus propiedades, sino también del tipo de membrana sobre la que actúan y, muy especialmente, de su concentración relativa respecto a los fosfolípidos y las proteínas del sistema.

A medida que el detergente se va añadiendo a la suspensión de fragmentos de membrana se van produciendo distintos fenómenos: cuando la concentración de detergente es baja, éste se solubiliza en la fase acuosa y va penetrando en la membrana donde compite con los fosfolípidos y el colesterol de la misma, empezando a solubilizarse las proteínas periféricas de la membrana; si se añade una segunda cantidad, a medida que la concentración de detergente va aumentando en la fase acuosa, también lo hará en la fase lipídica, con lo que se irá fragmentando la membrana y, consiguientemente, se solubilizarán proteínas integrantes de la misma; un nuevo aumento en la concentración de detergente hará que se sobrepase la concentración crítica micelar y, por consiguiente, se formarán micelas mixtas de proteína-detergente-fofolípidos, además de las detergente-fosfolípidos, con lo que se produce una amplia solubilización de las proteína; un subsiguiente añadido de detergente llevará a un aumento de la formación de micelas, pero también de la proporción de detergente libre, ello puede conllevar una desproporción entre éste y los fosfolípidos, situación en la cual el detergente puede ir arrancando, para irlos reemplazando, los lípidos endógenos de las proteínas de membrana solubilizadas, con lo que las funciones de éstas pueden ser alteradas, quedando inactivadas; para evitar lo cual, hay que mantener una proporción adecuada detergente/fosfolípidos, lo que se logra añadiendo fosfolípidos exógenos, si bien, ni aun así deja de haber un cierto grado de alteración de las propiedades de los receptores incluyendo su capacidad de unión a ligandos. Por tanto, el parámetro más importante a tener en cuenta en la operación de solubilización de receptores es la relación de detergente que se halla en forma micelar respecto a la concentración total de fosfolípidos.

Las clases de detergentes empleadas son distintas para cada uno de los grupos de receptores, cuando éstos son clasificados por su estructura; así

para los del Grupo 1 que sólo poseen un segmento transmembranal y que, generalmente, tienen actividad tirosina-quinasa, se suelen emplear detergentes no iónicos como el Triton X-100, el Nonidet P40 o el n-octil glucósido, que respetan la actividad tirosín quinasa ya que se unen principalmente al monosegmento transmembranal de carácter hidrofóbico, lo que, por otra parte, también tiene como consecuencia el que no alteren el segmento hidrófilo exterior donde se halla el lugar de anclaje. De forma que se puede considerar que, en general, los receptores pertenecientes al grupo primero son de los más resistentes en el proceso de solubilización, conservando mejor sus características y funciones.

Los receptores del Grupo 2 son solubilizados, corrientemente, mediante deoxicolato o colato sódico, si bien, también puede emplearse el Triton X-100; pero es de singular importancia el añadir fosfolípidos exógenos para que pueda conservarse la funcionalidad de los receptores. Hay que tener en cuenta que los receptores de este grupo se hallan asociados a un canal iónico y que pueden presentar varios lugares de anclaje; por ejemplo, el receptor de $GABA_A$ cuando es solubilizado con colato o TritonX-100 conserva su capacidad de ligar tanto los agonistas que se unen al receptor propio del GABA, como los que lo hacen al de benzodiacepinas, que aunque se encuentran algo separados, ambos están situados en el dominio extracelular de receptor; sin embargo, se pierde la actividad del lugar de anclaje del canal de Cl^- que se halla en el dominio hidrofóbico transmembranal, constituido por cuatro segmentos integrados por subunidades; la interacción de estas subunidades y, por lo tanto, la actividad del punto de anclaje del canal se conservan si se usa como detergente el 3-(3-colamidopropil) dimetilamino-2-hidroxi-1-propansulfonato.

En los receptores del Grupo 3, que poseen 7 segmentos transmembranales, se supone que de alguna forma éstos cooperan en la fijación del ligando, mientras que el dominio extracelular es muy pequeño; tal vez por esta circunstancia se trata de los receptores más lábiles por lo que, en general, no pueden ser solubilizados con los detergentes empleados comúnmente para los receptores de los grupos primero y segundo; en este caso se acude a la digitonina sóla o asociada a colato sódico, lo que constituye el detergente más seguro y eficaz para la solubilización de los receptores de este grupo, si bien, no deja de entrañar ciertas dificultades en su uso.

Otros muchos tipos de detergentes se emplean en el proceso de solubilización de receptores, como pueden ser el Triton X-405, el Lubrol PX, el dodecil-β-D- maltósido, lisofosfatidil colina,...

Una buena revisión de los métodos generales de solubilización ha sido compendiada por Haga T. y col. (1990) y por Demolion-Mason C.D. y

Bernard E.A. (1990) para los receptores opiáceos, así como por Panayotou G.N. y Gregorion M. (1990) para el receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF).

3.2. Purificación y concentración de receptores.

En la mayoría de los casos, la concentración de receptores en un tejido es muy baja; en general, se puede decir que está alrededor de 1 pmol/1 mg de proteína, con algunas excepciones como son la rodopsina, en la retina, y el receptor nicotínico de la acetilcolina (nACh), en el órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*.

Por ello es imprescindible, una vez separados los receptores, el acudir a técnicas que permiten una importante concentración y purificación de los mismos, lo que es deseable sea al menos de unas 10^4 veces la concentración inicial, ya que con cantidades menores es muy difícil que se pueda analizar la muestra a fin de caracterizar la estructura molecular de los receptores.

Generalmente, se acepta que para lograr una secuenciación parcial de péptidos, se necesita partir de 1 nmol de proteína purificada, aunque en ocasiones se ha determinado partiendo de cantidades menores. Dado que solamente se consigue la purificación del 10% de los receptores presentes en la membrana antes de la purificación, debe partirse de un material que contenga, por lo menos, unos 10 nmol, de receptores. Como a lo largo de las operaciones de preparación y solubilización de las membranas se puede producir la hidrólisis de los receptores por las proteasas endógenas, es de gran importancia el añadir inhibidores de dichas enzimas.

Para impedir la acción de las enzimas activadas por Ca^{2+} se añade al medio EDTA (1 -10 mM) y también se agregan fluoruro de fenilmetilsulfonilo (0.1 -1 mM) o benzamidina (0.1 mM) para evitar la hidrólisis producida por proteasas de serina. Se ha generalizado el uso de antibióticos como: la pepsatina, que inhibe las proteasas del ácido aspártico; la leupeptina, que impiden la acción de las que operan sobre grupos SH; la aprotinina, que lo hace sobre las kalikreínas,.... Frecuentemente, se emplean combinados de varios inhibidores de proteasas.

Los métodos empleados en la purificación y concentración de receptores están basados, fundamentalmente, en cromatografía de afinidad, para lo que se hace uso de distintos tipos de ligandos, que pueden ser:

3.2.1. Los agonistas propios de los receptores.

Este es el caso de los receptores del Grupo 1, como por ejemplo. los del EGF cuyo material es incubado con una matriz de éster de N-hidroxisuccinimida en gel de agarosa (Affi-gel-10) en la que previamente se ha fijado el EGF, que luego es lavada y eluída, concentrando, finalmente, por ultrafiltración a presión.

3.2.2. Análogos de los agonistas.

Con frecuencia son usados como ligandos algún tipo de antagonistas, generalmente, de bajo peso molecular. Así para separar por cromatografía de afinidad los receptores mACh se emplea la atropina para ligarlos; en el caso de los receptores de Dopamina (D1 y D2) se usa el haloperidol fijado en una matriz de Sepharosa; para los receptores opioides la clornaltrexamina, la bromoacetamidomorfina yodada, la cloroacetil naltrexona yodada, el isotiacianato de fentanilo,... según el subtipo de receptores (μ, $\varkappa$, δ...); los ligandos en este caso están marcados con H^3 o I^{125}, pues el seguimiento se hace por medio de la radiactividad; para los receptores ß-adrenérgicos (β-A) se puede usar el alprenalol inmobilizado en Sepharosa; los receptores α_2-adrenérgicos (α_2-A) son concentrados por paso a través de columna de ácido yohimbínico-Sepharosa; en algunos casos se usa el propio agonista, como en la purificación del receptor nACh, que se realiza mediante acetilcolina-agarosa.

En general, el uso de este tipo de cromatografía de afinidad en que se emplean los análogos de los ligandos naturales es aplicable a los receptores de los Grupos 2 y 3.

3.2.3. Otros ligandos que se unen a lugares subsidiarios o alostéricos del receptor.

Este es el caso, por ejemplo del receptor de $GABA_A$, para cuya purificación y concentración se suele usar alguna benzodiacepina (p.e.: Ro 7 - 1986/1) fijada a una columna de agarosa o el del receptor nACh separado mediante veneno de *Naja naja siamensis* en Sepharosa.

3.2.4. Anticuerpos monoclonales o policlonales.

La obtención de anticuerpos específicos a los receptores abre una nueva y prometedora vía de purificación y concentración de éstos. Así, Frackelton A.R. Jr (1984) ha descrito el método de obtención de anticuerpos monoclonales a la fosfotirosina para el uso frente a receptores con actividad tirosina-quinasa (del Grupo 1), que se consiguen sensibilizando animales a

los que se inyecta fosfotirosina unida a una proteína, separando luego del suero los anticuerpos monoespecíficos mediante cromatografía de afinidad.

La operación final después de la separación de los receptores por cromatografía de afinidad con sus ligandos específicos, es la elución para recuperarlos. A este respecto se da el caso de que aunque en el gel ha quedado más de un 75% de la actividad ligante, sólo se puede recuperar del gel un porcentaje muy inferior que oscila entre el 14-50%; ello es debido, seguramente, a que los receptores se encuentran excesivamente unidos al gel, lo que dificulta su elución; por ello es necesario emplear, en la purificación de receptores, ligandos de constante de afinidad moderada; el problema del escaso rendimiento de la elución es un punto a mejorar en el futuro.

Por medio de la cromatografía de afinidad se pueden lograr concentraciones de hasta 100 a 1.000 veces la inicial, pero ello quiere decir que, normalmente, un sólo paso en el proceso de cromatografía de afinidad es insuficiente, por lo que se debe asociar a otros procedimientos tales como la gel-permeación, las cromatografías de intercambio iónico, de hidroxiapatito o de lectina, o la electroforesis sobre gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico; esta última técnica se emplea tánto para aumentar la purificación, como para control de la pureza del material resultante.

3.2.5. Concentración.

Para la concentración de los receptores durante el proceso de purificación de éstos, o al final del mismo, uno de los métodos más empleados es la ultrafiltración bajo presión de nitrógeno; las membranas ultrafiltrantes basan su eficacia no sólo en el tamaño de poro, sino también en su capacidad de adsorción de moléculas hidrófilas como son los receptores; justamente, para aumentar su superficie es una buena práctica el disponer varias membranas ultrafiltrantes apiladas, lo que se usa, principalmente, para reducir grandes volúmenes, como pueden ser 200-500 ml., en vez de acudir a la evaporación al vacío, con agitación, que puede producir desnaturalización de las proteínas. Para reducir un pequeño volumen, como 2 ml., es muy aconsejable el método de centrifugación, a no más de 5.000 g, en conos filtrantes (Amicon o Millipore). La liofilización conjuntada con diálisis sólo es practicable cuando no hay peligro de desnaturalización de los receptores. Otros métodos de concentración incluyen el paso por columnas de hidroxiapatito o dietilaminoetilo-Sephadex; en realidad, en muchos casos se dispone de una batería de los distintos métodos de concentración.

Haga T. y col. (1990) aconsejan el uso de bulbos ultrafiltrantes (Millipore), que son situados en el seno de la solución que debe ser concentrada, y de los que se evacúa el ultrafiltrado mediante vacío; existen bulbos que retienen moléculas de distinto peso molecular; la operación se

facilita con una suave agitación de los bulbos para evitar fenómenos de monocapa.

4. DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DE LOS RECEPTORES.

Una vez obtenida una concentración suficiente de receptores y de haber comprobado sus lugares de anclaje, es conveniente determinar una serie de parámetros que ayuden a definir la identidad del receptor, como son: el tamaño molecular, el punto isoeléctrico y la proporción de receptor presente en el complejo receptor-detergente.

La determinación de la concentración de proteína en un preparado de receptores purificados, requiere métodos muy sensibles basados, por ejemplo, en: fluorimetría usando como reactivos la fluorescamina o el ortoftaldehido; colorimetría, acudiendo a la unión de la proteína con un colorante como el negro-amido; electroforesis de un derivado radioiodado, con posterior revelado por autorradiografía; cromatografía de columna a través de una de gel-filtración de alta resolución, con lectura espectrofotométrica del eluído a 214 nm; o bien, por hidrólisis mediante HCl 6N, a alta temperatura y subsiguiente análisis de aminoácidos.

La identificación de la secuencia parcial de aminoácidos se puede realizar, en un primer paso, eluyendo las bandas obtenidas por electroforesis y determinando la secuencia de los grupos amino terminales.

En algunos casos, los aminoácidos terminales se encuentran bloqueados, como suele suceder con los receptores pertenecientes al Grupo 3; cuando ésto sucede se acude a la hidrólisis, por medio de endoproteasas o tripsina, obteniendo así una gran cantidad de péptidos cortos, en los que pueden ser secuenciados lo aminoácidos. En ocasiones, se pueden usar anticuerpos específicos obtenidos inyectando animales con péptidos conjugados con proteínas de capacidad antigénica; con los anticuerpos resultantes se identifican, por inmunoprecipitación, los péptidos componentes de los receptores.

Para determinar la secuencia completa de genes del receptor, se usan sondas de oligodeoxinucleótidos sintetizados en base a secuencias de péptidos, lo que permite recurrir a la correspondiente librería de DNA complementario; las librerías de genes y de DNA complementario son consultadas para conocer los genes de los receptores y así deducir la secuencia de sus aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos así establecida a partir de la de nucleótidos se compara, mediante programas de computador, con las secuencias conocidas de otros receptores. De esta manera se ha podido

establecer el número de segmentos transmembranales de cada uno de los grupos de receptores, ya que una longitud de unos 20 residuos de aminoácidos en el dominio hidrofóbico indica que el segmento es transmembranal; bajo este criterio se ha considerado que los receptores del Grupo 1 tienen sólo un segmento transmembranal, los del Grupo 2 poseen al menos cuatro y los del Grupo 3 tienen siete.

5. RECONSTRUCCIONS DE RECEPTORES

El estudio y comprobación del funcionalismo de los receptores purificados requiere la reconstitución de éstos en vesículas de fosfolípidos, que forman una bicapa semejante a la de la membrana plasmática, en la que se pueden añadir otros componentes de la cadena efectora que de esta manera evidenciarán cuáles de ellos y en qué orden intervienen en la transmisión de la señal externa hasta el efecto final. De esta manera se ha puesto de manifiesto por ejemplo, el que los receptores del Grupo 3 interaccionan directamente con las proteínas G; así mismo, con receptores del Grupo 2, reconstituidos de semejante forma, se ha comprobado que aumentan el flujo de iones a través de la capa de fosfolípidos, cuando son estimulados con su agonista específico.

Otra estrategia para el estudio del funcionalismo de los receptores, que está aportando abundante información, requiere disponer de células con escasos receptores, en las que se puedan inyectar RNA mensajeros que codifiquen todas las subunidades del receptor en estudio y que posean los otros elementos con los que el receptor interacciona para producir el efecto. De esta manera se está obteniendo la expresión de receptores en células recipiendarias como el oocito del *Xenopus*.

6. MODELOS DE RECEPTORES DE MEMBRANA.

A medida que se ha ido conociendo la estructura de los receptores de memebrana, se pueden ir clasificando en los grupos que han sido ya mencionados y cuya descripción más detallada será el objeto del presente apartado, ya que mediante la aplicación de las técnicas que permiten el estudio bioquímico molecular se han llegado a definir muchos de los particulares de la conformación, función e interacción con el efector, de los receptores.

Debido al alto grado de conocimiento que se posee de los receptores que se incluyen en el Grupo 3 y dado que, incluso el orden cronológico en que se han ido desvelando las propiedades y estructuración de los receptores es inverso a la numeración asignada a cada grupo, la descripción de los modelos se comenzará por el grupo tercero.

6.1.- Modelo de receptores del Grupo 3.

A esta clase, que tienen en común el operar a través de proteínas G, pertenecen un amplio número de receptores, cuyos agonistas son muy variados ya que pueden ser: neurotrasmisoras, hormonas, autacoides, factores plasmáticos, péptidos... e incluso, estímulos externos como los olores y la luz; algunos de ellos se recogen en la Tabla IV:

TABLA IV

Receptores del grupo 3

Tipo de Agonista	Receptor	Tipo de Agonista	Receptor
Neurotransmisores	Adrenérgicos = α_1, α_2, β_1, β_2 Colinérgicos: m_1-m_5 Dopaminérgicos: D_1, D_2	Autacoides	Adenosina: A_1, A_2 Serotonérgicos: $5HT_{1A}$, $5HT_{1c}$, $5HT_2$ Histaminérgicos: H_1, H_2
	$GABA_B$	Factores plasmáticos Péptidos	AgII Encefalinas Endorfinas
Hormonas	Glucagón LH ACTH Vasopresina: V_1, V_2 Antidiuretica	Factores exteriores	TRH Sustancia P Sustancia K Luz: Rodopsina Olores Feromonas

El estudio de la estructura molecular de estos receptores hace suponer que todos ellos son derivados de un mismo gen ancestral y que a lo largo de la evolución han ido modificándose para adaptarse a los distintos agonistas, como sostiene Hall Z.W. (1987), ya que en realidad, son variantes de un arquetipo de receptor con siete segmentos transmembranales.

Efectivamente, el modelo de este tipo de receptores consiste en una proteína de membrana flotante en la bicapa lipídica de la membrana plasmática de las células eucariotas (Fig. 1), que posee un dominio exterior (en ocasiones pueden ser varios), en el que se encuentran cadenas laterales oligosacáridas que le confieren un carácter hidrófilo; éste es el lugar de reconocimiento de los agonistas específicos; el segmento exterior se prolonga hacia el interior de la membrana de forma que la proteína está en contacto con la bicapa lipídica y durante ese trayecto su estructura de cadenas laterales de aminoácidos es de carácter hidrófobo, como la bicapa; la larga cadenas de aminoácidos se enrolla sobre sí misma formando una hélice de tipo alfa, pero en cuanto alcanza el medio citosólico vuelve a presentar un dominio hidrófilo el cual cambia de sentido dirigiéndose nuevamente hacia el interior de la bicapa donde otra vez se convierte en una cadena hidrofóbica de forma, como antes, helicoidal que atraviesa la bicapa hasta exteriorizarse con un corto segmento hidrofílico en contacto con el medio exterior, el cual a su vez cambia de sentido internándose de nuevo en la bicapa mediante otro

segmento helicoidal semejante a los anteriores; repitiéndose tal estructuración hasta constituir siete segmentos transmembranales el último de los cuales se prolonga hacia el interior de la célula en un largo segmento hidrófilo que llega a contactar con proteínas sitas en la cara interna de la membrana plasmática, contacto que seguramente también se produce en algunos de los bucles citoplasmáticos que unen los segmentos helicoidales transmembranales. Pese al cierto anclaje en la bicapa que representan tales segmentos hidrofólicos, estas proteínas , como el resto de las moléculas lipídicas de la bicapa, son susceptibles de desplazarse en la matriz lipídica, dependiendo la velocidad con que lo hacen de la viscosidad de dicha matriz; algunos receptores, como la rodopsina, alcanzan una velocidad de 10 micrómetros por minuto, por lo que se puede calcular que estas proteínas de membrana pueden desplazarse en pocos minutos de un extremo a otro de la célula, siempre que no haya un impedimento como puede ser las uniones íntimas entre las células que se presenta, por ejemplo, en los tejidos epiteliales.

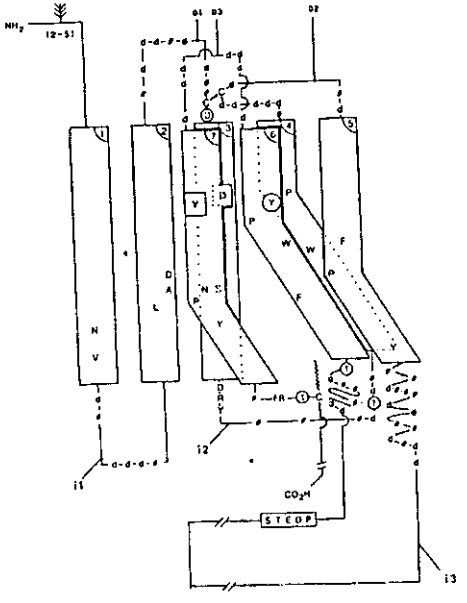


Figura 1.- Modelo de receptor acoplado a proteínas G (en este caso: mAChR); las hélices transmembranales están numeradas del 1 al 7 (obsérvese la falta de paralelismo de varias de ellas); las cadenas hidrófilas unen las hélices por la parte superior (exterior de la célula) y por la interior (citoplasma); la cadena inicial (antes de la hélice 1) posee un NH_2-terminal y un lugar de posible N-glicosilación ( ); la cadena final (sale de la hélice 7) presenta una mitad de ácido palmítico ( ) y un CO_2H-terminal; los residuos más conservados en los receptores acoplados a proteínas G, figuran con sus iniciales libres; otros residuos importantes figuran con su inicial incluída en un círculo o en un cuadrado.
(Tomado de Hulme E.C. y col., 1990, con autorización del autor).

Recientemente, se han aplicado técnicas de criomicroscopía y otros métodos que permiten establecer modelos de receptores en representación tridimensional (3D); precisamente se iniciaron estos estudios con el receptor bacteriorodopsina (Henderson R. y col., 1990), el cual pertenece a la familia de receptores que se acoplan a proteínas G (lo que en literatura anglófona se expresa como GPCRs "G-Protein-Coupled Receptors"), por lo que el modelo obtenido ha sido tenido como patrón de la estructura de los receptores de dicha familia, si bien, no se puede establecer un paralelismo exacto, dada la variedad y particulares características de los diversos tipos de receptores, aún dentro de la misma familia. Pero, en todo caso, las técnicas 3D permiten una mejor comprensión de la estructura molecular del receptor y establecer similitudes y diferencias entre los subtipos en que se puede dividir cada clase de ellos, como ha sucedido con los de 5-HT (Hibert M.F. y col. 1988; Hibert M.F., 1989). El empleo de estas técnicas, sin embargo, puede conducir a errores (Dahl S. y col. 1991; Venter J.C. y col. 1989), según el grado de resolución, el modelo de comparación escogido, etc... por lo que deben tenerse en cuenta, además, los datos experimentales (Hibert M.F. y col., 1993). Por tanto, entre que ya han sido clonados y secuenciado un gran número de GPCRs (más de 70) (Probst N.C. y col., 1992) y que de ellos han sido estudiados 39 en modelos 3D, se puede hoy día establecer una serie de parámetros, observaciones e hipótesis que, por un lado confirman, y por otro perfeccionan y aún modifican los conocimientos anteriores deducidos de representaciones bidimensionales, evidentemente menos dinámicas que las conseguidas con modelos 3D.

Por ejemplo, se ha llegado a la conclusión de que efectivamente existe un dominio exterior con un N-terminal, cerca del cual hay dos lugares de glicosilación (Benovic J.L. y col., 1986) y cuya función en algunos casos es catalítica; se comprueba la existencia de una serie de asas también hidrófilas que conectan sucesivamente los segmentos transmembranales, unas por el exterior y otras por el interior de la célula, siendo en estas últimas donde se hallan lugares de fosforilación, que intervienen en procesos como los de la internalización de los receptores y de la desensibilización (Lefkowitz R.J. y Caron M.G., 1988); el acoplamiento selectivo a estructuras intracelulares subsiguientes al receptor, se lleva a cabo por medio de la cadena final citoplasmática, que emerge del séptimo segmento transmembranal, y que presenta un C-terminal (Frielle T. y col., 1988); en ella existen algunos residuos serina, que pueden ser también lugares de fosforilación (Hargrave P.A., 1982).

Lo que resulta más sorprendente, es que también se ha llegado a la conclusión de que agonistas de bajo peso molecular se fijan a cierta profundidad en la región transmembranal. En efecto, ligandos de pequeño volumen como la acetilcolina o las catecolaminas penetran hasta una

profundidad de 15 Å por una estrecha abertura formada por el conjunto de los segmentos transmembranales o hélices 3, 4, 5 y 6 que se reúnen definiendo entre ellos una hoquedad en forma de dihedro donde se halla el lugar de fijación de dichos ligandos; lo cierto es que los 7 segmentos embebidos en la membrana celular se hallan muy próximos, unos de otros, formando un apretado paquete y siguiendo una secuencia (según la numeración que se les da del 1 al 7) en sentido contrario al movimiento de las agujas del reloj (si el punto de observación está fuera de la célula) (Hibert M.F. y col., 1993), estando las hélices 2, 3 y 4 en posición algo ladeada (es decir, no paralela) respecto a las restantes.

Estos ligandos alcanzan lo profundo de la cavidad y se unen a: un residuo aspartato que se encuentra (de forma constate en los GPCRs) en la hélice 3, a un residuo serina de la hélice 5 y a varios residuos aromáticos de la hélice 6 (Strader C.D. y col., 1988, 1989 a y b), sin perjuicio para que, de forma menos específica, intervengan en la fijación del ligando algunos residuos de otras regiones, tal como el aspartato de la hélice 2 que interaccionando con cationes monovalentes intracelulares (como el Na^+ y el H^+) modulan de forma alostérica la unión del ligando (Horstman D.A. y col., 1990; Neve K.A. y col., 1991), juntamente con secuencias de residuos de la segunda asa citoplasmática y la alanina de la tercera asa (en el receptor α-adrenérgico) (Fraser C.M. y col., 1988; Kjelsberg M.A. y col., 1992).

Efectivamente, la estructura de neurotransmisores catiónicos como las catecolaminas, la serotonina o la acetilcolina, encaja perfectamente con este tipo de receptores ya que entre el grupo amonio (catiónico) y el aspartato de la hélice 3 se forma un par iónico (Curtis C.A. y col., 1989), el cual es englobado por un conjunto de residuos aromáticos muy cercanos a dicho aspartato, lo cual neutraliza la carga positiva del amonio y refuerza así la intensidad de la unión; estos residuos aromáticos (muy constantes en los receptores de neurotransmisores catiónicos) son, por un lado, una fenilalanina situada en la hélice 3 y otros dos, de la hélice 6, que pueden ser tirosina o triptofano (Sussman J.L. y col., 1991; Dougherty D.A. y Staüffer D., 1990); aparte de esas posiciones de residuos comunes a este tipo de GPCRs, cada uno de ellos presenta sus peculiaridades específicas para reconocer a su ligando propio; así, los receptores de catecolaminas poseen dos serinas en la hélice 5 en el lugar preciso para formar dos uniones de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la catecolamina correspondiente, mientras el receptor de serotonina posee sólo una serina en tal posición, ya que el ligando sólo tiene un grupo hidroxilo, siendo una alanina la que está situada en la posición que hubiera ocupado la otra serina. Ambas posiciones son sustituídas por alaninas en los receptores colinérgicos (muscarínicos), ya que la acetilcolina no posee grupo catecol; precisamente, al ser este ligando un éster, en la hélice 6 se encuentra una asparragina, en lugar de fenilalanina de los receptores de

catecolaminas, lo que posibilita una unión de hidrógeno con la función éster; de otra parte, los receptores de histamina (tanto H_1 como H_2), en el lugar que ocupan las serinas de los receptores de catecolaminas, en la hélice 5, tienen una treonina en una de las posiciones y en la otra una asparragina o un aspartato, que encajan perfectamente con el agonista (Cooper D.G. y col. 1990); lo que sí tienen en común todos los receptores de neurotransmisores con grupos aromáticos es la fenilalanina de la hélice 6 que, según se desprende de los modelos en 3D, puede interaccionar con el grupo aromático en forma ortogonal, lo que da una fuerte estabilidad a la unión. Otro rasgo común de estos receptores es una serina en la hélice 4, en la posición precisa para interaccionar con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de las catecolaminas de manera estereo-específica o de formar una unión de hidrógeno con el nitrógeno indólico, en el caso de la serotonina.

Menos relación con el hecho de fijar el ligando, pero más respecto a la conformación de la estructura de los GPCPs son los residuos prolina y glicina, que aunque no abundan en las α-hélices, sí se encuentran en varias de ellas (1, 4, 5, 6 y 7), donde dan lugar a uniones y bucles en el esqueleto helicoidal (Finkelstein A.V. y col., 1971); la prolina, especialmente, puede actuar como bisagra (Riegler R., 1990), haciendo oscilar los dos brazos de la hélice, por lo que cuando se produce el acoplamiento del ligando, juega un importante papel en el consecuente cambio conformacional; este plegamiento de la proteína se ve estabilizado por las uniones de hidrógeno que producen los residuos asparragina, que en las hélices 1 y 7 se hallan contiguos a la prolina y a la glicina. Justamente el par asparragina-prolina del segmento 7 se hallan en las posiciones 21 y 22, respectivamente, y muy cercano se encuentra un residuo tirosina (en la posición 15 del mismo segmento 7) cuya cadena lateral se reorienta en el momento del acoplamiento del ligando, lo que pivota sobre el vecino par antes mencioando (Trumpp-Kallmeyer S. y col., 1992). Además, dos de los residuos aromáticos de la hélice 6 que comparten la formación de la hoquedad donde se produce el acoplamiento, son un triptofano en posición 13 y fenilalanina o tirosina en la 16, por lo tanto abarcando la prolina situada en 15, por lo que es porobable que ésta sea el disparador de la secuencia de cambios estructurales que se desencadenan por la unión del ligando al receptor, entre los que figuran la modificación de la geometría del segmento 5, también protagonizada por una prolina que se encuentra en la posición 12 de dicha hélice, la cual ejerce su función de bisagra al modificarse la posición de las cadenas laterales de los residuos aromáticos: fenilalanina, en posición 9 del mismo segmento y el triptofano colocado en 3, del vecino segmento 4. El resultado total de estos cambios es que algunos de los residuos de las asas intracelulares se hacen accesibles a determinadas proteínas citosólicas.

Efectivamente, el final de la cadena proteica del receptor que penetra en el citosol, como también alguno de los bucles citosólicos, entran en contacto con una proteína situada en la cara interna de la bicapa que es capaz de unirse a nucleótidos de la guanina, circunstancia por lo cual ha recibido el nombre de proteína G; precisamente, ésta es la principal característica común a los receptores que han sido clasificados en el Grupo 3 (Fig. 2). Todos ellos, cuando su dominio exterior reconoce al ligando y reacciona con él traducen la señal de ese primer mensajero en una señal interna, ya que la unión al ligando produce el cambio de configuración que va a dar lugar al contacto con la proteína G; ésta, que en su forma inactiva está ligada, por su subunidad alfa, al nucleótido de guanina GDP cambia, a su vez, su conformación por lo que la molécula de GDP se separa y es sustituida por una molécula de GTP, sustancia abundante en el citosol, lo que lleva consigo la modificación de la forma de la subunidad alfa y su consiguiente activación.

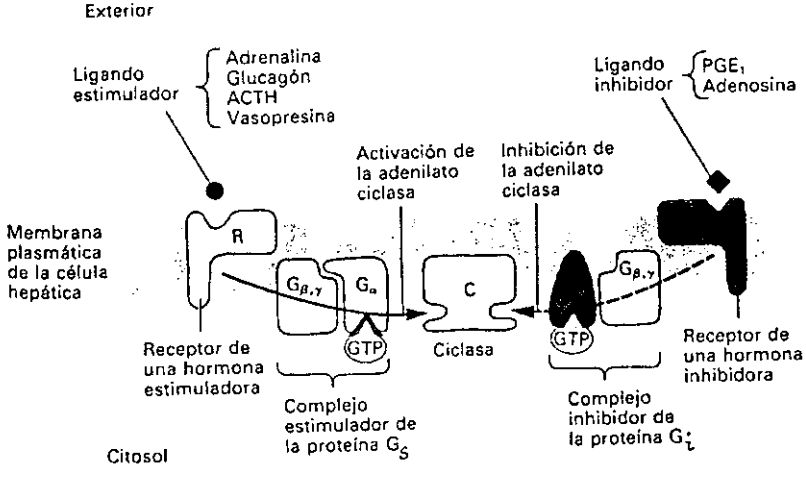


Figura 2.- Esquema de receptores acoplados a proteínas G; una vez formado el complejo ligando-receptor, la proteína G sustituye la unión a GDP por GTP, con lo que la subunidad α (G_α) se desplaza hasta contactar con la adenilatociclasa (C) y activarla (G_s) o inhibirla (G_i); el complejo de las subunidades β y γ ($G_{\beta,\gamma}$) puede ser el mismo tanto para las G_s como para las G_i. (Tomado del Gilman A.G., 1984, del libro "Biología Celular y Molecular" Ed. Labor, 1988, con autorización del editor).

Esta activación permite a la subunidad alfa, unida al GTP, el separarse de las otras dos subunidades que constituyen la proteína G: la beta y la gamma, que permanecen unidas entre sí y estáticas mientras la

subunidad alfa se desplaza a lo largo de la cara interna de la bicapa por lo que tiene la posibilidad de encontrar una molécula que dé inicio a la cascada de reacciones que van a dar lugar al efecto biológico. En el momento de la separación de la subunidad alfa, de las otras dos, disminuye la afinidad del receptor por el agonista (Gilman A.G., 1986).

Las proteínas G no poseen una zona fuertemente hidrófoba que las fije intensamente a la bicapa, sino más bien podrían estar unidas a ésta por una molécula intermedia de naturaleza lipídica, derivada de isopreno que se uniría a la subunidad gamma, si bien, la subunidad alfa de algunas proteínas G conectarían a la membrana por medio de ácido mirístico, también de naturaleza lipídica. De hecho, las subunidades alfa de las distintas proteínas G hasta ahora conocidas, son distintas entre sí, en cambio, hasta el momento han sido descritas alrededor de cinco tipos de subunidades beta y más de diez clases de subunidades gamma; el conjunto de estos dos subunidades, en las distintas proteínas G, no es siempre diferente sino que se repite en muchas de ellas.

Cuando las proteínas G son de tipo estimulante (G_s), su subunidad alfa activada por GTP encuentra como inicio de la cadena efectora a una enzima; ésta, puede ser la adenilil-ciclasa que se halla enclavada en la membrana plasmática mediante doce segmentos transmembranales y que posee dos dominios hidrófilos citoplasmáticos por medio de los cuales actúa sobre su sustrato natural, el ATP, transformándolo en el segundo mensajero AMPc, que transmite la señal al efector a través de proteínas-quinasa (PK), enzimas fosforilantes con un componente regulador al que se une el AMPc liberando así el componente catalítico que es el que fosforila proteínas diversas, las cuales de esta forma son activadas y promueven la respuesta celular.

Si la subunidad alfa de una proteína G_s presente en otro tipo de receptores (Fig. 3), al desprenderse del complejo de las subunidades beta y gamma y desplazarse por la cara interna de la bicapa, encuentra otro enzima situado en la membrana como la fosfolipasa C a la cual se une, el cambio conformacional subsiguiente da lugar a que ésta hidrolice al fosfolípido de membrana 4,5-difosfato-fosfatidil-inositol (PIP_2); este fosfolípido proviene de otro más abundante en la cara interior de la bicapa: el fosfatidil-inositol (PI), el cual tiene la propiedad de tomar dos fosfatos del ATP, que van a ocupar las posiciones 4 y 5 del núcleo del inositol, con lo que la molécula resultante posee tres grupos fosfato.

Así pues, la señal externa proveniente del receptor y transmitida por la subunidad alfa de la proteína G_s, al activar la fosfolipasa C hace que ésta

actúe sobre el PIP_2 hidrolizándolo, producto de lo cual es la aparición de dos segundos mensajeros: el di-acil-glicerol (DAG) y el trifosfato de inositol (IP3).

Estos dos productos van a tener vías distintas de trasmisión de la señal a la cadena final del efector; el DAG actúa a través de enzimas fosforilantes, la fosfolipasa C, que activa la proteína-quinasa A, fosforilando proteínas del efector; el IP_3, en cambio, actúa principalmente movilizando el ion calcio almacenado en el retículo sarcoplasmático celular. De esta forma, la fosforilación de determinadas proteínas, por un lado, y el aumento de la concentración de calcio, por otro, dan lugar a la respuesta biológica de la célula.

En este caso, como en el que el segundo mensajero es el AMPc, la respuesta celular lleva a una acción, pero cuando la señal externa va a dar lugar a la suspensión de una acción, es cuando el mecanismo de transducción se realiza a través, también de proteínas G, pero en esta ocasión inhibitorias (G_i) (Fig. 3). En efecto, la señal externa proveniente de la unión ligando-receptor es trasmitida por éste a la cara interna de la bicapa donde se encuentra la G_i, que como sucede con la G_s, está unida a GDP hasta que recibe la señal que induce la sustitución de éste por GTP, lo que igualmente da lugar a que su subunidad alfa se desprenda del complejo de subunidades beta y gamma y se translade hasta encontrar el efector; el ejemplo clásico es el de la acción inhibidora del neurotransmisor acetilcolina sobre las células contráctiles cardíacas, en este caso, las subunidad alfa, en su desplazamiento, contacta con los canales iónicos de potasio modificando su conformación de forma que éstos se abren permitiendo un aumento de flujo de ion potasio desde la célula al exterior produciendo la hiperpolarización de ésta y el cierre de los canales de calcio, por lo que se dificulta la función contráctil celular. Además, el complejo de subunidades beta-gamma también se desplaza hasta acoplarse con la subunidad alfa de la vía excitatoria, por lo tanto de la G_s, impidiendo que llegue a contactar con la adenilil-ciclasa, evitando así el mecanismo estimulante de la formación de AMPc.

Este hecho resulta sorprendente pues demuestra que la función del complejo beta-gamma no es tan pasivo como se le suponía, pero más llamativo es el descubrimiento de que esa actividad inhibitoria de la adenilil-ciclasa sólo se da cuando está presente la G_s, por lo que se produce lo que Gilman A.G. (1987) ha llamado un "intercambio de subunidades" entre diferentes proteínas G.

Es posible solubilizar los complejos receptor-proteína G, lo que se utiliza para estudiar el tipo de interacciones y de afinidad entre ambos términos, para identificar las proteínas G, y para conocer el mecanismo de acción de los receptores y las particularidades de cómo son activadas dichas

proteínas. Los métodos que se siguen para ello son diversos según los casos, no siendo posible establecer un criterio común; en principio, las técnicas utilizadas son semejantes a las que se emplean en la solubilización de los receptores; una revisión de los métodos empleados ha sido realizada por D. Poyer (1990).

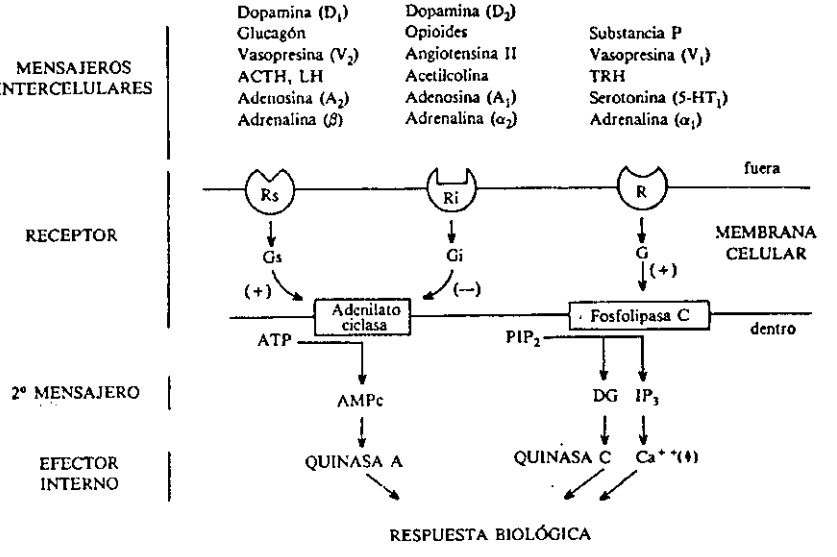


Figura 3.- La unión de los agonistas a sus lugares de reconocimiento específicos en la superficie celular induce la interacción de este complejo con una proteína G (G_s en el caso de agonistas que estimulan la actividad de la enzima adenilato ciclasa, G_i para los agonistas que inhiben a la enzima y $G_?$ para aquellos que estimulan a la fosfolipasa C). La regulación de estas enzimas genera modificaciones en el ritmo de formación de los segundos mensajeros, bien AMPc, en el caso de la adenilato ciclasa, o diacilglicerol (DG) e inositoltrifosfato (IP_3) en el de la fosfolipasa C. AMPc y DG activan quinasas proteicas específicas; IP_3, moviliza calcio intracelular. La fosforilación de ciertas proteínas específicas por la acción de las quinasas junto con el aumento de la concentración de calcio en el citosol son los principales responsables del control de la respuesta biológica de la célula.
(Tomado de Sánchez Blázquez P., 1989, con autorización de la autora).

De hecho, han sido descritos diversos tipos de proteínas G, pues además de las G_s y G_i (de la que hay dos clases), se conocen la G_t (transducina) presente en la retina y la G_o abundante en el cerebro. Precisamente, la transducina o proteína G_t ha contribuido en gran manera a aumentar el conocimiento sobre las proteínas G y se toma como modelo de tal estructura y como sustancia de referencia en muchas experiencias. Su mejor conocimien-

to se debió a la riqueza con que se encuentra en los bastoncillos de los ojos de los vertebrados en los cuales el receptor rodopsina es sensible a la señal externa luminosa, de modo que cuando inciden en él los fotones transmite la señal a la G_t que se une al GTP y de esa forma es capaz de activar la fosfodiesterasa que metaboliza el GMPc, lo que disminuye fuertemente la concentración de éste, que se halla elevada en la oscuridad; esa caída de la presencia de GMPc lleva consigo el cierre de los canales iónicos de sodio produciéndose así la liberación del neurotransmisor que envía señales a las neuronas. En este caso, el GMPc actúa como segundo mensajero, dándose la curiosa situación de que éste debe disminuir al recibir la célula las señales externas, para que se dé el efecto.

Una vez que la subunidad alfa de una proteína G ha activado el enzima correspondiente, su acción termina por la actividad GTP-asa de la propia subunidad alfa, con lo que el lugar de GTP vuelve a ser ocupado por el GDP y, por lo tanto, la subunidad queda desactivada; esta operación se produce a los pocos segundos del acoplamiento de la subunidad alfa y la enzima, teniendo lugar a continuación el desacoplamiento y la reconstitución de la proteína G al unirse nuevamente la subunidad alfa con el complejo beta-gamma.

De ese modo las proteínas G se comportan como un interruptor ya que son las que ponen en marcha el mecanismo que va a dar lugar el efecto y las que lo discotinúan al hidrolizar al GTP, modulando, así mismo, el tiempo de duración del efecto, de ahí el calificativo de "interruptores" y "temporizadores" que les dan Linder M.E. y Gilman A.G. (1992). Incluso, los citados autores les califican también de "amplificadores", ya que, por ejemplo, una molécula activada de adenilil-ciclasa puede sintetizar un elevado número de moléculas de AMPc; de forma semejante, la fosfolipasa C al hidrolizar el PIP_2 da lugar a varias moléculas de DAG y de PI_3; el caso más espectacular es el de la rodopsina, que es capaz de trasmitir la señal recibida a más de quinientas moléculas de transducina.

En el esquema (Fig 3) están representados los mecanismos de respuesta biológica a través de proteínas G, con los principales agonistas que actúan a través de las diversos tipos de las mismas.

La exposición a los agonistas, especialmente aquellos cuya acción es mediada por adenilil-ciclasa, produce la fosforilación del receptor, que de esa forma queda desactivado, produciéndose el fenómeno de la desensibilización, ya que el receptor en tal estado no puede acoplarse a la proteína G y ésta, por tanto, no contactará con la adenilil-ciclasa para activarla.

Además de esa desensibilización inmediata por desacoplamiento del receptor a la proteina G, la presencia continuada de altas concentraciones de agonista produce un efecto más lento y duradero de reducción del número de receptores y de capacidad de respuesta del sistema efector, que en la literatura inglesa se conoce con el término de "down-regulation" que puede ser traducido como "regulación a la baja" (en contraposición al término "up regulation" que se traduce como "regulación al alza").

El primer fenómeno, el de la desensibilización, se produce a los pocos segundos o minutos de la activación del receptor y tiene como finalidad el evitar que el efecto del acoplamiento sea permanente; el mecanismo bioquímico de tal regulación consiste en que la misma proteína quinasa activada por el AMPc (PKA) -en los receptores que actúan a través de este segundo mensajero, como los β_2-adrenérgicos- y otras presentes en el citoplasma celular, como la quinasa del receptor β-adrenérgico (βARK) contribuyen a la fosforilación de los residuos citoplasmáticos del receptor, con el consiguiente desacoplamiento antes comentado (Lohse M. y col., 1990; Dohlman H.G. y col., 1991; Benovic J.L. y Palczewski K., 1991). El fenómeno es reversible cuando el estímulo desaparece.

En cambio, la regulación a la baja tiende a mantener el equilibrio entre la degradación y la síntesis de los receptores, ya que la exposición continuada a altas concentraciones de agonistas produce la internalización y proteolisis de los receptores, que para su reconstrucción precisan la síntesis de nuevas proteínas (Collins S. y col., 1991; Campbell P.T. y col., 1991). En el proceso de internalización y degradación tienen un papel importante los residuos tirosina que se hallan en el segmento citoplasmático con carboxi-terminal.

En cambio, el proceso de la síntesis es AMPc-dependiente, ya que éste regula -también a través de la proteína quinasa A (PKA), en el receptor β_2-adrenérgico (β_2-AR) y en otros varios acoplables a proteínas G- la transcripción de los genes que codifican el RNAm promotor de la síntesis de las proteínas que reconstruyen los receptores. Efectivamente, el AMPc regula la transcripción de varios tipos de genes por medio de unas secuencias de DNA llamadas "elemento de respuesta al AMPc" (CRE), las cuales son reconocidas por una proteína o factor de transcripción de 43 KDa denominada proteína de unión al CRE y que, por lo tanto se le conoce por las siglas CREB (la B corresponde a la palabra "binding"), cuya capacidad de estimular la transcripción de los genes en cuestión está regulada por fosforilación (Fig. 6) (Montminy M.R. y col., 1990; Hershey A.D. y col., 1991; Sheng M. y col., 1990).

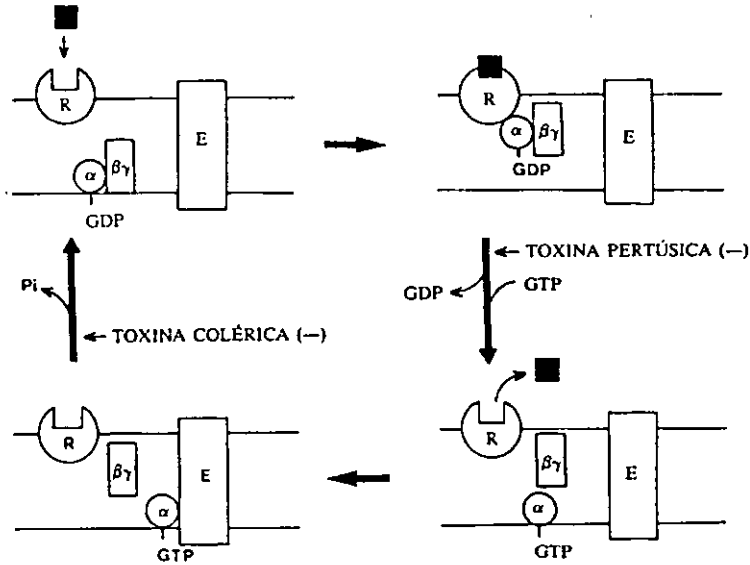


Figura 4.- Representación esquemática de la activación del sistema efector acoplado al receptor a través de una proteína G. Tras la unión del agonista a su lugar de reconocimiento se produce: la disociación de las subunidades de la proteína G, la unión de GTP a la subunidad α y una reducción en la afinidad del receptor por el agonista. La subunidad α de la proteína G estimula al efector interno; la subunidad $\beta\gamma$ tendría un papel de tipo regulador, si bien actualmente se considera la posibilidad de que pueda estimular, también, a un sistema efector. La inactivación de este ciclo se inicia con la hidrólisis del GTP a GDP catalizada por la enzima GTPasa, la cual induce la reagrupación de las subunidades, así como la recuperación de la afinidad por el agonista. Las toxinas pertúsica y colérica actúan, respectivamente, inhibiendo la disociación de las subunidades o impidiendo su reagrupación.
(Tomado de Sánchez Blázquez P.; 1989, con autorización de la autora).

Un fenómeno semejante se produce con receptores que se unen a G_i, como son los opioides, en los que, además, se da un fenómeno de rebote, en el sentido de que la adenilil-ciclasa inhibida por la prolongada acción del agonista, aumenta su actividad cuando éste se retira; el aumento brusco de AMPc produce síntomas semejantes al cuadro de abstinencia a morfínicos, por lo que se supone que la dependencia a opiáceos puede tener esa base molecular (Francis D.L. y col., 1986).

Por otra parte es bien conocida la explicación que hoy se puede dar de la patología producida por el *Vibrion colera* pues se sabe que la toxina que produce es un inhibidor de la enzima GTP-asa encargada de finalizar la estimulación de la adenilil-ciclasa activada por la subunidad alfa unida al GTP; al no producirse la desactivación, por el bloqueo de la GTP-asa, se

sintetiza continuamente AMPc (incluso sin que el receptor esté ocupado por algún agonista) lo que da lugar a que las células intestinales segreguen líquido de forma incontenible produciendo el síndrome diarreico típico del cólera (Fig. 4).

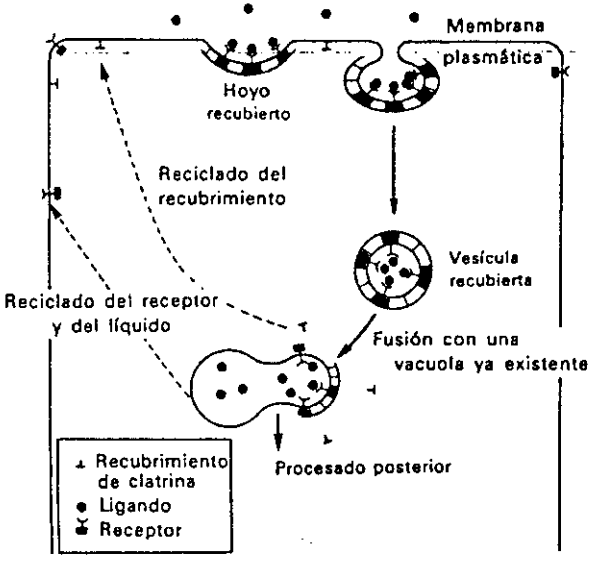


Figura 5.- Internalización de receptores después del acoplamiento al respectivo ligando; formación de una cavéola rodeada de una gruesa capa de clatrina; internalización de la vesícula recubierta que transporta en su interior el complejo ligando-receptor, ya inactivado; procesado del conjunto de enzimas hidrolíticos lisosomales; reciclado de los receptores y la clatrina, a la membrana celular.
(Tomado de Pearse B., 1980, con autorización del editor).

Otro efecto conocido de una toxina bacteriana es la inhibición que produce la pertúsica, elaborada por la *Bordella pertrusis* agente de la tosferina, sobre la disociación de las subunidades de la proteína G_i, con lo que el receptor queda aislado del efector, que en este caso es frenador de la actividad de la adenilil-ciclasa; consecuentemente, la concentración de esta enzima en el medio celular aumenta anormalmente y ello debe ser responsable, sin duda, del desarrollo de la enfermedad (Fig. 4).

Pero no se conocen sólo toxinas que interfieran con la cadena que va desde el receptor al efector, sino que son ya de uso corriente en experimentación activadores que actúan a niveles posteriores al receptor, así la forskolina (producto natural contenido en las raíces de la planta *Coleus forskohlii*) resulta ser un estimulador directo (no a través del receptor) de la adenilil- ciclasa.

Otros ejemplos son: por un lado, se dispone de sustancias que actúan directamente sobre la proteína-quinasa C, esto es, que ejercen la misma acción que el DAG; éstas son los ésteres del forbol, que es uno de los componentes del aceite de croton , agente que aunque muy tóxico fue usado antiguamente como purgante y que procede de las semillas del *Croton tiglium*. Por otra parte, los ionóforos de calcio, que atraviesan directamente la membrana plasmática, producen el mismo efecto que el IP_3 aportando el ion calcio necesario para la respuesta biológica celular, por lo tanto, actuando en la cadena receptor-efector, no sólo más allá del receptor sino, incluso, del enzima que éste activa, la fosfolipasa C.

6.1.1. Posibles estrategias futuras

Estos conocimientos de farmacología molecular hacen suponer que en el futuro el diseño de fármacos no estará dirigido principalmente, como ha sido hasta el presente, a la obtención de sustancias que puedan ser reconocidas por receptores, esto es, ligandos que van a actuar como agonistas o como antagonistas, o que modulen la síntesis, liberación, metabolismo o recaptación de los neurotransmisores, sino que se orientará hacia el conseguir sustancias que actúen selectivamente sobre la proteínas G, sus subunidades, la separación o reconstitución de éstas, los enzimas formadores de los segundos mensajeros, sobre éstos mismos o sobre las proteína-quinasas que activan la respuesta celular.

El influir, mediante fármacos, en estos mecanismos intermediarios entre el receptor y el efector, puede dar origen a sustancias muy selectivas que operen únicamente sobre las células que padezcan la disfunción, respetando las que permanecen normales. El que no siempre lo mejor es el actuar farmacológicamente sobre los receptores lo sugiere el hecho de que frente a una exposición continua del agonista o del antagonista, se producen fenómenos de desensibilización o de supersensibilidad, que pueden ser responsables de nuevas alteraciones fisiológicas.

De hecho, los avances habidos en el conocimiento de los sucesos que tienen lugar en la célula cuando ésta ha recibido una señal externa, han llevado a poder interpretar el mecanismo de acción de algún fármaco de uso habitual en terapeútica y que, precisamente, actúa a nivel molecular intracelular . Ese es el caso del ión litio, empleado con eficacia en enfermedades mentales y que se ha demostrado que inhibe la enzima inositol-1-monofosfatasa, imprescindible en la reposición del ciclo del inositol, por tanto, el ión litio al penetrar en la célula va a retardar la resíntesis del fosfatidil-inositol, precursor del PIP_2 sobre el que debe actuar la fosfolipasa

C dando lugar a los segundos mensajeros DAG e IP_3; la menor producción de éstos, seguramente, es la causa de la modulación de los estados maníaco-depresivos para los que está indicada la administración del ión litio.

Podría pensarse, incluso, el que en el futuro se logren fármacos de efecto "anti-sentido" -como ya se está intentando en inmunología- que inviertan la función celular en respuesta a una determinada señal exterior. Tal vez se pudiera hipotizar, por ejemplo, el conseguir sustancias que cambiaran el efecto de los ésteres de forbol, antes aludidos; se ha comprobado que la capacidad de éstos de activar directamente la proteína quinasa C, además de desencadenar la respuesta celular, induce la síntesis de ADN y, sin duda, por ello son potentes potenciadores del efecto carcinogénico de otros productos; de un fármaco que invierta el sentido de esa señal podría esperarse que tuviera una actividad antitumoral.

Otra estrategia, en el diseño de nuevos fármacos, que ya se está investigando, es el conseguir inhibidores selectivos de las enzimas específicas que liberan péptidos neurotransmisores de sus respectivas moléculas precursores; así, ya han sido obtenidas sustancias que inhiben mil veces más la encefalín-convertasa, que a otras enzimas, impidiendo así, de forma selectiva, la liberación de las encefalinas de sus precursores A y B.

No se descarta el que algún día se pueda actuar sobre el mecanismo de internalización de receptores y ligandos en las vésiculas engendradas en las cavéolas de la superficie celular y que quedan recubiertas por la clatrina, proteína fibrosa y de gran volumen molecular (Fig. 5).

Un ejemplo de estrategia a seguir en el diseño de fármacos que puedan actuar a niveles posteriores a la unión ligando-receptor es la que se está llevando a cabo para obtener inhibidores de la fosfolipasa C, o mejor dicho, de la familia de las enzimas que actúan específicamente sobre los fosfoionositoles, de las que se conocen, al menos, cuatro grupos denominados: alfa, beta, gamma y delta; de ellas, las tres últimas poseen dos dominios análogos (I y II) de 150 y 120 aminoácidos respectivamente, que aunque se hallan situados en diversas posiciones dentro de las cadenas de aminoácidos, se supone que son los lugares activos de la molécula, ya que cuando son modificados se pierde la actividad catalítica de ésta.

Partiendo de la idea de que dada la importancia de estas enzimas en las funciones celulares y dado que no actúan sobre sus sustratos mientras la célula no esté estimulada, se supone que existen mecanismos para regular su actividad, como pueden ser: el secuestro de sus susbstratos, el desacoplamiento de los receptores de superficie que deben activarlas o la directa inhibición de tales enzimas.

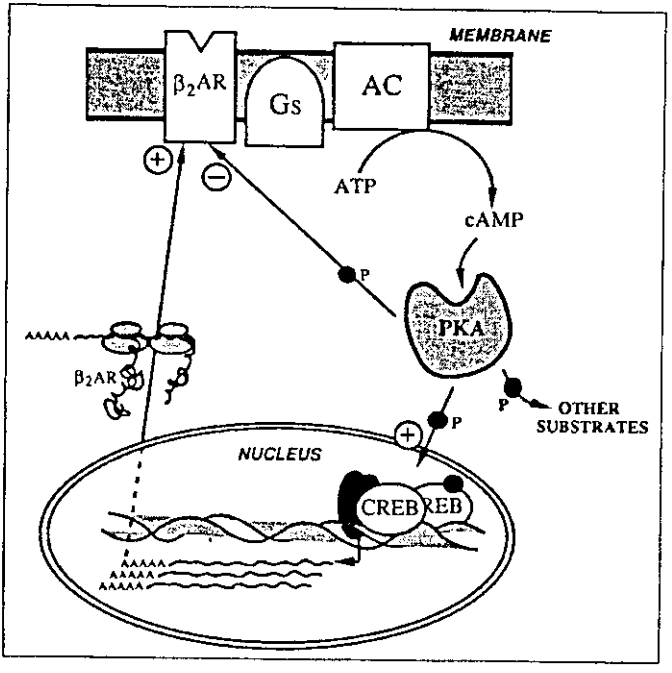


Figura 6.- Autorregulación de la síntesis de receptores por AMPc. La estimulación de la adenililciclasa (AC), en el receptor β_2-adrenérgico (β_2AR), aumenta los niveles de AMPc que activan la proteína-quinasa A (PKA), la cual promueve por un lado, la respuesta celular; por otro, estimula los factores nucleares (CRE-CREB) de transcripción del gen que codifica las proteínas del receptor; esta información es trasladada a los ribosomas y las porteínas sintetizadas se insertan en la membrana plasmática. Con esta regulación positiva (+) se equilibra la regulación negativa (-), por fosforilación del receptor, después de su unión al ligando; la PKA promueve sus acciones por fosforilación (● P)
(Tomado de Collins S. y col, 1992, con autorización de la autora).

Para incidir en esos tres mecanismos como objetivo para la obtención de nuevos fármacos se han sintetizado varias series de productos y además se ha estudiado el efecto sobre tales mecanismos, de agentes terapeúticos ya conocidos, por ejemplo:

6.1.1.1. Compuestos que afectan la disponibilidad de los substratos.

La neomicina se une al PIP_2 con alta afinidad y por ello modifica la acción de las fosfolipasas C, habiéndose encontrado una correlación entre su potencia "in vitro" y los efectos ototóxicos y nefrotóxicos que produce "in vivo", lo que hace suponer que esa capacidad secuestrante pueda explicar el mecanismo de su conocida toxicidad (Lipsky J.J. y Lietman P.S., 1982).

Las lipocortinas, que son inhibidores de la fosfolipasa A_2 (por lo que se les supuso ser el intermediario a través del cual ejercen su acción anti-inflamatoria los corticoides), también lo son de las fosfolipasas C (Hirata F., 1981) y precisamente, la lipocortina I se une con el PI (Machoczeck K. y col., 1989), impidiendo así la formación de los segundos mensajeros que de él se derivan.

Se han utilizado análogos del inositol, que pueden interferir en las reacciones que promueven la reposición del PIP_2, bien impidiendo la utilización del *myo*-inositol, o bien inhibiendo la PI-sintetasa o, incluso incorporando análogos de lípidos que interfieran la transducción de la señal; de hecho, el 1-deoxi-1-fluoro-*scyllo*-inositol compite con el *myo*-inositol en su incorporación al PI (McPhee F. y col., 1991).

Gran número de análogos de fosfato de inositol han sido sintetizados recientemente que interaccionan, incluso, con el lugar de acción del PI_3, lo que representa la gran ventaja de que al actuar en un lugar posterior a la fosfolipasa C, no modifican la producción de DAG (Potter B.V.L.,1990)

6.1.1.2. Compuestos que desacoplan la activación de la fosfolipasa C.

El efecto ya mencionado de la toxina pertusis que impide el acoplamiento de la subunidad alfa al efector, es un ejemplo de esta estrategia.

Otro producto natural, el mastopán que procede del veneno de cierta clase de avispas, activa una proteína G_i que inhibe la activación de la fosfolipasa C por estimulación muscarínica, en algunos tipos de células (Nakahata N. y col., 1990).

Una serie de productos como la espermina y otras poliaminas, el ácido retinoico e, incluso el etanol, interfieren con las proteínas G que median la actividad de la fosfolipasa C, impidiendo así su acción (Wojcikiowicz S. y Fain J.N., 1988; Sagawa N. y col., 1983; Higashi K. y Hoech J.B., 1991).

6.1.1.3. Compuestos que interaccionan directamente con la fosfolipasa C.

Entre éstos se ha descrito que un análogo de *myo*-inositol, el fosfato de *myo*-inositol-1,2-fluoro-metileno cíclico, actúa inhibiendo la segunda fase de la acción catalítica de la fosfolipasa C (Shashidar M.S. y col., 1990); un inhibidor de serina-estereasas, el NCDC (fenil-metil-sulfonil-fluoruro, 2-nitro-4-carboxi-fenil-N,N-difenil-carbamato), también inhibe la acción catalítica de

la fosfolipasa C, por lo que se supone que la serina está involucrada en tal proceso (Walenga R. y col., 1980).

El manoalide, producto natural extraído de una esponja marina, que tiene estructura terpenoide y que posee actividad anti-inflamatoria por ser inhibidor de la fosfolipasa A_2 también inhibe la fosfolipasa C alfa y lo hace con mucha mayor potencia (Bennet C.F. y col, 1987).

En este grupo puede incluirse también uno de los fármacos más prodigiosos que pese a ser de los productos de síntesis más antiguos, se le están encontrando cada vez más nuevas actividades; se trata del ácido acetilsalicílico, cuya sal sódica inhibe parcialmente la actividad de la fosfolipasa C, por un mecanismo aún no conocido, pero que no depende del grupo acetilo, pues la misma propiedad está presente en el ácido salicílico; seguramente, algunos de los efectos farmacológicos de la aspirina tienen como base este mecanismo de acción (Bomalaski J.S., y col., 1986).

6.1.1.4. Otros compuestos

Otros muchos sustancias se conocen como inhibidores de la producción de DAG y de PI_3, tales como el D609 (triciclodecan-9-9-yl-xantogenato), de acción antiviral y que se ha propuesto como antitumoral; el ET-18-OCH_3 (1-O-octadecil-2-O-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) que impide la movilización de calcio inducida por IP_3 (Seewald M. y col., 1990); también varios sialoglicerolípidos son activos "in vitro" como inhibidores de la fosfolipasa C (Shimizu C. y col, 1990); de cultivos del *Penicillium vinaceum* se ha aislado un producto al que se dio el nombre de vinaxantona (Ro 09-1450) que inhibe fosfolipasas C cerebrales, pero no la fosfolipasa A_2 (Aoki M. y col., 1991); actividad semejante presenta un potente antiagregante plaquetario, el RA233 (2,6-Bis(dietanol-amino)-4-pip-eridino-pirimido-(5,4)pirimidina) (Hassaneim A.A. y col., 1970); así como otro antiagregante, el U-73122 (1-[6-(17-beta-3-metoxiestra-1,3,5(10)-tiene-17-yl](amino-exil)-1H-pirrol-2,5-diona),que impide la producción de DAG y de IP_3, después de la estimulación del receptor, y , por tanto, el aumento de ion calcio (Bleasdale J.E. y col., 1990) y, además, tiene la propiedad de actuar sobre la proteina-quinasa C (Smith R.J. y col., 1990), si bien, los mecanismos por los que actúa este compuesto no han sido esclarecidos todavía.

6.2 Modelo de receptores del Grupo 2.

Los receptores que pertenecen a este grupo son los que ellos mismos constituyen un canal iónico el cual atraviesa la bicapa lipídica de la membrana celular, por lo que al ser activados por sus correspondientes agonistas dan lugar a la apertura de dichos canales facilitando el flujo iónico entre el exterior de la célula y el citosol de la misma, esta función de regular la apertura de tales "puertas" del intercambio iónico es lo que ha llevado a algunos autores (Cockcroft V. B. y col., 1990) a designarlos con las siglas LGIC, correspondientes a la expresión de la lengua inglesa:"Ligand-Gated Ion Channels", si bien, otros autores (Boddeke E.W. y Herrling P., 1991) prefieren llamarlos receptores ionotrópicos.

En todo caso, los receptores de tales características constituyen una superfamilia a la que pertenecen, por su gran semejanza estructural, los receptores colinérgicos de tipo nicotínico (n ACh), los gabérgicos del subtipo A ($GABA_A$) y los glicínicos (Gly), a los que pueden añadirse aquellos que son estimulados por aminoácidos excitatorios como los de la familia de los glutamatos (Cull-Candy S. y Usowicz M.M., 1987), el N-metil-D-aspartato (NMDA), el α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), el 2-amino-4-fosfobutanoato (AP-4),... y los de serotonina subtipo 3 ($5\text{-}HT_3$) (Derkach V. y col., 1989) e, incluso, receptores histaminérgicos que se encuentran en el sistema visual de diversos artrópodos (Hardic R.C., 1989). En cuanto a los receptores de kainato, aunque constituyen también un canal iónico, su estructura se aparta algo del resto de los LGIC (Hollman M.O. y col., 1989), lo que hace suponer que su orgien evolutivo pueda ser diferente.

Los ligandos endógenos de esta superfamilia son, en general, neurotransmisores y los receptores se encuentran ampliamente difundidos por el sistema nervioso central, siendo ejemplos clásicos de tales ligandos el GABA, la glicina y el glutamato; su efecto es producir cambios en el potencial de membrana, desencadenando respuestas rápidas (a diferencia de los ligandos del Grupo 3, comentados en el apartado anterior y que aunque también modifican los potenciales de membrana, las respuestas que se deducen de ello son de carácter más lento). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los receptores colinérgicos de tipo nicotínico además de encontrarse en neuronas del sistema nervioso central y en posiciones presinápticas, se hallan en los ganglios del sistema nervioso autónomo periférico y en la placa motriz de la unión neuromuscular del sistema motor.

Los iones cuyo intercambio es facilitado por la apertura de los canales incorporados a esta clase de receptores, varían según el tipo de éstos y de los agonistas que los activan; así, en el caso de los receptores n ACh, el flujo es de cationes monovalentes Na^+ y K^+, dándose también el hecho de

paso de cationes divalentes como Ca^{++} y Mg^{++}, en ocasiones. En cambio, los receptores $GABA_A$ y de glicina activan canales de Cl^-, mientras otros tipos de receptores, como los de NMDA, dan paso a iones monovalentes y divalentes (Na^+, Ca^{++}) de forma ligando-dependiente y a Mg^{++} por estimulación de potencial de membrana, esto es, se trata en este último caso de un mecanismo voltaje-dependiente.

Históricamente el primero de los receptores unidos a canal iónico, cuya estructura molecular fue conocida y, en definitiva, del que se posee mayor información es el nACh, ya que no sólo está presente en ganglios y unión neuromuscular de los vertebrados, sino que se halla muy concentrado en los órganos eléctricos de ciertos peces con capacidad de producir fuertes descargas eléctricas como mecanismo de defensa, tales como el género *Torpedo*, que ha sido básico para el estudio de este tipo de receptores, tanto sus especies *californica* como *marmorata*, e incluso, otros géneros como el *Electrophorus*. La enorme concentración de receptores nACh en los órganos eléctricos de estos peces ha facilitado grandemente su estudio permitiendo alcanzar un profundo conocimiento de su organización y estructura.

La principal característica de su estructura (Fig. 7) es que se trata de un hetero-oligómero, constituído, básicamente, por cuatro tipos de subunidades: α, β, γ y δ, si bien, el conjunto está formado por cinco subunidades, ya que la α está presente por duplicado de forma que el oligómero puede expresarse por la fórmula $\alpha_2\beta\gamma\delta$; estos polipéptidos de masas moleculares aparentes semejantes (en kilodaltons: α = 40, β = 50, γ = 60, δ = 66) constituyen una proteína transmembranal, que se abre en el exterior celular en forma de embudo, en algunos de los puntos de cuya pared se encuentran los lugares de anclaje del o los ligandos; las subunidades, orientadas desde el exterior hacia interior de la célula y yuxtapuestas entre sí forman un canal que continúa la estructura infundibular, atravesando el espesor de la membrana, de modo que queda conectado el medio externo con el citosólico endocelular, por lo que se trata de verdaderos ionóforos a través de los que tiene lugar el intercambio de los iones que puedan atravesarlos cuando son abiertos por el estímulo de los ligandos específicos. Esta estructura no sólo ha sido deducida del aislamiento, caracterización y recomposición de los receptores, de su expresión en células adecuadas, de la clonación del DNAc de las distintas subunidades, de la secuencia de los nucleótidos de dichos clones, etc... sino que ha sido observado en microscopía electrónica mediante preparaciones con tinción negativa (Kistler J. y col., 1982; Cartaud J. y col., 1978) (Fig. 7).

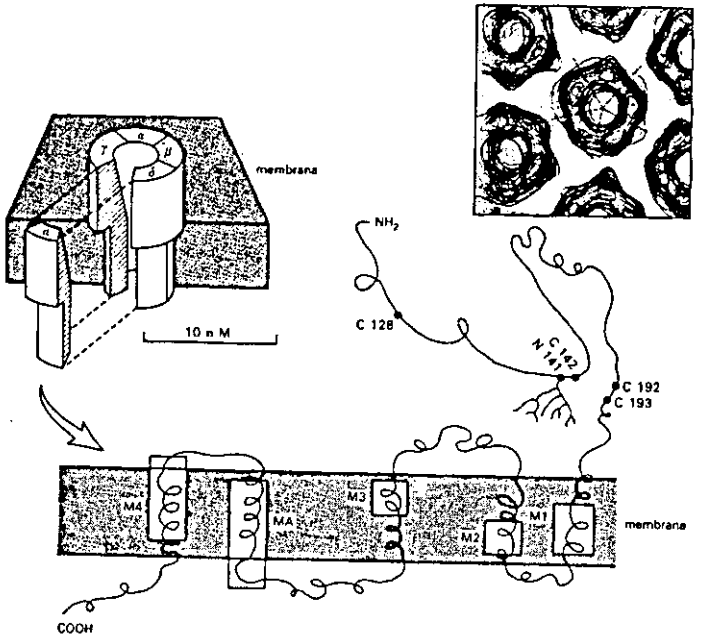


Fig. 7.- Esquema de receptor colinérgico nicotínico compuesto por las cinco subunidades que conforman el canal. en el recuadro se aprecia la disposición pentagonal y simétrica de las subunidades situadas perpendicularmente al plano de la membrana, en visión tomada desde la hendidura sináptica a partir de una imagen electrónica tridimensional de cristales de moléculas receptoras obtenidas de Torpedo (según Brisson y Unwin, 1985). La parte inferior muestra un modelo desarrollado de la estructura secundaria de la proteína subunidad α: la cadena de aminoácidos atraviesa varias veces el grosor de la membrana celular; contiene cuatro hélices (M1 a M4) hidrofóbicas y una (MA) anfipática. La subunidad α presenta un sitio de fijación para la acetilcolina próximo a una molécula de cisteína (C192), la cual participa en enlace disulfuro con una de otras tres cisteínas (C128, C142 y C193) en la porción extracelular del receptor. N141 es un sitio N-glicosilado, importante para el ensamblaje y función del receptor. (Tomado de J. Jackson, 1985 en el libro "Farmacología Humana", Flórez y col., 1987, con autorización del autor y del editor).

En cuanto a dónde y cómo se fija el agonista, en este tipo de receptores, parece que hay varios lugares a los que se puede atribuir esta propiedad. En la subunidad α hay una región que rodea un par de cisteínas colocadas en las posiciones 192-193 de la secuencia de aminoácidos, que se hallan en la parte extracelular del receptor, las cuales están unidas por un puente disulfuro; se ha comprobado que si tal puente es reducido, ese lugar

puede ser marcado con ligandos como la bromoacetilcolina (Kao P.N. y Karlin A., 1986), por lo que se ha supuesto que la parte activa de los agonistas estaría en una posición equivalente al grupo bromometilo de la bromoacetilcolina; en todo caso, las cisteínas 192-193, que no existen más que en la subunidad α, se consideran un lugar de singular importancia en la fijación del ligando, si bien, cuando esas cisteínas han sido experimentalmente sustituídas por serinas no se ha perdido totalmente la capacidad del receptor de ligar sustancias afines al agonista, de lo que puede deducirse que esa región, aún siendo de gran importancia, no es la única en la que radica la propiedad de fijación del receptor; de hecho, su entorno cercano - posiciones 185 a 196- es capaz de fijar fuertemente sustancias como la α-bungarotoxina, la cual carece de actividad colinérgica, ni antagonista, pero es una excelente herramienta de trabajo por su capacidad de unión con el receptor nACh (Neumann D. y col., 1986).

Efectivamente, en la subunidad α existe otra región que incluye las posiciones 128-147, en la cual se encuentran dos cisteínas, también unidas constituyendo un puente disulfuro, pero en este caso no forman un par contiguo, sino que una de ellas está en la posición 128 y la otra en la 142 por lo que su unión forma un asa cerrada en la región extracelular del receptor; esta última posee más de 200 residuos y finaliza en un N-terminal. Precisamente, de toda esa región, el asa formada entre ambas cisteínas (por lo que ha sido denominada como asa-cis) es la que presenta una secuencia de aminoácidos más constante en los diversos receptores ionotrópicos o LGIC conocidos hasta ahora, no variando al menos cuatro de los quince resíduos que forman el asa (Kao P.N. y Karlin A., 1986; Luyten W.H., 1986; Smart L. y col., 1984).

En esta asa es donde se presenta de forma invariable en la posición 11 de la misma un ácido aspártico, que por su carácter acídico sin duda constituye un sitio aniónico, de forma que es capaz de interaccionar con el polo positivo del agonista formando un par iónico, mientras el dipolo del sistema de electrón-π del agonista se orienta convenientemenete en el campo del grupo aspartato (Thomas K.A. y col., 1982).

De hecho, según Cockcroft V.B. y col. (1990), cuando el agonista se encuentra a 12 Å del residuo aspartato, el campo electrostático que se forma entre la carga negativa de ese residuo y el polo positivo del agonista es la causa de la atracción de éste, cuyo dipolo local se orienta por dicho campo electrostático cuando el agonista se halla a unos 6 Å, lo cual permite el acoplamiento; el dipolo del agonista aumenta de tamaño al entrar en el campo electrostático del aspartato con lo que se modifica la densidad de electrones incidiendo sobre el átomo electronegativo del sistema de electrón-

π, con lo que se favorece la interacción del centro electromagnético con el protón anular ε del residuo aromático situado en la posición 8 del asa-cis.

Además, en la posición 6 del asa-cis se encuentra un residuo treonina, cuyo grupo hidroxilo interacciona, a su vez, con el oxígeno del éster de la acetilcolina formando un puente de hidrógeno. Se supone que el residuo 6 del asa-cis puede ser determinante en el reconocimiento del agonista, pues así como en el receptor nACh es treonina, en otros casos es un aminoácido distinto; así, en el receptor de $GABA_A$, en la subunidad β, una tirosina se encuentra en la posición 8, mientras la 6 está ocupada por una arginina, formándose un puente de hidrógeno entre ambas lo que mantiene la arginina a la distancia justa para que el grupo carboxilo del GABA pueda interaccionar con el grupo aspartato. En otros varios tipos de receptores la posición 6 está ocupada por fenilalanina; en cambio en el receptor de glicina se encuentra una lisina (en la subunidad de 48 KDa) cuyo pequeño tamaño del grupo amino primario le permite interaccionar con el grupo carboxilo de la glicina (Gómez I.V. y col., 1989). Incluso, el lugar de anclaje de las benzodiacepinas en la subunidad γ_2 del receptor $GABA_A$ tiene lugar en la histidina que ocupa la posición 6 del asa-cis (Pritchett D.B. y col., 1989).

El hecho de que haya dos puntos de anclaje del ligando parece indicar que puede existir una estereoselectividad en el acoplamiento; efectivamente, los agonistas de receptores LGIC presentan como característica una semirigidez que les permite albergar un centro quiral entre su polo positivo y su átomo electronegativo del sistema electrón-π, y de hecho, los isómeros S de los mismos son más activos que la forma racémica.

Por otra parte, en varios de los receptores unidos a canal iónico, como en el de nACh y el de $GABA_A$, se produce el hecho de que pueden permanecer en un estado de desensibilidad en el cual la unión con el agonista se produce con una afinidad muy inferior a la del estado activo.

Así y todo, la afinidad del receptor por sus ligandos no reside únicamente en la subunidad α y el hecho de que existan puntos de anclaje en el asa-cis no excluye el que también existan otros sitios de unión además del ya mencionado par de cisteínas 192-193 cuyos grupos tiol son altamente reactivos; la prueba es que si esos residuos se sutituyen por serinas, no se pierde del todo la capacidad de fijación. De hecho, en el receptor de nACh existen varios lugares de afinidad que residen en otras subunidades distintas de la α; por ejemplo, con un ligando fotoactivable como el DDF (fluorborato de p-(dimetilamino)-bencendiazonio) (Langenbuch-Cachat J. y col., 1988) se marca la subunidad γ además de la subunidad α, lo que indica que en aquella también hay lugares de fijación. Lo cual se confirma por el hecho de que en tal subunidad en su asa-cis exista una treonina en posición 6, como

sucede en la subunidad α; en cambio, en tal posición la subunidad β tiene una metionina y la subunidad δ presenta una leucina.

Por tanto, hay otras subunidades que tienen los elementos necesarios para la fijación de ligandos; se supone que estas subunidades pueden actuar como coadyuvantes, estabilizando la estructura del receptor en el momento del acoplamiento. Esta idea viene reforzada por experiencias en las que se ha logrado la expresión de genes que codifican el receptor o algunas de sus subunidades, en oocito de *Xenopus* (Kurosaki T. y col., 1987); en efecto, si se expresa el receptor nACh, pero desprovisto de sus subunidades β, γ y δ, se observa una activación de los canales, pero mucho más débil que cuando el receptor está completo. Incluso, cuando se expresan subunidades aisladas de los receptores de $GABA_A$ o de glicina, en experiencias semejantes, al estimularlas con los correspondientes agonistas se obtiene algún tipo de respuesta electrofisiológicas a pesar de que el receptor está incompleto (Blair L.A.C. y col., 1988; Schmieden V. y col., 1989). El que cada subunidad tenga su papel específico que redunda en el comportamiento global del receptor, tiene un ejemplo muy claro: en el receptor de $GABA_A$, si se le introduce la subunidad γ_2 se logra la modulación de la afinidad del agonista GABA a través de activadores tipo benzodiacepinas (Pritchett D.B. y col., 1989).

Todo ello lleva a pensar que si cada subunidad tiene su cometido específico, se puede idear el que existan o puedan construirse receptores "mixtos", tales como en la práctica lo son los de NMDA y el mismo de $GABA_A$, así como otros existentes en los invertebrados y que comparten diversas características farmacológicas de receptores iónicos de los vertebrados (Ono J.K. y Salvaterra P.M., 1980; King W.M. y Carpenter D.O., 1987).

El estudio de la estructura, conformación y posición de las subunidades ha sido posible mediante las técnicas de secuenciación de nucleótidos del RNAm deducida de la inserción de plásmidos en el DNAc, la hibridación y clonaje, el marcado con sondas radiactivas, etc... siendo la subunidad α del receptor de nACh del órgano eléctrico del pez *Torpedo*, la que se ha descrito primeramente.

Devillers-Thiery A. y col. (1983) presentaron un modelo de la misma como una cadena de 437 amonoácidos que comienza en una serina con el $-NH_2$ terminal situada en un segmento hidrófilo, que se continúa con varios segmentos hidrófobos y que termina con un aminoácido neutro, la glicina; la masa molecular total de la subunidad ha sido calculado en 50.200 Da. En

tal cadena se distinguen cuatro importantes segmentos o dominios; por un lado, dos de ellos son ricos en residuos hidrófilos y van del 1 al 209 y del 299 al 408, mientras que los otros dos tienen un carácter claramente hidrófobo y son los que van del residuo 210 al 298 y del 409 al 437 (Fig. 8).

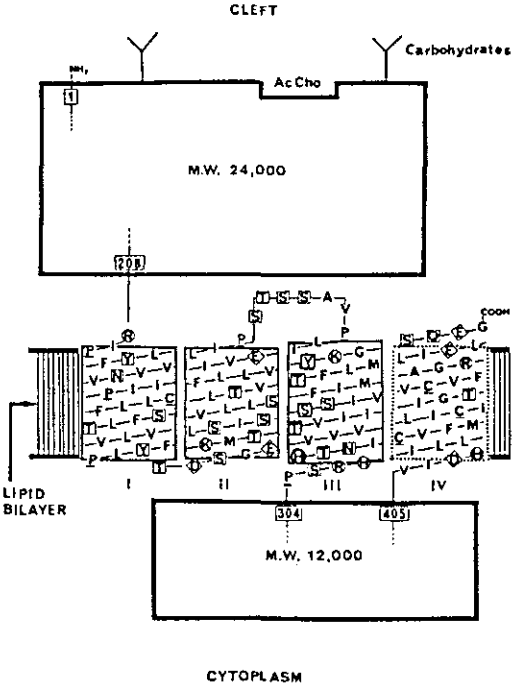


Fig. 8.- Representación esquemática de los dominios de la subunidad α. El rectángulo superior es de dominio extracelular, con: un NH_2-terminal, el lugar de reconocimiento del ligando (AcCho), varias cadenas de carbohidratos y 208 residuos, que suman un peso molecular de 24.000.

El dominio transmembranal presenta cuatro hélices (I, II, III, IV), en las que los aminoácidos se señalan con sus iniciales (no cargados □, carga positiva ○, carga negativa ◊).

El rectángulo inferior es el asa citoplasmática que se encuentra entre las hélices III y IV, con 101 residuos (del 304 al 405) y un peso molecular de 12.000.

(Tomado de Devillers-Thiery A., y col., 1983, con autorización de la autora).

En estos dominios hidrófobos se distinguen regiones no cargadas, de aproximadamente 20 aminoácidos cada una, rodeados de residuos con carga (frecuentemente prolina), lo que constituye una estuctura típica de regiones proteicas que atraviesan la bicapa lipídica de la membrana celular, por lo que se deduce que así sucede con estos dominios de la subunidad α, que son cuatro, denominados: I (residuos 210-237), II (residuos 243-261), III (residuos

277-298) y IV (residuos 409-428), los cuales están conformados en forma de α-hélices; los residuos cargados que los circundan están lo suficientemente cercanos a la superficie de la membrana que sus cadenas laterales emergen hasta el entorno acuoso; en cuanto a las α-hélices, cada una de sus vueltas incluye entre 3 y 4 residuos y el diámetro de las mismas oscila alrededor de 9 a 10 Å; las tres primeras (I, II y III) se hallan unidas por cadenas cortas, por lo que forman un cuerpo compacto; en cambio, la IV se halla separada de ese paquete y tiene como característica una cadena con su -COOH terminal. La estructura de la subunidad α termina con una larga cadena de 101 aminoácidos que por un lado une los segmentos III y IV, y por otro, gracias a su carácter hidrófilo, contactan con el citoplasma celular.

Por tanto, el conjunto de la subunidad α puede dividirse en tres regiones bien diferenciadas: el dominio exterior, en la cara sináptica del receptor, de carácter hidrofílico, de un tamaño aproximado de 5.5 nm, en el que sin duda se halla el lugar de anclaje; un dominio hidrófobo que consta de cuatro elementos que cruzan la membrana celular en una longitud de 11 nm, fijando la subunidad a la bicapa lipídica; y un dominio corto, de 1,5 nm, que se extiende por la cara citoplasmática y contiene residuos treonina y serina, los cuales presentan la característica de poder ser sitios de fosforilaciones, reacciones que tienen lugar en la cara citoplasmática de la membrana celular.

Ha sido muy sugerente la hipótesis propuesta por dichos autores que se fundamenta en el hecho de que al conocerse la secuenciación de aminoácidos de la hélice III se ha puesto de manifiesto que se hallan alineados verticalmente, desde la cara sináptica a la citosólica, cinco residuos de carácter puramente polar: tirosina en la posición 277, treonina en la 281, serina en la 288, una nueva treonina en la 292 e histidina en la 299, lo que conforman una superficie hidrófila que atraviesa la bicapa lipídica; ya que las distintas subunidades del receptor se hallan adosadas unas a otras en forma circular, al coincidir esa superficie hidrófila con otras semejantes del resto de las subunidades, entre todas constituyen un canal que es el que permite el flujo de iones, cuyo diámetro se calcula que debe ser de 6,6 Å. Este modelo sigue siendo válido, pero no aplicable a la hélice III, pues trabajos posteriores llevados a cabo en el mismo laboratorio por J. Giraudat y col. (1986), han demostrado que son los segmentos II los que se hallan alineados en el canal iónico. Dado que la superficie hidrófila que conforma el canal está revestida de aminoácidos sin carga, es difícil suponer que por sí sólos puedan seleccionar el paso de los iones, por lo que se deduce que en ello intervienen también los dominios de la cara sináptica y de la citosólica, pues de hecho los canales son selectivos para los cationes en el caso del receptor nACh y para el Cl^- en los receptores de $GABA_A$ y de glicina; todo ello hace suponer que existe interrelación entre el dominio exterior y el canal iónico.

El resto de las subunidades del receptor nACh de *Torpedo* han sido estudiadas y secuenciadas por Noda M. y col. (1982, 1983a, 1983b) que han puesto de manifiesto la semejanza en la estructura y orientación de las mismas: cada subunidad tiene cuatro regiones fuertemente hidrófobas que constituyen los segmentos transmembrana y que, seguramente, interrelacionan las subunidades entre sí; estas regiones hidrófobas de las cuatro subunidades poseen tramos de 19-27 aminoácidos no cargados y están rodeados de residuos con carga, estructura típica de segmentos transmembranales.

Si se comparan las secuencias de aminoácidos de los precursores de las subunidades alineándolos en sucesivos renglones correspondientes a la α, β, γ y δ, se comprueba la gran homogeneidad de sus estructuras, de modo que se encuentra hasta un 19% de coincidencia del mismo aminoácido en idéntica posición en las cuatro subunidades y un 20% de casos en que coincide el mismo residuo en tres de las subunidades, presentando en la cuarta uno similar en el 54% de estas situaciones; esta homogenicidad hace suponer que las subunidades se orientan de forma simétrica respecto a la membrana, lo que confirma que entre todas constituyen el canal iónico.

6.2.1 Posibles estrategias futuras.

Dado que en el tipo de receptores que conforman un canal iónico suelen existir, con mayor o menor afinidad, varios sitios de unión al o a los ligandos, una estrategia de diseño de fármacos puede consistir en buscar sustancias que se fijen preferentemente en uno u otro lugar. Un ejemplo de ello es el receptor $GABA_A$, en el que se conocen al menos tres zonas de fijación, para cada una de las cuales existen ligandos específicos (Fig. 9); en una de ellas existen lugares que reconocen a los barbitúricos, cuyo efecto es la apertura del canal de Cl^- con la consiguiente acción inhibidora de las estructuras de sistema nervioso central en las que está ubicado el receptor en cuestión, por lo que su actividad farmacológica será de tipo: anti-convulsionante, sedante o hipnótica; en cambio, en la misma zona puede fijarse otro tipo de sustancias que producen el cierre del canal con efectos, por tanto, excitatorios, con actividad convulsionante; tales sustancias incluyen la Bemegrida, la α-dihidropicrotoxinina e, incluso, algunos barbitúricos inductores de convulsiones.

En una segunda zona del receptor $GABA_A$, se hallan sitios de alta y de baja afinidad al propio GABA, que es el agonista específico cuyo efecto es la modificación de la compuerta del canal de Cl^- provocando un mayor flujo de iones a través de él con el resultado de la inhibición de la transmisión del impulso nervioso, ya que la acción del GABA en sistema nervioso central a través de sus receptores tipo A es siempre frenadora o moduladora de la actividad neuronal, debido a que bloquea la despolarización o induce

hiperpolarización, lo que le confiere su carácter sedante y anticonvulsionante. En esa misma zona del receptor es donde se fijan otros agonistas de actividad farmacológica semejante como el Muscimol y los antagonistas específicos del GABA tales como la Bicuculina y el SR 95531 que al bloquear la acción de aquél desarrollan convulsiones en los animales de experimentación como lo hacen las picrotoxinas y el pentametilentetrazol, pero por un mecanismo distinto ya que estos últimos se fijan en el lugar de acción de los barbitúricos, pero produciendo el cierre del canal de Cl^-.

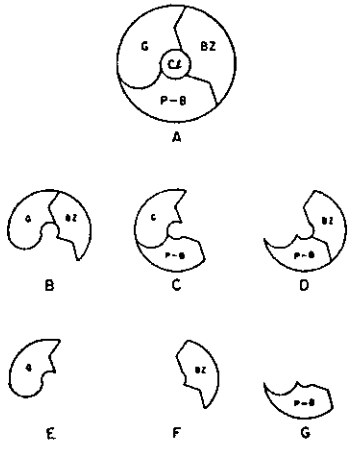


Fig. 9.- Esquema de la composición del receptor de $GABA_A$, dividido según sus zonas de anclaje a distintos ligandos: GABA (G), benzodiacepinas (BZ), picrotoxina-barbitúricos (P-B), formando el canal ionóforo del ión cloruro (Cl).

Cada componente del complejo tri-receptor (A), puede existir en combinaciones de dos (B, C, D) o como entidades individuales (E,F,G).

(Tomado de Olsen R.W., 1982, con autorización del autor).

La tercera zona importante es la de las benzodiacepinas, que son reconocidas por lugares específicos; del acoplamiento producido se deduce una potenciación de la actividad del GABA ya que se aumenta la afinidad de éste por su lugar de unión propio; el efecto GABA-facilitador de las benzodiacepinas de acción terapéutica no se debe, por tanto, a que éstas promuevan la liberación del GABA ni que aumenten los niveles de éste inhibiendo su metabolismo o por otro mecanismo, sino por que existe en el complejo receptor $GABA_A$ una estructura tal que al ser activada -posiblemente por un ligando endógeno- modula positivamente la acción del GABA potenciando su efecto; esta estructura que ha sido llamada receptor benzodiacepínico ya que es el lugar de fijación de éstas a través del cual ejercen su acción farmacológica, también es el sitio de anclaje de sustancias de efecto contrario que han venido a denominarse agonistas inversos pues no bloquean al receptor sino que lo activan pero para producir un efecto inhibidor sobre la acción del GABA, en lugar del facilitador de las benzodia-

cepinas; las sustancias agonistas inversas pertenecen al grupo químico de las β-carbolinas derivados del ácido-β-carbolina-β-carboxílico, y su más claro exponente es el producto designado con las siglas β-CCM; sin embargo, otras sustancias de estructura química semejante tienen un débil efecto tipo-benzodiacepina por lo que se les considera como agonistas parciales del receptor benzodiacepínico, así las denominadas ZK-93423 y ZK-91296; incluso, existen agonistas inversos parciales, como es el caso del FG-7142 y del Ro-15-4513. Pero, además, hay antagonistas o bloqueantes del receptor benzodiacepínico, que impiden la acción tanto de los agonistas como la de los agonistas inversos, y, por supuesto la de los agonistas parciales de uno u otro tipo; a este grupo pertenecen el Flumazenil y el ZK-93426.

Aparte de las tres zonas de unión comentadas: barbitúricos, GABA y benzodiacepinas, existen otros lugares de anclaje, en el complejo receptor $GABA_A$, menos conocidos y no bien identificados, donde se fijan otras sustancias, como es el caso de los esteroides de los que se conocen algunos con acción potenciadora del GABA y otros de efecto inhibidor del mismo.

En realidad, no siempre los receptores tipo $GABA_A$, que conforman un canal ionóforo para el Cl^- tienen tal complejidad, incluso, no en todos está presente la zona del receptor benzodiacepínico, el cual abunda en los receptores $GABA_A$ localizados en otros territorios tanto del sistema nervioso central como en órganos periféricos, tales como el intestino y las glándulas suprarrenales.

Con una estructura tan compleja, en la que existen múltiples lugares de unión para ligandos tan distintos y que integran respuestas de sentidos diversos e, incluso, opuestos, se pueden idear múltiples estrategias para diseñar sustancias que actúen en uno y otro lugar y que posean acciones farmacológicas muy dispares, no sólo agonistas o antagonistas, sino como ocurre en algún caso, de tipo agonista inverso. De hecho, pequeñas variaciones estructurales en miembros de un mismo grupo químico producen esa diversidad de efectos farmacológicos, como sucede entre los barbitúricos en donde se dan sustancias anticunvulsionantes, que se usan como tales en terapéutica, y otras que experimentalmente producen convulsiones; también entre las β-carbolinas existen, como ha sido comentado, unas de agonismo tipo-benzodiacepínico, otras como agonistas inverso y algunos como antagonistas de ambas funciones; incluso entre las benzodiacepinas además de las de uso terapéutico como ansiolíticos, anticonvulsivantes y relajantes musculares de mecanismo central, tanto de acción corta (Midazolam, Triazolam, ...), de acción intermedia (Loracepam, Nitracepam,Oxacepam,...), como de larga duración (Cloracepato, Clordiacepóxido, Diacepam, Medacepam,...), todos ellos por lo tanto, agonistas, existen otras de escasa acción que se pueden considerar agonistas parciales como el Abecarnil y el Bretazenil y

otros derivados claramente antagonistas de la acción benzodiacepínica, como es el caso del Flumazenil y del Ro 15-1788, incluso, en la misma serie química se han descrito productos de acción agonista inversa, por ejemplo, el Ro 15-3505 y otros que se clasifican como agonistas parciales de tal acción inversa, lo que sucede con el Ro 15-4513.

6.3 Modelo de receptores del Grupo 1.

A los receptores del Grupo 1 se les define como aquellos que tienen un único dominio transmembranal y sus ligandos endógenos producen, en general, efectos relativos al crecimiento celular, a la proliferación, a la supervivencia o al metabolismo de las células; otra característica es que la estructura química de tales ligandos es de tipo polipeptídico.

Hay algo muy característico de este grupo de receptores, pero que en realidad no se puede aplicar a todos sus componentes los cuales, por ello, deben subdividirse en dos subgrupos, y es que un número importantes de receptores de un sólo dominio transmembranal poseen actividad tirosina-quinasa, de tipo catalítico. Por tanto, están, por un lado los receptores de tal actividad (tirosina-quinasa) y los de otras diversas acciones a través de guanilil ciclasa, fijación e internalización del ligando u otras aún no bien conocidas.

Al primer subgrupo, pertenecen los receptores cuyos ligandos son factores de crecimiento u hormonas, así: el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), el del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR), el de Insulina (IR) y el Factor de Crecimiento tipo-Insulina-1 (IGF_1R); en el segundo subgrupo también se cuentan algunos factores de crecimiento, por ejemplo, el tipo-Insulina-2 (IGF_2R) y el de crecimiento neuronal (NGFR) y, además, otros de diversas acciones como los de algunas citoquinas (p.e.: de la Interleuquina-2) (IL-2R), o de fijación y recaptación de sustancias circulantes, caso de las Lipoproteínas de Baja Densidad (LDLR), incluso, recientemente se ha incorporado a este subgrupo el receptor del Factor Natriurético Auricular (ANFR) y los receptores que captan dicho péptido haciéndole desaparecer del torrente circulatorio (C-ANFR).

6.3.1 Modelos de receptores con actividad tirosina-quinasa

Como el resto de receptores del Grupo 1 poseen un sólo segmento transmembranal que sirve de nexo de unión entre el dominio exterior, con capacidad para unirse con el ligando y el dominio citoplasmático que es donde radica la actividad catalítica tirosina-quinasa (Hanks S.K. y col., 1988; Yarden Y. y Ullrich A., 1988; Schlessinger J., 1988; Williams L.T., 1989). Se puede considerar, por lo tanto, a estos receptores como enzimas asociadas a

la membrana celular, en los que el dominio de activación y el de acción enzimática están separados por la bicapa lipídica que conforma la membrana, a través de la cual debe ser trasladada la señal de activación, lo que tiene lugar por medio del segmento transmembranal.

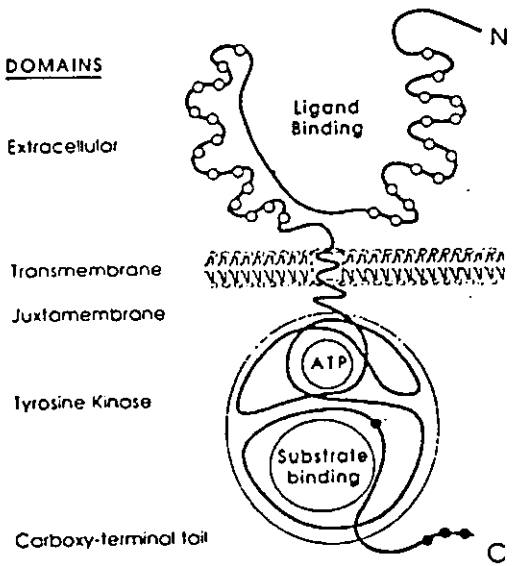


Fig. 10.- Prototipo de estructura de receptor de tirosina-quinasa; se indican: el amino (N) y el carboxi (C) terminales, el lugar de anclaje del ligando, el lugar de fijación del ATP y el del sustrato endógeno. Los círculos abiertos (O) significan cisteínas en el dominio extracelular y los cerrados (●) tirosinas en el citosólico.
(Tomado de Yarden Y. y Ullrich A., 1988, con autorización del autor).

El modelo general (Fig. 10) para los receptores de este subgrupo es el de una larga cadena extracelular con un grupo amino terminal, en la cual hay regiones ricas en cisteína donde se produce la interacción con los ligandos de estructura polipeptídica; esa cadena se continua en un dominio hidrófobo, que es el que atraviesa la membrana, de escasa longitud y cuya secuencia no es esencial para la transducción de la señal (Riedel H y col., 1989; Lammers R. y col., 1989; Lee J. y col., 1989), el cual se expansiona en un segmento más corto que penetra en el citoplasma celular; éste, por hallarse aún pegado a la cara interna de la membrana, recibe el nombre de segmento yuxtamembranal cuya misión parece ser la modulación de la función del receptor; el dominio citoplasmático que le sigue es de grandes dimensiones, poseyendo entre 500 y 600 aminoácidos; esta última particularidad distingue claramente los receptores de actividad tirosina-quinasa de los otros receptores de un sólo elemento transmembranal, cuyo dominio interno es sensiblemente

más corto, como sucede con el IL-2R de 13 aminoácidos, el NGFR de 151, el LDLR de 50, el de transferrina de 61 o los de Ig de 103.

Precisamente, el gran volumen del dominio citoplasmático de los receptores tirosina-quinasa es debido a que en él se encuentran al menos cuatro zonas de distinta funcionalidad: en la más cercana al segmento yuxtamembranal se hallan los lugares de unión ATP, principalmente constituídos por residuos lisina; a continuación una zona hidrofílica de separación, de distinta longitud según la subclase de receptores de tirosina-quinasa de que se trate, seguida de la región propiamente catalítica que selecciona, admite y modifica el correspondiente sustrato, donde existen puntos de autofosforilación cuya finalidad es regular la interacción con los sustratos celulares y que se concreta en un residuo tirosina; finalmente, existe una larga cola hidrófila, constituída por pequeños aminoácidos y, por tanto, de gran flexibilidad lo que le permite doblarse sobre sí misma y así interactuar con el dominio tirosina-quinasa; esta cola finaliza en un carboxilo terminal y a lo largo de la misma se hallan sitios de autofosforilación.

El esquema general de los receptores de actividad tirosina-quinasa sufre multitud de modificaciones en cada uno de los tipos o grupos en que pueden ser subdivididos; tal vez, la parte que tiene mayor similitud entre ellos es, justamente, su dominio más característico, esto es, el que desarrolla la actividad trirosina-quinasa, que no sólo es común a los receptores de ese tipo, sino incluso a otras tirosina-quinasas (Hunter T. y Cooper J.A., 1985) y, más aún, también a quinasas específicas de treonina y serina, si bien, en estos casos la similitud es menor. Donde hay una gran diversidad entre los receptores del grupo, es en la cola carboxílica final, con longitud variable entre 70 a 200 aminoácidos.

Una importante característica de los receptores de actividad tirosina-quinasa es que cuando son estimulados por sus respectivos ligandos, en el dominio extracelular, la modificación conformacional que de ello se deduce lleva a una oligomerización de los receptores; generalmente, lo que se da es una dimerización, es decir, se unen dos receptores entre sí, lo que parece estabilizar la interacción entre dominios citoplasmáticos adyacentes, lo cual resulta imprescindible para la activación de la función tirosina-quinasa (Schlessinger J., 1988; Williams L.T., 1989).

Este proceso de dimerización (Fig. 11) puede ser inducido de diferentes formas: a) por una sola molécula de ligando (ligando monomérico) por receptor, produciéndose el hecho de que cuando dos receptores contiguos se han acoplado a su respectivo ligando, se juntan formando una unidad dímera como sucede con los receptores de EGF (Greenfield C. y col. 1989); b) en otros casos se trata de receptores con dos dominios éxteriores

unidos por puentes disulfuro (subclase II), cada uno de los cuales acepta una molécula de ligando con lo que se aproximan más cada una de las subunidades que forman el dominio exterior, lo que a su vez produce un acercamiento de los dominios citoplasmáticos, constituyéndose así un dímero funcional; c) en otros casos el ligando es bivalente, es decir, una sóla molécula del mismo puede unirse simultáneamente a los dominios exteriores de dos receptores distintos, por lo que en la práctica quedan unidos por el agonista dímero, que a su vez dimeriza a ambos receptores: esto sucede con factores como el PDGF y el CSF-1 (Seifert R.A. y col., 1989; Heldin C.H. y col., 1989; Hammacher A. y col., 1989).

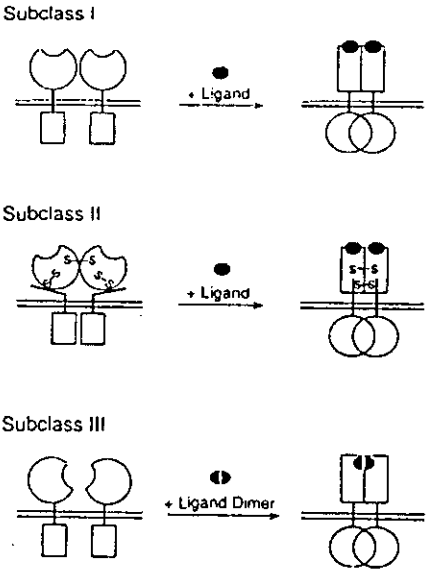


Fig. 11.- Modelos de dimerización de los receptores tirosina-quinasa, según sus subclases: ligando monomérica y formación del dímero (I); dos moléculas de ligando se unen a un receptor dimerizado por puentes disulfuro (S-S) (II); un ligando dimérico se une a dos receptores (III). (Tomado de Ullrich A. y Schlessinger J., 1990, con autorización del autor).

Esta oligomerización de los receptores de factores de crecimiento no sólo potencia la actividad tirosina-quinasa, sino que refuerza la afinidad ligando-receptor (Yarden Y. y Schlessinger J., 1987a y 1987b; Böni-Schnetzler M. y Pich P.F., 1987). De hecho, la oligomerización es un fenómeno que ha sido observado tanto en preparaciones de células vivas, como en membranas aisladas e, incluso, en receptores purificados (Yarden Y. y Schlessinger J., 1987a y 1987b, Cochet C. y col. 1988).

Pero aparte de los rasgos comunes entre los receptores de actividad tirosina-quinasa, a medida que se ha podido ir conociendo su estructura y la

secuencia de los aminoácidos que la conforman, se ha deducido por comparación de aquellos hoy día mejor conocidos, que existen diferencias importantes entre unos y otros, lo que ha llevado a clasificarlos inicialmente en tres subclases (Yarden Y. y Ullrich A., 1988) y posteriormente, por subdivisión de la tercera subclase, en cuatro (Ullrich a. y Schlessinger J., 1990) (Fig. 12).

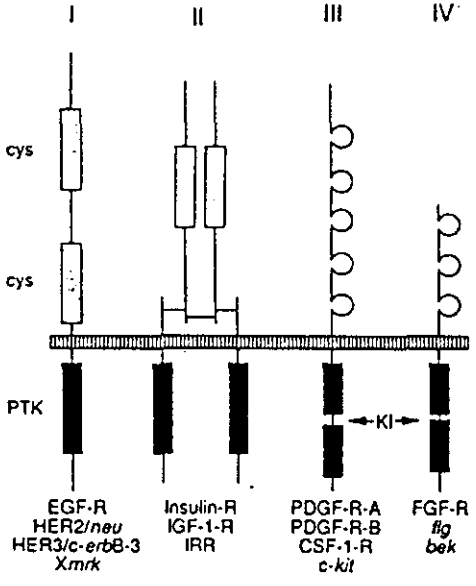


Fig. 12.- Representación esquemática de las subclases de receptores de tirosina-quinasa.
I.- Dos secuencias ricas en cisteína en el dominio exterior y un sólo dominio (entero) citoplasmático.
II.- Dominio exterior dimerizado y dos dominios citoplasmáticos.
III y IV.- Lugares tipo inmunoglobulina en el dominio exterior (cinco en III, tres en IV), y el interior dividido por un lugar de inserción de quinasa (KI).
Debajo de cada subclase figuran algunos de los ligandos específicos (en abreviatura). (Tomado de Ullrich A. y Schlessinger J., 1990, con autorización del autor).

La subclase I se distingue por: a) presentar el dominio exterior dividido en dos secuencias que contienen cisteína y son semejantes entre sí; b) su dominio interno es contínuo y c) en su conjunto se trata de un receptor monomérico; el paradigma de esta subclase I es el receptor de EGF, cuyo dominio exterior está dividido en cuatro subdominios (Fig. 13); dos de ellos (el II y el IV) son las secuencias ricas en cisteína y están más próximas a la superficie exterior de la membrana celular y contactando entre sí, mientras que los otros dos (el I y el III) se hallan en una posición algo más elevada y en un plano perpendicular al que forman los anteriores, de forma que cuando el ligando se une a las cisteínas de los subdominios II y IV, se está

apoyando en los I y III, cuya estructura es, por esta causa, la que selecciona el tipo de ligandos que pueden ser fijados por el receptor.

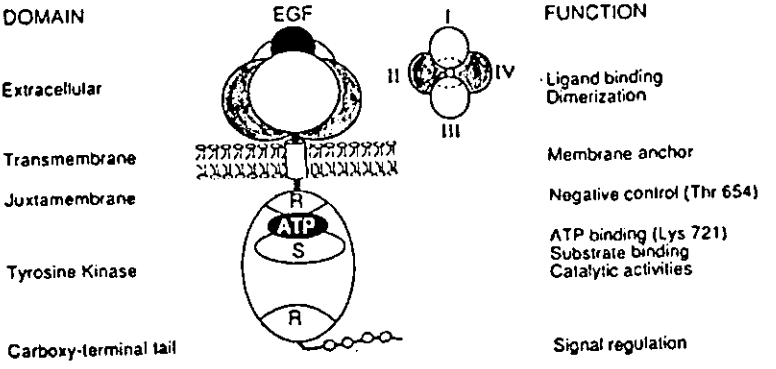


Fig. 13.- Topología estructura-función propuesta para el receptor de EGF. Los subdominios II y IV (oscurecidos) son las regiones ricas en cisteína del dominio extracelular, mientras los I y III forman la "llave" que selecciona el ligando. Vista desde el lado (izquierda) y desde arriba (derecha). En el dominio citosólico: lugar de fijación del ATP (ATP), del sustrado endógeno (S) y de factores reguladores (R).

(Tomado de Ullrich A y Schlessinger J., 1990, con autorización del autor).

El dominio exterior penetra a través de la membrana por medio de una zigzagueante cadena de aminoácidos que constituyen un tramo hidrófobo y emerge de la cara interna de la bicapa lipídica, formando el dominio yuxtamembranal que consta de 40-50 aminoácidos; en esta región se encuentra, en el receptor de EGF, un residuo treonina en la posición 654, de singular importancia juntamente con un residuo serina, ya que en ellos puede producirse el efecto fosforilante de la proteína-quinasa C, a través de lo cual tiene lugar el proceso llamado transmodulación de los receptores, que consiste en que el efecto del ligando específico sobre la actividad tirosina-quinasa, puede ser moderado por otro ligando, esto es, por un estímulo heterólogo; así, la activación del receptor de PDGF modifica la afinidad del EGF por sus receptores específicos, que se hallen situados en la misma célula (Lin C.R. y col., 1986).

De hecho, la fosforilación de dicho residuo treonina por acción de la proteína-quinasa C tiene como consecuencia la disminución de la actividad

tirosin-quinasa del receptor (Davis R.J., 1988), por lo que se considera que la fosforilación aludida está relacionada con la acción mitógena del receptor (Livneh E. y col., 1988), modulándola. A su vez, la fosforilación de la fosfolipasa C_γ activa esta enzima que -sin intervención de ninguna proteína G- pone en marcha el sistema efector del metabolismo del PIP_2, en su doble vía de producción de DAG, que a través de una proteína-quinasa va a abrir canales iónicos de calcio, por un lado, y por otro sigue la vía de formación de IP_3, el cual se une a receptores específicos situados en los depósitos intracelulares de ión calcio, movilizándolo.

En cuanto al dominio interno que se continúa desde el segmento yuxtamembranal, sigue la regla general de los receptores de actividad tirosina-quinasa que consiste en que en tal dominio debe existir una secuencia Glicina-X-Glicina-XX-Glicina-X-(15-20)-Lisina, que constituye el lugar de unión del ATP, de modo que si en varios de los receptores (incluyendo el de EGF) se reemplaza la Lisina por un residuo diferente, se suprime por completo la actividad tirosina-quinasa (Chou C.K. y col., 1987; McClain D.A. y col., 1987; Rusell M.F. y col., 1987; Honegger A.M. y col., 1988; Chu W.S. y col., 1989; Williams L.T., 1989). Esa región va seguida por la que presenta los lugares de acoplamiento del sustrato y, por tanto, donde tiene lugar la actividad catalítica tirosina-quinasa; a continuación, una secuencia de unos 10-20 aminoácidos viene a ser la región donde se efectúa la interacción con factores de regulación.

La cola final es uno de los elementos más variables entre los receptores de actividad tirosina-quinasa, pero tiene siempre en común el contener un carboxi-terminal y residuos tirosina que representan lugares de autofosforilación, ya que la longitud y flexibilidad de la cola permite la interacción de ésta con los lugares de acoplamiento del sustrato a la tirosina-quinasa y de esa manera se produce una modulación de la actividad de ésta; así y todo, parece que para esta función no es esencial el residuo tirosina ya que algunos autores (Bertics P.J. y col., 1988; Honegger A. y col., 1988; Khazaie K. y col., 1988) han realizado experiencias en las que ese residuo ha sido sustituído por fenilalanina sin que se modifiquen las propiedades biológicas y enzimáticas, en el receptor de EGF.

La subclase II (Fig. 12) de los receptores de actividad tirosina-quinasa reúne los IR e IGF_1R y, en contraste con la subclase anterior tiene una estructura heterotetramérica, es decir, posee dos subunidades α en el exterior celular y dos subunidades β en el interior, por lo que pueden formularse como $\alpha_2\beta_2$. Las subunidades α poseen los dominios ricos en cisteína, semejantes entre sí, que representan los lugares de fijación del ligando, mientras la región amino-terminal, del aminoácido 20 al 120 en el IR, sería

la estructura destinada a la selección del ligando, como ocurría en los subdominios I y III del receptor de EGF (Wedekind F. y col., 1989).

Las dos subunidades α del dominio exterior se hallan unidas entre sí por un puente disulfuro, y además, cada una de ellas se une mediante también un puente disulfuro con una subunidad β, las cuales atraviesan la membrana celular y constituyen los dominios citoplasmáticos del receptor. El dominio yuxtamembranal es muy semejante entre los receptores de esta subclase II hasta el punto que hay una homogeneidad entre ellos de un 75%. La porción catalítica es la más coincidente entre todos los receptores de actividad tirosina-quinasa, de las distintas subclases y, por lo tanto, los de la II presentan una estructura de este dominio parecida a lo descrito para los de subclase I; si bien, dado que son dos subunidades β paralelas, éstas se unen formando un dímero cuando el receptor se acopla con dos moléculas de su ligando específico, cada una con una de las subunidades α del dominio exterior, como se comentó anteriormente.

La dimerización de todo tipo de receptores de actividad tirosina-quinasa, de cualquiera de las subclases de este grupo, ha sido estudiada y comprobada mediante experiencias en que se construyen artificialmente los llamados receptores quiméricos, consistentes en unir dominios de receptores de las distintas subclases los cuales resultan perfectamente funcionales (Riedel H. y col., 1989). El mecanismo de dimerización incluso ha hecho sospechar que ésta pueda producirse espontáneamente, en la misma célula, resultando la formación de dímeros mixtos entre receptores muy similares, como pueden ser los de esta subclase II, tales como los IR e IGF_1, lo cual parece haber sido demostrado en algunos casos, acuñándose para ellos el término de heterodímeros (Hammacher A. y col., 1989; Soos M.A. y Siddle K., 1989).

La subclase III (Fig. 12) incluye los receptores de factores de crecimiento tales como el PDGF-A, el PDGF-B y el CSF-1 (factor estimulante de colonias o factor de crecimiento de macrófagos) y se distinguen por características muy específicas: son monómeros en cuyo dominio exterior se encuentran repetidos y alineados cinco segmentos semejantes a los de las inmunoglobulinas, que constituyen lugares de anclaje los cuales incluyen residuos de cisteína (Coussens L. y col., 1986); otra de sus principales características es que el dominio tirosina-quinasa citoplasmático está dividido en dos mitades separadas por una larga cadena de más de cien aminoácidos principalmente de carácter hidrófilo la cual parte, por lo tanto, esta región en dos subdominios, uno con un terminal amino que propicia el acoplamiento del ATP, mientras el segundo presenta un carboxi-terminal; la zona quinasa intercalada contiene un residuo tirosina, en posición 751, que constituye el

lugar de autofosforilación, proceso que regula la interacción con los sustratos endocelulares (Kazlauskas A. y Cooper J.A., 1989).

La subclase IV (Fig. 12), se ha desgajado de la subclase anterior -a la que es muy semejante- por el hecho de presentar en el dominio exterior únicamente tres lugares tipo-inmunoglobulina (parecidos a los del receptor de interleuquina-1), pero su dominio interior está igualmente dividido en dos mitades con un largo intervalo donde radica la actividad quinasa. A esta subclase pertenecen los receptores del FGF (factor de crecimiento de fibroblastos) tanto ácidos, como básicos (Ruta M. y col., 1989; Pasquale E.B. y Singer S.J., 1989), que han sido denominados como *fig* y *bek*.

Con todo, aún no se conocen en su integridad los mecanismos por medio de los cuales tienen lugar las acciones de los receptores de actividad tirosina-quinasa, hasta el punto que algunos autores (Margolis B. y col., 1989 y 1990) sostienen que ciertos factores de regulación, que han sido llamados "partículas de transferencia de señal" (Ullrich A. y Schlessinger J., 1990), están acoplados permanentemente a los receptores en el dominio tirosina-quinasa cuando éstos se hallan inactivos; cuando el receptor es activado por el ligando, el cambio conformacional que se produce permite la fosforilación en residuos tirosina de tales factores reguladores, lo que lleva consigo la disociación de éstos con respecto al receptor; esta nueva conformación del receptor activado da lugar a sitios de fijación de los sustratos específicos como la fosfolipasa C_{γ}, la fosfatidil inositol-3-quinasa, la proteína activadora de *ras*-GTP-asa y el *raf*-proto-oncogene; cuando éstos -formando un conjunto o individualmente- se acoplan en tales lugares contituyen la "partícula de transferencia activada" capaz de poner en marcha la respuesta celular, que suele ser múltiple.

Efectivamente, los eventos que se promueven por la activación ligando-receptor -todos ellos encaminados a la progresión de la vida celular- incluyen funciones tan diversas como: transporte de ion calcio y de glucosa, activación de quinasas de membrana, cambios morfológicos como el repliegue de la membrana o la modificación del citoesqueleto, síntesis de poliaminas, glicolisis, fosforilación de la proteína S6 ribosomal, síntesis del DNA y replicación celular; de hecho, a las 3-20 horas del acoplamiento del ligando, se han encontrado aumentadas las síntesis de proteínas, RNA y DNA (Rosen O.M., 1987; Cochran B.H., 1985; Carpenter G. y Cohen S., 1979; Foesch E.R. y Schmid C., 1985; Stanley E.R. y col., 1983). Por todo ello la respuesta obtenida se considera pleitotrópica, ya que abarca múltiples aspectos del trofismo celular.

A continuación de la activación de los receptores, una vez producido el efecto, éstos son incluídos en cavidades que se recubren de una pared

gruesa y son internalizados para ser degradados, o bien, reciclados, según los casos. Riedel H. y col. (1989) han estudiado, mediante receptores quiméricos híbridos de receptores EGF-insulina, cuál es el destino de los mismos una vez internalizados y cuál es la estructura que los dirige a ciertos dominios citoplasmáticos, encontrándose que para que pueda producirse la degradación del receptor es necesario que conserve su actividad quinasa -indispensable para que se dirija a los lisosomas-, en cambio, la autofosforilación no es la señal necesaria para que se produzca la degradación (McClain D.A. y col., 1987; Russell D.S. y col., 1987; Honegger A. y col., 1987 y 1990a y b; Glenney J.R. Jr y col., 1988; Chen W.S. y col., 1989).

Pero precisamente porque la respuesta del receptor de actividad tirosina-quinasa activado es una señal mitogénica, como se comentó anteriormente, dirigiendo el crecimiento y la diferenciación celular, ello supone una pontencial oncogenicidad en los receptores de actividad tirosina-quinasa. Efectivamente, en determinadas circunstancias se produce la subversión de la señal, lo que da lugar al crecimiento celular anómalo y desordenado, con el consiguiente efecto oncogénico.

De hecho, los receptores tirosina-quinasa son susceptibles de convertirse en oncogenes. Parece que en ese proceso no son de importancia las mutaciones espontáneas que puedan producirse sino más bien los fenómenos de la activación autocrina y de la sobreexpresión de receptores. La activación autocrina lleva a una transformación del fenotipo (Sporn M.B. y Todaro G.J., 1980), así, en numerosas células cancerosas se ha encontrado la coexpresión de factores de crecimiento y sus receptores, tales como PDGF (A y B), FGF (ácido y básico) (Factor de crecimiento de fibroblastos), TGFα (Factor α de crecimiento transformante) y sus respectivos receptores.

Por otra parte, también se encuentra en las células cancerosas sobreexpresión de receptores, lo que se debe a amplificación de los genes (Liberman T.A. y col., 1985; Yamamoto Y. y col., 1986; Kraus M.K. y col., 1987; Yokota J. y col., 1986; Van der Nijver M. y col., 1987); pues bien, esta circunstancia unida a la activación autocrina desencadena la transformación y disregulación del efecto de los receptores tirosina-quinasa, convirtiéndolo en una señal subvertida que lleva al desarrollo acelerado múltiple y desordenado de las células y, por tanto, a la formación de tumores (Di Fiore P.P. y col., 1987; Velu T.J. y col., 1987; Riedel H. y col., 1988).

De hecho existe un sinnúmero de oncogenes derivados de receptores de actividad tirosina-quinasa, como las familias *erb, fms, kit, neu,...* (Wolford J.W. y col., 1988; Rousel M.F. y col., 1988; Bergman C.I. y col., 1986; Weiner D.B. y col., 1989; Khazaie K. y col, 1988).

6.3.1.1 Posibles estrategias futuras

En el caso de los receptores de actividad tirosina-quinasa, se pueden perfilar dos estrategias divergentes en la búsqueda y diseño de nuevos fármacos que puedan actuar sobre ellos: por un lado, sustancias estimulantes que sustituyan, amplíen o repongan el efecto de los factores de crecimiento, logrando así la reproducción y mantenimiento de células y, por lo tanto, de los tejidos que se hallen lesionados, disminuídos o afectados por alguna patología; la utilización terapéutica de factores de crecimiento tejido-específicos será, sin duda uno de los más amplios terrenos de investigaciones futuras.

Por otro lado, debido a la potencial oncogenicidad de los receptores tirosina-quinasa, una segunda estrategia es la búsqueda de sustancia capaces de impedir la formación de oncogenes derivados de este tipo de receptores, evidentemente, en la investigación de antitumorales. En la práctica, esta clase de receptores están siendo un excelente modelo en los estudios dirigidos a comprender los mecanismos de la génesis del cáncer.

6.3.2 Receptores no tirosina-quinasa

Dentro del Grupo 1 de receptores de membrana se consideran una serie de ellos, también monoméricos, pero que carecen de actividad tirosina-quinasa y, por supuesto que no ejercen su acción a través de proteínas G. Este grupo recoge muy variados tipos de receptores, algunos de los cuales tienen poco en común en cuanto su estructura y mecanismos de acción, por lo que el grupo resulta extremadamente heterogéneo. Así mismo, las funciones que desarrollan los distintos ligandos específicos son muy variadas, es decir, que del acoplamiento ligando-receptor no se deducen acciones celulares, como puede ser: contracción, secreción, crecimiento, duplicación, etc... sino procesos como la captación de sustancias circulantes, para su eliminación, reutilización o metabilización.

Este es el caso de los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) situados en el tejido hepático y que al reconocer a tales liporpoteínas las fijan, sufriendo inmediatamente un proceso de internalización mediante el cual son retiradas las LDL del torrente circulatorio. Algo semejante ocurre con los receptores que facilitan la degradación de las atriopeptinas o Factor Natriurético Atrial (ANF); en efecto, la administración de ANF produce niveles plasmáticos muy pasajeros, con una semi-vida de eliminación de pocos minutos, sin embargo, se comprobó que la sangre por sí misma no es capaz de degradar tal sustancia con rapidez (Condra C. y col., 1988), lo que hizo sospechar que el proceso de degradación tiene lugar en otros tejidos; efectivamente, se han encontrado en diversos órganos como el riñón, el

hígado y los músculos estriados, receptores capaces de la captación de ANF y, por lo tanto, de la depuración sanguínea ("clearance") del mismo, por lo que se les ha denominado con las siglas C-ANF (Winquist R.J., 1991).

Precisamente, los receptores de ANF son un ejemplo típico de este grupo carente de actividad tirosina-quinasa; en este caso, el ANFR posee un dominio externo rico en residuos cisteína donde se encuentran los lugares de fijación del ligando; la longitud total de la cadena es de algo más de mil aminoácidos, pero,en realidad, existen dos subtipos: el denominado A posee 1.057 aminoácidos y presenta una mucho mayor afinidad hacia el ligando que el subtipo B de 1.047 residuos (Schultz S., 1989; Chang M.S., 1989); la gran diferencia de este receptor respecto a los del grupo anterior es que en este caso, el dominio interior está acoplado al enzima guanilato-ciclasa, que al activarse actúa sobre el GTP convirtiéndolo en GMPc, el cual activa, a su vez a una proteína-quinasa-dependiente de GMPc; varios tipos de fosfo-di-esterasas (PDE) metabolizan el GMPc a una forma inactiva (5'-GMP), con lo que cesa el efecto ligando-receptor.

Otra sustancia que actúa estimulando la enzima guanilato-ciclasa es el Factor Relajante Derivado de Endotelio (EDRF), ya que cuando ejerce su actividad,tanto la relajante de la pared vascular como la antiagregante plaquetaria, se aprecia una importante elevación de los niveles intracelulares de GMPc (Rapoport R.M. y Murad F., 1983; Busse R.A. y col., 1987);dicho factor ha sido definido por Moncada S. y col. (1988) como el óxido nítrico (NO), del que no se conoce todavía si actúa de forma directa o a través de algún mecanismo intermedio, pero en todo caso teniendo al GMPc como segundo mensajero.

6.3.2.1. Posibles estrategias futuras

En estos casos, la estrategia de actuación de nuevos fármacos puede ir dirigida a: a) la inhibición de la activación de la guanilato ciclasa, como ocurre con la hemoglobina ferrosa y con el azul de metileno (Martin W. y col., 1985); b) mantener más tiempo la presencia del GMPc mediante la inhibición de la PDE específica metabolizante del mismo, como se logra con el Zaprinast; c) actuar sobre la proteína-quinasa dependiente de GMPc; hasta hoy no se han conseguido potenciadores de la acción de ésta, pero sí inhibidores, por ejemplo, las isoquinolín sulfamidas y d) en el caso del ANF, una estrategia para prolongar su acción antihipertensiva (por sus efectos natriurético, diurético y relajante de musculatura vascular) es, precisamente, la de bloquear los receptores C-ANF, que -como se comentó anteriormente- son captadores del ANF en diversos territorios tisulares.

6.4 Otros receptores

Existe una gran cantidad de otros receptores que reconocen muy variado tipos de ligandos endógenos y cuya estructura y mecanismo de acción están siendo estudiados, como los relativos a los metabolitos del ácido araquidónico que, por un lado son los derivados de la acción de la ciclo-oxigenasa; así, los receptores denominados DP, EP, FP, IP y TP (Coleman R.A., 1991) reconocen respectivamente las prostaglandinas D_2, E_2, $F_{2\alpha}$, I_2 y el tromboxano A_2; incluso, los receptores EP se han dividido en los subtipos EP_1, EP_2 y EP_3 y, probablemente aparecerán más subtipos de los receptores de prostanoides; en cuanto a los derivados de la acción de la lipo-oxigenasa, los principales receptores descritos son los que corresponden a los leucotrienos LTB_4, LTC_4, LTD_4 y LTE_4, ya que el LTA_4 es sumamente inestable y es hidratado rápidamente transformándose en LTB_4 (Gordon Letts L., 1991).

Otro grupo de receptores es el relativo al sistema renina-angistensina; de los de renina, que se hallan tanto en riñón como en otros tejidos, se han obtenido antagonista con el fin de su uso terapéutico como antihipertensivos; más éxito han tenido como tales los inhibidores de la enzima convertasa, que bloquean el paso de la Angiotensina I a Angiotensina II (AgII) y de los cuales se han comercializado un buen número de ellos, con amplia y eficaz utilización clínica; los receptores de AgII se han subdividido en los tipos 1 y 2, según sus mecanismos sea estimular la vía del fosfoinositol o la inhibición de la actividad adenilil-ciclasa (Timmermans P.B. y col., 1991).

Entre los receptores relacionados con el sistema de coagulación, pueden citarse los receptores de trombina, que actúan también por las vías del fosfatidilinositol y del intercambio Na^+/H^+ (Müller T.H. y Eisert W.G., 1991), así como los del fibrinógeno, sustancia ésta que por su compleja estructura multimérica tiene facilidad para encontrar lugares de fijación en receptores plaquetarios, dando lugar a complejos que modulan los mecanismos de adhesión y agregación por medio de sustancias de la familia de las integrinas, como la citoadhesina, vitronectina, fibronectina... (Müller T.H. y Himmelsbach F., 1991).

Una multitud de péptidos son ligandos de sus correspondientes receptores, así las diversas neuroquininas (NK-1, NK-2 y NK-3), la bombesina cuyos receptores se han subdividido en BB_1 y BB_2, la colecistokinina que puede actuar sobre los CCK-A y CCK-B, los neuropéptidos Y y péptidos YY, de los que se han descrito receptores Y_1 e Y_2, etc... (Lang R.E. y Doods H.N., 1991; Regoli D. y Rouissi N., 1991).

Por supuesto, forzosamente existen receptores en los canales iónicos tanto en los potásicos, de los que existe un sinnúmero de sustancias capaces

de abrirlos y otras tantas de bloquearlos, como de los sódicos en los que actúan fármacos de acciones diversas; así, los anestésicos locales tipo lidocaína bloquean la conducción neuronal por producir un estado de inactividad en los canales de Na^+, mientras la aconitina activa las corrientes de sodio; sustancias provenientes de venenos naturales como la tetrodotoxina (TTX) son usadas experimentalmente como inhibidores de la corriente rápida de ingreso del Na^+ en la célula, para lo que resultan una excelente herramienta de trabajo (Scholtysik G., 1991; Edwards G. y Weston H.H., 1991).

Respecto a los canales de calcio, concretamente a los de tipo L, activados por altos voltajes, en la subunidad α_1 existen lugares de anclaje para estructuras químicas muy diversas como: fenil alquilaminas, benzotiazepinas y 1,4-dihidropiridinas, a cuyas estructuras pertenecen las familias de antagonistas de calcio usados profusamente en terapéutica, incluso, entre las 1,4-dihidropiridinas no sólo existen bloqueantes como la nifedipina y derivados, sino también agonistas de canales de Ca^{++} que actúan abriéndolos, de los que el ejemplo más paradigmático es el Bay K 8644 (Wilffert B. y col., 1991).

Relacionada con los procesos calcio-dependientes, está la proteína calmodulina (posiblemente, la de estructura más constante a lo largo de toda la escala animal y la más ubicua en células eucariotas), de la que se han buscado también sustancias bloqueantes que impidan su acción movilizadora de calcio endocelular, incluso, son objeto de investigación otras que puedan modular la recaptación y la liberación del calcio, por el retículo sercoplasmático (Norman J., 1991; Smith J.S., 1991).

El sistema inmune del organismo se halla coordinado por una serie de polipéptidos que actúan de forma semejante a las hormonas, ya que lo hacen sobre células muy distanciadas debido a que unas son migratorias (linfocitos, macrófagos,...) y otras se hallan en órganos distantes (hígado, médula ósea, bazo,...); muchas de esas células son, a su vez, las productoras de tales polipéptidos -interleuquinas (IL), factor necrosante tumoral (TNF), interferones (IFN),...- que constituyen los ligandos y son de estructuras muy variadas, los cuales se unen a receptores de superficie (que serán, por lo tanto, también muy diversos), para producir una serie de respuestas así mismo muy diferentes; tanto es así que, por ejemplo, los receptores de IFN son cadenas únicas (Agnet M. y col., 1989) mientras los de IL-2 son heterodímeros (Waldmann T.A., 1989); incluso se da el caso frecuente de que un mismo ligando puede acoplarse a receptores distintos que, naturalmente, van a integrar respuestas específicas de cada tipo de receptor, así: la IL-1 activa receptores tanto en las células T como en las B (Chizzinite R. y col., 1989; Bomszty K. y col., 1989) y el TNF reacciona también con varias clases de receptores (Hohmann H.P. y col., 1989; Engelmann H. y col., 1990).

La variabilidad es tal en el sistema inmune que presenta la gran peculiaridad de que existen receptores solubles en los líquidos biológicos, como ocurre con los de IL-2 y TNF (Rubin L.A. y col., 1985; Hohmann H.P. y col., 1989); así mismo, el número de receptores por célula puede variar desde unos pocos centenares a varias decenas de millares; incluso, el mecanismo por el cual un receptor activado da lugar al efecto correspondiente, puede ir desde los receptores de actividad tirosina-quinasa, hasta los que utilizan otras quinasas diversas o los que actúan a través de proteínas G; dándose casos tan peculiares como el de los receptores de IL-6 que al ser activados interactúan extracelularmente con otras proteínas de membrana, que son las que transmiten la señal (Taga T. y col., 1989).

6.4.1 Posibles estrategias futuras

Por todo ello, las estrategias seguidas para influir mediante fármacos sobre el sistema inmune son harto variadas, basadas tanto en obtener análogos de los múltiples ligandos, como en el bloqueo de los variopintos receptores; incluso se ha pensado en lograr modificar el número de receptores celulares, ya que fisiológicamente se da el caso de que los receptores de TNF son regulados por otras citoquinas tales como la IL-1 y el IFN-τ; por cierto, que la naturaleza ya ha previsto el empleo de antagonistas, pues existe un ligando endógeno que se acopla a los receptores de IL-1, pero no produce ningún efecto, por lo que se comporta como un verdadero bloqueante del ligando agonista, la IL-1 (Sickinger P. y col., 1987).

7.- RECEPTORES CITOSOLICOS

Hasta ahora han sido comentados los receptores de membrana, aquellos que tienen que transducir una señal (que llega al exterior de la célula por medio de una sustancia hidrosoluble), hasta el interior de la misma, salvando así la membrana celular que, al ser lipídica, es infranqueable para el primer mensajero; pero cuando éste es de naturaleza liposoluble no necesita tal tipo de transducción, sino que penetra fácilmente en la célula por simple difusión a través de la bicapa lipídica; de ahí, que los receptores específicos de primeros mensajeros de carácter lipófilo no precisen estar situados en la membrana celular, sino que se hallan en el interior de la célula, por lo que se denominan, con propiedad, como receptores intracelulares, endocelulares o citosólicos.

Los primeros mensajeros que poseen propiedades liposolubles son, principalmente, derivados de colesterol, esteroides de acción hormonal cuyos efectos atañen, fundamentamente al desarrollo y a la fisiología de los vertebrados; las hormonas esteroideas comprenden los dos grandes grupos de los corticoides (receptores de glucocorticoides: GR; de mineralcorticoides:

MR) y de los que regulan los procesos de la reproducción (de estrógenos: ER; de progesterona: GR; de andrógenos: AR); el mismo colesterol, cuya síntesis está regida por un mecanismo de retro-regulación, interviene en este proceso a través de receptores citosólicos; igualmente la vitamina D_3 (receptores D_3R), de estructura semejante, actúa de forma similar. Pero a este grupo de agonistas con capacidad de penetrar directamente en la célula pertenecen sustancias de otras estructuras químicas muy diversas, como la hormona tiroidea (receptores TR), el ácido retinoico (receptores RAR) y otros metabolitos relacionados con la vitamina A e, incluso, hormonas de los insectos como el isoprenoide "hormona juvenil" o la ecdysona (ésta de naturaleza esteroidea) que interviene en la metamorfosis de los insectos (Ashbrener M., 1980), por lo tanto de función semejante a la de la hormona tiroidea en la metamorfosis de los batráceos. A estas sustancias naturales pueden añadirse algunas exógenas manofacturadas por el hombre y no sólo las derivadas de hormonas como los corticoides semi-sintéticos, sino otras de estructura completamente distinta tal como el herbicida TCDD (dioxina), cuyo receptor ha sido identificado (Poland A. y col., 1976), y posiblemente otros productos de actividad biológica.

Todas estas sustancias pertenecen a una superfamilia de agonistas que tienen en común, además de unirse a receptores citosólicos y que éstos tienen una estructura semejante, el que de la unión ligando-receptor se deduce una acción de este complejo sobre el núcleo celular, activando, modificando o inhibiendo el mecanismo de transcripción del DNA, con el evidente resultado sobre la síntesis de proteínas. Por eso, algunos autores (Evans R.M., 1988) denominan a esta superfamilia con las siglas LTF, que provienen de : "Ligand-responsive transcription factors".

Efectivamente, la estructura de los receptores y su mecanismo de acción es común para todos los ligandos de la superfamilia. El mecanismo general sigue una serie de pasos bien delimitados: a) penetración del ligando a través de la membrana celular; b) unión del ligando al receptor citosólico; c) cambio conformacional del complejo ligando-receptor, con activación del mismo; d) translocación del complejo que se introduce en el núcleo de la célula; e) unión del complejo a la cromatina, en lugares específicos; f) la unión del complejo al "Elemento de Respuesta Hormonal" (HRE) del DNA induce a la activación (o en algunos casos a la inhibición) de la transcripción.

Todos estos pasos son necesarios para que se produzca el efecto de los ligandos responsables de factores de transcripción, mientras algunos mutantes de los ligandos o de los receptores, pueden dar lugar a alguno de los pasos enumerados, pero sin lograr el resultado final; así, la unión del receptor a una anti-hormona promueve la translocación del complejo y su

localización en el núcleo, pero no se produce la trans-activación o activación de la transcripción.

Los receptores citosólicos son, evidentemente, proteínas, las cuales están constituídas por una cadena de entre cuatrocientos y cerca de mil aminoácidos, en la que se distinguen hasta seis regiones, que se enumeran de la A a la F (Fig. 14).

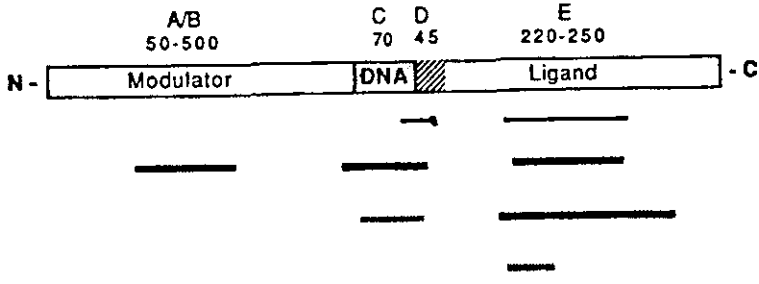


Fig. 14.- Estructura general de receptores citosólicos, con sus regiones A/B, C, D y E y sus respectivas funciones.
(Tomado de Beato M., 1989 con autorización del autor).

Las dos primeras regiones A y B, se considera que tienen un papel modulador en el momento de actuar sobre la transcripción; parece que en ciertos receptores, como los GR, son esenciales para la activación de la transcripción (Giguère V. y col., 1986), mientras que en otros, como en los ER, no son imprescindibles (Kumar V. y col., 1987); la cadena de estas regiones es muy variable entre los distintos receptores, teniendo, eso sí, en común el poseer un grupo amino-terminal.

La región central C es de singular importancia ya que es donde se encuentra la estructura que reconoce el HRE del DNA para fijarse en él, lo que produce, con la cooperación de las regiones A y B, generalmente la activación de la transcripción.

El dominio C es el que conserva mayor identidad entre los diversos receptores de este grupo, de tal forma, que entre los GR, MR y PR, el porcentaje de semejanza está por encima del 90%; entre los ER, D_3R, T_3R_α y T_3R_β, la similitud es de un 87%, aproximadamente; mientras este grupo respecto al primero está sobre un 50% de homología.

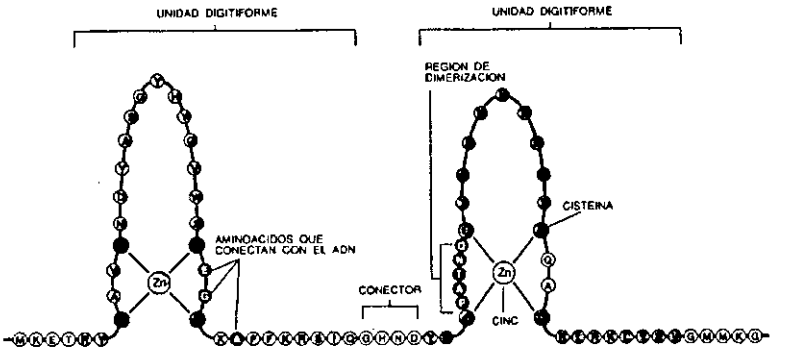


Fig. 15.- Representación del dominio de unión al ADN, del receptor de estrógenos, la secuencia de aminoácidos (letras mayúsculas) presenta dos "dedos de cinc"; en el primero de ellos tres aminoácidos (E, G y A, sobre fondo negro) son los que interaccionan con el ADN, mientras que otros cinco del segundo dedo (Q, N, T, A, P, sobre fondo negro) dan lugar a un dímero con otra molécula de receptor, lo que permite un acoplamiento al ADN, más preciso.

(Tomado de Rhodes D. y Klung A., 1993, con autorización de la revista Investigación y Ciencia; dibujo de Guilbert Gattes).

La cadena de este dominio está compuesta de unos 66 aminoácidos y tiene como principal característica el presentar dos bucles o "dedos" coordinados en su base por el ion zinc unido a dos pares de cisteína (Fig. 15); estos bucles se hallan: uno de ellos al principio del dominio, en la zona próxima a la que termina en un grupo amino y el otro en el extremo opuesto del dominio, en un lugar cercano a la próxima región (la D) y , por lo tanto, hacia el carboxilo-terminal. Ambos forman los "dedos de zinc" 1 y 2 por medio de los cuales el receptor se une al DNA para activar la transcripción en los genes-diana (Green S. y Cahmbon P., 1987). En efecto, el receptor contacta con una de las vueltas de la doble hélice del DNA, fijándose el "dedo de zinc 1" en la hendidura mayor, mientras el "dedo de zinc 2" lo hace en el azúcar fosforado del esqueleto central (Chalepakis G. y col., 1988b).

Pero dado que el HRE donde se fija el receptor para activar la transcripción tiene en el centro de su secuencia una simetría bilateral, se sugirió que ello podía deberse a que para la trans-activación fuera necesaria la dimerización del receptor, lo cual ha sido ya demostrado, al menos, para

el ER (Kumar V. y Chambon P., 1988), de forma que si se interfiere con esta dimerización se produce una trans-activación defectuosa. Por otra parte, parece obvio el que en el proceso del acoplamiento al DNA y para que se produzca la trans-activación es necesario que el receptor sea fosforilado, lo cual también debe ser imprescindible para el reciclado de los receptores. Así pues, el dominio de unión al DNA, al menos el del ER (Schwabe J.W. y Rhodes D., 1991) que se toma como modelo (Fig. 16), consta de dos unidades similares ente sí; en cada una de ellas hay un segmento irregular en forma de bucle en cuya base se hallan dos residuos cisteína, el cual se continúa en un segundo segmento de forma espiral (hélice α) que también presenta dos residuos cisteína en su base; entre las cuatro cisteínas atrapan un átomo de zinc y de esa manera las bases de ambos segmentos quedan fuertemente unidas, constituyendo el "dedo de zinc". Las dos unidades semejantes están unidas por un segmento conector, de suerte que la totalidad del dominio presenta los dos dedos de zinc, ya comentados; en el primero de ellos se hallan tres aminoácidos próximos que son los responsables del reconocimiento de las bases del DNA a las que se van a acoplar específicamente; entre dos de las cisteínas del segundo "dedo de zinc" (las que corresponden al segmento irregular) se encuentran los aminoácidos que constituyen el punto o zona de dimerización; una vez realizada éste, cada proteína del dímero reconoce la mitad del lugar de anclaje al DNA. Ahora bien, se conoce en la actualidad que la secuencia de bases reconocida por el ER y por el TR son iguales excepto en la distancia (número de pares de bases) que separa las dos mitades antes aludidas, lo que ha llevado a la idea de que el dímero debe reconocer dos lugares de unión específica y, además, medir la distancia entre ellos; de esto último se encarga el segundo "dedo de zinc", mientras que del reconocimiento lo hace el primero (hélice de reconocimiento). Por otra parte, las hélices de ambas unidades poseen en su parte central aminoácidos hidrófobos los cuales se atraen y fijan las dos hélices en forma perpendicular (una respecto a la otra), lo que orienta al dímero para que pueda acoplarse abrazando el DNA casi completamente, mientras la hélice α se encaja en el surco mayor del mismo y se establecen enlaces con los grupos fosfatos de los travesaños que unen las cadenas del DNA.

La región D es una cadena de longitud variable según los receptores, lo que implica también una diversidad en la secuencia de aminoácidos; éstos son de tal suerte que confieren a este dominio un carácter hidrófilo que le permiten actuar como bisagra entre las regiones donde residen los lugares de anclaje: la C se acopla al DNA, como ha sido comentado y la E lo hace a la hormona o ligando.

Efectivamente, el dominio E es una cadena de unos 220-250 aminoácidos, en general, y con un grupo carboxi-terminal; todo él presenta una similitud bastante acusada entre los diversos tipos de receptores, rayana

en un 80%; en este dominio es donde se produce el acoplamiento del ligando con el receptor, lo cual promueve el cambio conformacional de éste dando así posibilidad a que el complejo formado reconozca el HRE del DNA del gen-diana y se una a él.

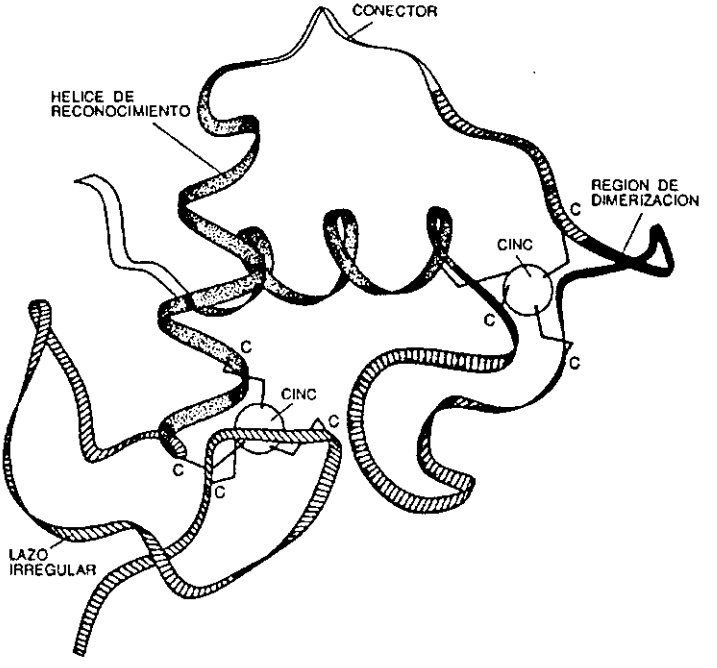


Fig. 16.- Representación de la estructura tridimensional, del receptor de estrógenos, que reconoce al ADN y dimeriza con otra molécula de receptor: consta de dos unidades semejantes, cada una de ellas posee un bucle irregular (rayado) y una hélice (punteada); las hélices de una y otra unidad están en posición perpendicular entre sí (hélice vertical en la unidad de la izquierda y hélice horizontal en la unidad de la derecha); ambas unidades se unen por un tramo conector.

En cada unidad, dos cisteínas (C) del bucle y otras dos de la hélice fijan un átomo de cinc formando los respectivos "dedos de cinc"; los aminoácidos que reconocen las bases específicas del ADN se hallan en la hélice vertical (tres puntos negros); los responsables de la dimerización están en el bucle de la segunda unidad (zona negra).

(Tomado de Rhodes D. y Kung A., 1993, con autorización de la revista Investigación y Ciencia; dibujo de Gabor Kiss).

De hecho, lo que sucede es que mientras el receptor está libre (no acoplado al ligando) se halla asociado a una proteína de choque térmico de 90 Kd en forma de un complejo oligomérico, el cual impide la traslación hacia el núcleo (Groyer A. y col., 1987; Denis M. y col., 1988). Pues bien, al producirse la unión al ligando, se disocia el complejo oligomérico, con lo que queda libre el dominio C del receptor que así puede fijarse en la cromatina.

De tal forma, la acción del ligando sobre el receptor es múltiple: lo activa, promueve su desplazamiento hasta el núcleo y permite su interacción con el DNA; incluso, modifica la cinética de esta interacción acelerándola, con lo que facilita el efecto trans-activador (Schauer M. y col., 1989).

Así, el papel del dominio con carboxilo-terminal resulta verdaderamente complejo, pues además del anclaje del agonista tiene un importante papel en la translocación del receptor e, incluso, en la dimerización y en el proceso de trans-activación del DNA (Kumar V. y col., 1987; Guigère V. y col., 1986; Godowsky P.J. y col., 1988; Webster N.J.G. y col., 1988).

Es de hacer notar, sin embargo, que en algunos casos como en el de los ER y PR no es precisa la traslocación pues aún en ausencia de la hormona, los receptores están localizados en el propio núcleo, si bien, con una unión muy débil que no permite la interacción con el DNA de los genes-diana; cuando la hormona se acopla al receptor, el cambio producido facilita esa interacción (Schrader W.t., 1984; Bailly A. y col., 1986).

En algunos pocos receptores, concretamente en el ER, existe después de la región E, una sexta región (F), cadena de unos 44 aminoácidos, cuya función no es del todo conocida.

En realidad, tampoco es conocido por entero el mecanismo completo por el cual ejercen su acción los receptores citosólicos activados por su correspondiente ligando. Por un lado, se da el caso de que algunos receptores pueden reconocer un HRE que se suponía específico de un receptor distinto; así, los PR y AR son capaces de acoplarse al elemento de respuesta a glucocorticoides (el HRE de los GR) (Beato M. y col., 1989; Umesono K. y Evans R.M., 1989). Existe, por otro lado, la impresión -proveniente de experiencias de intercambio de genes- de que diferentes dominios son intercambiables entre proteínas muy diversas y de que la unión del receptor al DNA en realidad sirve para que el dominio de trans-activación de aquél se aproxime a partículas vecinas que sean las promotoras del efecto (Beato M., 1989). De hecho, se conoce un amplio conjunto de otros factores que actúan en combinación con el complejo ligando-receptor activando partículas adyacentes promotoras de efectos (Schüle R. y col., 1988a y 1988b). Entre estos factores se encuentra el Factor Nuclear I (NFI) que se acumula -en ciertas experiencias- en la vecindad de tales promotores. Otro ejemplo de interacción entre el complejo ligando-receptor y factores de transcripción es que la inducción del gen AGP (glicoproteína α_1 acídica) por los glicocorticoides puede ser inhibida por la cicloheximida, lo que hace presumir que para que se produzca el efecto de la hormona es necesario que tenga lugar la síntesis de algunas proteínas (Baumann H. y col., 1983; Vannice J.L. y col., 1983).

7.1 Posibles estrategias futuras

Dada la complejidad de los receptores citosólicos y las múltiples etapas que se suceden desde la activación por el ligando hasta que el mensaje del que éste es portador llegue a modificar la transcripción del DNA al correspondiente RNA, se comprenderá que existen -y, sobre todo, existirán en un futuro, cuando se amplíen los conocimiento actuales- gran cantidad de posibles estrategias para incidir en tales mecanismos a fin de obtener un resultado terapéutico; en la práctica, ya existen algún tipo de anti-hormonas, que son capaces de unirse al receptor e, incluso, el complejo formado puede acoplarse al correspondiente HRE y, sin embargo, la activación de la transcripción queda inhibida.

Por otra parte, se conoce desde hace tiempo que el déficit de ciertas hormonas, como los corticoides o la hormona tiroidea, tiene una importante relación con trastornos del sistema nervioso central (Sapolsky R.M., 1986), por lo tanto, el estudio y mayor conocimiento de los receptores será una contribución especialmente importante para descubrir la causa de enfermedades psiquiátricas y su posible diagnóstico, pero también será, sin duda, fuente de obtención de fármacos adecuados para su tratamiento.

Mediante modificaciones de la cadena amino-terminal, se han obtenido receptores que disminuyen su actividad entre 10 y 20 veces, como ha sucedido con GR y ER (Yamamoto K. y col., 1976; Kumar V. y col., 1987), lo que hace suponer que mediante la manipulación de los receptores podrá, en su día, conseguirse un efecto inverso, es decir, lograr potenciar su actividad.

El hecho de que se haya encontrado un receptor citosólico para el herbicida dioxina (Poland A. y col., 1976), el cual tiene una serie de actividades metabólicas ya que es de estructura química semejante a la hormona tiroidea, hace suponer que en un futuro se podrán conseguir otros análogos de hormonas que, incluso, actúen sobre receptores de los que todavía no se conoce el ligando natural, como es en este caso.

El conocimiento de que el déficit de zinc en la dieta puede acarrerar retraso en el desarrollo sexual se ha relacionado con una posible carencia de este metal en los receptores de estrógenos y andrógenos, que al verse privados del constituyente esencial de los "dedos" necesarios para el acoplamiento al gen-diana, podrían realizar su función deficientemente. En otro aspecto, la disfunción de un "dedo de zinc", causada por una mutación genética, que impide el acoplamiento a un determinado DNA, se ha comprobado que es la causa del desarrollo del tumor renal denominado de Wilm. En todo caso, no es improbable el pensar que algún día puedan llegar

a diseñarse secuencias con "dedos de zinc" que reconozcan específicamente lugares-diana del DNA, con fines terapéuticos.

Otros tipos de mutaciones en ER y AR dan como resultado el que cánceres de mama y de próstata que eran esteroide-dependientes, pasen a ser independientes de tal tipo de tratamiento (Sledge G.w. y McGuire W.L., 1983), lo que indica la relación entre estructura de los receptores y el desarrollo de patologías.

Finalmente, no hay que olvidar el sorprendente parecido de algún segmento del receptor GR con el oncogen *erb* A (Hollemberg S.M. y col., 1985; Weinberger C. y col., 1985; Debuire B. y col., 1984), lo que se ha confirmado para otros receptores, lo cual hace suponer que también los receptores citosólicos o su manipulación puedan estar relacionados en un futuro con la terapia anti-tumoral (Green S. y col., 1986; Krust A. y col., 1986).

8.- EPILOGO

Hace escasamente veinte o treinta años el conocimiento que teníamos sobre la composición y estructura de los receptores era prácticamente nulo, apenas una intuición y un objetivo de estudio, un campo a investigar, un deseo de conocer; en cambio, en este breve período de tiempo se ha llegado a desentrañar hasta detalles mínimos: su localización, la diversidad que de ellos existe, el cómo de su activación y transducción de la señal recibida, los mecanismos en los que se hallan implicados y los que ponen en marcha, etc... todo lo cual, aunque sin ser exhaustivo, representa un avance insospechado e incalculable respecto a la intuición de que se partía; aún más, se ha aprendido a aislarlos, a manejarlos, a expresarlos en células que no son las propias en las que se encuentran en la naturaleza y, por fin, a manipularlos, a construirlos según la voluntad del hombre, siendo hoy relativamente sencillo el obtener receptores modificados en algunos de sus dominios, e incluso, los denominados quiméricos, compuestos mixtos de diversas clases de receptores.

Así y todo, el científico tiene la sensación de que, en realidad, no se ha hecho nada más que empezar a conocer el mundo fascinante de los receptores, sus funciones y el cómo actuar sobre ellos para conseguir una mejor rendimiento que pueda tener aplicación terapéutica o, posiblemente, de perfeccionamiento de la especie humana. Naturalmente, todavía están por investigar y por descubrir multitud de aspectos relativos, por ejemplo, a: el por qué del orden de los aminoácidos en muchas de las secuencias, las fuerzas que dan lugar a las conformaciones espaciales y sus modificaciones, las distancias óptimas entre determinados residuos para que tengan lugar los

efectos correspondientes, las cascadas bioquímicas de muchos de los efectores, la existencia y funcionamiento de terceros mensajeros (ya se habla de ellos) y, posiblemente, de cuartos,... y otros muchos previsibles e imprevisibles procesos.

Todo lo cual, se espera que permita, no sólo el diseño y obtención de nuevos fármacos, sino también la modificación de los propios receptores, la programación de los mismos y sus funciones, la vectorización de los fármacos hacia los lugares específicos donde deben actuar, etc... Hasta, incluso, el desvelar el origen genético de los receptores, lo que permitirá, como ya está sucediendo, interpretar y conocer mejor el inmenso misterio de la evolución biológica de los seres vivos.

Sin embargo, hay preguntas que seguramente el ser humano jamás llegará a contestar, como es el desconcertante hecho de que nuestros receptores sepan reconocer y, por tanto, ser activados por sustancias exógenas al organismo, existentes en la naturaleza, principalmente en el reino vegetal, lo cual ha sido, en realidad, la génesis del concepto de medicamento; efectivamente, el hombre conoció desde sus albores que en las plantas se encuentran principios curativos capaces de aliviarle o mejorarle en sus enfermedades, conocimiento que proviene, lo que es más sorprendente, de otras especies animales que son capaces de distinguir entre aquellos vegetales que les conviene ingerir -aún siendo carnívoros, en muchos casos- cuando padecen ciertas dolencias y las que deben evitar por el peligro de su toxicidad.

Así y todo, no es éste el principal problema que acucia el Hombre como ser pensante, como único espectador (que conozcamos) de la Naturaleza, sino que el misterio que le sobrecoge es el del sentido último del Cosmos, las llamadas "grandes preguntas" que todo ser humano se plantea y que ha formulado jocosamente el pensador y humorista contemporáneo Woody Allen, cuando dice: "No sé de donde vengo, ni a donde voy; de lo único que estoy seguro es que... llegaré tarde". Efectivamente, por mucho que la Ciencia se adentre hasta la más recóndita intimidad de la organización de la vida, de la que el conocimiento de los receptores no es más que un peldaño casi inicial, es probable que no alcance nunca a desvelar el misterio de la existencia de la propia vida y, menos aún, de su sentido, o tal vez ¿será posible?.

BIBLIOGRAFÍA

Aguet M. et al. (1988) *Cell* 55, 273.
Ahlquist R.P. (1948) *Am. J. Physiol.* 153, 586.
Ahlquist R.P. (1966) *J. Pharm. Sci.* 55, 359.
Aoki M., Itezono Y., Shirai H. (1991) *Tetrahedron Left*, 32 4737.

Ashbrener M. (1980) *Nature* (London) 225, 435.
Bailly A., Le Page C., Rauch M., Milgrom E.E. (1984) J. 5, 3235.
Barger G. y Dale H.H. (1910) *J. Physiol. Lond.* 41, 19.
Bargmann C.I., Hung M.C., Weinberg R.A. (1986) *Cell* 45, 649.
Baumann H., Firestone G.L., Burgess T.L., Gross K.W., Yamamoto K.R., Held W.A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 563.
Beato M. (1989) *Cell* 56, 335.
Bennett C.f., Mong S., Wu H.-L.W., Clark M.A., Wheeler L., Crooke S.T. (1988) *Molec. Pharmacol.* 32, 87.
Benovic J.L., Mayor F., Sumers R.L., Caron M.G. (1986) *Nature* 321, 869.
Benovic J.L., Palczewski K. (1991) *Trends Biochem Sci.* 16, 387.
Bertics P.J., Chen W.S., Hubler L., Lazar C.S., Rosenfeld M.G., Gill G.N. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3610.
Blair L.A.C., Levitan E.S., Marshall, J., Dionne V.e., Barnard E.A. (1988) *Science* 242, 577.
Bleasdele J.E., Thakur N.R., Gremban R.S. (1990) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 756.
Boddeké E.W., Herrling P. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 234. Ed. Ellis Horwood, New York.
Bomalaski J.S., Hirata F., Clark M.A. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 139, 115.
Bomsztyk K. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8034.
Böni-Schnetzler M., Pilch P.F. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 84, 7832.
Brisson A., Unwin P.N. (1985) *Nature* 315. 474.
Burnley S.K., Petsko G.A. (1988) *Adv. Protein Chem.* 39, 125.
Busse R.A. et al. (1987) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 336, 566.
Campbell P.T. et al. (1991) *Mol. Pharmacol.* 39, 192.
Carpenter G., Cohen S. (1979) *Ann. Res. Biochem.* 48, 193.
Cartaud J., Benedetti L., Sobel A., Changeux J.P. (1978) *J. Cell Sci.* 29, 313.
Chalepakis G., Arnemann J., Slater E., Brüller H.J., Gross B., Beato M. (1988a) *Cell* 53, 371.
Chalepakis G., Postma J.P.M., Beato M. (1988b) *Nuc. Acids Res.* 16, 10237.
Chang M.S. (1989) *Nature* 341, 68.
Chen W.S., Lazar C.S., Lund K.A., Welsh J.B., Chang C.P., Walton G.M. Der C.J., Wiley H.S., Gill G.N., Rosenfeld M.G. *Cell* 59, 33.
Chizzonite R. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8029.
Chou C.K., Dull t.J. Russell, D.S., Gherzi R., Lebwohl D., Ullrich A., Rosen O.M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 1842.
Clark A.J. (1926) *J. Physiol.* (Lond.], 61, 530.
Clark A.J. (1933) "The mode de action of drugs on cells" W. Wood Co., Baltimore.
Cochet C., Kashles O., Chambaz E.M., Borrello I., King C.R., Schlessinger J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3290.
Coejran B.H. (1985) *Adv. Cancer Res.* 45, 188.
Coleman R.A. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 151. Ellis Horwood, New York.
Collins S., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1992) *TIBS* 17, 37.
Collins S.; Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:, 497.
Condra C. et al. (1988) *J. Clin. Invest.* 81, 1348.
Corckcroft V.B., Osguthorpe D.J. Barnard E.A., Lunt G.G. (1990) *Proteins* 8, 386.
Coussens L., Van Beveren C., Smith D., (1986) *Nature* 320, 277.
Coussens L., Yang-Freng T.L., Liao Y.C. Chen E.,Gray A., et al. (1985) *Science* 230, 1132.
Cuatrecasas P. y Hollenberg M. (1976) *Avd. Protein Chem* 30, 252.
Cuatrecasas P. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 63, 450.
Cull-Candy,S., Usowicz M.M. (1987) *Trends Pharmacol.* 8, 218.
Czupinski O., Malarki Z., Sobezyk L. (1980) *Bull. Acad. Pol. Sci. Sev. Sci. Chim* 28, 661.
Dale H.H. (1933) *J. Physiol.* 80, 10p.
Dales H.H. (1906) *J. Physiol.* 34, 163.

Davis R.J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 9462.
Debuire et al. (1984) *Science* 224, 1456.
Demoliou-Mason C.D. y Barnard E.A. (1990) "Receptor Biochemistry" pág. 99. IRL Press, Oxford
Denis M., Poellinger L., Wilstöm A.C., Gustafsson J.A. (1988) *Nature* 333, 686.
Derkach V., Surprenant A., North R.A. (1989) *Nature* 339, 706.
Devillers-Thiery A., Giraudant J., Bentaboulet M., Changeux J.P. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 80, 2067.
Di Fiore P.P., Pierce J.H., Fleming T.P., Hazan R., Ullrich A., King C.R., Schlessinger J., Aaronson S.A. (1987) *Cell* 51, 1063.
Dougherty D. A., Staüffer (1990) *Science* 250, 1558.
Edwards G. y Weston A.H. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments". pg. 194. Ellis Horwood, New York
Engelmann H. et al. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1531.
Erlich P. (1898) "Uber die Beziehungen von chemischer konstituion, Verteiliun und pharmakoligischer Wirkung". Berlín.
Evans R.M. (1988) *Science* 240, 889.
Finkelstein A.V.; Ptisyn O.B. (1971) *J. Mol. Biol.* 62, 613.
Florez J., Armijo J.A., Mediavilla A. (1987) "Farmacología Humana" pg. 31. EUNSA, Pamplona.
Frackelton A.R., Ross A.H., Eisen N.N. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 3, 3173.
Francis D.L., Roy A.C., Collier H.O.J. (1986) *Life Sci.* 16, 1901.
Froesch E.R., Schmid C., Schwander J., Zapf J. (1985) *Ann. Res. Physiol.* 47, 443.
Fukishige S.-I., Matsubara K.I., Yoshida M., Sasaki M., Suzuki T. et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 955.
Giguère V., Hollenger S.M., Rosenfeld M.G., Evans R.M. (1986) *Cell* 46, 645.
Giguère V., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G. and Evans R.M. (1986) *Cell* 46, 645.
Gilaman A.G. (1984) *Cell* 36, 577.
Gilamn A.G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 615
Gilman A.G. (1984) *Cell* 36, 577
Gilman A.G. (1986) *TINS* 9, 460.
Gilman A.G. (1988) "Biología Celular y Molecular". Ed. Labor, Barcelona.
Giraudat J., Dennis M., Heidmann T., Chang J.Y., Changeux J.P. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 83, 2719.
Glenney J.R.Jr., Chen W.S., Lazar C.S., Walton G.M., Zokas M.R., Rosenfeld M.G., Gill G.N. (1988) *Cell* 52, 675.
Godowski P.J., Picard D., Yamamoto K.R. (1987) *Science* 241, 812.
Gómez I.V., Fernández-Shaw C., Valdivieso F., Mayor F. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 160, 374.
Gordon Letts L., (1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 156. Ellis Horwood, New York.
Green S., Chabon P. (1986) *Nature* 324, 615.
Green S. et al. (1986) *Nature (London)* 320, 134.
Green S., Chambon P. (1987) *Nature* 325, 75.
Greenfield C., Hils I., Waterfiled M.D., Federwisch W., Wollmer A., Blundell T.L., McDonald N. (1989) *EMBO J.* 8: 4115.
Groyer A., Schweizer-Groyer G., Cadepond F., Mariller M., Baulieu E.E. (1987) *Nature* 328, 624.
Haga T., Haga K., Hulme E.C. (1990) "Receptor biochemistry" pg. 1. IRL Press, Oxford.
Hall Z.W. (1987) *TINS* 10, 99
Hammacher A., Mellström K., Heldin C.H., Westermark B. (1989) *EMBO J.* 8, 2489.
Hanks S.K.,Quinn A.M., Hunter T. (1988) *Science* 241, 42.
Hardie R.C. (1989) *Nature* (London) 339, 704.

Hargrave P.A. (1982) *Prog. Retinal Res.* **1**, 1.
Hassanein A.A., Turpie A.G.G., McNicol G.P., Douglas A.S. (1970) *Brit. Med. J.* **2**, 83.
Heldin C.H., Emlund A., Horsman C. and Rönnstrand L. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 8905.
Henderson, R., Baldwin J., Ceska, T.H., Zemlin F., Beckmann E., Dowining K. (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 899.
Hershey A.D., Dykema P.E., Krause J.E. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4366.
Hibert M.F. (1989) *Actual Chim. Ther.* 16, 37.
Hibert M.F., Gittos M.W., Middlemiss D.N., Mir A.K., Fozard J.R. (1988) *Med. Chem.* 31, 1087.
Hilbert M.F., Trumpp-Kallmeyer S., Hoflack J., Bruinvels A. (1993) *Tips* **14**, 7
Higashi K., Hoese J.B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 2178.
Hirata F. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7730.
Hohmann H.P. et al. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14927.
Hollenger S.M. et al. (1985) *Nature* 318, 635.
Hollman M.O., Shea-Greenfield, A., Rogers S.W., Heinemann, S. (1989) *Nature* (London) **342**, 643-648.
Honegger A., Dull T.J., Bellot F., Van Obberghen E., Szaopary D., Schmidt A., Ullrich A., Schlessinger J.(1988a) *EMBO J.* **7**, 3045.
Honegger A.M., Schmidt A., Ullrich A., Schlessinger J. (1990b) *J. Cell Biol.* **110**, 1541
Honegger A.M., Smidt A., Ullrich A. and Schlessinger J. (1990a) *Mol. Cell Biol.* **10**, 4035
Hulme E.C. (1990) "Receptor Biochemistry". IRL Press, Oxford.
Hulme E.C. (1990) "Receptor Biochemistry" pp. 303. IRL Press, Oxford.
Hulme E.C., Birdsall N.J.M., Buckley N.J. (1990) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 633.
Hulme E.C. (1992) "Receptor Ligand Interactions". IRL Press, oxford.
Hulme E.C. y Birdsall N.J.M. (19992) "Receptor Ligand Interactions" pg. 63. IRL Press Oxford.
Hunter T., Cooper J.A. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 897.
Kao P.N., Karlin A. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 8085.
Kaztauskas A., Cooper J.A. (1989) *Cell* 58, 1121.
Khazaie K., Dull T.J., Graf T., Schlessinger J., Ullrich A., Beug H., Wnnström B. (1988) *EMBO J.* **7**, 3061.
King W.M. Carpenter D.O. (1987) *Neurosci. Lett.* 82, 343.
Kistler J., Stroud r.M., Klymkowsky W, Lalancette R.A., Fairclough R.H. (1982) *Biophys. J.* **37**, 371.
Kosterlitz H.W. y Waterfiled A.A. (1975) *Ann. Rev. Pharmacol* **15**, 29.
Kraus M.H., Popescu N.C., Amsbaugh S.C., King CR. (1987) *EMBO J.* **6**, 605.
Krust A. et al. (1986) *EMBO J.* 5, 891.
Kumar V., Green, S., Stack, G., Berry M., Jin J.R., Chambon P. (1987) *Cell* **51**, 941.
Kumar V., Chambon P. (1988) *Cell* 55, 145.
Kumar V. et al. (1987) *Cell* **51**, 941.
Kurosaki T., Fukuda K., Mori Y., Tanaka K.M., Mishina, Numa S. (1987) *FEBS Lett.* **2**, 253.
Lammers, R., Gray, A., Schlessinger J., Ullrich A. (1989) *EMBO J.* **8**, 1369.
Lang R.E. y Doods H.N. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments". pg. 92. Ellis Horwood, New York.
Langenbuch-Cachat J., Bon C., Mulle C., Goeldner M., Hirt C. (1988) *Biochemistry* **27**, 2337.
Langley J.N. (1878) *J. Physiol.* London **1**, 339.
Langley J.N. (1906) *proc. R. Soc. London,* Ser. B 78, 170
Lee J., Dull T.J., Lax L., Schlessinger J., Ullrich A. (1989) *EMBO J.* **8**, 167.
Libermann t.A. Nusbaum H.R. Razon N. Kris R., Lax I. et al. (1987) *Nature* **313**, 144.
Lin C.H., Chen W.S., Laza C.W. Carpenter C.D., Gill G.N., Evans R.M., Rosenfeld M.G. (1986) *Cell* **44**, 839.
Linder M.E. y Gilamn A.G. (1992) *Inv. Cienc.* sept. pg. 31.
Lipsky J.J., Lietman P.S. (1982) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **220**, 287.

Livneh E., Dull T., Prywes R., Ullrich A., Schlessinger J. (1988) *Mol. Cell Biol.* 8, 2302.
Lodish H., Darnell J., Baltimore D. (1988) "Biología Celular y Molecular", Editioral Labor, Barcelona.
Lohse M.J.; Benovic J.L., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* 60, 653.
Lord J., Waterfield A., Hughes J. y Kosterlitz H.W. (1977) *Nature* 267, 495.
Machoczek K., Fischer M., Soling H.D. (1989) *FEBS Lett.* 251, 207.
Margolis B., Rhee S.G., Felder S., Mervic M., Lyall R., Levitzk A., Ullrich A., Ziberstein, A., Schlessinger J. (1989b) *Cell* 57, 1101.
Margolis B., Bellot F., Honegger A.M., Ullrich A., Schlessinger J., Ziberstein A. (1990a) *Mol. Cell Biol.* 10, 435.
Margolis B., Ziberstein A., Franks C., Felder S., Kreamer S., Ullrich A., Rhee S.G., Skorecki K., Schlessinger (1990b) *Science*, 248, 607.
Martin W. et al. (1985) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232, 708.
Matthews D.A., Alden R., Bolen J.T., Freer S.T., Hamlin R., Xuong N., Kraut J., Poe M., Williams M., Hoogstein
McClain D.A., Maegawa H., Lee, J. Dull T.J., Ullrich A., Olefsky J.M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 14663.
McFartking, K. (1992) "Receptor-Ligand Interactions". pg. 398. IRL Press, Oxford.
McPhee F., Downes C.P. Lowe G. (1991) *Biochem. J.* 277, 407.
Molinoff P.B.,Wolfe B.B., Weiland G.A. (1981) *Life Sci.* 29, 427.
Moncada S., Radomski M.W., Palmer R.M.J. (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37, 2495.
Montminy M.R., González G.A., Yamamoto K.K. (1990) *Trends Neurosci.* 13, 184.
Müller T.H., Eisert W.G. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 107. Ellis Horwood, New York.
Müller T.H. y Himmelsbach F.(1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 112. Ellis Horwood, New York.
Nakahata N., Abe M.T., Matsouka I., Nakanishi H. (1987) *EMBO J.* 6, 2907.
Noda M. et al. (1982) *Nature* 299, 793.
Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Numa S. (1983) *Nature* 302, 528.
Noda M. et al. (1983) *Nature* 301, 251.
Norman J. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 169. Ellis Horwood, New York.
Olsen R.W. (1982) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 247.
Ono J.K., Salvaterra P.M. (1980) *J. Neurosci.* 1, 259.
Panayton G.N. y Gregorion M (1990) "Receptor Biochemistry" pg. 203. IRL Press, Oxford
Pasqueale E.B. and Singer S.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5449.
Pearse B. (1980) *Trends Biochem. Sci.* 5, 26.
Pettersen L., Liljefors T. (1987) *J. Comp. Chem.* 8, 1139.
Poland, A., Glover E., Kende A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4936.
Potter B.V.L. (1990) *Nat. Prod. Rep.* 7, 1.
Poyer D. (1990) "Receptor-Effector Coupling" pg. 31 IRL Press, Oxford.
Pritchett, D.B., Sontheimer, H., Shivers, B.D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P.R., Seeburg, P.H. (1989) *Science* 242, 1306.
Rapoport R.M. and Murad F. (1983) *Circ. Res.* 52, 352.
Regoli D. y Rouissi N. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments". pg.131. Ellis Horwood, New York
Rhodes D. y Klung A. (1993) *Investigación y Ciencia* 199, 26.
Riedel H., Dull, T.J. Honegger A.M., Schlessinger J., Ullrich A. (1989) *EMBO J.* 8, 2943.
Riedel H., Massoglia S., Schlessinger J. and Ullrich A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 85, 1477.
Riegler, R. (1990) *Round Table Roussel-Uclaf* 67, 19.
Rosen O.M. (1987) *Science* 237, 1452.
Roussel M.F., Downing J.R., Rettenmier C.W., Sherr C.J. (1988) *Cell* 55, 979.

Russel D.S. Gherzi R., Johnson E., Chou C.K., Rosen O.M. (1967) *J. Biol. Chem.* 262, 11833.
Russel W.R.S., Burch R.L. (1959) "The Principles of Human Experimental Technique". Methuen, London.
Ruta M., Burgess W., Givol D., Epstein J., Neiger N., Kaplow J. Crumley G., Dionne C., Jaye M., Schlessinger (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 86, 8722.
Sagawa S. DiRenzo G.C.. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 752, 153.
Sanchéz Blázquez P. (1988) *Rev. Farmacol. clin. Exp.* 6, 41.
Sapolsky R.M. (1986) *J. Neurosci* 6, 2240.
Schauer M., Chalepakis G., Willamann T., Beato M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 1123.
Schlessinger J. (1988) *Trends Biochem. Sci.* 13, 443.
Schmieden V., Grenninfloh G., P.R. Schofield, Betz H. (1989) *EMBO* 8, 695.
Scholtysik G. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments". pg.190. Ellis Horwood, New York
Schrader W.T. (1984) *Nature* 308, 17.
Schultz S. (1989) *Cell* 58, 1155.
Schwabe J.W.R., Rhodes D. (1991) *TIBS* 16, 191.
Seckinger P. et al. (1987) *J. Immunol.* 139, 1546.
Seewald M.D., Olsen R.A., Sehgal I., Melder D.C. Modest E.J., Powis G. (1990) *Cancer Res.* 50, 44.
Seifert R.A. Hart C.E., Phillips P.E., Forstrom J.W., Ross R., Murray M.J., Bowen-Pope D.F. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 8771.
Sheng M., McFadden G., Greenberg M.E. (1990) *Neuron.* 4, 571.
Sledge, G.W., McGuire W.L. (1983) *Adv. Cancer Res.* 38, 61
Smith J.S. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 175. Ellis Horwood, New York.
Smith K. (1993) TIPS Receptor Nomenclature Supplement.
Soos M.A., Siddle K. (1989) *Biochem. J.* 263, 553.
Sporn M.B., Todaro G.J. (1980) *N. Engl. J. Med.* 303, 878.
Stanley E.R., Guilbert L.J., Tushinski R.T., Bartelmez S.H. (1983) *J. Cell. Biochem.* 21, 151.
Taga, T. et al. (1989) *Cell* 58, 573.
Thomas, K.A., Smith G.M., Thomas T.B., Feldmann R.J. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 79, 4843.
Timmermans P.B. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 96. Ellis Horwood, New York.
Trumpp-Kallmeyer S., Hoflck J., Bruinvels A., Hilbert M.F. (1992) *J. Med. Chem.* 35, 3448.
Ullrich A., Schlessinger J. (1990) *Cell* 61, 203.
Van der Nijver M., Van de Bresselaar R., Devilee P., Cormelisse C., Peterse J. et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 2019.
Vannice J.L., Ringold G.M., McLean J.W., Taylor J.M. (1983) *DNA* 2, 205.
Velu, T.J., Beguinot L., Vass W.C., Willingham M.C., Merlino G.T., Pastan I., Lowy D.R. (1987) *Science* 237, 1408.
Waldmann T.A. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 875.
Wang J.X., Yamamura H., Wang W. y Roeske W.R. "Receptor-Ligand Interactions" pg. 213. IRL Press, Oxford.
Watson S., Abbott A. (1991) "Trends in Pharmacological Sciences; Receptor Nomenclature Supplement". Elsevier, Amsterdam
Webster N.J.G., Green S., Rui Jin J., Chambon P. (1988) *Cell* 54, 199.
Wedekind F., Baer-Pontzen,K., Bala-Mohan S., Choli D., Zahn H., Brandenburg D. (1989) *Biol. Chem.* Hoppe-Seyler 370, 251.
Weiland G.A., Molinoff P.B. (1981) *Life Sci.* 29, 313.
Weinberger C. et al. (1985) *Nature*, 318, 670.
Weiner D.B., Liu J., Cohen J.A., Williams W.V., Greene, M. (1989) *Nature* 339, 230

Wells J.W. (1992) "Receptor-Ligand Interactions" pg. 289. IRL Press, Oxford.
Wilffert B., Wilhelm D., Wermelskirchen, Peters T. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 181. Ellis Horwood, New York.
Williams L.t. (1989) *Science* 243, 1564.
Winquist R.J. (1991) "Receptor Data for Biological Experiments" pg. 87. Ellis Horwood, New York.
Wojcikiewicz S., Fain J.N. (1988) *Biochem. J.* 255, 1015.
Woolford J.W., McAulife A., Rohrschneider L.R. (1988) *Cell* 55, 965.
Yamamoto Y., Kamata N., Kawano H., Shimizu S., Kuroki T. et al (1986) *Cancer Res.* 46, 414.
Yamamoto, K. et al. (1976) *Rec. Prog. Hormone Res.* 32, 3.
Yamamura H.I.,Enna S.J., Kuhar M.J. (eds) (1985) *Neurotrasmiter Receptor Binding*, Raven Press, New York.
Yarden Y., Ullrich A. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57, 443.
Yarden Y., Schlessinger J. (1987a) *Biochemistry* 26, 1434.
Yarden Y., Schlessinger J. (1987b) *Biochemsitry* 26, 1443.
Yokota J., Yamamoto T., Toyoshima K., Terada M., Sugimura T. et al. (1986) *Lancet* 1, 765.
Youngs R.L. "Receptor-Ligand Interations". pg. 429. IRL Press, Oxford.

Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de farmacos

FEDERICO GAGO BADENAS
Departamento de Fisiología y Farmacología,
Universidad de Alcalá de Henares, Madrid.

1.0 INTRODUCCIÓN.

Cualquier acción farmacológica tiene su inicio en la formación de un complejo entre la molécula de fármaco y su sitio receptor en una macromolécula biológica. Por lo tanto, la especificidad de la respuesta a un fármaco dado viene determinada en gran medida por la capacidad de los distintos receptores celulares para reconocerlo como agonista o antagonista y evocar o no una respuesta. La formación de complejos en los que participan moléculas biológicas no es un fenómeno exclusivo de la Farmacología, sino que se contempla en otras ramas de la Biología, como la Bioquímica (*e.g.* complejos de Michaelis entre enzimas y sustratos) o la Inmunología (*e.g.* complejos antígeno-anticuerpo), y de la propia Química, donde las interacciones entre moléculas "huéspedes" (*guests*) y "hospedadoras" (*hosts*) han abierto nuevas perspectivas en la denominada Química Supramolecular (Cram, 1988). Lo que confiere a la Farmacología un carácter propio es el efecto que surge como consecuencia de esa unión, y su posible manipulación con fines terapéuticos. Con la progresiva identificación de los mediadores celulares implicados en estas respuestas, la creciente caracterización de los diferentes receptores celulares involucrados, y la mejor comprensión de los mecanismos transductores y amplificadores de la señal inicial, la Farmacología moderna persigue profundizar en el conocimiento de los pasos intermedios que separan la formación del complejo fármaco-receptor de la respuesta fisiológica o bioquímica observada.

El receptor debe ser contemplado, pues, como un sitio discriminador capaz de distinguir entre posibles ligandos y moléculas que no poseen afinidad de unión. Pero además, hay que considerarlo como el primer responsable de la serie de acontecimientos que pueden traducir esa interacción en una respuesta celular. Desde el punto de vista de los ligandos, esto quiere decir que su fijación al receptor no va a conducir invariablemente a la producción de una respuesta máxima, sino que existirá, en función de su eficacia, una gradación de respuestas, que servirá para su clasificación como agonistas, agonistas parciales o antagonistas.

La síntesis de nuevos compuestos con capacidad para interaccionar con receptores específicos es el objetivo prioritario de la llamada Química Farmacéutica o Química Médica. Hasta hace relativamente poco tiempo, estas

síntesis se realizaban al azar o, en el mejor de los casos, estaban guiadas por el estudio más o menos cuantitativo del efecto que diversas modificaciones introducidas en la estructura de distintos fármacos o ligandos endógenos conocidos ejercían sobre una determinada acción farmacológica. En gran medida, esto era la consecuencia lógica del desconocimiento existente sobre la estructura de los receptores.

En los últimos años el panorama ha cambiado sustancialmente gracias a los avances en muchas y variadas disciplinas, que han hecho posible la identificación de numerosas macromoléculas diana y el conocimiento de su secuencia de nucleótidos o aminoácidos, e incluso, en algunos casos, la elucidación a nivel atómico de su estructura y la de sus complejos con inhibidores. Todo un arsenal de nuevas metodologías, con un importante componente matemático y computacional, hacen uso de esta información para crear modelos tridimensionales de receptores y ligandos, estudiar sus preferencias conformacionales, dilucidar la naturaleza y magnitud de las fuerzas interatómicas que gobiernan su interacción, y analizar el comportamiento dinámico de cada molécula por separado y de sus respectivos complejos. Estos procedimientos ayudan a comprender mejor el comportamiento de estos sistemas a nivel submolecular, permiten establecer comparaciones entre teoría y datos experimentales, e incluso permiten realizar predicciones cuantitativas, por lo que constituyen herramientas muy poderosas para diseñar nuevas moléculas con afinidad por un determinado receptor.

2.0. RELACIONES ENTRE ESTRUCTURA QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Muchos de los fármacos hoy disponibles en la industria farmacéutica fueron caracterizados en su día mediante técnicas de *screening* convencionales, consistentes en evaluar en una batería lo más amplia posible de ensayos biológicos el mayor número posible de sustancias, tanto de origen natural como sintético, elegidas más o menos al azar. Con este procedimiento se consiguen identificar nuevos "cabezas de serie", o moléculas prototipo pertenecientes a una clase estructural determinada y con potencial en una área terapéutica concreta. Modificaciones químicas subsiguientes tienden a producir "análogos" de esas estructuras con una mayor actividad o una menor incidencia de efectos colaterales. Este método de descubrimiento de nuevos agentes con actividad biológica es interesante desde el punto de vista de que puede convertir a nuevas clases estructurales de compuestos en fármacos potenciales pero, al estar basado fundamentalmente en técnicas de ensayo y error, consume mucho tiempo y requiere grandes recursos económicos. El porcentaje de éxitos se ha estimado inferior a 1 por cada 10.000 compuestos sintetizados (Sheridan, 1987).

Los primeros intentos dirigidos a incrementar la probabilidad de sintetizar un análogo activo o de encontrar un nuevo cabeza de serie se basaron en encontrar correlaciones entre la estructura química de una serie de compuestos y su actividad biológica. De ahí surgieron las famosas siglas QSAR, acrónimo de *Quantitative Structure-Activity Relationships*, que es hoy día una palabra de uso corriente tanto en el proceso de diseño de nuevos fármacos como en la racionalización de las propiedades farmacológicas de una serie de sustancias. En los últimos 10 años hemos asistido a una auténtica revolución en el desarrollo de los métodos de QSAR, y en la actualidad todas las compañías farmacéuticas y centros de investigación importantes hacen uso de alguna de estas tecnologías para optimizar la rentabilidad de sus síntesis y mejorar sus expectativas de dar con una nueva sustancia que pueda ser explotada comercialmente. La creciente sensibilidad social ante nuevos procesos patológicos, como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o la enfermedad de Alzheimer, la prevalencia de altas tasas de mortalidad por distintas enfermedades, como las cardiovasculares y neoplásicas, y el descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas, como la NO sintetasa o ciertas proteinasas virales, son algunos de los factores que proporcionan un ímpetus adicional para que la búsqueda de nuevos agentes terapéuticamente eficaces sea más racional.

Los métodos que relacionan la estructura química con la actividad biológica pueden dividirse en dos grandes categorías (Sheridan, 1987): métodos topológicos/estadísticos y métodos de modelado molecular. En la *aproximación topológica* sólo se tiene en cuenta la estructura química "plana" de la molécula y se utilizan técnicas estadísticas o de reconocimiento de patrones para encontrar las QSAR. En los *métodos de modelado*, que son el objeto de esta pequeña revisión, se consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones y son importantes, entre otros, el análisis conformacional, la mecánica cuántica, los campos de fuerzas, la termodinámica estadística, y los gráficos moleculares interactivos. Estos últimos permiten la representación y manipulación de las moléculas en tres dimensiones, lo que proporciona una información espacial que es esencial para comparar moléculas y para estudiar la interacción entre ligandos y receptores macromoleculares (Langridge, 1981). El término *modelado molecular* no es exclusivo de los estudios encaminados al diseño de nuevos fármacos, sino que es aplicable en otras áreas de investigación, como la ingeniería de proteínas o la química de polímeros. Las siglas CAMD (*Computer-Aided Molecular Design*) engloban a un número considerable de procedimientos, basados en el uso de ordenadores, encaminados a relacionar actividad con estructura molecular. Como su propio nombre indica, su fin último es utilizar estas relaciones para predecir compuestos con un determinado perfil de actividades (Hopfinger, 1985).

Una vez conseguido un ligando con alta afinidad por un determinado sitio receptor en una macromolécula biológica de interés, queda un largo camino hasta que el fármaco potencial pueda integrarse como medicamento en el arsenal terapéutico. Unas características farmacocinéticas inadecuadas, la aparición de efectos secundarios inaceptables, o la biotransformación a un metabolito tóxico, son algunos de los factores que pueden hacer que el compuesto, en principio prometedor, vuelva a los laboratorios de investigación en un intento de optimización.

3.0. MÉTODOS DEDUCTIVOS. HIPÓTESIS DEL FARMACÓFORO.

Es un hecho bien conocido que ante un receptor de estructura desconocida (el problema más frecuente hasta hace pocos años), la variación sistemática de la estructura química de sus ligandos lleva rápidamente a la conclusión de que algunas partes de la molécula son críticas para la actividad, mientras que otras pueden modificarse y su alteración sólo conlleva pequeñas variaciones de afinidad. Estas diferencias, que se manifiestan con facilidad en los resultados de los ensayos de fijación de ligandos marcados (*binding*) o de otras pruebas farmacológicas, llevaron a postular el concepto de *farmacóforo*, entendido como el conjunto de grupos químicos que todas las moléculas activas tienen en común y que son esenciales para el reconocimiento por parte del receptor. Esta formulación es semejante a la analogía entre llave y cerradura que sirvió inicialmente para comprender la complementariedad entre los sitios activos de las enzimas y sus sustratos.

La aproximación clásica de Hansch y colaboradores a las QSAR (Hansch, 1979) puso de manifiesto que un marco de referencia común basado en una serie congenérica ofrece una buena base para la interpretación racional. A principios de los 80, Hopfinger demostró que la calidad de las QSAR derivadas utilizando únicamente características físico-químicas y subestructurales mejoraba sustancialmente si se consideraba de forma sistemática la forma molecular. La base para comparar formas moleculares era la determinación del volumen común de solapamiento estérico entre pares de moléculas en función de la geometría intermolecular (Hopfinger, 1980). La diferencia de actividad entre dos moléculas cualesquiera se asumía función de las diferencias en medidas de las correspondientes propiedades moleculares, entre las que se encontraban los descriptores de forma entre pares de moléculas. Para tener en cuenta la flexibilidad conformacional se incluían en la regresión todos los confórmeros estables calculados por mecánica molecular (Buttershell, 1981).

La limitación inherente a los procedimientos de minimización de la energía es que encuentran una solución que no es única y que depende de

la formulación del problema. Para determinar el conjunto de todos los posibles patrones tridimensionales que pueden presentar los grupos farmacofóricos se hace imprescindible la exploración sistemática de las conformaciones asequibles a un compuesto activo (*cf.* sección 8). La decisión respecto al umbral energético elegido para rechazar una determinada conformación es también arbitraria, y además hay que tener en cuenta que la superficie energética del fármaco aislado se puede perturbar por la interacción con el receptor. Para Hopfinger, el confórmero específico finalmente seleccionado era el resultado de optimizar el ajuste de regresión entre la actividad y los descriptores, uno de los cuales era precisamente el volumen común de solapamiento estérico (Hopfinger, 1983). Los métodos que calculan la semejanza entre moléculas están ya firmemente establecidos en CAMD (Burt, 1990; Good, 1993) y son de utilidad tanto para generar parámetros útiles en QSAR como para optimizar la superposición entre estructuras (Manaut, 1991; Sanz, 1993).

Buscando el equivalente topográfico o tridimensional de las QSAR, Marshall y colaboradores desarrollaron la conocida como *aproximación de los análogos activos* (*'active analog approach'*), en la que el farmacóforo proporciona un mínimo marco geométrico de referencia, o un conjunto de reglas de orientación, para la comparación de distintas moléculas no necesariamente congenéricas (Marshall, 1985). La hipótesis de partida es la complementariedad estructural entre el receptor y los compuestos que se unen a él, asumiendo además que el sitio receptor permanece constante y que fármacos estructuralmente diferentes se unen en conformaciones que presentan un patrón estérico y electrónico semejante, el *farmacóforo*. La principal dificultad en la práctica radica en que la libertad conformacional inherente a la mayor parte de los fármacos les hace capaces de presentar multitud de patrones tridimensionales frente a un receptor dado. Cada una de las conformaciones energéticamente accesibles delimita una disposición tridimensional determinada de los grupos funcionales candidatos a interaccionar con el receptor (un heteroátomo, el centroide de un anillo aromático, un par de electrones sin compartir, etc).

Si la hipótesis del farmacóforo es cierta, cada análogo activo debería presentar un patrón que tendría que aparecer en el conjunto de posibles patrones determinados para cada compuesto. Un punto de referencia inicial lo constituyen las conformaciones de mínima energía. Si no se encuentra una disposición común de los grupos elegidos como esenciales en los confórmeros de baja energía de cada molécula, habrá que revisar la selección inicial de grupos. Si se encuentra más de una disposición posible de los mismos grupos, habrá que introducir más restricciones. Sin embargo, no resulta realista asumir que los ligandos siempre se unen al receptor en sus conformaciones de mínima energía ya que la energía libre de asociación

generalmente supera la energía necesaria para que el ligando sufra un cambio conformacional. Es necesario por tanto considerar todas las conformaciones que posean una energía hasta unas pocas kilocalorías/mol por encima del mínimo global. Adicionalmente hay que examinar el volumen del sitio de unión que está realmente disponible para ser ocupado por los ligandos. El volumen mínimo lo proporciona la unión de los volúmenes de todas las moléculas activas en aquellas conformaciones que maximizan la superposición de grupos farmacofóricos equivalentes (Figura 1).

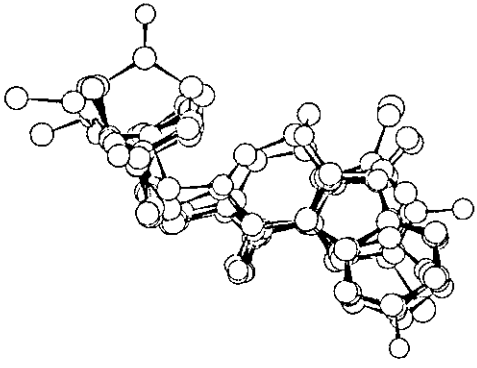


Figura 1. Superposición de 9 moléculas estructuralmente diferentes con afinidad por el receptor 5-HT_3 (Hibert, 1990). La adición del volumen esencial para cada fármaco activo cuando se encuentra unido adecuadamente determina el mínimo espacio disponible. Una molécula que posea el farmacóforo, y que incluso pueda adoptar la geometría óptima para la unión, puede resultar inactiva si se extiende más allá de los límites impuestos por este volumen mínimo del sitio activo.

Una vez los datos experimentales demuestran la validez de la hipótesis del farmacóforo, se deben examinar, para aumentar la consistencia del modelo, compuestos que posean los grupos funcionales requeridos pero que muestren poca o ninguna actividad. En el supuesto de que alguno de ellos sea, no obstante, capaz de asumir una conformación energéticamente razonable en la cual los grupos farmacofóricos se encuentran correctamente alineados con los de los compuestos activos, una explicación plausible para su inactividad es que esa molécula en esa conformación requiere un volumen adicional que está de hecho ocupado por el receptor. Este tipo de moléculas son útiles para ayudar a determinar la localización del mínimo espacio ocupado por el receptor en relación con el farmacóforo. Si el conjunto de moléculas estudiadas es suficientemente grande, se pueden llegar a determinar mapas de volumen para diversos receptores, cuya comparación puede permitir optimizar la actividad de un compuesto con respecto a otro. De este modo, esta técnica se convierte en un medio eficaz de caracterizar la topografía de un sitio receptor de naturaleza en principio desconocida (*receptor mapping*) al permitir determinar tanto el volumen asequible al

farmacóforo como el volumen adyacente que debe ser excluido. Más aún, no sólo se obtiene información sobre la forma del sitio de unión sino también sobre la posible naturaleza de los grupos funcionales presentes en el receptor, responsables de la afinidad. Sobre esta base se ha llegado a proponer, por ejemplo, que existe un farmacóforo común para 14 clases diferentes de fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central (Lloyd, 1986). El responsable de este modo de unión común sería un receptor precursor común de aminas biógenas. Los diferentes receptores distinguirían unas moléculas de otras gracias a diferencias en sitios de unión accesorios. El reciente modelado de un buen número de receptores de membrana que funcionan acoplados a proteínas G y responden a diferentes neurotransmisores (Trumpp-Kallmeyer, 1992) proporciona una base estructural sólida a esta hipótesis.

Una vez delineado, el farmacóforo candidato (o su modelo simplificado de receptor con grupos funcionales complementarios en las posiciones adecuadas) puede guiar en la interpretación de la actividad de compuestos químicos diversos y en el desarrollo de nuevas clases de agentes terapéuticos. Este concepto sirvió, por ejemplo, para explicar la actividad promotora de tumores de los esteres de forbol, teleocidina B y aplisiatoxina, en base a su semejanza con el activador natural de la proteína quinasa C, el 1,2-diacilglicerol (Wender, 1986), o para la definición geométrica de un modelo para el sitio activo de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el que se ajustaban 28 clases distintas de inhibidores (Mayer, 1987). Estas técnicas han servido asimismo para la caracterización topográfica del receptor 5-HT_{1A} de serotonina, que condujo a la síntesis de un compuesto con una selectividad mejorada por este receptor frente al adrenoceptor α_1 (Hibert, 1988), así como para definir el farmacóforo de una serie de antagonistas anti-$5HT_3$ (Hibert, 1990).

Una limitación de esta aproximación es la simplificación que supone la superposición de grupos funcionales de los ligandos cuando en realidad son posibles modos de unión alternativos, como se ha puesto de manifiesto claramente mediante el análisis de estructuras cristalinas de complejos proteína-ligando (Badger, 1988) o ADN-ligando (Quintana, 1991), o incluso unión a diferentes sitios de un mismo receptor (Marullo, 1990). Otra limitación es que, al ignorar las afinidades relativas de los diferentes compuestos, se pierde información y no se puede cuantificar la bondad de la interacción con el supuesto sitio receptor.

Una forma de paliar esta última limitación consiste en utilizar la metodología de geometría de distancias y los conceptos de QSAR para generar un sitio hipotético con unas propiedades tales que su afinidad

calculada para series de análogos reproduzcan las afinidades experimentales. De este modo, el sitio modelado puede ayudar en la selección de compuestos a sintetizar e investigar y permite su continuo refinamiento a medida que se van obteniendo nuevos datos.

3.1 Geometría de distancias.

La serie de ligandos se puede representar como una colección de puntos en el espacio que corresponden a átomos o pequeños grupos de átomos, y la flexibilidad conformacional se puede tratar como límites máximos y mínimos sobre las distancias entre todos los pares de puntos que constituyen el ligando (Crippen, 1977). Para manejar la información contenida en este tipo de matrices se hace uso de la metodología de geometría de distancias, que Crippen aplicó por vez primera al estudio de la interacción ligando-receptor (Crippen, 1979, 1980). Comparando las matrices de distancias de un número suficiente de ligandos de interés (que deben pertenecer a clases estructurales diferentes) es posible deducir sus características estructurales comunes, con respecto a las cuales se pueden ir posicionando los sustituyentes y los sitios complementarios del receptor. Suponiendo que la energía total de unión del ligando a su receptor es igual a la suma de las interacciones individuales entre sitios del ligando y sitios del receptor, y conocida la energía libre de unión a partir de la constante de disociación del complejo ligando-receptor determinada experimentalmente, el método permite calcular las contribuciones energéticas individuales de cualquier interacción entre estos sitios. Las limitaciones más importantes de este tipo de cálculos es que no permiten cambios conformacionales en el receptor y no tienen en cuenta la energía conformacional del ligando, que se asume es pequeña con relación a la energía libre de unión.

Además de incorporar en los cálculos la flexibilidad conformacional del ligando, el método permite al investigador, en condiciones ideales, proponer nuevos ligandos con mayor afinidad sobre la base de los parámetros geométricos y energéticos del modelo deducido del sitio receptor. El sitio de unión en la macromolécula se propone en base a un número de sitios puntuales que ocupan posiciones fijas en el espacio unos respecto a otros y pueden estar "vacíos" o "llenos". Un sitio puntual vacío es un lugar disponible que se encuentra en una posición donde se puede situar el ligando cuando tiene lugar la unión. Un sitio lleno, por el contrario, indica la posición de algún grupo que produce bloqueo estérico, por lo que ningún punto del ligando puede coincidir con él durante la unión. Los posibles modos de unión de los ligandos vienen dictados por aquellos puntos del ligando que ocupan sitios puntuales vacíos del receptor. La suma de las contribuciones de todos los contactos entre cada punto del ligando y puntos

del receptor proporciona la energía libre calculada. El mayor número de puntos comunes a todas las moléculas de ligando que tienen los mismos tipos de sitios y distancias entre ellos constituye el grupo base o farmacóforo, que se asume se une siempre al receptor en la misma orientación. A continuación se determina el conjunto más pequeño de grupos sustituyentes necesarios para considerar los puntos restantes de todos los ligandos, se evalúan los límites de distancia de los sitios puntuales y se deducen las coordenadas (Donné-Op den Kelder, 1988).

3.2 QSAR tridimensional. Análisis comparativo de campos moleculares.

En la aproximación de los análogos activos presentada anteriormente, la descripción de la actividad de los compuestos se limita a una elección binaria: activos o inactivos. En la práctica, sin embargo, cuando se miden las respuestas mediadas por un receptor o su afinidad de unión ante distintos ligandos, se encuentra una amplia dispersión en los resultados. Estas diferencias reflejan las sutiles variaciones que tienen lugar en la interacción y pueden ser muy clarificadoras si se consiguen interpretar de forma consistente. Tradicionalmente éstos han sido los dominios de los estudios de QSAR, que ofrecen una base para la interpretación racional pero eluden la cuestión conformacional al centrarse en series congenéricas en las que la relación tridimensional de los distintos fragmentos moleculares se asume que es semejante debido al esqueleto químico común (Hansch, 1986). La necesidad de pasar de esta aproximación esencialmente topológica a un equivalente topográfico aplicable a compuestos con estructuras no necesariamente relacionadas y que tuviera además en cuenta explícitamente la variable conformacional obligó a desarrollar un marco conceptual y computacional diferente (Motoc, 1986; Labanowski, 1986).

La aproximación de los análogos activos sienta las bases para comparar series no congenéricas de compuestos, y hace posible asociar cambios en potencia con la localización de diversos fragmentos moleculares en distintas regiones del espacio del receptor. Otro intento de describir las propiedades de unión de una serie de compuestos de forma cuantitativa, y un paso adelante para la predicción de nuevos compuestos biológicamente activos sobre la base de compuestos previamente sintetizados y ensayados, es el análisis comparativo de campos moleculares (*CoMFA* = *Co*mparative *M*olecular *F*ield *A*nalysis), desarrollado por Cramer y colaboradores en 1.988. La premisa básica en este método es que "el adecuado muestreo de los campos estérico y electrostático alrededor de un conjunto de moléculas de ligando (o de fármaco) puede proporcionar toda la información necesaria para comprender sus propiedades biológicas" (Cramer, 1988). La lógica subyacente radica en que las interacciones que dan lugar a la producción de un efecto biológico suelen ser no-covalentes y en que una gran variedad de

propiedades moleculares se pueden explicar de forma precisa mediante campos de fuerzas de mecánica molecular que sólo consideran fuerzas estéricas y electrostáticas.

Para llevar a cabo el muestreo, se calculan las energías de interacción tanto estérica (van der Waals 6-12) como electrostática (Coulomb, con una constante dieléctrica inversamente proporcional a la distancia) entre cada molécula de interés y una "sonda atómica" adecuada (*e.g.* con las propiedades de un carbono sp^3 y carga +1.0) situada en puntos regularmente espaciados (*e.g.* 2 Å) de una malla tridimensional que rodea a todos los compuestos sometidos a examen. Para ello es necesario que todos los ligandos se alineen previamente de tal modo que, en el mejor de los casos, el alineamiento sea equivalente a la orientación espacial relativa de las diversas moléculas de fármaco en el sitio receptor. En otras palabras, se lleva a cabo una superposición de las moléculas en conformaciones que presumiblemente se corresponden con las biológicamente activas. Las propiedades de unión de los ligandos se suelen expresar en función de sus constantes de asociación, directamente relacionadas con las energías libres de unión (*vide infra*). Como el análisis de regresión lineal está limitado por el gran número de variables existentes para el conjunto de observaciones experimentales disponible, se recurre a las nuevas técnicas estadísticas de mínimos cuadrados parciales (PLS) para extraer las variables latentes necesarias para la descripción óptima de la varianza del conjunto de datos, las cuales se someten posteriormente a un método de validación cruzada para eliminar el riesgo de correlaciones casuales.

Los pasos a seguir para un análisis de este tipo serían los siguientes (Donné-Op den Kelder, 1988):

a) postular un conjunto de reglas de alineamiento (de forma semejante a la aproximación de los análogos activos).

b) alinear las moléculas y establecer a su alrededor una malla tridimensional como una caja de puntos en el espacio potencial del receptor.

c) calcular el campo que cada molécula ejercería sobre un átomo sonda situado sobre cada punto de la malla (normalmente se guardan por separado los efectos estéricos y los electrónicos para facilitar su interpretación).

d) utilizar estadística de PLS para determinar una expresión linear ("QSAR tridimensional"), que podría consistir simplemente en un conjunto mínimo de puntos de la malla necesarios para distinguir a los compuestos sometidos a examen de acuerdo con sus actividades determinadas experimentalmente.

e) validar de forma cruzada el modelo PLS (*cross-validation*), es decir, comprobar su valor predictivo eliminando observaciones sucesivamente, rederivando el modelo, y "prediciendo" las observaciones eliminadas.

f) ajustar ligeramente el alineamiento del compuesto o compuestos peor predichos y repetir los pasos anteriores hasta que se encuentre un alinea-

miento mutuo que produzca una QSAR-3D con alto valor predictivo (alto valor de *cross-validated* r^2).

Las QSAR producidas por un CoMFA, con sus cientos o miles de términos, se pueden visualizar gráficamente de forma muy simple, representando los mapas de contorno para los valores especificados de los coeficientes, que además pueden colorearse diferencialmente de acuerdo con la dirección y la magnitud de la interacción. Los poliedros coloreados resultantes en cada mapa mostrarán aquellas regiones donde las diferencias de actividad observadas se encuentran más relacionadas con cambios en los campos estéricos o electrostáticos. Estos diagramas de contorno se pueden interpretar en términos de estructura del receptor en aquellas ocasiones en que la estructura del receptor es conocida (Marshall, 1988).

La variable que resulta más crucial en CoMFA es el posicionamiento de las moléculas dentro de la malla tridimensional (Cramer, 1988; Klebe, 1993). En ausencia de información experimental sobre el modo de unión de la serie de moléculas sometidas a examen, se puede intentar superponer los grupos farmacofóricos equivalentes minimizando simultáneamente las distancias entre los átomos que los definen en las distintas moléculas y la energía potencial de cada molécula individual ("ajuste múltiple flexible"). Los resultados de este procedimiento van a estar sesgados por la selección que se haya hecho del farmacóforo y van a ser dependientes de las geometrías de partida. Otro procedimiento, tendente a incrementar la semejanza de campos dentro de la serie estudiada ("ajuste de campos"), minimiza la diferencia de mínimos cuadrados en la suma de las energías de interacción estérica y electrostática, promediadas para todos los puntos de la malla, entre una determinada molécula del conjunto y el promedio de todas las moléculas del conjunto (Cramer, 1988). Para ello las moléculas se tratan como cuerpos rígidos que sólo pueden trasladarse o rotarse en las tres direcciones del espacio. Este segundo procedimiento se suele utilizar para modular el ajuste puramente estérico del primero, con lo que se tienen mejor en cuenta las diferencias en las propiedades electrostáticas de las moléculas consideradas.

Otro aspecto fundamental a considerar es que las energías de interacción calculadas en CoMFA mediante mecánica molecular no incluyen factores con una base entrópica, como la hidrofobicidad. Como la constante de asociación está relacionada con la energía libre de unión, a lo más que se puede aspirar es a correlacionar la energía de interacción calculada con el componente entálpico de la energía libre. En la práctica esto significa que sólo se podrán predecir adecuadamente entalpías de unión, y no energías libres o constantes de unión. Es de suponer que moléculas que presenten diferentes grados de flexibilidad conformacional, es decir que exhiban un número diferente de conformaciones accesibles en el estado no unido,

mostrarán diferentes contribuciones entrópicas a la energía libre de unión una vez que se encuentren inmovilizadas conformacionalmente en su sitio de unión. El no considerar estos efectos entrópicos adecuadamente en CoMFA puede traducirse en un peor alineamiento y en la caracterización de una conformación que no es exactamente la conformación "activa" (Klebe, 1993).

4.0. EVALUACIÓN EMPÍRICA DE LAS INTERACCIONES ENTRE GRUPOS FUNCIONALES DE LIGANDOS Y RECEPTORES.

La afinidad de un fármaco F por un receptor X en la reacción de asociación simple

$$F + X \rightleftharpoons FX$$

viene dada por

$$K = \exp(-\Delta G^0/RT) \qquad [1]$$

donde $K = [FX]/[F][X]$ es la constante de asociación en el equilibrio, ΔG^0 es el cambio en energía libre de Gibbs, R es la constante de los gases (producto de la constante de Boltzmann por el número de Avogadro) y T es la temperatura en Kelvin. La energía libre de Gibbs es una medida adecuada de la fuerza directriz para reacciones a temperatura y presión constantes. La especificidad de la interacción entre F y X viene dictada por la diferencia entre los valores de K correspondientes a la unión de ligandos específicos y no-específicos. Las constantes de unión más altas de los ligandos específicos surgen de fuerzas de atracción más fuertes entre ambas moléculas, la mayor parte de las cuales son de corto alcance (distancias menores de 2-4 Å): fuerzas de dispersión de van der Waals-London, efecto hidrofóbico y enlace de hidrógeno. De estos tipos de fuerzas, los dos primeros pueden considerarse isotrópicos, pero los enlaces de hidrógeno son estrictamente direccionales y requieren la orientación de los grupos participantes. Las fuerzas electrostáticas son de largo alcance, pero en la realidad se ven limitadas por la alta constante dieléctrica del agua. Por ello, el enterramiento de grupos cargados en una interfaz ligando-receptor (o antígeno-anticuerpo, o enzima-sustrato) conlleva un aumento del campo electrostático efectivo, pero a costa de la desolvatación energéticamente desfavorable de los grupos cargados. Por esta razón, el complejo estable sólo se formará entre ambas moléculas si, además de presentar complementariedad de formas, su distribución de cargas superficiales es tal que la interacción de cargas opuestas proporciona una atracción de Coulomb suficiente para compensar la pérdida en energía libre de solvatación y así estabilizar el complejo (Novotny, 1992).

Los sitios de unión en macromoléculas son prácticamente siempre cavidades o surcos. La preferencia por superficies cóncavas se puede explicar por tres motivos fundamentales: i) la difusión para salir de la cavidad es significativamente más lenta que cuando se trata de una superficie plana o es a través del disolvente, ii) en las cavidades, los campos electrostáticos se encuentran aumentados o focalizados, y iii) las superficies cóncavas son más hidrofóbicas que su equivalente plano o convexo porque la hidrofobicidad de una superficie es función de su curvatura con respecto al tamaño y curvatura de una molécula de agua.

Para estimar las fuerzas aproximadas de las interacciones fármaco-receptor, la alternativa más simple (Albert, 1979) es la de utilizar los valores estándar de las entalpías de formación de los diferentes tipos de enlace implicados (iónico, de hidrógeno, de van der Waals, etc). Esta aproximación, sin embargo, no incluye ningún componente entrópico y presenta además incertidumbres en cuanto a cuáles de los posibles enlaces deben ser incluidos en la interacción y cuál debe ser el valor preciso de la energía asociada con cada uno de ellos. Para superar estas dificultades se han intentado estimar las fuerzas de las interacciones que implican a grupos funcionales individuales del fármaco. El "principio del ancla", desarrollado por Page en la década de los 70, se basa en encontrar pares de compuestos para los cuales la diferencia en afinidades de unión a un receptor se pueda achacar a la contribución de un único grupo funcional (Page, 1977). Para ello es necesario disponer de muchos pares de moléculas que difieran entre sí sólo en la presencia de un grupo funcional determinado. La diferencia en energía de unión entre dos fármacos, con y sin ese grupo funcional, debe incorporar sólo aquellos factores asociados con ese grupo, al tiempo que excluye la pérdida de entropía rotacional y traslacional asociada con la molécula de fármaco (el "ancla"). Aparte de las dificultades inherentes a conseguir la serie de compuestos necesaria para un análisis de este tipo, la mayor objeción a esta metodología es asumir que el papel del grupo funcional estudiado se limita exclusivamente a proporcionar una energía de unión adicional, olvidando, entre otros factores, la posible facilitación conformacional de una forma biológicamente activa de la molécula. Andrews y colaboradores intentaron superar esta limitación utilizando datos experimentales publicados para una serie de 200 fármacos e inhibidores enzimáticos, seleccionados subjetivamente por su buena fijación a sus correspondientes sitios receptores, para hacer un cálculo estadístico de las fuerzas de los enlaces no covalentes asociados con cada grupo funcional en un entorno fármaco-receptor medio (Andrews, 1984). Como estos agentes actúan sobre receptores distintos, no se puede aplicar el principio del ancla, haciéndose necesaria la inclusión de un factor corrector, fijado en 14 kcal mol^{-1} en condiciones estándar, para tener

en cuenta la pérdida de entropía rotacional y traslacional. También se debe incluir la pérdida de entropía de rotación interna tras la unión, ya que puede asumirse que la conformación unida de un fármaco, al menos en su receptor óptimo, será relativamente fija. Este término lo derivaron estos autores empíricamente a partir de los datos experimentales, de la misma manera que las energías de unión intrínsecas para los grupos funcionales individuales, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta G = T\Delta S_{rt} + n_{gdl}E_{gdl} + \Sigma n_X E_X \qquad [2]$$

donde ΔG es la energía libre de unión determinada a partir de constantes de disociación (ecuación [1]) en ensayos de fijación o de constantes de inhibición enzimáticas (ΔG = -R T lnK), $T\Delta S_{rt}$ es la pérdida global de entropía rotacional y traslacional de la molécula de fármaco unida, n_{gdl} es el número de grados internos de libertad conformacional en la molécula de fármaco (rotaciones internas posibles, excluyendo la rotación del grupo metilo y la de sistemas restringidos como el grupo amida), E_{gdl} es la energía correspondiente asociada con el cambio en entropía que resulta de la pérdida de cada grado de libertad conformacional, y E_X es la energía intrínseca de unión asociada con el grupo funcional X, del que hay n_X presentes en el fármaco. Cada valor de E_X incorporaría así un número de términos, entre los que se incluyen (i) la entalpía de la interacción entre el grupo funcional y su correspondiente sitio de unión en el receptor, (ii) los cambios de entalpía y entropía asociados con la eliminación de agua de hidratación, tanto del grupo funcional como de su sitio de unión, y con la formación de enlaces entre las moléculas de agua desplazadas, y (iii) la entropía vibracional de baja frecuencia asociada con los nuevos enlaces formados entre el grupo funcional y los grupos del receptor. En una primera aproximación, todos estos factores pueden considerarse como propiedades del grupo funcional estudiado relativamente independientes de los grupos a los que se encuentra unido, de modo que es razonable utilizar tales potenciales de unión intrínsecos de forma aditiva para proporcionar una medida global de la interacción fármaco-receptor. Una vez codificada toda la información para los 200 compuestos, el análisis de los datos mediante un programa de regresión lineal, de acuerdo con la ecuación [2], permitió obtener una estimación media de los valores de E_X para cada unidad estructural seleccionada (Tabla I).

Estas energías intrínsecas de unión siguen el orden esperado, siendo los grupos cargados los que dan lugar a interacciones más fuertes, seguidos por los grupos polares y, finalmente, los apolares. El signo negativo del coeficiente para el término relacionado con el número de grados de libertad rotacional interna está justificado porque la menor libertad conformacional

del fármaco tras la unión resulta en una pérdida de entropía que contribuye desfavorablemente a la energía libre de unión.

Tabla I. Energías intrínsecas de unión promediadas (kcal mol^{-1})

grupo	energía
Carbono tetrahédrico	0.8
Carbono trigonal	0.7
Nitrógeno protonado	11.5
Nitrógeno neutro	1.2
Grupo carboxilato	8.2
Grupo fosfato	10.0
Grupo hidroxilo	2.5
Grupo carbonilo	3.4
Oxígeno, azufre	1.1
Halógeno	1.3
Enlace de rotación libre	-0.7

Estos valores medios de energías de unión, aunque de dudoso valor predictivo, reflejan la energía de unión esperada para un fármaco medio sobre la base de sus partes constituyentes. Una desviación positiva entre la unión observada y la calculada mediante la ecuación [2] indicaría que se une mejor que la media, sugiriendo que no todas las características estructurales del ligando se están utilizando para la unión a la macromolécula y, en el caso de moléculas flexibles, que la forma unida de la molécula es una conformación de alta energía relativa. Por otra parte, una desviación negativa sería indicativa de una unión más débil que la media, de lo que se podría deducir que la mayor parte de los grupos funcionales de la molécula de fármaco están interaccionando favorablemente con el receptor y que el fármaco probablemente actúa en una conformación de baja energía, por lo que puede ser un buen cabeza de serie para el desarrollo de nuevos ligandos.

5.0. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE RECEPTORES FARMACOLÓGICOS Y DE SUS COMPLEJOS CON LIGANDOS.

Gracias al trabajo que culminó en el modelo de Watson y Crick, los ácidos nucleicos, y en particular el ADN, se distinguen por ser los primeros constituyentes realmente grandes de la célula para los que se pudo describir una estructura y una conformación detalladas (Watson, 1953). Los trabajos originales sobre fibras cristalinas (Arnott, 1972) dieron paso a la obtención y análisis de cristales de secuencias cortas de ADN (*e.g.* decámeros o dodecámeros) que han mostrado al ADN como una molécula extraordinariamente

flexible, cuya estructura depende de sus interacciones con otras moléculas, y cuya deformación y deformabilidad viene dictada por su secuencia particular de nucleótidos (Dickerson, 1991). El ADN es un blanco farmacológico de suma importancia, al que se pueden unir pequeñas moléculas por mecanismos tanto intercalativos como no-intercalativos, y casi siempre con un cierto grado de selectividad de secuencia (Pullman, 1990).

La primera descripción detallada de la forma molecular de una proteína data de 1958, cuando se aplicaron técnicas de cristalografía de rayos x a la mioglobina de ballena (Kendrew, 1958). Estos estudios mostraron al grupo prostético hemo como un ligando orientado de forma precisa en una cavidad de una proteína y sirvieron para interpretar la fisiología del transporte de oxígeno sobre la base de cambios en la interacción entre este grupo y la globina. La primera enzima no apareció en la literatura hasta 1965, cuando la resolución de la lisozima procedente de la clara de huevo (Blake, 1965) vino a corregir la falsa creencia de que sólo las globinas eran susceptibles de ser estudiadas mediante rayos x. La elección de todas estas proteínas venía dictada, por supuesto, por la disponibilidad de material que podía ser purificado y cristalizado, y no por criterios que pudieran ser relevantes para el diseño de nuevos fármacos.

Los modelos moleculares rígidos utilizados inicialmente para presentar los datos de rayos x influyeron de forma decisiva sobre los argumentos esgrimidos para racionalizar las correlaciones estructura-función de las proteínas durante la década de los 60. Sin embargo, a finales de los 70 el movimiento interno de las proteínas estaba firmemente documentado, fundamentalmente por los datos suministrados por la resonancia magnética nuclear (RMN). Un resultado importante de la investigación sobre los aspectos dinámicos de las macromoléculas biológicas ha sido la contemplación de una estructura, no como un conjunto único de coordenadas atómicas, sino acompañada de sus correspondientes fluctuaciones de posiciones atómicas, energía y entropía alrededor de unos valores medios. La resolución de la estructura en disolución del tendamistat, un inhibidor de la α-amilasa, exclusivamente mediante técnicas de ^{1}H-RMN y geometría de distancias (Kline, 1986) marcó el comienzo de una nueva era en la determinación de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos. Hoy día, la calidad de las estructuras determinadas en disolución con las técnicas de RMN es comparable a la conseguida con técnicas de difracción de rayos x utilizando cristales, con la ventaja añadida de que muestra transiciones estructurales que pueden ser de crucial importancia para las propiedades funcionales (Wüthrich, 1990).

En abril de 1993, el Banco de Datos de Proteínas (PDB) de Brookhaven (Upton, NY 11973, USA), principal depositario de coordenadas

atómicas de macromoléculas biológicas procedentes de cristalografía de rayos x y de resonancia magnética nuclear (Bernstein, 1977), contaba ya con 982 proteínas, y disponía de aproximadamente un centenar de estructuras de ácidos nucleicos y una docena de carbohidratos. Al ritmo exponencial de crecimiento actual, se espera que para finales de 1998 existan más de 10.000 entradas en esta base de datos. Todo este caudal de información, accesible a cualquier investigador, puede ser de gran utilidad a la Farmacología y a la Química Farmacéutica. A partir de las observaciones sobre macromoléculas y sus complejos con pequeñas moléculas, se pueden conocer las características de la unión y las interacciones que mantienen al ligando en posición. Estos complejos constituyen el punto de partida para otro tipo de estudios más predictivos encaminados al diseño de nuevos ligandos (*cf.* sección 10).

La cocristalización de enzimas con inhibidores competitivos del sustrato proporciona mucha información estructural sobre el proceso de acoplamiento, que en muchas ocasiones conlleva cambios conformacionales significativos. Más aún, los complejos de enzimas con análogos del estado de transición del sustrato han servido como base para revelar las interacciones responsables de la catálisis, algunos de cuyos componentes dinámicos se pueden deducir comparando la estructura de la enzima acomplejada con la de la enzima libre (Lolis, 1990).

6.0. VISUALIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS LIGANDO-RECEPTOR. SUPERFICIES MOLECULARES.

Los métodos más tradicionales de representación gráfica de estructuras moleculares mediante ordenador visualizan a los átomos como esferas (bien puntuales o bien con un radio proporcional al radio de van der Waals) y a los enlaces químicos como segmentos que unen los centros de estas esferas. Una alternativa es representar la forma molecular como una envoltura continua en contacto con los átomos que son accesibles al disolvente. El concepto de *superficie accesible al disolvente*, desarrollado e implementado originalmente por Lee y Richards para su aplicación al estudio del plegado de las proteínas (Lee, 1971), ha sufrido algunas matizaciones y ha servido para desarrollar algunas metodologías de interés para el diseño de fármacos. En su formulación original, la superficie accesible al disolvente se definía como el área delimitada por el centro de una sonda esférica (que representa una molécula de agua y suele tener 1.4 Å de diámetro) a medida que rueda sobre la superficie de la molécula de interés, y, en consecuencia, está desplazada de la superficie de van der Waals (Figura 2). Posteriormente, Richards definió una superficie accesible al disolvente alternativa que consiste en la parte de la superficie de van der Waals de los átomos que son accesibles a la sonda esférica (*superficie de contacto*) junto con una serie de

superficies cóncavas y en forma de sillín (*superficie de reentrada*) que alisan las

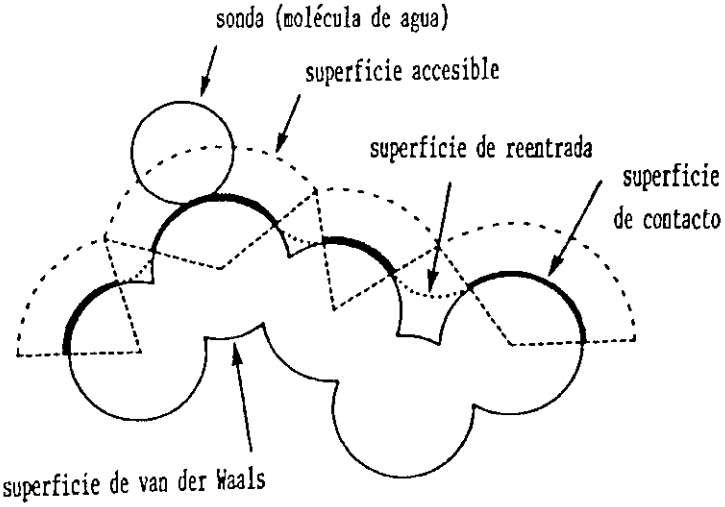


Figura 2. Definición de superficies moleculares.

rendijas y oquedades entre los átomos. Esta superficie es el límite del volumen del que se excluye a la sonda esférica para que no experimente solapamiento de van der Waals con los átomos (Richards, 1977). Connolly desarrolló un algoritmo numérico para situar puntos sobre esta superficie molecular accesible al disolvente (Connolly, 1983a) e inventó un algoritmo de superficie analítica para computar áreas y volúmenes moleculares (Connolly, 1983b). La visualización de estas superficies punteadas de alta resolución es, por lo general, más útil que la representación de esferas sólidas (o modelos CPK) porque (i) las superficies son transparentes, permitiendo que se vean los enlaces e incluso las etiquetas identificativas de los átomos, (ii) la imagen puede rotarse, escalarse y seccionarse en tiempo real, permitiendo, por ejemplo, la exploración de cavidades en el interior de la proteína, y (iii) los puntos de la superficie pueden colorearse de acuerdo con distintas propiedades químicas, como la hidrofobicidad o el potencial electrostático molecular, lo que expande la idea de complementariedad topográfica a complementariedad lipofílica o electrostática, de importancia capital en las interacciones proteína-ligando, proteína-proteína, ADN-proteína y ADN-ligando (Weiner, 1982). Además de servir como lienzo sobre el que mostrar información química de distintas clases, las superficies moleculares juegan un papel fundamental en el cálculo de esa misma información. Por ejemplo, el potencial se puede evaluar en el centro de cada posición de la sonda esférica que genera un punto de la superficie (Besler, 1990) o en una serie de capas

de Connolly definidas por fuera del radio de van der Waals de los átomos (Orozco, 1990).

Encontramos un segundo nivel de sofisticación en el análisis cuando intentamos calcular la afinidad del ligando por su sitio de unión. Para calcular la energía del complejo se suele hacer uso de la mecánica molecular, a partir de la cual podemos estimar la entalpía de unión (ΔH) sustrayendo las energías de ligando libre y receptor libre. Es evidente que estos cálculos son sólo aproximados, pues normalmente se hacen en el vacío, en tanto que las observaciones experimentales tienen lugar en disolución y se correlacionarían mejor con las energías libres de unión (ΔG). La omisión de los efectos entrópicos y de solvatación en estos cálculos teóricos refleja las limitaciones actuales de la metodología, aunque la utilización de técnicas de simulación de dinámica molecular con inclusión explícita de disolvente ya está al alcance de la mayor parte de los grupos de investigación teóricos. Cuando se estudian series congenéricas, se puede argumentar que los efectos entrópicos y de solvatación van a ser semejantes para los distintos análogos. En ocasiones la correlación encontrada entre las ΔH calculadas y las afinidades de unión es probablemente debida a la compensación entropía-entalpía observada en disolventes acuosos (Lumry, 1970; Breslauer, 1987), aunque esto no se puede asumir de forma sistemática para la interacción fármaco-receptor (Hitzemann, 1988). Entre los problemas adicionales podemos citar la inexistencia en los campos de fuerzas habitualmente utilizados para macromoléculas de parámetros para las nuevas estructuras (lo que requiere un estudio teórico intensivo), la necesidad de aplicar con rigor la mecánica cuántica para reproducir adecuadamente los efectos electrostáticos, las incertidumbres sobre la constante dieléctrica del medio que apantalla la intensidad de la interacción, la polarizabilidad de los átomos que intervienen en la formación del complejo, la posibilidad de que exista más de un modo de unión para compuestos con estructuras semejantes, la localización del mínimo global, etc.

Uno de los primeros sistemas que sirvieron para introducir la mecánica molecular en el estudio de complejos modelados fue el de la unión de las hormonas tiroideas T3 y T4 a la prealbúmina (Oatley, 1984), aprovechando el hecho de que se habían determinado las estructuras de rayos x de los complejos. Así, fue posible correlacionar las afinidades relativas de T_3 y T_4 con las energías de unión calculadas y racionalizar de forma cualitativa la mayor afinidad de esta última por la proteína, una vez introducido un término corrector para tener en cuenta las diferencias de solvatación entre las dos moléculas. Los trabajos pioneros asumían que tanto el ligando como el receptor permanecían rígidos, limitando por tanto la exploración a las seis variables de traslación y orientación relativas de uno respecto a otro. La adición de flexibilidad interna al sistema permite el ajuste inducido y mejora

la complementariedad, pero a costa de aumentar la complejidad y, paralelamente, la demanda computacional, aunque esto no supone un problema insalvable con la creciente capacidad de cálculo de los modernos ordenadores.

Estos procedimientos, aplicados a series con un mayor número de análogos, permiten evaluar sobre una base más firme las características de la unión y extraer conclusiones que pueden ser de utilidad para el diseño de nuevos ligandos (Menziani, 1989; Gago, 1989).

7.0. MODELADO DE LIGANDOS Y DE RECEPTORES FARMACOLÓGICOS.

Las estructuras tridimensionales de los ligandos, en caso de no disponer de datos de rayos x, se pueden generar a partir de átomos y/o fragmentos moleculares con la ayuda de un programa de construcción de moléculas adecuado, o bien modificando una estructura similar existente en las bases de datos, sin olvidar que la forma de la molécula que lleva a cabo sus funciones en el contexto biológico no tiene por qué ser la forma estable que adopta en el estado sólido o en disolución.

Por otro lado, las técnicas encaminadas a la determinación de estructuras tridimensionales se han sofisticado hasta el extremo de que hoy día puede resultar posible seleccionar una diana macromolecular adecuada, producirla en cantidades relativamente grandes, purificarla, y estudiarla mediante técnicas de RMN, o bien cristalizarla para su análisis por difracción de rayos x. Cuando esto no es posible se puede recurrir a su modelado, teniendo en cuenta que la predicción de la estructura de un receptor proteico se enfrenta con dos problemas básicos:

1) el espacio configuracional asequible a una proteína, es decir, el número de conformaciones accesibles a una cadena polipeptídica, es enorme. Por ejemplo, una proteína de tan sólo 100 residuos de aminoácidos posee unos 300 grados de libertad de ángulos torsionales. Si cada ángulo torsional tiene acceso a, digamos, tres valores de mínima energía, la cadena polipeptídica puede dar lugar al menos a 3^{300} conformaciones. Este vasto espacio configuracional a explorar se puede reducir si se dispone de información procedente de métodos experimentales (*e.g.* RMN o datos cristalográficos de baja resolución) (van Gunsteren, 1988).
2) la descripción teórica de la interacción entre los átomos de una proteína requiere la formulación precisa de un potencial o campo de fuerzas empírico que contenga términos para representar los enlaces covalentes, los ángulos de enlace y torsionales, los enlaces de hidrógeno, y las interacciones electrostáticas y de van der Waals. Los campos de fuerzas actualmente en uso

no han alcanzado todavía el nivel de sofisticación necesario para predecir con precisión la estructura de una proteína a partir únicamente de su secuencia primaria.

A pesar de lo anteriormente expuesto, los métodos computacionales de predicción de estructuras de proteínas, tanto estáticos como dinámicos, son muy útiles y su poder predictivo varía en función de la complejidad del sistema sometido a estudio. Podemos distinguir tres niveles de dificultad, en relación inversa con su exactitud relativa:

7.1. Modificaciones locales de estructura: a partir de la estructura conocida de una proteína, se intenta predecir la estructura y propiedades de otra u otras proteínas que difieren tan sólo en unos pocos aminoácidos (Ortiz, 1992). Para ello se sustituyen las cadenas laterales de los aminoácidos diferentes, optimizando su orientación mediante una búsqueda sistemática de conformaciones de baja energía seguida de optimización del entorno del nuevo aminoácido mediante un algoritmo de minimización de la energía (Schiffer, 1990). La configuración de mínima energía resultante se encontrará generalmente próxima a la inicial puesto que el minimizador mueve al sistema básicamente "cuesta abajo" en la hipersuperficie energética del espacio configuracional, de modo que se ignoran posibles respuestas estructurales de la proteína a la sustitución del aminoácido. La búsqueda en el espacio configuracional se puede expandir haciendo uso de simulaciones de dinámica molecular (DM), que resuelve las ecuaciones clásicas de Newton del movimiento para todos los átomos del sistema y permite la superación de barreras de energía. La DM explora así una parte mucho mayor del espacio configuracional y permite localizar mínimos energéticos más bajos que los alcanzados mediante el uso de los minimizadores de energía ordinarios.

7.2. Modelado de proteínas homólogas: el plegado global del esqueleto polipeptídico es el mismo pero sólo se conserva un pequeño porcentaje de residuos de aminoácidos, pudiendo jugar un papel fundamental en el mantenimiento de la estructura los efectos del disolvente (Novotny, 1984). Este tipo de modelado puede ser muy ventajoso para guiar el diseño de nuevos ligandos. Así, el sitio activo de la carboxipeptidasa A bovina, cuya estructura tridimensional era conocida, sirvió para definir las analogías existentes entre esta proteína y la enzima convertidora de angiotensina (ECA), y para caracterizar la naturaleza y geometría de los grupos funcionales que deberían participar en la unión de sustratos peptídicos. Este modelo simplificado se empleó ventajosamente para diseñar potentes inhibidores que condujeron al desarrollo de antihipertensivos de la familia del captoprilo (Cushman, 1977). La renina fue una de las primeras enzimas modeladas en su totalidad. Su modelado tridimensional se basó en la

estructura conocida de la endothiapepsina y la secuencia primaria de la renina de ratón, muy semejante a la de la enzima humana (Blundell, 1983). Más recientemente, se han conseguido avances considerables en la creación de modelos tridimensionales fiables de receptores farmacológicos que funcionan acoplados a proteínas G (Trumpp-Kallmeyer, 1992) basados en la estructura de la bacteriorrodopsina, determinada por criomicroscopía electrónica.

7.3. Predicción de estructuras 'de novo': la proteína se considera como un conjunto de elementos de estructura secundaria (hélices α, láminas β, giros β, etc), cuyo ensamblaje da lugar a la estructura terciaria. Aunque se han hecho grandes esfuerzos para predecir la estructura secundaria a partir de la secuencia de aminoácidos, ninguno de los métodos actuales (*e.g.* Garnier, Chou-Fasman) ni siquiera identifica correctamente todos los elementos de estructura secundaria.

8.0. METODOS DE SIMULACIÓN PARA SISTEMAS MOLECULARES.

Entre los métodos teóricos utilizados hoy día para el refinamiento de modelos moleculares y para el estudio de las interacciones fármaco-receptor se incluyen las minimizaciones de energía (ME), las simulaciones de dinámica molecular (DM), las simulaciones de Monte Carlo (MC), y las perturbaciones de la energía libre (PEL). Todas estas técnicas ofrecen en última instancia la posibilidad de comprender el comportamiento de péptidos, proteínas, y ácidos nucleicos, y el de sus complejos entre sí o con moléculas orgánicas, en términos de fuerzas moleculares fundamentales. Para ello dependen de la fiabilidad de la representación analítica de la hipersuperficie energética de las moléculas, que viene dada por la suma de una serie de funciones simples que expresan tanto la energía requerida para distorsionar las coordenadas internas más allá de unos valores de equilibrio como las interacciones entre átomos no enlazados.

La función energética que describe la energía potencial del sistema en función de las posiciones de los átomos recibe el nombre de *campo de fuerzas*, y presenta una forma semejante a la ecuación [3], tomada del programa AMBER (Weiner, 1986), que se encuentra parametrizado para proteínas y ácidos nucleicos.

La suma de términos incluye interacciones enlazadas (distancias, b, y ángulos, θ y Φ) y no enlazadas (van der Waals, electrostáticas, y enlaces de hidrógeno). La energía es función del conjunto de coordenadas cartesianas, **R**, que especifican las posiciones de todos los átomos implicados, de una serie de parámetros energéticos (A, B, C, D, y las constantes de fuerza K), de las cargas atómicas (q), de la constante dieléctrica del medio (ε), y de los

valores geométricos de equilibrio. La exactitud de los resultados de las simulaciones dependerá de la precisión del método de derivación de los parámetros utilizados y de la forma analítica de representar la energía. Las limitaciones y deficiencias de los campos de fuerza utilizados se ponen de manifiesto cuando se comparan los resultados de la simulación con datos experimentales.

La expresión de la energía de la ecuación [3] es tratable computacionalmente sólo para sistemas con un número de átomos relativamente pequeño. El número de coordenadas internas crece linearmente con el

$$V(R) = V_b + V_\theta + V_\phi + V_{VDW} + V_{ELE} + V_{EH} =$$

$$\sum_{n=1}^{N_b} K_{b,n}(b_n - b_{eq,n})^2 + \sum_{n=1}^{N_\theta} K_{\theta,n}(\theta_n - \theta_{eq,n})^2 +$$

$$\sum_{n=1}^{N\phi} \sum_{m=1}^{N_\eta} \frac{V_{m,n}}{2}\left[1+\cos\left(\eta_{mn}\cdot\phi_{mn} - \gamma_{m,n}\right)\right] +$$

$$\sum_{j=1}^{N_{átomos}} \sum_{i>j}^{N_{átomos}} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}}\right) +$$

$$\sum_{j=1}^{N_{enlaces\,H}} \sum_{i>j}^{N_{enlaces\,H}} \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}}\right) +$$

$$\sum_{j=1}^{N_{átomos}} \sum_{i>j}^{N_{átomos}} \frac{q_i \cdot q_j}{\varepsilon \cdot r_{ij}} \qquad [3]$$

donde: $r_{ij}^* = r_i^* + r_j^*$

tamaño del sistema molecular, de modo que el tiempo de cálculo invertido en evaluar los tres primeros sumatorios también crece de forma linear. Sin embargo, la inspección de los tres sumatorios siguientes, que representan las interacciones no enlazadas, revela una dependencia cuadrática del número de átomos del sistema. Por esta razón es corriente introducir una distancia límite (*cut-off*) para que el algoritmo no considere las interacciones no enlazadas entre aquellos átomos separados entre sí por distancias mayores de un valor predeterminado. De este modo se acortan sustancialmente los tiempos de cálculo, aunque se corre el riesgo de que las discontinuidades

creadas en la energía y sus derivadas conduzcan a artefactos en las minimizaciones y a la no conservación de la energía en las trayectorias de dinámica molecular. En la práctica, los programas crean una lista de aquellos pares de átomos cuya distancia entre sí es menor que la distancia límite especificada por el usuario, y la actualizan cada cierto número de pasos de minimización o de dinámica. Otra consideración importante a la hora de definir esta selección de átomos concierne a las interacciones electrostáticas. La utilización de distancias límite para el potencial de interacción de van der Waals es bastante razonable, puesto que es un potencial de corto alcance y se extingue en función de $1/r^6$. A unos 8-10 Å de distancia, que son algunos de los límites corrientes, la energía y las fuerzas son bastante pequeñas, de modo que igualar a cero este potencial a una distancia de 10 Å es una aproximación razonable. Por el contrario, las interacciones de Coulomb se extinguen en función de $1/r$, lo que significa que incluso a distancias considerables este término no es despreciable. Sin embargo, si exceptuamos unos pocos grupos con carga formal, la mayoría de las moléculas están compuestas de fragmentos neutros con dipolos y cuadripolos, por lo que en realidad el término de mayor importancia en las interacciones electrostáticas entre moléculas o entre partes de una misma molécula es la interacción dipolo-dipolo, que decrece en función de $1/r^3$. Un ejemplo sencillo puede servir para comprender las implicaciones de este razonamiento: la interacción entre dos monopolos, cada uno con una unidad electrónica de carga, es de unas 33 kcal mol^{-1} a 10 Å, mientras que la energía de interacción entre dos dipolos formados a partir de monopolos unidad no es mayor de 0.3 kcal mol^{-1}. De aquí se desprende que ignorar la interacción monopolo-monopolo conduciría a un error considerable, en tanto que ignorar la interacción dipolo-dipolo se puede considerar una aproximación modesta. Por todo lo anterior queda claro que la aplicación de un *cut-off* sobre la base de átomos individuales puede fácilmente conllevar la separación artificial de dipolos (dejando a un átomo dentro de la distancia límite y a otro fuera), lo que supone introducir una interacción monopolo-monopolo considerable, en lugar de ignorar una interacción dipolo-dipolo relativamente pequeña. Por ello es preferible definir el *cut-off* sobre la base de residuos o grupos de átomos cuya carga neta sea cero o casi cero.

8.1. Minimización de la energía.

La minimización de la energía de pequeñas moléculas o de sistemas macromoleculares se lleva a cabo por cálculos iterativos sucesivos en los que se somete a la conformación inicial del sistema a un proceso de optimización geométrica parcial o completa. Todos los parámetros que definen la geometría del sistema, o en su caso sólo algunos, se modifican en pequeños incrementos hasta que la estructura alcanza un mínimo energético local. Aunque algunos algoritmos hacen uso de la derivada de la función

(gradientes conjugados), o incluso de la derivada segunda (Newton-Raphson), para guiar la minimización, ninguno de estos métodos puede garantizar que se ha encontrado la estructura de energía más baja posible, el llamado *mínimo global*. La minimización puede proceder bien en coordenadas internas (enlaces y ángulos) o, más frecuentemente para sistemas macromoleculares, en coordenadas Cartesianas (cada átomo está caracterizado por unas coordenadas *x*, *y* y *z*, y el átomo se mueve con pequeños incrementos a lo largo de estos ejes). Una de las ventajas de minimizar en coordenadas internas es que se pueden simular bien los movimientos cooperativos de varios átomos o grupos de átomos y se reduce el riesgo de que las moléculas queden atrapadas en falsos mínimos.

Las minimizaciones se pueden controlar mediante el uso de restricciones. Por ejemplo, se pueden fijar las coordenadas de algunos átomos, o constreñir la distancia entre dos átomos dados, enlazados o no, a un valor prefijado aplicando una constante de fuerza adecuada. Igualmente se pueden fijar restricciones a las torsiones alrededor de determinados enlaces o forzar a una molécula a que adopte la conformación de otra ("forzado sobre plantilla") (Baniak, 1987).

8.2. Análisis conformacional.

En un problema con múltiples variables, como es el de encontrar el confórmero de mínima energía de una molécula o la conformación más estable de un complejo, la respuesta que se obtiene depende en gran medida del punto de partida. Además, la mayoría de las veces estamos interesados no sólo en el mínimo global sino en todos aquellos confórmeros que pueden estar poblados de forma significativa a temperatura ambiente, o hasta una pocas kcal/mol por encima del mínimo global. Para localizar todas estas conformaciones de baja energía definidas por una compleja hipersuperficie de energía potencial es necesario realizar una *búsqueda conformacional*. El punto de partida lo puede constituir un confórmero cualquiera, que se optimiza mediante una técnica de minimización de la energía, y se compara con otros confórmeros encontrados previamente para chequear su posible duplicación. Si el nuevo confórmero así generado no había sido descubierto aún, se añade a una lista acumulativa de confórmeros distinguibles entre sí. Este ciclo se continúa utilizando una nueva geometría de partida, minimizando, etc. Llegará un momento en que se habrán utilizado todas las geometrías iniciales posibles o en que no se encuentren nuevos mínimos, con lo que se dará por finalizada la búsqueda. Como la parte correspondiente a la minimización simplemente refina las estructuras de partida hasta alcanzar el mínimo local más próximo, quien más controla la eficacia de la búsqueda para alcanzar la convergencia es el algoritmo que genera los confórmeros iniciales.

Los métodos utilizados para generar un conjunto de configuraciones del sistema molecular se pueden dividir en tres grandes categorías: (1) búsquedas deterministas que cubren todas las áreas del espacio conformacional de forma sistemática, (2) métodos estocásticos (Monte Carlo) que utilizan un elemento aleatorio para la exploración del espacio, y (3) dinámica molecular. Los dos primeros pueden operar bien en coordenadas externas (Cartesianas), en coordenadas internas (enlaces y ángulos de enlace y torsionales), o en representaciones de geometría de distancias (matrices de distancias internucleares). Como el número de estructuras tridimensionales posibles se expande geométricamente con el número de grados de libertad, y es bien sabido que los distintos confórmeros difieren principalmente en sus ángulos torsionales, es muy ventajoso y eficaz confinar la búsqueda exclusivamente al espacio torsional. De este modo un problema en principio R^{3N-6} queda reducido como mucho a otro $R^{N'}$, siendo R el número de puntos muestreados a lo largo de la coordenada torsional, N el número total de átomos y N' el número de torsiones independientes (Chang, 1989; Saunders 1990). Una búsqueda conformacional de este tipo puede considerarse como una búsqueda "en árbol" (*tree search*), donde los grados de libertad sucesivos son los nodos del árbol y el muestreo produce las ramas que emergen de estos nodos (Figura 3). El tiempo necesario para llevar a cabo una búsqueda es proporcional al número de nodos en el árbol. Este tipo de método se encuentra implementado en el programa CONGEN (Bruccoleri, 1987) para muestrear uniformemente el espacio conformacional de pequeños segmentos polipeptídicos de proteínas y así predecir el plegado de las cadenas laterales de los aminoácidos cuando se lleva a cabo el modelado por homología.

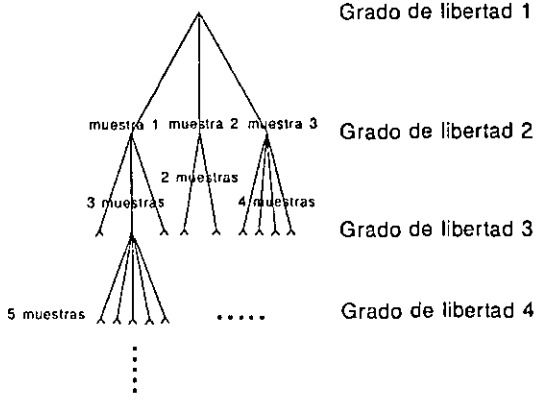


Figura 3. Porción superior de una árbol de búsqueda, que muestra cómo se puede representar el procedimiento de muestreo.

Una limitación de la mayor parte de las técnicas de muestreo actuales es que asumen que las cargas atómicas calculadas para una determinada geometría son válidas para todas las geometrías. En este sentido, es importante que las cargas utilizadas sean representativas de un amplio abanico de conformaciones (Reynolds, 1992).

8.2.1. Búsqueda sistemática ("*grid search*").

Si el sistema contiene sólo unos pocos grados de libertad se puede explorar la totalidad del espacio configuracional, variando cada uno de los torsionales de forma sistemática y minimizando la energía de cada uno de los confórmeros así generados. Para una molécula con 3 ángulos dihedros, y un incremento del valor de cada ángulo de 60°, se generarán $6^3 = 216$ configuraciones. Si el número de torsionales considerados es 6, esta cifra aumenta a 46.656, y para 9 torsionales, el número de configuraciones generadas es superior a diez millones. Estos números sirven para poner de manifiesto que, al ser un procedimiento combinatorio, la demanda computacional restringe su uso a problemas con un número limitado de grados de libertad torsional y obliga en muchos casos a establecer un medio adicional de seleccionar sólo aquéllos confórmeros que son únicos y de energía relativamente baja. La mayor parte de las mejoras a este método se centran en algoritmos de filtrado que permiten desconsiderar porciones poco razonables del espacio conformacional (Howard, 1988). Además hay que considerar que si el número de valores para cada torsión es pequeño, la resolución con que se cubre el espacio puede ser inadecuada para proporcionar una geometría de partida en la vecindad de cada mínimo, y se pueden perder mínimos de baja energía.

Una vez encontradas las distintas conformaciones posibles y ordenadas de acuerdo con sus energías, es de esperar que aquéllas con las energías más bajas sean las que contribuyen a las propiedades del estado fundamental de la molécula. Si bien esto es cierto para algunas moléculas, no se puede decir lo mismo cuando las especies están cargadas o la molécula es polarizable. En este caso, es muy probable que las conformaciones más favorecidas sean aquéllas que maximicen las interacciones electrostáticas y el número de enlaces de hidrógeno. Tampoco hay que olvidar que si las energías de estos mismos confórmeros se evaluaran en presencia de un disolvente polar, en lugar de *in vacuo*, un número significativo de esas interacciones serían reemplazadas por interacciones más favorables con moléculas del disolvente (Howard, 1988).

8.2.2. Monte Carlo (MC).

Si el sistema contiene muchos grados de libertad, se puede generar un conjunto de configuraciones utilizando una combinación de muestreo aleatorio y el empleo del factor de Boltzmann:

$$\exp[-V(r_1,r_2,...,r_N)/k_B T] \qquad [4]$$

Dada una configuración de partida elegida arbitrariamente, se genera una nueva por desplazamiento al azar en espacio Cartesiano de uno o más átomos (o por variaciones en ángulos torsionales seleccionados), de forma tal que al cabo de un gran número de desplazamientos sucesivos se haya muestreado de forma uniforme el espacio disponible a todos los átomos. Cada nueva configuración se acepta o rechaza en base a un criterio energético (Metropolis, 1953) que implica un cambio en la energía potencial del sistema ($\Delta V(\mathbf{r})$) con respecto a la configuración anterior: se acepta si $\Delta V \leq 0$, o si para $\Delta V>0$, $\exp(-\Delta V/k_B T) > R$, donde R es un número aleatorio tomado de una distribución uniforme sobre el intervalo (0,1). En caso de ser rechazada la actual, se vuelve a la configuración previa, que se utiliza de nuevo como punto de partida para otro desplazamiento al azar. De esta manera cada configuración aparece con una probabilidad proporcional a su factor de Boltzmann y, si el paso básico se repite muchas veces, equivale a simular el movimiento de los átomos en contacto térmico con un baño de calor a la temperatura T. De este modo el sistema evoluciona a una distribución de Boltzmann. Para obtener una buena eficacia computacional sería de desear la combinación de un tamaño de paso (aleatorio) grande con una razón de aceptación alta. Por desgracia, para sistemas complejos que cuentan con muchos átomos enlazados covalentemente, sólo se puede obtener una razón de aceptación razonable para un tamaño de paso muy pequeño, lo cual limita la eficacia de este método para sistemas macromoleculares.

La muestra de Monte Carlo es una mera colección de estructuras tridimensionales arbitrarias, no relacionadas entre sí. Las configuraciones secuenciales de este tipo de muestreo son 'instantáneas' tomadas al azar (de ahí que el nombre del método haga referencia al célebre Casino) del movimiento total de la molécula y, por tanto, no ofrecen ninguna pista sobre la ruta traslacional que las une. No obstante, se puede extraer información respecto a la flexibilidad de la cadena a partir de las colecciones de datos conformacionales acumulados durante el proceso de muestreo, haciendo uso de la mecánica estadística. Las estructuras se pueden organizar sobre la base de algún criterio y compararse luego frente a modelos ideales o modelos de otras moléculas.

La eficacia de las técnicas de MC (definida en términos del cociente entre el número de estructuras aceptadas y el número total de tanteos) está determinada tanto por la temperatura, *T*, a la que tiene lugar el muestreo (cuanto más alta, mayor será la probabilidad de aceptación de la nueva estructura) como por el tipo y magnitud de los cambios conformacionales introducidos. Cambios demasiado grandes darán lugar a tasas de aceptación bajas por originar con facilidad solapamientos estéricos; ajustes demasiado pequeños harán necesarios muchos pasos "cuesta arriba" para cruzar una barrera de energía conformacional.

8.2.3. Dinámica molecular (DM).

A temperatura ambiente, un sistema molecular no es estático sino que atraviesa múltiples mínimos de la superficie de energía potencial. Cada átomo puede ser considerado como una partícula cuyo movimiento está determinado por las fuerzas que sobre ella ejercen todos los otros átomos de su entorno, según prescribe la física newtoninana ($F = m \cdot a$). Dadas las posiciones y velocidades de las partículas, así como la magnitud y dirección de las fuerzas que actúan sobre cada una de ellas en un instante determinado, por integración de las ecuaciones del movimiento de la mecánica clásica se pueden obtener la posición y la velocidad en un instante ligeramente posterior. Tomando pasos de tiempo sucesivos se puede construir una trayectoria dependiente del tiempo para todos los átomos, que representará así el movimiento de los mismos.

El movimiento de un átomo dado a lo largo de una coordenada determinada, por ejemplo x, se puede calcular de la siguiente forma: conocida su posición a tiempo t, x(t), su posición tras un pequeño intervalo de tiempo, Δt, vendrá dada por la serie de Taylor mostrada en la ecuación [5].

$$x(t+\Delta t) = x(t) + \frac{dx(t)}{dt}\Delta t + \frac{d^2x(t)}{dt^2}\frac{\Delta^2 t}{2} + \ldots \qquad [5]$$

La solución numérica a las ecuaciones del movimiento consiste en conocer la posición x(t), la velocidad dx/dt(t) y la aceleración $d^2x/dt^2(t)$, y en hacer aproximaciones adecuadas para tener en cuenta las contribuciones de las derivadas más altas, de modo que x(t + Δt) pueda calcularse con una precisión razonable. Para ello, el intervalo de integración ha de ser lo suficientemente breve (del orden de 0.5-1 femtosegundos) para que la fuerza que actúa en la nueva posición no difiera mucho de la que se registraba en la posición original. El cálculo de esta nueva posición al final de este

incremento de tiempo completa un ciclo del procedimiento que, repetido iterativamente, produce la trayectoria total en la forma de una serie de posiciones y velocidades en tiempos sucesivos. El conjunto de configuraciones así generadas se asume que constituyen una representación adecuada de la función de distribución completa.

El lado derecho de la ecuación [5] es una serie infinita que es necesario truncar para poder determinar $x(t + \Delta t)$. La forma de llevar esto a cabo constituye una de las diferencias fundamentales entre los diferentes algoritmos de DM, cuya eficacia se puede probar haciendo uso de la tercera ley de Newton, según la cual la fuerza neta que actúa sobre la totalidad del sistema de partículas es 0, de tal modo que deben conservarse la energía total del sistema (potencial + cinética) y el momento (McCammon, 1987b).

El paso de tiempo, Δt, es el principal factor limitante de la duración de la simulación. Como se encuentra restringido a tiempos menores que los movimientos de frecuencia más alta, *i.e.* el estiramiento y acortamiento de los enlaces, es frecuente utilizar algoritmos, *e.g.* SHAKE (Ryckaert, 1977), que constriñen las longitudes de enlace a sus valores de equilibrio, permitiendo así el uso de pasos de tiempo de hasta 2 fs.

Hoy día, los cálculos de DM incluyen moléculas de disolvente (generalmente agua) y contraiones, en un intento de modelar las moléculas en disolución de la forma más realista posible. La omisión del agua en el modelo puede conllevar el enterramiento de grupos cargados dentro de la estructura de una proteína y una distorsión muy marcada de estructuras polianiónicas, como son los ácidos nucleicos, fenómenos que no es probable que ocurran en disolución. Como los sistemas modelados contienen normalmente unos pocos miles de átomos, como máximo, mientras que los sistemas que pretenden representar poseen dimensiones prácticamente infinitas, es convencional crear copias del modelo (generalmente, un paralelepípedo rectangular), que se repiten periódicamente en todas las direcciones. De esta forma, cada paralelepípedo es simplemente una imagen del sistema, que se encuentra así en las denominadas *condiciones de límite periódico*. Esto garantiza que todos los átomos se encuentren rodeados de átomos vecinos, bien 'reales' (los del modelo original) o imágenes de los mismos (los que se encuentran más allá de los límites), y que cuando una molécula abandona la caja por una cara, se introduzca de nuevo en ella por la cara opuesta, de modo que el número total de partículas se mantenga constante.

Desde el punto de vista de la mecánica estadística, una simulación de macromoléculas *in vacuo* o una simulación que incluya el disolvente y condiciones fijas de límite periódico corresponde a un 'conjunto o ensamblado microcanónico', en el que la energía total del sistema se conserva, así como el volumen y el número de partículas. Los sistemas se suelen simular en condiciones de temperatura y volumen constantes ('conjunto canónico') o de temperatura y presión constantes ('conjunto isotérmico-isobárico'), ya que éstas son las condiciones en las que se realizan la mayor parte de los experimentos.

Para comenzar una simulación de DM, es necesario disponer de un conjunto inicial de posiciones atómicas y de velocidades. La estructura de partida normalmente ha de ser refinada energéticamente, utilizando un algoritmo de minimización, para aliviar posibles tensiones locales derivadas de solapamientos atómicos o de distorsiones de enlaces o ángulos. Las velocidades iniciales se asignan a los átomos de forma aleatoria a partir de una distribución de Maxwell-Boltzmann correspondiente a una baja temperatura, y se realiza una primera simulación de DM durante unos pocos picosegundos. Le sigue un período de equilibrado durante el cual continúan alternándose nuevas asignaciones de velocidades, elegidas a partir de distribuciones Maxwellianas correspondientes a cada nueva temperatura sucesivamente aumentada, con intervalos similares de relajación dinámica hasta alcanzar la temperatura deseada. La temperatura, T, para este conjunto microcanónico se mide en términos de la energía cinética media para el sistema compuesto de N átomos como:

$$\frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N} m_i \langle v_i^2 \rangle = \frac{3}{2} N k_B T \qquad [6]$$

donde m_i y $\langle v_i^2 \rangle$ son la masa y el cuadrado de la velocidad media del átomo i, respectivamente, y k_B es la constante de Boltzmann. El período de equilibrado se considera terminado cuando no son evidentes cambios sistemáticos en la temperatura del sistema durante unos 10 ps.

La eficacia de la DM está determinada en gran medida por la temperatura, T, a la que tiene lugar el muestreo. Si T es demasiado alta, la molécula pasará demasiado tiempo en estados de alta energía y visitará los mínimos energéticos con muy poca frecuencia. A la inversa, si T es demasiado baja, la molécula será incapaz de superar barreras de energía con la rapidez necesaria para acceder a nuevas regiones del espacio configuracional en un tiempo razonable. La realización de simulaciones de DM a

temperaturas altas conlleva un aumento del tamaño del espacio conformacional explorado, pero (sobre todo en el caso de macromoléculas) hay que tener en cuenta que la temperatura de la simulación está limitada por el requerimiento de mantener la estructura secundaria (evitar isomerizaciones *trans-cis* de enlaces peptídicos, desapareamientos de bases en el ADN, etc.), que puede hacer necesario en ciertos casos la imposición de restricciones. Generalmente las conformaciones generadas a altas temperaturas (500-1000 K) minimizan a energías por debajo de la inicial, demostrando la utilidad del método para superar barreras de energía alrededor del mínimo local (Bruccoleri, 1990). Incluso a temperatura ambiente, la DM puede ayudar al refinamiento energético de una macromolécula, especialmente en el caso de estructuras procedentes de RMN o cristalografía de rayos X, donde ya están presentes restricciones adicionales (Brünger, 1991).

En el estudio de procesos dinámicos en los que existen barreras potenciales sustanciales, la DM puede resultar ineficaz para un muestreo adecuado con fines estadísticos. Para muestrear grandes regiones del espacio conformacional mediante DM lo más adecuado es generar un cierto número de conformaciones iniciales diferentes, y utilizar cada una de ellas como punto de arranque para diferentes trayectorias (Howard, 1988).

El enfriamiento rápido de un sistema simulado a alta temperatura, *e.g.* por minimización de la energía, lo conduce al mínimo local más próximo, que puede ser un estado sobrecalentado. Para evitar el atrapamiento del sistema en "falsos mínimos" de alta energía, es útil enfriarlo y proseguir la dinámica a una temperatura más baja (*v.g.* 300 K) con objeto de que pueda escapar hacia mínimos de energía más bajos (Mackay, 1989; Ortiz, 1993). Otra alternativa es el llamado "*simulated annealing*", proceso durante el cual el sistema se calienta inicialmente a una alta temperatura para luego proceder a su enfriamiento lento hasta que se produce su "congelación" y ya no sufre más cambios (Kirkpatrick, 1983). A cada temperatura sucesivamente más baja la simulación debe proceder durante un tiempo suficientemente largo para que el sistema alcance un estado estacionario.

8.2.4. Híbrido DM/MC.

Uno de los principales inconvenientes de utilizar técnicas de DM para explorar el espacio conformacional es que gran parte de la energía cinética disponible se disipa en vibraciones de enlaces y ángulos, que son irrelevantes para la búsqueda conformacional. Las transiciones conformacionales que implican rotaciones concertadas alrededor de ángulos dihedros flexibles son relativamente infrecuentes. El algoritmo SHAKE

(Ryckaert, 1977) intenta solventar este problema, eliminando estas vibraciones de las trayectorias de DM. También se pueden aplicar técnicas de filtrado de Fourier a los datos sin procesar de la dinámica para eliminar los movimientos indeseados y aislar las transiciones conformacionales de baja frecuencia (Dauber-Osguthorpe, 1990). Por su parte, en las simulaciones de MC, al mantenerse completamente fijos las longitudes y los ángulos de enlace mientras se someten los dihedros a rotaciones aleatorias, las barreras rotacionales pueden llegar a ser artificialmente altas.

Recientemente se ha propuesto una solución intermedia, el Monte Carlo Dinámico (Morley, 1992), que aprovecha las ventajas respectivas de los dos métodos: se generan configuraciones de partida mediante cortas simulaciones de DM en las que la energía cinética se concentra en un enlace rotable seleccionado al azar. La trayectoria de DM continúa en tanto en cuanto las energías de las nuevas estructuras satisfagan la prueba de Metropolis, permitiendo así una rápida localización de regiones del espacio conformacional de baja energía. Si se rechaza la nueva configuración, se selecciona un nuevo enlace para empezar un nuevo ciclo de dinámica.

8.3. Método de la perturbación de la energía libre.

Los resultados del modelado y la minimización de la energía en el mejor de los casos son cualitativos debido a las limitaciones de los cálculos. De las trayectorias de DM se pueden obtener los valores promediados estadísticamente en el equilibrio para cualquier propiedad del sistema que sea medible directamente en cada punto de la trayectoria (*e.g.* la energía cinética de partes relevantes del sistema, propiedades estructurales, campos eléctricos). A partir de estos valores promedios se pueden derivar también un número importante de propiedades termodinámicas, aunque dos cantidades importantes, la entropía y la energía libre (de Helmholtz o de Gibbs) no se pueden derivar de un promedio estadístico, por ser propiedades globales que dependen de lo extenso que sea el espacio configuracional (o de fase) accesible al sistema molecular. Esto hace que sea virtualmente imposible calcular la energía libre absoluta de un sistema molecular. Sin embargo, la constante de unión de un ligando a su receptor está directamente relacionada con la energía libre (ecuación [1]), por lo que la determinación de esta cantidad es de sumo interés. Afortunadamente en los últimos años se han desarrollado una serie de procedimientos para evaluar cambios relativos de energía libre que abren perspectivas hasta hace poco impensables en el estudio de la interacción fármaco-receptor.

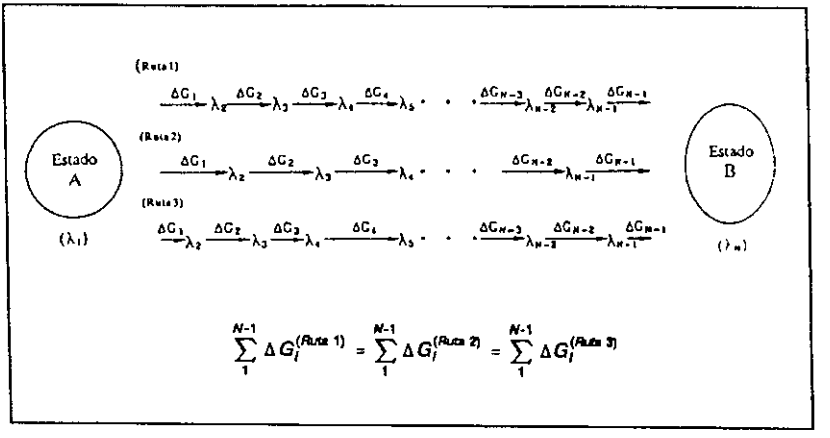


Figura 4. Rutas posibles de transformación del estado A en B a lo largo de una perturbación termodinámica.

Los métodos de perturbación e integración termodinámica se basan en que los *cambios* de energía libre relacionados con pequeñas perturbaciones de un sistema molecular se pueden determinar a partir de una simulación (de MC o DM). La diferencia de energía libre entre dos estados, A y B, de un sistema se puede determinar a partir de una simulación de DM en la que la función de energía potencial, $V(\mathbf{r})$, se altera lentamente de modo que el sistema A se va transformando poco a poco en el sistema B a lo largo de una ruta reversible (Figura 4). Para ello, el Hamiltoniano $H(\mathbf{p},\mathbf{r})$, o sólo el término de energía potencial $V(\mathbf{r})$, se hace función de un *parámetro de acoplamiento*, λ, tal que $H(\mathbf{p},\mathbf{r},\lambda_A)$ caracteriza al estado A del sistema y $H(\mathbf{p},\mathbf{r},\lambda_B)$, al estado B. λ define una ruta de transformación entre los estados iniciales (λ=0) y finales (λ=1). Esta ruta no tiene por qué ser una ruta física si la cantidad de interés es una función de estado, como ΔG, que es independiente del camino que siga la transformación. Esta es la ventaja crítica en la práctica pues la ruta no física puede ser computacionalmente ventajosa, de modo que se puede "mutar" un grupo funcional en el ligando o en el propio receptor. Algunos de los tipos de cambios que se pueden hacer en términos de "coordenadas de transición topográfica" aparecen esquematizados en la figura 5.

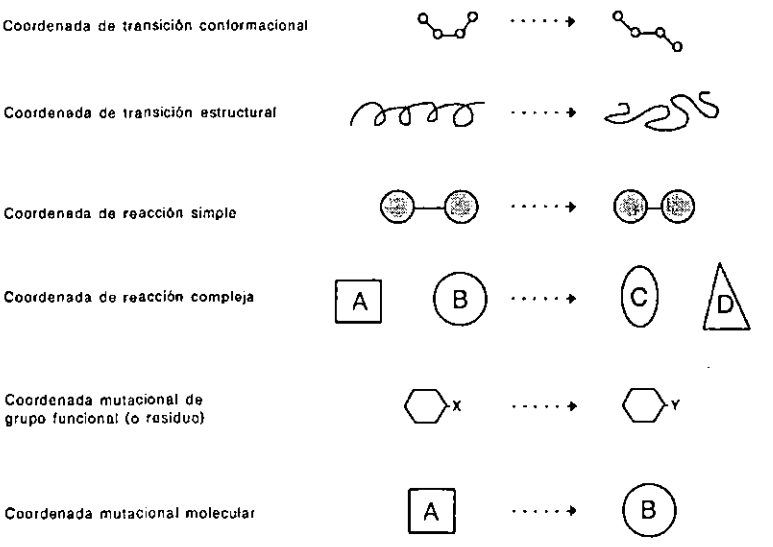


Figura 5. Tipos de coordenadas de transición topográfica utilizadas en las determinaciones de energías libres por medio de simulaciones moleculares.

8.3.1. Formulación del problema.

En un conjunto canónico (T, V y N constantes), la fórmula fundamental para la energía libre de Helmholtz es:

$$F = -k_B T \ln Z \qquad [7]$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y Z es la función de reparto, determinada por el Hamiltoniano $H(\mathbf{p},\mathbf{q})$ que describe la energía total del sistema en términos de las coordenadas $\mathbf{q}$ y los momentos $\mathbf{p}$ de los átomos del sistema:

$$Z = [h^{3N} N!]^{-1} \int\int \exp[-H(p,q)/k_B T]\, dp\, dq \qquad [8]$$

donde N es el número total de átomos y h la constante de Planck.

La correspondiente energía libre de Gibbs viene dada por:

$$G = F + PV = U + PV - TS \qquad [9]$$

donde P es la presión del sistema y $U + PV$ es la entalpía.

La diferencia de energía libre, ΔG, entre dos estados bien definidos, A y B, cuyas funciones de reparto respectivas vienen dadas por Z_A y Z_B, se puede escribir como:

$$\Delta G = G_B - G_A = -k_B T \ln \frac{Z_B}{Z_A} \qquad [10]$$

Aquí entra en juego el parámetro de acoplamiento, λ, para evitar tener que calcular independientemente Z_A y Z_B:

$$G(\lambda) = -k_B T \ln Z(\lambda) \qquad [11]$$

Al ir variando λ desde 0 (donde Z es 100% Z_A) hasta 1 (donde Z será 100% Z_B) continua y lentamente, la energía potencial del sistema, $V(\lambda)$ va pasando lentamente de V_A a V_B. La diferencia de energía libre ΔG_{BA} viene dada por:

$$\Delta G_{BA} = G(\lambda_B) - G(\lambda_A) = -k_B T \ln \frac{Z(\lambda_B)}{Z(\lambda_A)} \qquad [12]$$

que se puede expresar como un promedio de conjunto:

$$\Delta G_{BA} = -k_B T \ln \{<\exp[-\frac{H(p,r,\lambda_B) - H(p,r,\lambda_A)}{k_B T}]>_{\lambda_A}\} \qquad [13]$$

donde $<...>_\lambda$ significa un promedio del conjunto sobre las coordenadas **r** y los momentos **p** al valor λ.

Para que esta *fórmula de la perturbación* dé resultados exactos, el estado B debe estar próximo al estado A. Normalmente la diferencia es lo suficientemente grande como para que sea necesario descomponer el cambio desde A hasta B en un número de pasos entre estados intermedios que se encuentran lo sufientemente próximos para permitir el uso de esta fórmula (Figura 4). ΔG_{BA} viene dada entonces por la suma del conjunto de ΔG para cada paso.

Diferenciando en la ecuación [13] con respecto a λ a temperatura constante, T, se obtiene directamente:

$$\left[\frac{\delta G(\lambda)}{\delta \lambda}\right]_{T,P} = -\frac{k_B T}{Z(\lambda)}\left[\frac{\delta Z(\lambda)}{\delta \lambda}\right]_{T,P} = \left\langle \frac{\delta H(p,r,\lambda)}{\delta \lambda} \right\rangle_{\lambda} \qquad [14]$$

que nos lleva a la *fórmula de la integración* para la diferencia de energía libre ΔG_{BA}:

$$\Delta G_{BA} = \int_{\lambda_A}^{\lambda_B} \left\langle \frac{\delta H(p,r,\lambda)}{\delta \lambda} \right\rangle_{\lambda} d\lambda \qquad [15]$$

Si λ va cambiando muy lentamente desde λ_A hasta λ_B durante una simulación de dinámica molecular, la integración se puede ir haciendo a lo largo de la simulación. De este modo se puede obtener ΔG_{BA} para los estados algo diferentes A y B, con tal que el cambio continuo de λ sea tan pequeño que el sistema permanezca esencialmente en equilibrio para cada valor intermedio de λ.

En resumen, el cálculo de ΔG se puede ir haciendo bien integrando la derivada de $G(\lambda)$ a lo largo de λ (*integración termodinámica* o "crecimiento lento"), o bien designando estados intermedios $G(\lambda_i)$ que disten unos de otros suficientemente poco y calculando los cambios ΔG paso a paso (*perturbación termodinámica* o "ventanas"). Otra posibilidad sería ir desarrollando $G(\lambda)$ sobre el intervalo [A,B] a partir de simulaciones en las que λ es variable y obteniendo ΔG como $G(\lambda=1)$-$G(\lambda=0)$. La función $G(\lambda)$ es equivalente al "potencial de fuerza media" con respecto a la coordenada λ en termodinámica estadística de fluidos. Estos 3 tipos de cálculos constituyen hoy día las principales aproximaciones a las determinaciones de la energía libre vía simulación molecular.

El factor crucial para obtener valores fiables de diferencias de energía libre (especialmente cuando contribuyen factores entrópicos) es el muestreo adecuado del espacio configuracional, que generalmente se lleva a cabo mediante simulaciones de DM. La energía del sistema se obtiene como un *promedio* sobre el conjunto de configuraciones generadas, mientras que la energía libre es una *integral* sobre el espacio configuracional, o de fase, al que es accesible el sistema. Una condición necesaria, aunque no suficiente, para obtener una estimación precisa de ΔG_{BA} consiste en realizar la integración en la ecuación [15] no sólo en la dirección desde el estado A al B, sino también en sentido contrario, desde B hasta A. Si el cambio de A a B a A se lleva a

efecto de forma reversible, la histéresis será cero: $\Delta G_{BA} + \Delta G_{AB} = 0$. Otra condición a tener en cuenta es que el tiempo de simulación durante el cual se perturba el sistema desde A hasta B, y viceversa, debe ser mayor que el tiempo de relajación del sistema.

8.3.2. Ciclos termodinámicos.

Para utilizar las técnicas de perturbación o integración termodinámica para calcular energías libres relativas es necesario formular lo que se denomina un *ciclo termodinámico*. La clave del método radica en el hecho de que la energía libre es una función de estado, lo que significa que en tanto en cuanto el sistema se perturbe de forma reversible el cambio de energía libre, ΔG, será independiente de la ruta de perturbación elegida. Por lo tanto, a lo largo del ciclo o ruta cerrada, ΔG ha de ser igual a 0.

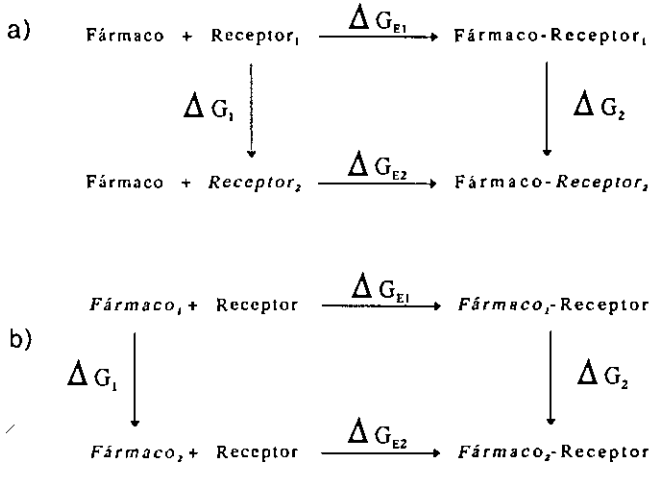


Figura 6. Ejemplos de perturbación de energía libre aplicada a la interacción fármaco-receptor

Hay dos formas de obtener ΔG: una es calcular esta diferencia directamente a lo largo de la ruta que corresponde al proceso de interés; otra es diseñar un ciclo en el que el proceso que nos interesa sea sólo una parte,

y calcular la diferencia de energía libre de la parte restante del ciclo. Aquí radica precisamente el poder del método, pues computacionalmente se pueden llevar a cabo procesos no físicos como, por ejemplo, la conversión de un átomo o un grupo químico en otro. Consideremos, por ejemplo, el proceso de unión de dos fármacos (G_A y G_B) a un receptor común R (Figura 6a). La simulación de los procesos que transcurren en sentido horizontal son prácticamente imposibles de simular pues implican la desolvatación del sitio receptor y de la molécula de fármaco para que pueda formarse el complejo fármaco-receptor. La constante de unión relativa vendría dada por:

$$\frac{K_B}{K_A} = e^{-[\Delta G_B - \Delta G_A]/RT} \qquad [16]$$

donde R denota la constante de los gases. Sin embargo, la diferencia deseada no computable puede ser calculada indirectamente en virtud del ciclo termodinámico, ya que:

$$\Delta G_B - \Delta G_A = \Delta G_2 - \Delta G_1 \qquad [17]$$

siempre que la composición del fármaco A no sea demasiado diferente de la del fármaco B. Esta técnica posibilita predecir de forma cuantitativa la manera en que un determinado sustituyente afectará a la afinidad de unión de un cabeza de serie al sitio receptor.

Esta metodología se ha aplicado a una variedad de pequeñas moléculas para calcular cambios relativos en su energía libre de solvatación (Charles, 1991) o en potenciales redox (Richards, 1989), y también a la interacción de inhibidores con enzimas, como por ejemplo la conversión de benzamidina a *p*-fluorobenzamidina en la tripsina (Wong, 1986) o la mutación NH $\rightarrow$ O en dos inhibidores peptídicos de la termolisina (Bash, 1987a). Igualmente resulta posible perturbar el sitio receptor (Figura 6b), por lo que también se han podido calcular los cambios en las propiedades de unión y catálisis de enzimas mutantes con respecto a las enzimas nativas (Bash, 1987b), y evaluar la diferencia en energía libre de unión de un antibiótico a dos secuencias diferentes de ADN (Gago, 1990).

8.3.3. Limitaciones del método PEL.

Aunque se han caracterizado algunos de los requisitos necesarios para juzgar si se ha alcanzado la convergencia, éstos pueden no ser suficientes para garantizar que se han muestreado todas las conformaciones accesibles que contribuyen al promedio del conjunto (Pearlman, 1989). El

hecho de que el resultado final de los cálculos de PEL sea un simple número que tiene relevancia experimental ($\Delta\Delta G$) plantea la posibilidad de que el resultado obtenido sea el esperado pero de forma totalmente fortuita (o por compensación de errores, o por ajuste de parámetros). Son necesarias pruebas adicionales y valoraciones precisas de los efectos producidos por cambios en las condiciones de simulación (*cut-off*, formulación de r_{eq} para los átomos que 'desaparecen' o 'crecen', forma de cambiar λ, uso de ventanas modificadas dinámicamente, tratamiento de las condiciones de límite periódico, etc) para confirmar la validez de los resultados.

La fiabilidad de las predicciones va a depender también del sistema considerado y de la magnitud y naturaleza de los cambios introducidos. Si pensamos en un ligando que puede unirse a un receptor en dos orientaciones posibles con tan solo una pequeña diferencia de energía libre entre ambas, la sustitución de un grupo funcional por otro puede determinar una inversión en la preferencia orientacional del nuevo ligando con respecto al primero, y este cambio puede no ser observable en la simulación si la barrera de energía a salvar es considerable.

La energía libre de un sistema molecular es bastante sensible al potencial de interacción o campo de fuerzas utilizado en los cálculos. Para un caso relativamente sencillo como es la energía libre de solvatación del metanol en el agua, la aplicación de parámetros provenientes de distintos campos de fuerzas bien establecidos da lugar a una dispersión de unas $2kT$ alrededor del valor experimental de G (van Gunsteren, 1988). Esto quiere decir que los cálculos de la energía libre de solvatación de moléculas pequeñas, cuando están disponibles los valores experimentales, pueden proporcionar información sobre la validez de un campo de fuerzas y sobre cómo mejorar la calidad de los parámetros disponibles. Al mismo tiempo, esto quiere decir también que los resultados obtenidos de las simulaciones de PEL para interacciones ligando-receptor se deben chequear con respecto a variaciones en los parámetros del campo de fuerzas utilizado.

9.0. SELECTIVIDAD DE LA INTERACCIÓN FÁRMACO-RECEPTOR. "DOCKING".

A medida que se fueron cristalizando y analizando complejos macromolécula-ligando se fueron estableciendo las características generales de la unión. Pronto se puso de manifiesto que el ligando se mantiene en posición por muchas interacciones con diferentes grupos del receptor, grupos que en el caso de las proteínas pueden estar ampliamente dispersos en la secuencia de aminoácidos. Empezó a resultar aparente que una función

importante de la estructura macromolecular en su conjunto es precisamente mantener estos grupos en la orientación relativa adecuada para definir las características de la cavidad y constituir un sitio de unión específico. Las contribuciones individuales de cada grupo a la energía total de unión pueden ser débiles pero la suma de todas ellas puede hacer que el ligando se una muy firmemente. Como consecuencia de esta interacción pueden aparecer cambios alostéricos que, en el caso de las enzimas, o de la propia hemoglobina (Perutz, 1986), por ejemplo, son de fundamental importancia para comprender el mecanismo de acción de la proteína.

Uno de los ejemplos que mejor sirve para ilustrar el fenómeno de la selectividad es el de la dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima diana para distintos agentes quimioterápicos, que cataliza la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato, utilizando NADPH como cofactor. De los distintos inhibidores prototípicos, la pirimetamina inhibe selectivamente la enzima presente en *Plasmodium* sp., encontrando utilidad como antipalúdico, mientras la trimetoprima es más efectiva en bacterias. El metotrexato, por su parte, que muestra una constante de disociación parecida para todas las formas de la enzima, se utiliza para inhibir el crecimiento de células neoplásicas. Como se han conseguido analizar a alta resolución las estructuras cristalinas de varias DHFRs y se han preparado formas alteradas de la enzima mediante técnicas de mutagénesis dirigida, este sistema ha resultado singularmente propicio para su análisis desde un punto de vista tanto estructural como energético (Roberts, 1986). Igualmente, ha permitido examinar la especificidad de la interacción tanto en términos de la sustitución de determinados aminoácidos en la proteína como de la explotación de sitios de unión adicionales para mejorar la afinidad del inhibidor (Kuyper, 1985). Otro aspecto interesante que surgió como consecuencia de estos estudios es que el modo de unión de estos inhibidores está "invertido" con respecto al del propio dihidrofolato (Bolin, 1982), lo que acentúa la necesidad de prestar suficiente atención a las propiedades electrónicas de los ligandos y de comprobar en qué medida los métodos teóricos son capaces de realizar este tipo de predicciones (Manaut, 1991).

En ausencia de datos cristalográficos sobre el modo preciso de unión del ligando a la macromolécula, es preciso explorar las diversas posibilidades de interacción entre ambas moléculas. Para que se forme un complejo, la energía de interacción (ΔE), ha de ser negativa:

$$\Delta E = E_{(ligando\text{-}receptor)} - E_{ligando} - E_{receptor} \qquad [18]$$

La computación de ΔE implica conocer tanto las conformaciones óptimas de ligando y receptor por separado como la conformación más estable del complejo. La búsqueda del complejo óptimo no es trivial en la mayoría de las ocasiones, y su modelado implica tener en consideración un buen número de factores, entre los que se encuentran:

a) conocimiento del sitio de unión óptimo en la macromolécula. En el caso de enzimas, el sitio receptor candidato va a ser el propio sitio activo, aunque en ocasiones el sitio relevante para la acción del fármaco puede ser diferente, lo que supone exploraciones adicionales (Ortiz, 1993).

b) determinación de la orientación relativa del ligando con respecto al sitio receptor, pues los casos de múltiples modos de unión están suficientemente documentados tanto para proteínas (Badger, 1988) como para ADN (Quintana, 1991). Los métodos teóricos normalmente buscan aquella orientación que da lugar a la energía de interacción más favorable, aunque cuando se ha podido comparar con resultados cristalográficos (Meng, 1992; Shoichet, 1993), se ha llegado a la conclusión de que los sitios calculados como más favorables no tienen por qué coincidir necesariamente con los observados experimentalmente.

c) caracterización de la conformación óptima del ligando en el sitio de unión.

d) evaluación de los posibles cambios conformacionales en el sitio receptor como consecuencia de la unión.

Las técnicas manuales de modelado del complejo ligando-receptor tratan inicialmente al sitio diana como si fuera completamente rígido, mientras que la conformación del ligando se va ajustando de forma interactiva, tanto por movimientos de traslación y rotación como mediante giros de enlaces rotables. Esta maniobra de acoplamiento (*"docking"*, por analogía con la atracada de los buques en puerto) se simplifica considerablemente si se cuenta con información visualmente comprensible sobre las características químicas de ambas moléculas (*e.g.* superficies coloreadas codificadas según el potencial electrostático o hidrofóbico, o mapas energéticos de interacción con sondas de grupos funcionales). Los cálculos energéticos proporcionan asimismo una medida de la energía de interacción, que con algunos programas se puede monitorizar también interactivamente y sirve como guía para elegir la orientación preferida de una molécula respecto de otra. Pero aún utilizando una función simple de energía no enlazada que comprenda un componente estérico y otro electrostático, e ignorando las contribuciones entre átomos que pertenecen a una misma molécula (ecuación [19]), el tiempo de cálculo, proporcional al cuadrado del

número de átomos, puede hacer que este proceso sea demasiado lento para sistemas moleculares grandes en la mayor parte de las estaciones de trabajo.

$$E_{interacción} = \sum_{i=1}^{lig} \sum_{j=1}^{rec} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{6}} + \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} \right) \qquad [19]$$

La ecuación [19] contiene los términos *intermoleculares* presentes en la función de mecánica molecular de AMBER (ecuación [3]) con la excepción del término corrector del enlace de hidrógeno. Entre las simplificaciones propuestas está la de precalcular los términos de la función de energía potencial correspodientes a los átomos del receptor y tabularlos en tres dimensiones (Pattabiraman, 1985). La aproximación utilizada para separar los términos de van der Waals consiste en calcular la media geométrica de A_{ij} y B_{ij} (Hagler, 1974):

$$A_{ij} = \sqrt{A_i A_j} \; ; \qquad B_{ij} = \sqrt{B_i B_j}$$

por lo que la ecuación [19] se puede reescribir como:

$$E_{interacción} = \sum_{i=1}^{lig} \sqrt{A_i} \sum_{j=1}^{rec} \frac{\sqrt{A_j}}{r_{ij}^{12}} - \sum_{i=1}^{lig} \sqrt{B_i} \sum_{j=1}^{rec} \frac{\sqrt{B_j}}{r_{ij}^{6}} + \sum_{i=1}^{lig} q_i \sum_{j=1}^{rec} \frac{q_j}{\varepsilon r_{ij}} \qquad [20]$$

Computacionalmente, el volumen ocupado por los átomos del receptor se encierra dentro de una malla tridimensional y para cada punto de la misma, *m*, se almacenan en memoria los tres sumatorios correspondientes a los átomos del receptor que se encuentren a menos de una distancia límite de ese punto. Para las interacciones electrostáticas, el uso de este *cut-off* debe tener en cuenta la no escisión del dipolo del residuo (*cf.* sección 8). Asumiendo que un punto de la malla se encuentra razonablemente próximo a un átomo de la molécula que se está sometiendo a movimiento, la cantidad r_{ij} se puede reescribir como r_{im}, que corresponde a la distancia entre el punto de la malla y el átomo de la molécula que se mantiene fija. Como quiera que r_{im} es constante (la malla no se mueve en relación con la molécula fija), los valores comprendidos en el interior de los sumatorios para la molécula *i* se pueden calcular una sola vez y almacenar en cada punto de la malla. La energía de interacción vendrá ahora dada por:

$$E_{interacción} = \sum_{i=1}^{lig} \left[\sqrt{A_i}\, M_A\,(P_i) - \sqrt{B_i}\, M_B\,(P_i) + q_i M_e(P_i) \right] \qquad [21]$$

donde M_e (P_i), M_A (P_i), y M_B (P_i) representan los valores en los puntos de la malla para las energías precalculadas electrostática (*e*), y Lennard-Jones repulsiva (*A*) y atractiva (*B*), siendo P_j la posición del átomo en la molécula que se desplaza. Esta posición se utiliza para asignar el valor de energía correspondiente al punto de la malla más próximo, directamente o por interpolación trilinear (Meng, 1992). Cuanto menor sea el ancho de la malla, más se aproximarán los resultados de la ecuación [21] a los resultados de la ecuación [20] ya que disminuye el error entre la posición atómica verdadera y el punto de la malla. Esto equivale a asumir que los átomos del ligando se encuentran siempre en puntos de esta red tridimensional, por lo que el error asumido en esta aproximación es la mitad del ancho de la malla. Un espaciado de 0.5 Å es adecuado para el cálculo del potencial electrostático, que es función del inverso de la distancia entre los átomos interactuantes, pero para el potencial de van der Waals, al ser función del inverso de la sexta y duodécima potencia de la distancia, es preferible utilizar un ancho de malla de 0.25 Å (Pattabiraman, 1985; Meng, 1992).

Como el proceso de *docking* no deja de ser un "rompecabezas tridimensional" (Kuntz, 1992), cuya resolución puede además verse sesgada por el propio usuario, se han desarrollado algunos métodos que intentan explorar las diversas alternativas de forma automatizada, muestreando los 6 grados de libertad implicados en la disposición espacial relativa de dos objetos tridimensionales rígidos. Así, el programa DOCK (Kuntz, 1982) primero caracteriza los surcos y las invaginaciones de la superficie de la macromolécula que pueden constituir sitios diana para el ligando (o sitios alostéricos o sitios sin función conocida), los cuales llena con conjuntos de esferas cuyos centros sirven para crear una imagen negativa del sitio. A continuación se utilizan algoritmos para ajustar las estructuras de los ligandos a la imagen del receptor sobre la base de una comparación de distancias internas y para realizar una superposición de mínimos cuadrados, evaluando todas las posibles orientaciones. La bondad del ajuste se mide mediante un método de puntuación simple de la complementariedad de forma (Kuntz, 1982) o, más recientemente, haciendo uso de un sistema de tanteo triple basado en contactos, potenciales electrostáticos y un campo de fuerzas intermolecular (Meng, 1992). Con este último marcador, que utiliza también una malla tridimensional con valores precomputados para acelerar los cálculos, mejora mucho la calidad de las predicciones.

En otro procedimiento, desarrollado para acoplar sustratos en proteínas (Goodsell, 1990), se combina un método de exploración conformacional para el ligando con el cálculo de potenciales de afinidad en puntos de una malla tridimensional en la que se encuentra incluida la macromolécula. La malla de afinidad así computada para distintos tipos de átomos, así como una malla de potencial electrostático calculada mediante una carga puntual de +1, se almacena en memoria y se utiliza a modo de tabla para la evaluación rápida de la energía de interacción de cada confórmero con la proteína.

Una vez modelados una serie de complejos, es necesario minimizar su energía, permitiendo la relajación de todos los átomos, para su comparación y para obtener una estimación de la entalpías relativas de interacción del ligando en cada uno de ellos, lo que proporciona una indicación de su verosimilitud. En este tipo de cálculos (realizados en el vacío) las interacciones iónicas y de enlace de hidrógeno están sobrestimadas porque las moléculas no compiten con el agua, que en la realidad actúa como disolvente y como aceptor/donador de enlaces de hidrógeno. No hay que olvidar que las energías de unión determinadas experimentalmente representan diferencias entre las energías de ligando y receptor unidos separadamente al agua y la de ligando y receptor unidos entre sí (Ward, 1990). Este proceso conlleva una pérdida de entropía que debe compensarse por la energía de unión que resulta de las interacciones no-covalentes favorables entre ligando y receptor (Page, 1977; Breslauer, 1987).

Los procedimientos de *docking* automático son preferibles a los interactivos para la búsqueda de prototipos en bases de datos, y pueden ser de utilidad para el diseño de nuevos ligandos (Shoichet, 1993).

10.0. DISEÑO DE NUEVOS LIGANDOS BASADO EN LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL RECEPTOR.

Si la estructura de la macromolécula diana es conocida, se cuenta con una inestimable ayuda para generar ideas sobre posibles nuevos ligandos. Uno de los primeros ejemplos data de 1976, cuando las estructuras tridimensionales de la hemoglobina y sus complejos con el efector alostérico 2,3-difosfoglicerato inspiraron a algunos investigadores, utilizando modelos de varillas metálicas del sitio de unión, a diseñar ligandos con una estructura química completamente distinta y un modo de unión diferente que podían ser utilidad en el tratamiento de la anemia falciforme (Beddell, 1976).

Los modelos CPK o de varillas son adecuados hasta un cierto nivel de complejidad estructural, más allá del cual surgen problemas que hacen inabordable la exploración y manipulación sistemática sin que el modelo sufra una considerable degradación. Con los gráficos moleculares generados por ordenador, por otra parte, se pueden almacenar múltiples configuraciones del sistema, directamente relacionadas con listas de coordenadas, y no existe peligro de que el modelo se desarme. Adicionalmente, los programas de gráficos permiten una variedad de formas de representación, que no se limita a la forma molecular sino que incluye propiedades químicas de interés (Olson, 1992). La mera inspección visual de la superficie que envuelve a los átomos del sitio activo de una proteína puede ayudar a comprender el acoplamiento de ligandos e inhibidores. En algunos casos ha servido incluso para interpretar los coeficientes de los parámetros QSAR utilizados en las ecuaciones de correlación clásicas (Hansch, 1986). Si el sitio se examina con un ligando ya unido, se puede pensar en introducir variaciones modestas en el ligando conocido de modo que el ligando resultante se una de forma similar, pero con una afinidad aumentada. Alternativamente, las áreas y cavidades de la superficie que no estén ocupadas serán indicativas de oportunidades para extender el ligando. En el caso de las enzimas, se puede pensar en estructuras que mimeticen el estado de transición predicho para un determinado sustrato, que en principio deberían unirse a la enzima más fuertemente que el propio sustrato, por lo que pueden resultar buenos inhibidores (Wolfenden, 1991).

Si se utiliza la superficie de Connolly o una superficie de van der Waals, los átomos del ligando se encuentran alejados un radio de van der Waals de la superficie de la proteína, lo que dificulta su examen. La superficie de Lee y Richards (1971), por el contrario, indica directamente las posiciones de los átomos de ligando que se encuentran en contacto de van der Waals. Si se representa el ligando en forma de esqueleto, todos los átomos que den lugar a buenos contactos de van der Waals se encontrarán muy próximos a la superficie, por lo que esta representación puede actuar de guía para mostrar dónde se deberían situar los átomos del ligando para que den lugar a contactos favorables. Si la superficie además proporciona información sobre la especificidad química de esa zona, puede encontrar aplicaciones interesantes como herramienta para el diseño de fármacos (Bohacek, 1992).

Para cuando no se cuenta con ningún cabeza de serie, o cuando se quieren diseñar compuestos con una estructura completamente diferente a la de los ligandos conocidos, se han desarrollado un cierto número de métodos que permiten proponer estructuras de moléculas con afinidad por

un determinado sitio receptor de modo automático o semiautomático. Una primera posibilidad consiste en realizar una búsqueda sistemática en una base de datos de estructuras tridimensionales (*e.g.* la Base de Datos Estructurales de Cambridge, CSD) (Allen, 1979) para identificar aquellos compuestos que pueden encajar en el sitio de interés. El programa DOCK (DesJarlais, 1988) fue una de las primeras contribuciones a este respecto. La principal ventaja de este método es que las moléculas investigadas existen realmente y se encuentran en una conformación de baja energía. El problema principal, sin embargo, es que no tiene en cuenta la flexibilidad conformacional, y es un hecho bien conocido que la conformación del ligando unido no tiene por qué ser la misma que la encontrada en la estructura cristalina de la molécula aislada, por lo que cabezas de serie potenciales pueden pasar desapercibidos por encontrarse en una conformación inadecuada para la unión. Un método de estas características se encuentra además limitado por la naturaleza y número de las estructuras presentes en la propia base de datos. Más aún, este procedimiento considera al proceso de acoplamiento como una mera cuestión de geometría, dejando a un lado las propiedades químicas de los átomos individuales, las cuales van a ser determinantes a la hora de formar el complejo. Si las moléculas son rígidas, las geometrías de unión sugeridas por DOCK pueden corresponderse bastante bien con las halladas por cristalografía de rayos X, pero cuando hay cambios conformacionales implicados, la predicción se hace bastante problemática (Shoichet, 1993).

Para tener en cuenta tanto la forma como las características energéticas del sistema, conviene recordar que el potencial de Lennard-Jones viene expresado por la ecuación:

$$E_{LJ} = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^{6}} \qquad [22]$$

donde r es la distancia entre un par de átomos no enlazados cuya energía de Lennard-Jones, E_{LJ}, está descrita por los parámetros A y B. Para valores de E_{LJ} ligeramente negativos se puede encontrar un intervalo crítico de distancias interatómicas, por debajo del cual enseguida domina el término de repulsión, A/r^{12}, y por encima del cual la interacción tiende a desaparecer. Entre estos dos límites existe una zona de atracción mutua que puede representarse gráficamente como una superficie de contornos. Siguiendo este razonamiento, se podrían computar las interacciones de un átomo, o grupo funcional, con los átomos de una macromolécula diana en distintas posiciones, tanto a su través como a su alrededor, y obtener así una serie de valores de energía para cada posición. Seleccionando unos niveles energéticos

adecuados, se podrían representar gráficamente los contornos tridimensionales de las zonas donde ese átomo o grupo funcional daría lugar a una interacción favorable con la proteína. El programa GRID (Goodford, 1985) realiza justamente esta tarea, para lo que incluye además efectos electrostáticos y de enlace de hidrógeno. Aplicado a un receptor de estructura tridimensional conocida, permite predecir las interacciones no-covalentes que presenta con una serie de grupos funcionales o "sondas", caracterizadas por propiedades tales como radio de van der Waals, polarizabilidad, carga, hibridación, fuerza y longitud del enlace de hidrógeno, y número de enlaces de hidrógeno que es capaz de donar y aceptar. Esta descripción detallada es la que confiere propiedades específicas de interacción a cada sonda en GRID.

Es sabido que la interacción electrostática no disminuye rápidamente con la distancia y depende de forma crítica de la constante dieléctrica del medio. En GRID se asume que una interfaz plana separa una fase proteica homogénea de constante dieléctrica $\zeta=4$ de un disolvente homogéneo de constante dieléctrica $\varepsilon=80$. La interacción electrostática disminuye progresivamente si la sonda o los átomos de la proteína se acercan a la superficie, y prácticamente desaparece a medida que la sonda entra en la disolución (la constante dieléctrica aumenta hasta $(\zeta + \varepsilon)/2$). Los enlaces de hidrógeno son muy importantes para determinar la conformación de proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, moléculas orgánicas y sus complejos respectivos. Se pueden considerar interacciones de alcance intermedio entre un átomo de hidrógeno deficiente en electrones y una región próxima de alta densidad electrónica. Tanto el átomo dador, que está covalentemente unido al hidrógeno, como el aceptor son altamente electronegativos, y cuando se forma el enlace de hidrógeno, la distancia entre ambos es menor que la suma de sus radios de van der Waals. Cuando la separación entre los átomos implicados es pequeña, el enlace de hidrógeno está gobernado por un equilibrio entre componentes atractivos electrostáticos (transferencia de carga, polarización y dispersión), y términos repulsivos de intercambio de electrones. Cuando la distancia entre estos átomos es grande, el enlace de hidrógeno es casi por completo electrostático. Algunos potenciales de mecánica molecular incluyen un término adicional de enlace de hidrógeno, además de los términos electrostáticos y de van der Waals, para el ajuste fino de las distancias entre los átomos implicados (*e.g.* AMBER, ecuación [3]). En GRID también existe este potencial para el enlace de hidrógeno, y se formula de modo que la energía sea el producto de tres términos: E_r, una función 6-8 que depende de la separación entre los átomos, y E_t y E_p, que describen la dependencia orientacional de los enlaces de hidrógeno y dependen de la naturaleza química de los átomos y del ángulo que forma el enlace de hidrógeno con el átomo diana o con la sonda (Boobbyer, 1989). De los

muchos enlaces de hidrógeno posibles que una sonda es capaz de establecer en una determinada posición *xyz*, se seleccionan los más favorables sin que se supere lógicamente el número máximo que los átomos de la proteína o de la sonda pueden donar o aceptar. Los átomos en GRID son representados como átomos "extendidos", es decir, esferas, centradas en una carga puntual, que consisten en un átomo más pesado que el hidrógeno y un número adecuado de hidrógenos que se consideran de forma implícita por modificación de los parámetros electrostáticos y de Lennard-Jones del átomo pesado. De este modo se tienen en cuenta tanto a los átomos de hidrógeno como a los pares de electrones sin compartir. Las funciones de enlace de hidrógeno para GRID han sido recientemente ampliadas a sondas capaces de formar dos (Wade, 1993a) o más (Wade, 1993b) enlaces de hidrógeno.

Una de las objeciones que se puede hacer a esta técnica es que en la computación de los contornos energéticos no se tiene en cuenta la entropía, que en la práctica es un factor muy importante a la hora de determinar la unión del ligando, puesto que la liberación de moléculas de disolvente ejerce una importante influencia en el efecto hidrofóbico (Tandford, 1980). Igualmente se puede argüir sobre la conveniencia de dividir un ligando en sondas independientes o de asumir la aditividad entre pares de átomos. En cualquier caso, esta metodología permite estudiar detalladamente los atributos de un perfil energético en relación con la estructura de una proteína o un ácido nucleico, lo que puede resultar especialmente beneficioso cuando se intentan diseñar nuevos ligandos para que encajen en una determinada zona del receptor. El programa GRID permite representar gráficamente los sitios más favorables para cada tipo de sonda (Figura 7), junto con la penalización energética que se debe pagar si el grupo funcional en cuestión no se encuentra exactamente en el lugar óptimo. La proximidad de los contornos proporciona además información sobre la naturaleza y dirección de las fuerzas que actuarían sobre la sonda. La posibilidad de recontornear a diferentes niveles de energía permite filtrar los picos pequeños, conservando las características principales de la interacción predicha.

Los valores de interacción computados para cada sonda suelen diferir marcadamente. Es corriente encontrar sitios donde un grupo amino o carboxilo presenta energías de interacción del orden de -15 a -20 kcal/mol, mientras que una sonda de metilo raramente consigue más de -4 kcal/mol, como consecuencia de su baja polarizabilidad y de no poder formar enlaces de hidrógeno. Esta información puede ser muy provechosa a la hora de diseñar ligandos de alta afinidad como posibles fármacos que contengan grupos amino o carboxilato, haciendo uso de los sitios de unión favorable

presentes en proteínas o ácidos nucleicos que sirven como posibles dianas farmacológicas.

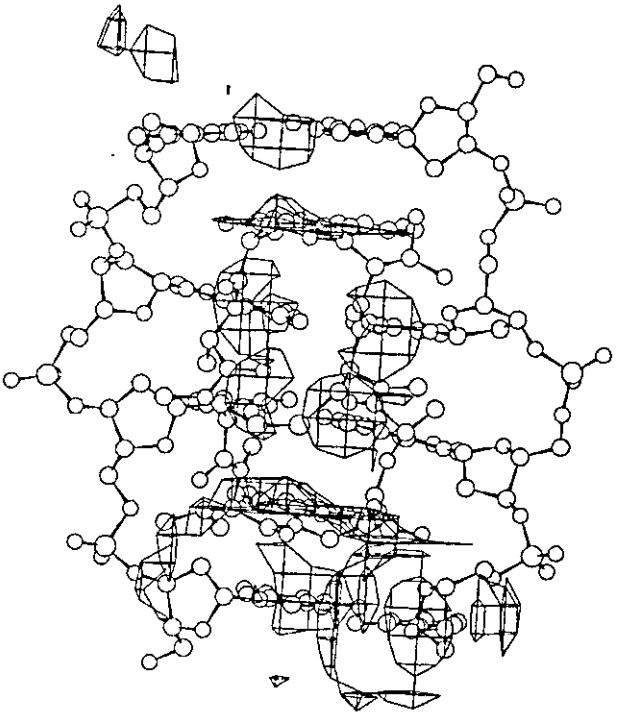


Figura 7. Mapas de GRID para una sonda de carbono sp^2 sobre un complejo ADN-fármaco bis-intercalante.

Otra característica notable de GRID es que puede utilizarse para la construcción de *mapas de selectividad*, que permiten comparar la interacción de una sonda con dos ligandos diferentes, por ejemplo, dos isómeros de una misma molécula. Para ello calcula la diferencia en energías de interacción de la sonda con cada isómero en todos los puntos de la malla tridimensional. Estas diferencias de energía se pueden asimismo contornear a un nivel de energía adecuado para mostrar las zonas donde una determinada interacción está más favorecida en una molécula que en otra (Boobbyer, 1989). También es posible representar las diferencias en las energías de interacción entre dos sondas. Utilizando, por ejemplo, una sonda reducida y una sonda oxidada, el mapa resultante sería indicativo de aquellas regiones de la macromolécula que unirían un fármaco en su forma reducida, pero no en su forma oxidada, mostrando así sitios potenciales de unión para agentes biorreductores,

teóricamente más selectivos frente a células tumorales pobremente oxigenadas (Reynolds, 1987).

En ocasiones puede no resultar fácil traducir a estructuras químicas concretas las energías de unión y las posiciones espaciales calculadas con GRID para una posible interacción. Cabría la posibilidad de ir posicionando fragmentos moleculares en determinadas posiciones del receptor, optimizando la formación de enlaces de hidrógeno y el relleno de cavidades hidrofóbicas, y conectarlos adecuadamente mediante otro tipo de fragmentos "puente". Este procedimiento, al ser susceptible de automatización, puede resultar muy rápido, y presenta la ventaja de que puede generar una enorme variedad de moléculas, ya que el número de posibles combinaciones de fragmentos es muy grande. El programa LUDI (Böhm, 1992a,b) se desarrolló para llevar a cabo esta búsqueda semi-automatizada, en la que el investigador tiene capacidad de decisión. Para entender el funcionamiento de este programa resulta útil definir los términos *sitio de interacción*, *fragmento molecular*, y *puente*.

- Un *sitio de interacción* es una posición del espacio que no está ocupada por el receptor donde un átomo perteneciente a un grupo funcional del ligando puede establecer interacciones favorables con el receptor. LUDI distingue cuatro tipos diferentes de sitios de interacción: lipofílico-alifático, lipofílico-aromático, donador de enlace de hidrógeno y aceptor de enlace de hidrógeno. Los dos primeros son adecuados para dar lugar a interacciones hidrofóbicas. Los dos últimos, por el carácter fuertemente direccional del enlace de hidrógeno, se almacenan como vectores de modo que contengan información sobre su orientación.
- Un *fragmento molecular* es una molécula pequeña o un grupo funcional con geometría ideal que puede interaccionar favorablemente con alguno de los sitios de interacción potenciales.
- Un *puente* es también un grupo de átomos con geometría ideal pero que sirve para unir distintos fragmentos moleculares en una única molécula, o añadir un nuevo fragmento a un ligando ya existente.

Para correr el programa es necesario disponer de:

a) las coordenadas cartesianas del receptor (incluyendo todos los hidrógenos de forma explícita) en formato PDB,
b) un archivo de distribuciones de contactos no enlazados,
c) una fragmentoteca (colección de fragmentos moleculares en formato PDB),
d) una colección de "puentes" intramoleculares en formato PDB, y
e) la posición del sitio receptor de interés (en forma de coordenadas para un determinado punto en ese sitio y una distancia límite como radio de acción).

En un primer paso, el programa calcula los sitios de interacción potenciales, para lo cual clasifica a los átomos del receptor en cuatro

categorías: (i) donadores de enlace de hidrógeno (aquellos hidrógenos unidos covalentemente a átomos de N o O), (ii) aceptores de enlace de hidrógeno (todos los átomos de nitrógeno que no están unidos covalentemente a hidrógenos, más todos los átomos de oxígeno), (iii) aromáticos (átomos de carbono de los anillos aromáticos de fenilalanina, tirosina, histidina y triptófano), y (iv) alifáticos: todos los átomos de carbono alifático.

Para generar los sitios de interacción, LUDI ofrece una de tres alternativas:

1) seguir un conjunto de reglas geométricas relativamente sencillas (Böhm, 1992b).
2) utilizar distribuciones estadísticas de enlace de hidrógeno y patrones de contactos no enlazados derivados de la Base de Datos Estructurales de Cambridge (Cambridge Crystallographic Data Centre, CB2 1EZ, U.K.).
3) emplear los resultados del programa GRID, para lo cual primero encuentra los mínimos y después selecciona un cierto número de puntos de baja energía alrededor de cada mínimo sobre los cuales fijar los fragmentos.

El siguiente paso consiste en ajustar los fragmentos moleculares sobre los sitios de interacción generados en el paso anterior. Para ello se explora la lista de sitios de interacción, utilizando criterios de distancia, para encontrar grupos adecuados de dos, tres o cuatro sitios sobre los que superponer los fragmentos moleculares: se calculan los cuadrados de las distancias entre los sitios de interacción y si estos valores se encuentran dentro de un determinado margen se procede a encajar el fragmento realizando un ajuste de mínimos cuadrados (RMS) entre los sitios diana definidos en el fragmento y los sitios de interacción, siempre y cuando el RMS sea menor de un valor umbral límite definido por el usuario (generalmente entre 0.3 y 0.5 Å), y no haya ni solapamiento de van der Waals ni repulsión electrostática entre el fragmento y los átomos del receptor.

La fragmentoteca puede incluir también otras moléculas en conformaciones de baja energía obtenidas a partir de minimizaciones de mecánica molecular, y puede ser ampliada a voluntad. Los fragmentos se tratan como cuerpos rígidos pero se puede tener en cuenta la flexibilidad conformacional incluyendo en la fragmentoteca distintos confórmeros para un mismo fragmento. Igualmente, como para fragmentos relativamente grandes, *e.g.* dipéptidos o compuestos heterocíclicos sustituidos, puede resultar difícil seleccionar los átomos que se van a utilizar en el proceso de superposición, es posible definir más de un conjunto de átomos diana por fragmento.

El último paso que realiza este programa es el de conectar los fragmentos ya encajados para dar lugar a una sola molécula. Para ello primero identifica los dos fragmentos más próximos entre sí y después aquellos hidrógenos de ambos fragmentos que a su vez se encuentran más cerca uno de otro. Estos dos hidrógenos, junto con los átomos a los que están unidos, se utilizan como sitios de referencia sobre los que situar el fragmento puente (*e.g.* $-CH_2-CH_2-$, -O-, -CO-, -CONH-, $-SO_2NH-$, etc), en un proceso análogo al anterior.

Uno de los inconvenientes de la actual implementación de LUDI es que, al considerar a la macromolécula de forma rígida, se rechazan fragmentos por no cumplir la distancia exigida, cuando ésta podría alcanzarse fácilmente mediante pequeños ajustes conformacionales de la cadena lateral de algún aminoácido clave. LUDI tampoco distingue entre enlaces de hidrógeno fuertes y débiles, no tiene en cuenta los efectos entrópicos, y requiere de un proceso de optimización posterior pues algunos enlaces y ángulos entre fragmentos y puentes pueden estar bastante alejados de sus posiciones de equilibrio. A pesar de estas limitaciones, y de tratarse esencialmente de un método geométrico, es una herramienta muy valiosa para el diseño de nuevas estructuras, especialmente si se complementa con los mapas energéticos de GRID (Pisabarro, 1993), y compite muy ventajosamente en cuanto a rapidez con los cálculos de mecánica molecular sobre los diferentes complejos ligando-receptor.

11.0. CONSIDERACIONES FINALES.

El modelado molecular continúa su evolución aplicando una gran variedad de métodos computacionales al problema de identificar las complejas relaciones existentes entre estructuras moleculares y actividades biológicas en términos de interacciones entre los átomos constituyentes. El fin último de utilizar estas relaciones de forma predictiva para diseñar compuestos con un determinado perfil de actividad ya ha dado sus frutos en algunas ocasiones. Esta capacidad refleja la introducción tanto de nuevas metodologías como de ordenadores con la potencia suficiente para aplicar estos tratamientos al análisis de modelos moleculares detallados.

Aunque todas estas herramientas están proporcionando una valiosísima interpretación física de la actividad molecular, no hay que olvidar que la calidad de los resultados obtenidos va a depender de forma fundamental de la exactitud de las funciones energéticas utilizadas. Para el estudio de determinadas interacciones electrostáticas (Gallego, 1993) sería conveniente considerar, por ejemplo, las fluctuaciones en la polarización de las distribuciones electrónicas de átomos y moléculas, aspecto hasta ahora no cubierto por la mayor parte de los campos de fuerzas actuales, así como la dependencia de la distribución de cargas atómicas con la conformación.

La simulación microscópica de los acontecimientos que tienen lugar cuando dos moléculas difunden en disolución hasta encontrarse para producir un complejo no es todavía tratable computacionalmente debido al enorme número de moléculas de disolvente que serían precisas y a las distancias relativamente grandes que hay que salvar. Sin embargo, estos procesos presentan mucho interés porque su influencia puede ser decisiva sobre la velocidad de la reacción. Para comprender cómo el comportamiento dinámico afecta a las constantes de velocidad de asociación se han desarrollado una serie de métodos de simulación molecular (Case, 1988) basados en técnicas de dinámica Browniana (McCammon, 1987b) que no se tratan en esta revisión no exhaustiva. Probablemente el ejemplo mejor estudiado es la difusión del anión superóxido al sitio activo de la superóxido dismutasa (Sharp, 1987; Case, 1988). Estas simulaciones no se limitan a la interacción de pequeñas moléculas con enzimas, sino que son aplicables al estudio de las asociaciones proteína-proteína y proteína-ADN.

Las técnicas computacionales pueden asistir tanto en el descubrimiento como en la optimización de compuestos "cabeza de serie" (Kuntz, 1992). En la práctica, está resultando más fácil descubrir nuevos compuestos activos con potencias del orden de micromolar que convertir estas moléculas en inhibidores con constantes de inhibición (K_i) del orden de nanomolar (Appelt, 1991). Una K_i baja, por otra parte, tampoco es garantía de selectividad absoluta sobre la diana estudiada, factor que adquiere especial relieve al considerar posibles efectos adversos. La ventaja de diseñar distintos cabezas de serie radica precisamente en que, aunque sus K_i sean parecidas, probablemente mostrarán diferentes perfiles farmacológicos y toxicológicos.

Los métodos de modelado molecular actualmente disponibles son posiblemente suficientes para tratar de solucionar multitud de problemas interesantes, aunque requieren buenas dosis de creatividad, ingenio y experiencia por parte del usuario. Cuanto menos, los modelos pueden ayudar a mejorar la percepción del problema bioquímico o farmacológico estudiado y pueden sugerir la realización de nuevos experimentos. En el mejor de los casos, proporcionan guías cualitativas, y en ocasiones cuantitativas, para el diseño de nuevos compuestos.

Las dificultades presentadas no hacen sino abrir nuevas vías de investigación que brindan oportunidades inmejorables para aquéllos que desean dedicarse a la carrera científica.

12.0. BIBLIOGRAFIA

Albert, A. (1979) *"Selective Toxicity"*, 6th ed., Wiley, New York, p. 277.

Allen, F. H.; Bellard, S.; Brice, M. D.; Cartwright, B. A.; Doubleday, A. et al. (1979) *Acta Cryst.* B35, 2331-2339.
Andrews, P. R.; Craik, D. J.; Martin, J. L. (1984) *J. Med. Chem.* 27, 1648-1657.
Appelt, K.; et al. (1991) *J. Med. Chem.* 34, 1925-1934.
Arnott, S.; Hukins, D. W. L. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 1504-1510.
Badger, J.; Minor, I.; Kremer, M. J.; Oliveira, M. A. et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3304-3308.
Baniak, E. I.; Rivier, J. E.; Struthers, S.; Hagler, A. T.; Gierasch, L. M. (1987) *Biochemistry* 26, 2642-2656.
Bash, P. A.; Singh, U. C.; Brown, F. K.; Langridge, R.; Kollman, P. A. (1987a) *Science* 235, 574-576.
Bash, P. A.; Singh, U. C.; Langridge, R.; Kollman, P. A. (1987b) *Science* 236, 564-568.
Beddell, C.R.; Goodford, P.J.; Norrington, F.E.; Wilkinson, S.; Wootton, R. (1976) *Br. J. Pharm.* 57, 201-209.
Bernstein, F. C.; Koetzle, T. F.; Williams, G. J. B.; Meyer, E. F. Jr.; Brice, M. D.; Rodgers, J. R.; Kennard, O.; Shimanouchi, T.; Tasumi, M. (1977) *J. Molec. Biol.* 112, 535-542.
Besler, B. H.; Merz, K. M.; Kollman, P. A. (1990) *J. Comput. Chem.* 11, 431-439.
Blake, C. C. F.; Koenig, D. G.; Mair, G. A.; North, A. C. T.; Phillips, D. C.; Sarma, V. R. (1965) *Nature* 206, 757-761.
Blundell, T.; Sibanda, B. L.; Pearl, L. (1983) *Nature* 304, 273-275.
Bohacek, R.S.; McMartin, C. (1992) *J. Med. Chem.* 35, 1671-1684.
Böhm, H.-J. (1992a) *J. Comp.-Aided Mol. Des.* 6, 61-78.
Böhm, H.-J. (1992b) *J. Comp.-Aided Mol. Des.* 6, 593-696.
Bolin, J. T.; Filman, D. J.; Matthews, D. A.; Hamlin, R. C.; Kraut, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13650-13662.
Boobbyer, D. N. A., Goodford, P. J., McWhinnie, P. M., Wade, R. C. (1989) *J. Med. Chem.* 32, 1083-1094.
Breslauer, K. J.; Remeta, D. P.; Chou, W.-Y.; Ferrante, R.; Curry, J.; Zaunczkowski, D.; Snyder, J. G.; Marky, L. A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8922-8926.
Bruccoleri, R. E.; Karplus, M. (1987) *Biopolymers* 26, 137-168.
Bruccoleri, R. E.; Karplus, M. (1990) *Biopolymers* 29, 1847-1862.
Brünger, A. T.; Karplus, M. (1991) *Acc. Chem. Res.* 24, 54-61.
Burt, C.; Huxley, P.; Richards, W. G. (1990) *J. Comput. Chem.* 11, 1139-1146.
Buttershell, C.; Malhotra, D.; Hopfinger, A. J. (1981) *J. Med. Chem.* 24, 812-818.
Case, D. A. (1988) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 52, 39-70.

Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 4379-4386.
Charles, A. J.; Nicholls, A.; Sharp, K.; Honig, B.; Tempczyk, A.; Hendrickson, T. F.; Still, W. C. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 1454-1455.
Connolly, M. L. (1983a) *Science* **221**, 709-713.
Connolly, M. L. (1983b) *J. Appl. Crystal.* **16**, 548-558.
Cram, D. J. (1988) *Science* **240**, 760-767.
Cramer, R.D. III; Patterson, D.E.; Bunce, J.D. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5959-5967.
Crippen, G. M. (1977) *J. Comput. Phys.* **24**, 96-107.
Crippen, G. M. (1979) *J. Med. Chem.* **22**, 988-997.
Crippen, G. M. (1980) *J. Med. Chem.* **23**, 599-606.
Cushman, D.W.; Chueng, H.S.; Sabo, E.F.; Ondetti, M.A. (1977) *Biochemistry* **16**, 5484-5491.
Dauber-Osguthorpe, P.; Osguthorpe, D. J. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7921-7935.
DesJarlais, R. L.; Sheridan, R. P.; Seibel, G. L.; Dixon, J. S.; Kuntz, I. D.; Venkataraghavan, R. (1988) *J. Med. Chem.* **31**, 722-729.
Dickerson, R. E.; Grzeskowiak, K.; Grzeskowiak, M.; Kopka, M. L.; Larsen, T.; Lipanov, A.; Privé, G. G.; Quintana, J.; Schultze, P.; Yanagi, K.; Yuan, H.; Yoon, H.-C. (1991) *Nucleosides Nucleotides* **10**, 3-24.
Donné-Op den Kelder, G. M. (1988) *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 391-393.
Gago, F.; Reynolds, C. A.; Richards, W. G. (1989) *Molec. Pharmacol.* **35**, 232-241.
Gago, F.; Richards, W. G. (1990) *Molec. Pharmacol.* **37**, 341-346.
Gallego, J.; Ortiz, A. R.; Gago, F. (1993) *J. Med. Chem.* **36**, 1548-1561.
Good, A. C.; So, S.-S.; Richards, W. G. (1993) *J. Med. Chem.* **36**, 433-438.
Goodford, P. J. (1985) *J. Med. Chem.* **28**, 849-857.
Goodsell, D. S.; Olson, A.J. (1990) *Proteins* **8**, 195-202.
Hagler, A. T.; Huler, E.; Lifson, S. (1974) *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 5319-5327.
Hansch, C.; Leo, A. J. (1979) "*Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*", Wiley, New York
Hansch, C.; Klein, T.E. (1986) *Acc. Chem. Res.* **19**, 392-400.
Hibert, M. F.; Gittos, M. W.; Middlemiss, D. N.; Mir, A. K.; Fozard, J. R. (1988) *J. Med. Chem.* **31**, 1087-1093.
Hibert, M. F.; Hoffmann, R.; Miller, R. C.; Carr, A. A. (1990) *J. Med. Chem.* **33**, 1594-1600.
Hitzemann, R. (1988) *Trends Pharmacol. Sci.* **9**, 408-411.
Hopfinger, A. J. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 7196-7206.
Hopfinger, A. J. (1983) *J. Med. Chem.* **26**, 990-996.
Hopfinger, A. J. (1985) *J. Med. Chem.* **28**, 1133-1139.
Howard, A. E.; Kollman, P. A. (1988) *J. Med. Chem.* **31**, 1669-1675.
Kendrew, J. C.; Bodo, G.; Dintzis, H. M.; Parrish, R. G.; Wyckoff, H.; Phillips, D. C. (1958) *Nature* **181**, 662-666.

Kirkpatrick, S.; Gelatt, C. D.; Vecchi, M. P. (1983) *Science* 220, 671-680.
Klebe, G.; Abraham, U. (1993) *J. Med. Chem.* 36, 70-80.
Kline, A.D.; Braun, W.; Wüthrich, K. (1986) *J. Mol. Biol.* 189, 377-382.
Kuntz, I. D.; Blaney, J. M.; Oatley, S. J.; Langridge, R.; Ferrin, T. E. (1982) *J. Mol. Biol.* 161, 269-288.
Kuntz, I. D. (1992) *Science*, 257, 1078-1082.
Kuyper, L. F.; Roth, B.; Baccarani, D. P.; Ferone, R.; Beddell, C. R. et al (1985) *J. Med. Chem.* 28, 303-311.
Labanowski, J.; Motoc, I.; Naylor, C.B.; Mayer, D.; Dammkoehler, R.A. (1986) *Quant. Struct.-Act. Relat.* 5, 138-152.
Langridge, R.; Ferrin, T.E.; Kuntz, I.D.; Connolly, M.L. (1981) *Science* 211, 661-666.
Lee, B.; Richards, F. M. (1971) *J. Mol. Biol.* 55, 379-400.
Lloyd, E.J.; Andrews, P.R. (1986) *J. Med. Chem.* 29, 453-462.
Lolis, E.; Petsko, G. A. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* 59, 597-630.
Lumry, R.; Rajender, S. (1970) *Biopolymers* 9, 1125-1227.
Mackay, D. H. J.; Cross, A. J.; Hagler, A. T. (1989) en "*Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*", Fasman, G. D., ed. Plenum, New York, pp 317-358.
Manaut, M.; Sanz, F.; José, J.; Milesi, M. (1991) *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 5, 371-380.
Marshall, G. R. (1985) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 439, 162-169.
Marshall, G. R.; Cramer III, R. D. (1988) *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 285-289.
Marullo, S.; Emorine, L.; Strosberg, D.; Delavier-Klutchko, C. (1990) *EMBO J.* 9, 1471-1476.
Mayer, D.; Motoc, I.; Naylor, C. B.; Marshall, G. R. (1987) *J. Comp.-Aided Mol. Des.* 1, 3-16.
McCammon, J. A. (1987a) *Science* 238, 486-491.
McCammon, J. A.; Harvey, S. C. (1987b) "*Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*", Cambridge University Press, Cambridge.
Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. (1992) *J. Comput. Chem.* 13, 505-524.
Menziani, M. C.; De Benedetti, P. G.; Gago, F.; Richards, W. G. (1989) *J. Med. Chem.* 32, 951-956.
Metropolis, N.; Rosenbluth, A. W.; Rosenbluth, M. N.; Teller, A. H. (1953) *J. Chem. Phys.* 21, 1087-1092.
Morley, S. D.; Jackson, D. E.; Saunders, M. R.; Vinter, J. G. (1992) *J. Comput. Chem.* 13, 693-703.
Motoc, I.; Dammkoehler, R.A.; Mayer, D.; Labanowski, J. (1986) *Quant. Struct.-Act. Relat.* 5, 99-105.
Novotny, J., Bruccoleri, R.; Karplus, M. (1984) *J. Mol. Biol.* 177, 787-818.
Novotny, J., Sharp, K. (1992) *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 58, 203-224.

Oatley, S. J.; Blaney, J. M.; Langridge, R.; Kollman, P. A. (1984) *Biopolymers* 23, 2931-2941.
Olson, A. J.; Goodsell, D. S. (1992) *Sci. Amer.* 11, 44-51.
Orozco, M.; Luque, F. J. (1990) *J. Comput.-Aided Mol. Design* 4, 411-426.
Ortiz, A. R., Pisabarro, M. T., Gallego, J., Gago, F. (1992), *Biochemistry* 31, 2887-2896.
Ortiz, A. R.; Pisabarro, M. T.; Gago, F. (1993) *J. Med. Chem.* 36, 1866-1879.
Page, M.I. (1977) *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 16, 449-459.
Pattabiraman, N.; Levitt, M.; Ferrin, T. E.; Langridge, R. (1985) *J. Comput. Chem.* 6, 432-436.
Pearlman, D. A.; Kollman, P. A. (1989) *Computer Simulations of Biomolecular Systems. Theoretical and Experimental Applications.* van Gunsteren, W. F.; Weiner, P. K., Eds. ESCOM, Leiden, 101-119.
Perutz, M. F.; Fermi, G.; Abraham, D. J.; Poyart, C.; Bursaux, E. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 1064-1078.
Pisabarro, M. T.; Ortiz, A. R.; Palomer, A.; Cabré, F.; García, L.; Wade, R.; Gago, F.; Mauleón, D.; Carganico, G. *J. Med. Chem.* en la imprenta.
Pullman, B.; Jortner, J., Eds. (1990) *"Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions"*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
Quintana, J. R.; Lipanov, A. A.; Dickerson, R. E. (1991) *Biochemistry* 30, 10294-10306.
Reynolds, C. A.; Richards, W. G.; Goodford, P. J. (1987) *Anti-Cancer Drug Design* 1, 291-295.
Reynolds, C. A.; Essex, J. W.; Richards, W. G. (1992) *J. Am Chem. Soc.* 114, 9075-9079.
Richards, F. M. (1977) *Annu. Rev. Biopys. Bioeng.* 6, 151-176.
Richards, W. G.; King, P. M.; Reynolds, C. A. (1989) *Protein. Eng.* 2, 319-327.
Roberts, V. A.; Dauber-Osguthorpe, P.; Osguthorpe, D. J.; Levin, E.; Hagler, A. T. (1986) *Israel J. Chem.* 27, 198-210.
Ryckaert, J. P.; Ciccoti, G.; Berendsen, H. J. C. (1977) *J. Comp. Phys.* 23, 327-341.
Sanz, F.; Manaut, F.; Rodríguez, J.; Lozoya, E.; López de Briñas, E. (1993) *J. Comput.-Aided Mol. Design* 7, 337-347.
Saunders, M.; Houk, K. N.; Wu, Y.-D.; Still, W. C.; Lipton, M.; Chang, G.; Guida, W. C. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* 112, 1419-1427.
Schiffer, C. A.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Stroud, R. M. (1990) *Proteins* 8, 30-43.
Sharp, K.; Fine, R.; Honig, B. (1987) *Science* 236, 1460-1463.
Sheridan, R. P.; Venkataraghavan, R. (1987) *Acc. Chem. Res.* 20, 322-329.
Shoichet, B. K.; Stroud, R. M.; Santi, D. V.; Kuntz, I. D.; Perry, K. M. (1993) *Science* 259, 1445-1450.

Tandford, C. (1980) *"The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes"*, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York.
Trumpp-Kallmeyer, S.; Hoflack, J.; Bruinvels, A.; Hibert, M. (1992) *J. Med. Chem.* **35**, 3448-3462.
van Gunsteren, W. F. (1988), *Prot. Eng.* 2, 5-13.
Wade, R. C.; Clark, K. J.; Goodford, P. J. (1993a) *J. Med. Chem.* 36, 140-147.
Wade, R. C.; Goodford, P. J. (1993b) *J. Med. Chem.* 36, 148-156.
Ward, W. H. J.; Timms, D.; Fersht, A. R. (1990) *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 280-284.
Watson, J. D.; Crick, F. H. C. (1953) *Nature* **171**, 964-967.
Weiner, P. K.; Langridge, R.; Blaney, J. M.; Schaeffer, R.; Kollman, P. A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3754-3758.
Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; Case, D. A. (1986) *J. Comput. Chem.* 7, 230-252.
Wender, P. A.; Koehler, K. F.; Sharkey, N. A.; Dell'Aquila, M. L.; Blumberg, P. M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4214-4218.
Wolfenden, R.; Radzicka, A. (1991) *Curr. Op. Struct. Biol.* 1, 780-787.
Wong, C. F.; Mc Cammon, J. A. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* 108, 3830-3832.
Wüthrich, K. (1990) *Biochem. Pharmacol.* **40**, 55-62.

Distancia Geometrica

ARTURO MOSQUEIRA TORIBIO
de la Real Academia de Farmacia

1.0 INTRODUCCION

Un concepto básico en el diseño de medicamentos es el de farmacoforo; una disposición específica, tridimensional, de unos grupos químicos esenciales, comunes a varias moléculas activas, que es reconocido por el receptor.

Las conformaciones activas pueden, o no, ser iguales a las de los cristales o a las correspondientes conformaciones, de mínima energía, de las moléculas en solución.

Como la estructura del receptor, la estructura tridimensional, no es conocida en la mayor parte de los casos, se tiende a determinar la estructura del farmacóforo a partir de un conjunto de moléculas, ligandos, activas o inactivas, que pueden ser todas o algunas, flexibles conformacionalmente y deducir de esta estructura la del receptor.

Una molécula puede ser representada de varias maneras: mediante las coordenadas cartesianas de cada átomo, o mediante el criterio de distancia, utilizando una matriz de distancia; una molécula puede así, ser descrita por 3N-6(o 3N-5, si es lineal), coordenadas o por N(N-1)-2, distancias interatómicas.

Desde luego, dadas estas N-6 coordenadas, se pueden describir de otra manera las distancias interatómicas, utilizando métodos geométricos o trigonométricos, pero la representación matricial de la distancia tiene ventajas para la comparación de dos moléculas entre si; Crippen y Crippen y Havel.

Muchas de las moléculas son flexibles o presentan distintas conformaciones. Esto es necesario tenerlo en cuenta en la geometría de la distancia; esta flexibilidad se representa por una matriz que muestra las distancias más largas y las más cortas, entre cada par de átomos, distancias que corresponden a los estados más lejanos y los más cercanos entre los átomos de las distintas conformaciones.

Así en el caso del cicloexano, según la Figura 1 y Tabla I:

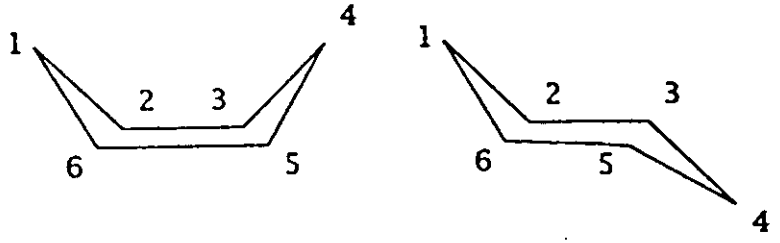


Figura 1.

BOTE SILLA

El triángulo superior representa las distancias en la configuración silla el inferior la del bote

	1	2	3	4	5	6
1	0	1,5	2,5	3,0	2,5	1,5
2	1,5	0	1,5	2,5	3,0	2,5
3	2,5	1,5	0	1,5	2,5	3,0
4	2,6	2,5	1,5	0	1,5	2,5
5	2,5	3,1	2,5	1,5	0	1,5
6	1,5	2,5	3,1	2,5	1,5	0

El problema fundamental del concepto de la distancia geométrica es según Crippen y Havel (1988), el siguiente: dada las distancias y la quiralidad que define (en nuestro estado de conocimiento), una molécula, encontrar una o varias conformaciones que las satisfagan o demostrar que no existen tales conformaciones.

Por comparación de las matrices de las distancias de los ligandos seleccionados, Crippen deduce la estructura común del conjunto de ligandos y unos puntos del receptor, complementarios, a esta común estructura. Por otra parte, se supone, que la energía de la interacción ligando-receptor, es igual a la suma de las interacciones individuales entre los puntos del ligando y los del receptor (Ligand points y site points, en la terminología anglosajona). El sistema consiste, entonces, en ensayar todas las posibles geometrías y las energías de cada tipo de interacción; en todo caso el ligando y el receptor deberán estar en contacto para poder interactuar. Se tienen en cuenta las diferentes conformaciones que se pueden asumir para la molécula del

ligando, es decir, su flexibilidad, y se constituye una matriz de distancia (que contienen unas distancias altas (Upper)), y otras bajas (Lower), entre los átomos seleccionados.

Aunque un buen número de datos pueden ser obtenidos, en términos de distancia geométrica la mayor parte se expresa en términos de ángulos entre cierto tipo de grupos de átomos, el perfil y tamaño de la molécula.

Las longitudes de enlace se conocen apriori de los datos obtenidos por cristalografía de rayos X.

Los ángulos de enlace O_{ijk} se obtienen a partir de las distancias dij, djk, según la ley del coseno.

$$d^2ik=d^2ij+d^2jk-2dijdjk\cos\theta ijk$$

De una forma análoga, el ángulo dihedro T hijk (es decir, para la cadena de átomos a_h, a_i, a_j, a_k), formado por rotación alrededor del eje ij, sería:

$$D^2{}_{hk}=(d2ij-dhi\cos\theta hij-djk\cos\theta ijk)^2+dhisen\theta hij-djksen\theta ijk\cos T_{hi}$$

$$+(djksen\theta ijksenhij)^2 y\cos Thijk=D(ah;ai;aj;aiajak\frac{k}{[D(ah,ai,aj)Daiaja}$$

donde D significa el determinante de Caley-Menger.

Las diversas etapas del método son:

1.- Generación de una estructura tridimensional de los ligandos.
2.- Asignación de unas determinadas propiedades físico-químicas a los átomos.
3.- Evaluación de las regiones de menos energía.
4.- Determinación de todas las posibles superposiciones.
5.- Decisión sobre la mejor superposición.
6.- Generación de la estructura aproximada del pocket (nicho) del receptor a partir de los datos obtenidos de la superposición de los ligandos.
7.- Determinación de la naturaleza de la intersección de las diferentes regiones y estimación de la energía de unión.

La construcción de la molécula se realiza por medio del programa MOLGEN Crippen y Havel (1988) pág. 327.

Para la asignación de las propiedades físico-químicas se utiliza el programa CLASIF. La densidad de carga se obtiene del método CNDO-2 y el coeficiente de partición octanol agua y la refractividad molecular, de la literatura.

Para determinar la conformación de menor energía se utiliza el programa CONFOR.

Las energías obtenidas se miniminizan utilizando la técnica de Hooke y Jeeves (1961).

En dos moléculas rígidas, el conocimiento de todas las posibles superposiciones, implica el tratamiento de todas las combinaciones. El número total de posibilidades viene dada por la ecuación (Crippen (1988))

$$N=\sum_{i=1}^{n_2} [{}^{n_1}C_{n_2+1-i}]\times[{}^{n_2}p_{n_2+1-i}]$$

donde ${}^{n_1}C_{n_2+1-i}$ *es la combinación de* n_1 *con* n_{2+1-i}

y ${}^{n_2}p_{n_2+1-i}$ *sería la permutación de* n_2 *con* n_{2+1-i}

Se considera en el segundo caso como una permutación, porque un cambio en el orden, puede producir diferentes superposiciones. En todo caso, incluso, en moléculas no muy grandes, el número de superposiciones es enormemente grande.

La geometría de la distancia permite abreviar este proceso. En efecto, si los átomos n_1, n_2... n_p de la molécula n, se superponen a los átomos m_1, m_2...m_p de la molécula m, la condición es:

$$| d_{n_i,n_j} - d_{m_i,m_j} | \leq \delta$$

siendo d la distancia entre los puntos indicados y δ el error aceptable para la superposición. Kuhl (1984), ha desarrollado un algoritmo para determinar los grupos de átomos de las moléculas superpuestas (Clique en la teoría de grafos) que permite disminuir el número de superposiciones.

Ghose y Crippen utilizan su programa STRUCOMP, 1989 que tiene en cuenta solamente las conformaciones que tienen energías menores que un

valor preasignado, al objeto de disminuir el número de superposiciones de una molécula con otra; cuanto menor es la energía de la conformación mayor es la prioridad. La búsqueda completa comprende los siguientes pasos: se generan y se comparan las matrices de distancias interatómicas. Segundo, una superposisicón básica, consiste en tomar todas las combinaciones de tres átomos de la estructura de referencia y todas las permutaciones con tres átomos de la segunda estructura.

Tercero; cuando la superposición básica es aceptada, los contactos entre los átomos son consecuencia de esta superposición básica. La superposición basada en la comparación de distancias no resuelve el problema de los enantiomeros.Ghose y Crippen en 1984 y 1985, estudian las soluciones propuestas para resolver este problema por Kenknight (Acta crys 1984. 708).

Debido a la gran complejidad del problema combinatorio, se puede simplificar la búsqueda por dos caminos diferentes:

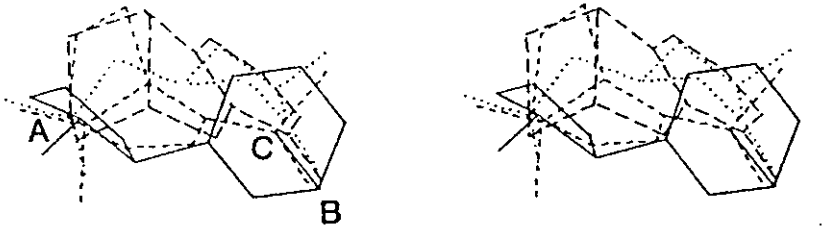
1º.- Tener en cuenta sólo los átomos más importantes, en la superposición básica.
2º.- Tomar sólo las superposiciones básicas, en las cuales sólo son superpuestas aquellas con átomos similares.

Con el término, átomos importantes, se entiende los que sean responsables de regiones de interacciones electrostáticas o dispersivas y que constituyen el farmacóforo, es decir, el o los grupos responsables de la actividad biológica. Simplificando podemos considerar los átomos afectados de la superposición comprendidos en los siguientes grupos:

1º.- Todos los heteroátomos que no tienen uniones múltiples con heteroátomos electro-negativos.
2º.- El resto de heteroátomos.
3º.- Carbonos unidos a heteroátomos.
4º.- Otros carbonos.
5º.- Hidrógenos unidos a heteroátomos.
6º.- El resto de hidrógenos.

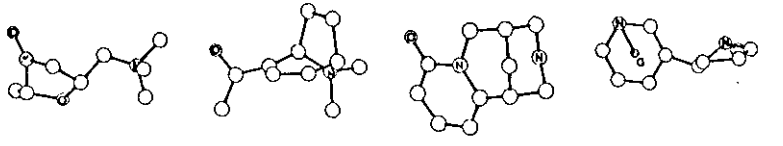
Todas estas estructuras están recogidas en el programa STRUCOMP.

Un ejemplo de superposición de cuatro moléculas agónistas del receptor nicotínico: (-) nicotina (línea continua), (-) citisina (Línea de rayas largas), (-) ferruginina (línea de rayas cortas) y (-) Muscarona (línea de puntos), se expone en las figuras 2 y 3:



(-) Nicotina = Línea continua
(-) Cytisina = Línea trazos largos
(-) Ferruginina = Línea trazos cortos
(-) Muscarona = Línea de puntos

Figura 2.



(-)- Nicotina (-) - Cystisina (-)- Ferrugina (-) - Muscarona

Figura 3.

Los puntos A, B, C, corresponden al farmacóforo, cuyas distancias son:

TABLA II

Molécula	A-B	A-C	B-C
Nicotina	4.5-4.9	3.8-3.9	1.2
Cystisina	4.9-5.0	4.2-4.3	1.2
Ferruginina	4.4-4.6	3.7-3.8	1.2
Muscarone	4.9-5.0	4.2-4.4	1.2

Un triángulo de lados (Figura 4)

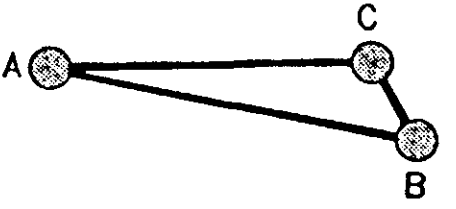


Figura 4

El siguiente punto: decisión sobre la mejor superposición, se resuelve por Ghose y Crippen correlacionando las propiedades físico-químicas de las diferentes regiones del ligando, con su actividad biológica. Se utilizan tres propiedades, coeficiente de partición, refractividad molar y densidad de carga. Las dos primeras se obtienen de la literatura, así I. Martin (Quantitative Drug Design 1978. Marcez Dekken (pág. 378 a 393) apéndice 17), relaciona estos parámetros para varios centenares de sustituyentes.

La mejor superposición se considera como la representación del modo de unión del lugar activo del ligando con el receptor, con lo que se obtiene información sobre la estructura de la cavidad activa del receptor y de las características de los sitios activos de la cavidad del receptor (site pocket en la terminología anglosajona).

Para evaluar la mejor superposición, se utilizan dos funciones, la primera asume que la estructura elegida, es la mejor y que cualquiera de ella es peor. Esto se expresa por:

$$F_1 = \sum_k \mid X_k \mid - \mid X_k - X_{j(k)} \mid$$

X_k es la propiedad físico-química del átomo k en la estructura elegida, jk es el átomo superimpuesto al átomo k; si el átomo no está superpuesto la propiedad es cero. Esta función asume que la interacción del átomo del ligando con el sitio del receptor, es cuadrática y tiene un máximo, de tal manera que decrece, si la propiedad físico-química cambia en cualquier sentido del valor "ideal".

La segunda función se establece según la fórmula:

$$F_2 = \sum_k [\ K_k / \ |X_k\ |\ ] X_{j(k)}$$

Si se utilizan varias propiedades físico-químicas, se sumarían los efectos de todas ellas, estableciendo un previo balance de parámetros.

Todos estos aspectos están incluidos en el programa ITSVP Ghose y Crippen 1989.

El siguiente objetivo es evaluar los sitios activos de la región del receptor donde se acopla el farmacóforo (site pockt).

En base a la conformación y superposición de los ligandos, el programa SITLAB (Ghose 1989) evalúa estos sitios activos, de modo que se obtenga el mínimo necesario de sitios, para acomodar todos los átomos activos de los ligandos.

Si se origina un número demasiado grande de sitios del receptor, deben gravarse por su analogía, constituyendo unos tipos, que comprenderán varios site pockets, reduciéndose así el número de puntos a considerar.

La energía de unión sería:

$$E_{calc} = -CE_c + \sum_{i=1}^{n_a} \sum_{j=1}^{n_p} [c_{i'j} \sum_{k=1}^{n_0} P_j(t_k)]$$

donde E_c es la energía de la conformación que se considera, C_s son los coeficientes característicos del tipo y la propiedad físico-química (previamente optimizada bien por el método de mínimos cuadrados o por los programas, de A. Ravindran (1972), i es el tipo del sitio i; n es el número de site pockets; n_p representa el número de propiedades físico-químicas relacionadas con el site pocket.

No es el número de átomos que ocupan el site pocket, P_j (tk) significa el parámetro físico-químico j del átomo del tipo t_k.

Cada propiedad físico-química representa un tipo determinado de fuerza activa en la interacción ligando-receptor e indica la naturaleza de los átomos del pocket del receptor.

En los primeros trabajos, Crippen (1979) emplea la variación de la energía para cuantificar la interacción ligando receptor; así en el trabajo de Crippen sobre inhibidores de quimiotripsina, el cambio de energía libre, viene dado en función de la concentración milimolar del inhibidor, necesaria para obtener una inhibición del 50%, que se relaciona con el cambio de energía libre por la fórmula de Michaelis-Menten:

$$\Delta G_{bind} = +RT\ln\left(\frac{K_m[I_{50}]}{K_m+[S]}\right)$$

siendo K_m la constante de Michaelis y S la concentración del sustrato usado en la determinación experimental. Esta expresión se establece a partir de la relación entre el cambio de energía libre G, y la constante de equilibrio K.

2.0 METODOS

2.1 Inhibidores Quimiotripsina

En el primer trabajo de Crippen (1979), los componentes estudiados fueron fenoxi acetonas sustituídas, como inhibidores de quimiotripsina, Figura 5.

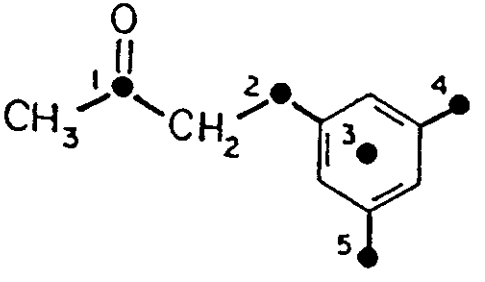


Figura 5

Se eligen 5 puntos del ligando:
T_{l1} = -CH_2-CO-CH_3
T_{l2} = -O-
T_{l3} = fenilo. centrado en el medio del anillo.
T_{l1} = CH_3
T_{l5} = -Cl ó CH_3

El inhibidor contiene 5 puntos equivalentes a 4 tipos (los puntos 4 y 5 corresponden a un mismo tipo).

En la Tabla III se establecen las matrices de distancias para los cuatro tipos correspondientes a los 5 puntos.

TABLA III

		TIPOS				
	Puntos	$t_{11'}$ (1)	$t_{12'}$ (2)	$t_{13'}$ (3)	$t_{14'}$ (4)	t_{14} (5)
$-CH_2COCH_3$	1	0,0	2,6	5,5	7,8	7,8
-O-	2	2,6	0,0	3,0	5,2	5,2
C_6H_3	3	3,5	3,0	0,0	3,1	3,1
$-CH_3$	4	3,8	5,2	3,1	0,0	5,4
$-CH_3$	5	3,8	5,2	3,1	5,4	0,0

Baker (1967) ha publicado los datos correspondientes al cambio de energía libre para cada uno de los 8 derivados de la fenoxiacetona estudiados en su unión con la quimiotripsina Tabla IV.

TABLA IV

		$RC_6H_4OCH_2COCH_3$	
Inhibidor nº	R	$\Delta G_{obsd'}$ Kcal	$\Delta G_{calcd'}$ Kcal
1[b]		-2,5	-2,5
2	H-	-2,8	-2,8
3	p-CH_3-	-2,8	-2,8
4	p-Cl-	-3,5	-3,7
5	m-Cl-	-4,2	-4,6
6	m-CH_3-	-2,8	-2,5
7	p-CH_3O-	-2,6	-2,5
8	m,m-$(CH_3)_2$-	-0,2	-0,2

[b] Fenilacetona.

De los datos de la Tabla se deduce que en el inhibidor 8, la energía de unión a la quimioltripsina, es muy pequeña, por lo que parece, que el receptor puede albergar un metilo en posición meta (compuesto nº 6) pero no dos metilos, es decir, el segundo metilo no está permitido estéricamente.

Crippen (1979) propone la creación de 3 puntos en el receptor, que permitirían al anillo fenílico, rotar, para situarse fuera del camino que impide instalarse al segundo metilo en posición beta. Esta propuesta queda reflejada en la figura siguiente:

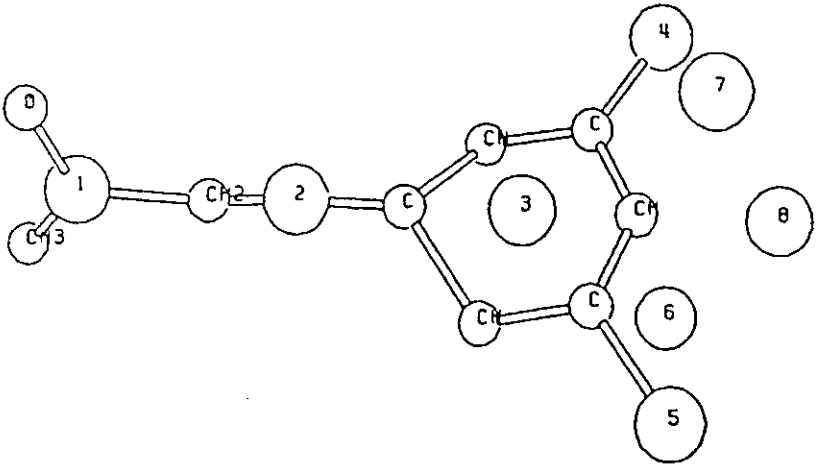


Figura 6

El punto 1 coincide con el carbonilo, el 2 con el oxígeno éter, el 4 con un grupo metil, y el 5 con otro grupo metilo. Los puntos 6, 7 y 8 son los propuestos por Crippen en la figura 6.

En la tabla V se expresa la matriz de distancia de los 8 puntos del receptor, propuestos:

TABLA V

no	$t_{s1'}$ 1	$t_{s2'}$ 2	$t_{s3'}$ 3	$t_{s4'}$ 4	$t_{s5'}$ 5	$t_{s6'}$ 6	$t_{s7'}$ 7	$t_{s8'}$ 8
1	0.0	2.6	5.5	7.8	7.8	7.8	7.8	11.0
2	2.6	0.0	3.0	5.2	5.2	5.2	5.2	6.0
3	5.5	3.0	0.0	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1
4	7.8	5.2	3.1	0.0	5.4	3.8	3.8	3.0
5	7.8	5.2	3.1	5.4	'.0	3.8	3.8	3.0
6	7.8	5.2	3.1	3.8	3.8	5.4	0.0	3.0
7	7.8	5.2	3.1	3.8	3.8	5.4	0.0	3.0
8	11.0	6.0	3.1	3.0	3.0	3.0	3.0	0.0

que corresponden a los puntos de la quimiotripsina, siguientes

nº	Tipo Químico	Localizado en	Distancia, Å
1	H-donador	Ser-195 Oγ 2.68[b]	
2	polar		
3	no polar		
4	Debílmente polar		
5	Bloqueador estérico	Ser-214 O	1.24
6	Bloqueador estérico	Gly-216N	1.36
7	bloqueador estérico	Val-213 Cᵞ 1.60	
8	bloqueador estérico	interior proteína	

El punto número 1 se uniría, débilmente, al grupo acetona, por su carácter donador en enlaces de hidrógeno. el punto número 2 sería un nicho polar suficientemente grande para acomodar el enlace éter, pero no al grupo acetona, quizá por razones estéricas. El punto 3 sería una región fuertemente hidrofóbica, que se uniría al grupo fenílico y que estaría constituída por una región estéricamente repulsiva, puntos del 5 al 8; el punto 4 sería atractivo para el cloro del ligando y sería repulsiva para el segundo metilo, que podría, sin embargo, ser acomodado.

Aunque existen descripciones de la estructura tridimensional de la quimiotrpsina, obtenidas a partir de datos cristalográficos, no existen estudios cristalográficos de la unión. En todo caso según Crippen, vendría dada en al figura siguiente:

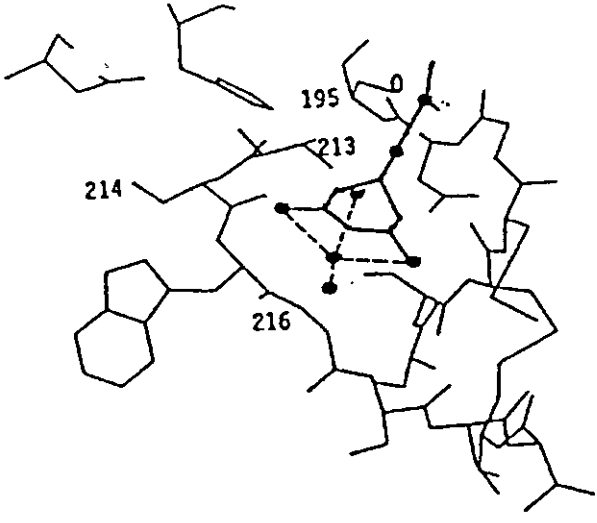


Figura 7

2.2 Inhibidores DHFR

Estudiando derivados de quinazolina G.M. Crippen (1979), estableció, que la geometría del receptor, en el caso de los derivados de quinazolina inhibidores de la DHFR, podría deducirse de 11 puntos y había determinado también que la presencia de los grupos aminos en las posiciones 2-4 del primer anillo de la quinazolina, aumenta la basicidad del anillo de los nitrógenos y provoca su protonación, lo que condiciona un diferente modo de unión y un aumento de la energía de unión, en comparación de los derivados que no tenían los 2 grupos aminos en posición 2-4. También anotaron que la inclusión de un azufre o SO_2, en posición 5 producía una disminución de la energía de unión, pero no cuando estos S-SO_2 estaban en posición 6, según se indica en la tabla siguiente:Crippen y Havel (1988).

TABLA VI

Ligando	R_2	R_4	R_5	T_6	ΔG_{obsd} (Kcal)	
1		NH_2	OH	S-2-$C_{10}H_7$	H	-7.4
2		NH_2	NH_2	S-2-$C_{10H}7$	H	-10.9
3		NH_2	NH_2	SO_2-2-$C_{10}H_7$	H	-6.5
4		NH_2	NH_2	H	S-2-$C_{10}H_7$	-12.1
5		NH_2	NH_2	H	SO_2-2-$C_{10H}7$	-12.4

Esta disminución de efectividad, puede ser debida al efecto electrófilo de los sustituyente S y SO_2, que origina la pérdida de protonación de la molécula de quinazolina, esto ocurre precisamente en posición 5 y no en la 6. También es posible que la causa sea un impedimento estérico, que sería efectivo en la unión 5 pero no en la 6. Ambas hipótesis requieren un diferente tipo de ligando, en la posición N-1. La explicación estérica fue adoptada por Crippen en 1979 y aplicada a 68 quinazolinas.

Teniendo en cuenta la energía de interacción de los puntos de la DHFR con los puntos del ligando, como se expresa en la tabla siguiente; Ghose y Crippen (1982) inician, en sus trabajos, un estudio seriado para especificar de que puntos puede prescindirse, sin pérdida de capacidad de unión con los ligandos, para facilitar el cálculo y simplificar el proceso.

PUNTO	
1	N_1 noprotonado
2	N_1 protonado
3	G(6)
4	Sustituyente en posición 2
5	Sustituyente en posición 4, si la quinazolina no es 2-4 diamino
6	igual que 5, pero con quinazolina 2-4 diamino
7	Sustituyente en posición 5. Si en quinazolina no es 2-4 diamino.
8	Igual que 7, pero con quinazolina 2-4 Diamino
9	α posición del anillo de naftaleno
10	α' posición del anillo de naftaleno
11	posición 6.

Cuyas coordenadas serían:

TABLA VII

Punto	X	Y	Z
1	3.318	0.039	-1.057
2	3.219	-0.194	1.138
3	-0.679	-1.883	0.490
4	5.100	0.716	0.354
5	0.696	2.157	1.606
6	1.411	0.042	-2.462
7	-0.931	0.404	1.751
8	-0.750	-0.776	-1.759
9	-3.024	0.125	0.123
10	-6.286	1.637	-0.884
11	-2.073	-2.267	0.700

que se representan en la gráfica siguiente:

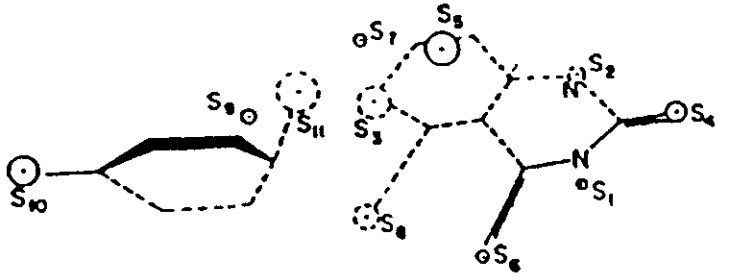


Figura 8

El número de puntos del receptor fue nuevamente reducido por Ghose en 1.983 y establece solamente seis puntos en la DHFR.

Los mismos A.K. Ghose y G.M. Crippen (1983), basándose en los trabajos anteriores analizan la inhibición de la DHFR, antes era la correspondiente a un microorganismo el S. foecium; en el trabajo de 1983 el sustrato procede el hígado de ratas. La inhibición de la DHFR es diferente en microorganismos que en mamíferos. En microorganismos el inhibidor de elección es el trimetoprin y en la de los mamíferos el Methotrexato. Uno es activo en enfermedades infecciosas y el otro es antitumoral.

Frente a la DHFR, procedente del hígado de ratas, estudian 33 triazinas y 15 quinazolinas, cuyas estructuras se indican en la figura 9.

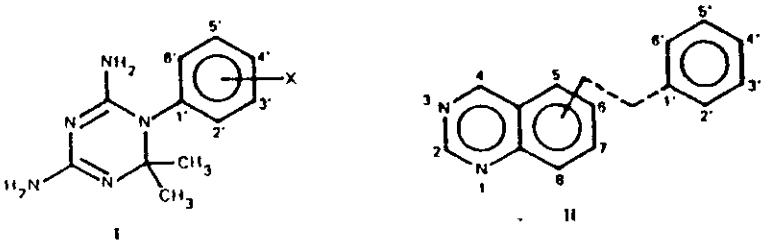


Figura 9

Las 15 quinazolinas seleccionadas son tanto 2-4 diamino, con S y SO_2 en posición 6 así como 4-S-2-4$(OH)_2$, 2-4H_2, 2S-4NH_2 entre otros.

Se establecen 9 puntos del receptor de los que 7 corresponden a quinazolina y triacinas y 2 sólo a triacinas. Las coordenadas de estos puntos del receptor aparecen en la Tabla VIII.

TABLA VIII

puntos	X	Y	Z
1	-4.419	-0.804	0.329
2	-6.114	0.887	0.641
3	-1.908	2-270	-1.160
4	-0.628	-1.629	-2.040
5	2.968	-0.239	-1.279
6	5.469	2.723	-0.402
7	1.203	-1.574	0.182
8	2.060	-0.267	1.938
9	1.368	-1.357	1.790

representados gráficamente en la figura 10.

Se asume que la baja actividad de los 5 sulfinil y 5 sulfonil derivados es debido a un efecto electrófilo más que a uno estérico.

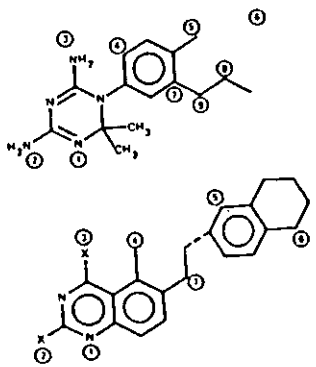


Figura 10

La energía de interacción de los puntos de la DHFR, con los diversos puntos de los ligandos se representan en la Tabla IX.

TABLA IX

Ligando	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.C(sp^3)				0.001	0.437		0.001	0.349	0.969
2.O		0.648	2.498						0.349
3.N		1.074	1.386						
4. S (S o SH)			2.354	0.001			1.097		
5.Cl				0.001		1.098	0.001		1.376
6.F					1.044			0.567	1.009
7.C (sp^2)				0.075	0.770	1.298	0.535		
8.N'	0.570								
9.N	2.250								
10.S (SO)									
11.S (SO_2)							1.244		
12. C (CO)									
13. Br						0.001	0.001		1.739
14. I									1.769
15. C (sp)									1.452

que indica una interacción muy fuerte del anillo protonado con el punto 1; el S-SO_2 estaría unido fuertemente con el sitio 7 y el cuatro tiene una débil capacidad con todos los puntos de los ligandos. la unión del punto 3 con el nitrógeno básico, O S o SH, sugiere la formación de un enlace de hidrógeno. El punto 2, cuando se une a un nitrógeno básico, presenta una mayor energía de unión, que cuando se une a un oxhidrilo lo que indica una unión del tipo de puente de hidrógeno, en la que el punto 2 sería donador de hidrógeno. El punto 6 se une con un carbono Sp_2 y a un cloro con una energía de interacción moderada.

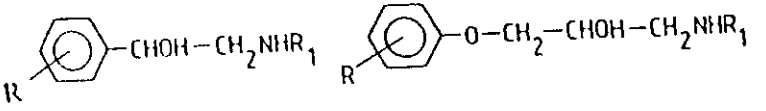
En los puntos 7 y 8 se puede sugerir una unión de tipo dipolar. De la matriz de interacciones, puede deducirse que algunas triacinas, pueden ser prometedoras como inhibidores DHFR de mamíferos. A diferencia de la quinazolinas, la sustitución 2-4 no es esencial en el modo de unión de las triacinas. En cuanto al poder de predicción del modelo, se examinan 91 productos (88 quinazolinas y 3 productos no quinazolínicos, Methotrexate y Trimetoprin, etc.). el parámetro utilizado es lg 1/c.

Las energía de unión calculadas para el antifolato corresponden, bastante bien, con las observadas, pero para el Methotrexato se obtienen diferencias notables, quizás por que un anillo de este compuesto se une a un punto del receptor, que no ha sido considerado en el modelo propuesto. Para el Trimetoprin, la energía calculada es mucho más alta que la observada. El compuesto tiene 3 sustituyentes que no han sido incluidos en la triacinas propuestas, por lo que es posible, que un sitio repulsivo para S sustituyente, puede haber sido pasado por alto.

Las diferencias entre las energías de unión, calculadas y observadas, para los restantes 88 compuestos se exponen en los trabajos de Ghose y Crippen y se ajustan, en líneas generales a una buena aproximación.

2.3 Beta adrenérgicos

G.M. Donne-Op Denkelder en 1986 estudia el receptor b-adrenérgico por el método propuesto por Crippen en 1979, sobre 20 derivados Netil y Nbutil feniletanolaminas (tipo A) y 13 isopropil fenoxipropanolaminas (tipo b).



A B

Figura 11

El valor ΔG, se determina por la inhibición específica de (3H) dihidroprenalol que se une a fragmentos del músculo trapecio bovino en presencia de 3.10^{-5} mg GppNHp.

El músculo trapecio de bovino es rico en receptor beta adrenérgico.

Para obtener datos compatibles con la computación, los 6 ejes se rotan 360 grados en 6 etapas. Los ángulos diedros se rotan en 3 etapas de 120 grados.

Los de la clase A se tratan como las Fenoxipropanolaminas pero con menor número de ejes de rotación (sólamente 4). Los sustituyentes OH, NH_2, CH_3, tanto en la cadena como en el núcleo no se rotan, pero se sitúan en la conformación de menor energía.

Este análisis conformacional no sería válido para un cálculo preciso, pero si para una representación de conformaciones permitidas energéticamente, para construir una matriz de distancia.

El proceso sigue las especificaciones siguientes:

1.- El grupo amino protonado de la cadena lateral de todos los ligando, ocupa siempre el mismo lugar del receptor.

2.- Se distribuyen los puntos de los ligandos de manera uniforme: 2 para la cadena lateral de etanolamina, 1 para la mitad aromática situada en el centro del grupo fenilo; 3 para los sutituyentes del anillo fenílico; 1 para el puente $O\text{-}CH_2$ localizado en el oxígeno.

Las coordenadas de unión se definen por un conjunto de 12 puntos cuyas características se indican en la Tabla X.

TABLA X

nº	Tipo	Une al OH de ambos tipos
1	1	
(-0.40, -2.05, 1,17)		Fuertemente hidrofílico Une el grupo amino
2	1	Región hidrofóbica
(-3.00, -2.29, 00)		
3	2	Une al grupo fenílico ó
(no coord. deduc.)		el puente $O\text{-}CH_2$
4	1	Grupo hidrofóbico
(0.69, 0.20, 00)		
5	3	Fuertemente hidrofóbico
(-2.04, 1.20, 00)		
6	4	Débilmente hidrofóbico
(-0.69, 3.59, 00)		
7	5	Débilmente hidrofóbico
(2.07, 3.59, 00)		
8	6	Fuertemente hidrofóbico
(3.42, 1.20, 00)		
9	4	Hidrofóbico. Acomoda el
(1.38, 4,78, 00)		sustituyente R_4
10	3	Hidrofóbico. Une el
(-3.42, 3.59, 00)		sustituyente. R_2
11	7	Punto que no permite en unión
(0.69, 5.98, 00)		salvo para átomos de Hidrógeno.
12	8	
(-2.06, 5.95, 00)		

En la Figura 12 se indica el modo de unión de la isoprenalina (clase A) y del dihidroalprenelol (clase B).

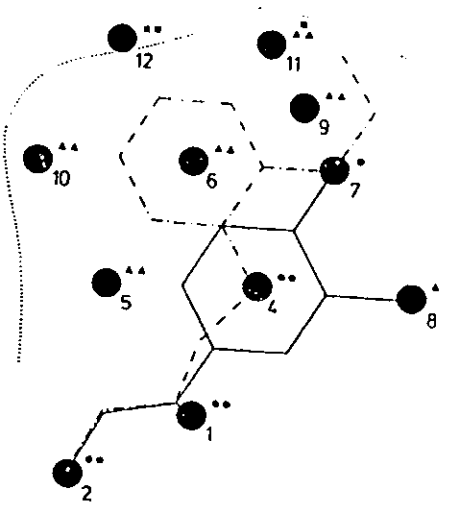


Figura 12

M.R. Linscotten (1986) estudia el receptor beta adrenérgico en los eritrocitos de pavo, utilizan; feniletanolaminas, fenoxipropanol-aminas, naftoxipropanolaminas, indoloxipropanolaminas y otros derivados.

El cálculo de conformaciones lo llevan a cabo mediante el programa ENCOR de Winter (1977). Los modos de unión del ligando al receptor lo efectúan con el programa, propio, FEASMAN. todas las posibilidades de unión indicadas por este programa, son comprobados por el programa COCON, para determinar las conformaciones compatibles. Las energías de unión calculadas se minimizan con el programa RECMA (recentermaping) basado en el algoritmo de Marquardt 1963, que combina el procedimiento interactivo de Newton-Gauss y el de Steepst descent.

Para determinar las energías de unión, utilizan el procedimiento de Bilezikian (1978) que mide las constantes de disociación en un extenso grupo de agonistas y antagonistas, frente al receptor beta de los eritrocitos de pavo.

Para el análisis conformacional, parte de las coordenadas internas; como las moléculas son flexibles y podrían asumir infinitas configuraciones, es necesario fijar un módulo, los autores lo establecen en 12 etapas de 30 grados para los ángulos de torsión, pero si el número de estos ángulos excede de 5 se utilizan etapas de 60 grados. En todo caso la computación

consume 4.000 segundos. Para las moléculas mayores, el análisis conformacional de todos los ligandos consume 50 mil segundos.

Como el grupo etanolamina está presente en todos los ligandos estudiados, cada átomo de esta cadena lateral se considera un punto del ligando y la geometría de los sutituyentes se calcula por las distancias al grupo farmacóforo; los anillos se presentan por un punto neutro en el centro del anillo y se considera a todos los sustituyentes no hidrógenos, como puntos del ligando.

Se asume que las interacciones hidrofílica-hidrofílica, como pertenecientes a 3 tipos: 2 para las uniones hidrofílicas OH y una para las -NH_2 y se consideraron así mismo 2 hidrofóbicas una débil y otra fuerte, además, claro es, la interacción específica de la etanolamina. Los parámetros finales se dan en la Tabla XI.

TABLA XI

Tipo de ligando	Tipo de unión	Unión
Etanolamina	Interacción específica	-4.81 (±0.68)
-O- contenido	hidrofílica tipo 1	-0.78 (±0.33)
-O- contenido	hidrofílica tipo 2	-0.86 (±0.40)
NH- contenido	hidrofílica tipo 1	-1.18 (±0.54)
ninguna	débilmente lipofílica	-0.51[a] (±0.17)
ninguna	fuertemente lipofílica	-1.98[a] (±0.20)

Hasta ahora todos los trabajos estaban basados en determinar la energía de interacción, por la medida de una constante de disociación o, en definitiva, una interacción del ligando con el receptor de forma general, sin embargo A.C. Ghose y G.M. Crippen en 1985 (19) abordan el problema de la determinación de la energía de enlace entre el ligando y el receptor, de una manera diferente a como lo habían considerado en trabajos anteriores. En lugar de utilizar la constante de disociación del complejo ligando-receptor, que está relacionado con el cambio de energía libre según la expresión:

$$\Delta G = -RT \ln K$$

Se asume que la energía de unión para un tipo determinado de interacción, es función lineal de uno o varios parámetros físico-químicos.

Se usan como parámetros, el coeficiente de partición y la refractividad molar.

2.4 Método Voronoi

L.B. Boulu, G.M. Crippen y colaboradores (1990) utilizan el modelo tridimensional de Voronoi, expuesto ya hace tiempo y citado por Crippen (1988) página 408.

Boulu y Crippen aplican los poliedros de Voronoi al estudio de los sitios de unión de hidrocarburos policíclicos aromáticos a la proteína, recientemente aislada PAHs, proteína que es relativamente pequeña y que actúa como receptor de hidrocarburos y es de alta afinidad específica y saturable. El benzopireno es el ligando más característico.

Los hidrocarburos estudiados no son miembros de una serie homóloga y difieren en su perfil estructural.

La mayor parte de los estudios QSAR, tienen como base un conjunto de compuestos relacionados estructuralmente y, se supone, que no existe ambiguedad en la superposición y en la orientación de los ligandos a los puntos del nicho del receptor.

En los hidrocarburos implicados, los perfiles son diferentes y por ello el modelo de Voroni es adecuado para estudiar el comportamiento de un grupo heterogéneo, desde el punto de vista del perfil molecular, pues este modelo no formula hipótesis sobre la orientación del ligando ni sobre su conformación.

Según los datos expuestos en el trabajo, la afinidad de los ligandos se incrementa de forma notable, al aumentar el número de átomos de carbono y de hidrógeno de cada ligando, hasta llegar a un punto crítico en que queda, prácticamente, constante para moléculas mayores que el pireno. Parece pues, como si el receptor tuviera un lugar preferente para la unión hidrofóbica, de tamaño limitado del tamaño del pireno o menor, (pero no mucho menor), el modelo de Voroni parece como muy adecuado para dar cuenta de estos hechos; en efecto, este lugar puede ser obtenido con 4 puntos que generan 4 regiones: una central producida por 2 dimensiones finitas y 3 regiones infinitas según el esquema de la figura 13.

De esta manera, el lugar de reunión es una estructura formada por 4 puntos que generan un tetrahedro central y finito y cuatro regiones infinitas r2-r5. Para obtener una imagen del receptor, se bloquean los lugares 3-5, de modo que el ligando puede unirse con r1 y r2; r1 sería un nicho hidrofóbico, la región infinita r2 sería la que correspondería a la zona de acceso al disolvente, las otras 3 regiones serían como zonas repulsivas y corresponderían a las vallas, estéricamente prohibidas, del nicho.

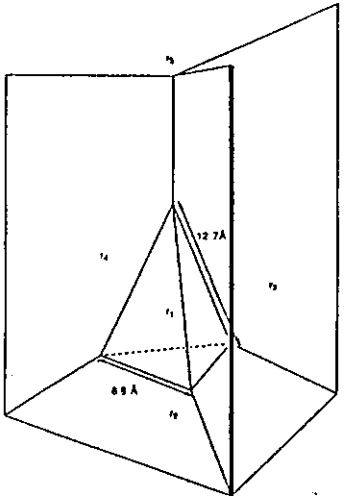


Figura 13

El lugar está constituído por la base del triángulo equilátero de 8,9 Å de lado y los 3 ejes de 12,7 Å.

El programa permite calcular las energías de interacción de cada uno de los exponentes de los ligandos, que se estudian en este trabajo, según se expone en la Tabla XII.

TABLA XII

	Regiones	
átomos	r1	r2
H	0.84	-0.21
C	0.78	0.28
NH_2	-0.75	-0.24
OH	0.08	0.99

La mayor parte del tiempo de computación se consume en calcular los modos permitidos de unión, desde 5 minutos para el compuesto 8-2 aminofluoreno y 7 horas para el 15 4α, 5,β-dihidroxi-4, 5-dihidrobenzo (a) pireno.

Con arreglo a la tabla XII es posible calcular la energía de unión de un hidrocarburo dado. Así para el Benceno, que por su pequeño tamaño, entraría totalmente en el nicho hidrofóbico, sería (0,84 + 0,78) igual a 9,7

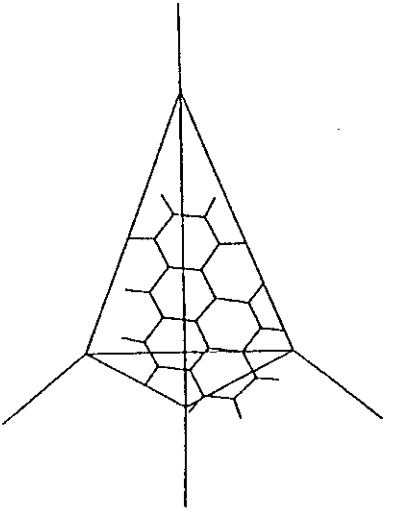


Figura 14

unidades y para el dibenzoantraceno 17,6.

En el dibenzo antraceno, 12 carbones y 6 hidrógenos entrarían en el nicho hidrofóbico y el resto en el r2 como se indica en la figura 15.

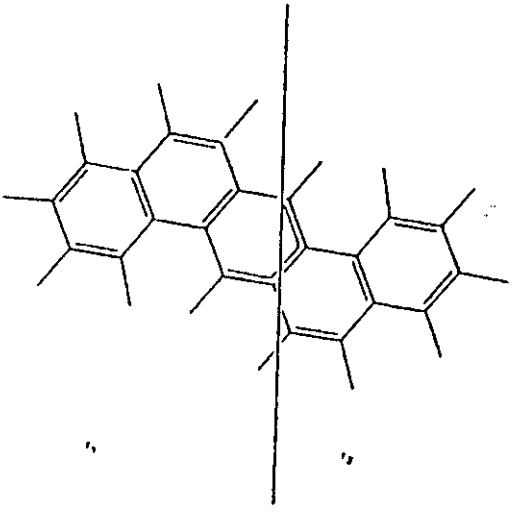


Figura 15

Sin embargo el benzopireno entraría, casi totalmente, en el nicho triangular (Figura 14).

En términos de IC-50, para el benceno correspondería un valor de 120, lo que significaría que ni el benceno ni otros monoaromáticos serían competitivos con el benzopireno.

El modelo de Voronoi puede ser utilizado para otros tipos de receptores.

2.5 Nucleósidos antivirales

Un modelo de unión de ciertos nucleósidos de distinta conformación, con el receptor del virus de para influenza, ha sido propuesto por A.K. Ghose y G.M. Crippen (1989). En la tabla siguiente se ofrece una descripción de los sitios del nicho del receptor (site pocket), Tabla XIII, Tabla XIV y Figura 16.

TABLA XIII

Site pocker	Coeficientes Hidrofobicidad	Dispersiva	Electroestática
1		-0.0827	
2	-0.6197	-0.2219	
3	-1.2185	0.5197	6.3771
4	-0.1895	-0.0470	5.7077
5	-0.8911	0.0919	
6	0.7012	-0.7665	
7	-0.8582	0.2088	

TABLA XIV

site	Oc-H_2O Coeficiente de partición	molar refrac	densidad de carga	site pocket
1		9.0870 (-0.752)		$O_{2'}$, O_9, C_{10}, H-C_{10} (2) H-$O_{2'}$
2	-0.2757 (0.171)	0.8000 (-0.178)		H-N_7
3	-0.1275 (0.155)	5.7997 (3.014)	0.1238 (0.789)	C_6, H_7
4	-0.1961 (0.037)	13.5502 (0.637)	-0.0234 (0.134)	N_1, N_2, C_{11}, H-C_{11} (3)
5	-1.6520 (1.472)	28.5058 (2.620)		$O_{1'}$, $C_{1'}$, $C_{2'}$, $C_{3'}$ $C_{4'}$, $C_{5'}$, $O_{3'}$, $O_{5'}$ C_3, H-$C_{1'}$, H-$C_{2'}$ H-$C_{3'}$, H-$C_{4'}$, H-$C_{5'}$ (2) H-$O_{3'}$, H-$O_{4'}$
6	0.0982 (0.069)	8.0676 (-6.183)		C_4, C_5, H-C_{10}
7	-0.5244	2.4506		O_8, H-N_7

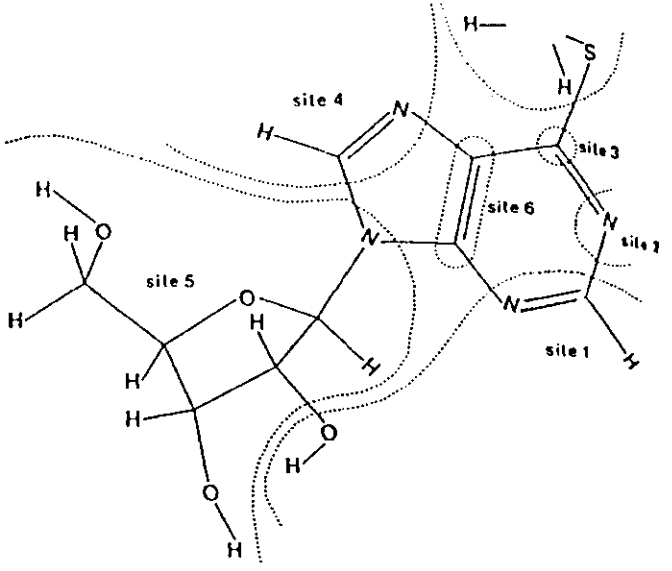


Figura 16

El análisis de la contribución de los parámetros físico-químicos de los diferentes lugares de los ligandos a la actividad biológica, produce una interesante información. Las fuerzas de dispersión de los átomos de azufre trioésteres o tioamidas, es una fuente de interacción atractiva con el receptor. Sin embargo, el efecto repulsivo del anillo de 6 átomos de los compuestos que llevan estos tioéteres y tioamidas, no permite obtener una actividad de alto nivel en estas moléculas.

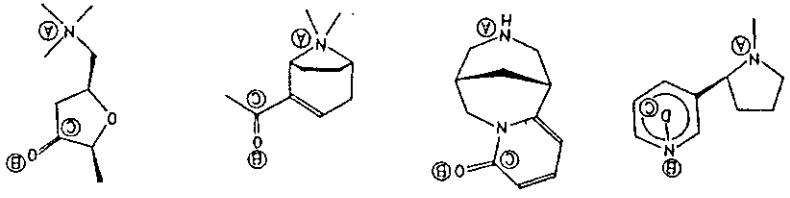
Un anillo de 5 átomos de nitrógeno es deseable en este sentido. Una buena idea sería fundir el grupo amida de un anillo de 5 átomos con otro anillo de 5 átomos, que daría consistencia a la estructura y quitaría la repulsión de un anillo de 6 átomos de carbono. Los compuestos 1-B-D-ribofuranosil-1h-1,2,24-triazol-3-carboxamida (ribavirina) y 2-B-D-ribofuranosilthiazol-4-carboxamida (tiazofurin) tienen un anillo de 5 miembros y son activos. La conformación aceptada en el trabajo para la ribavirina corresponde para la sugerida por Miles.

2.6 Métodos no incrementales

R.P. Sheridan, P. Nilakantan y col. (1986) han desarrollado una variante del modelo original de Crippen (1979); consideran las moléculas con un simple conjunto; el modelo Crippen opera sobre una molécula básica y distintos derivados de la misma, como en el caso de los feno oxiacetonas como inhibidores de quimiotripsinas; quinazolinas, etc.

Sheridan trabaja con moléculas de núcleos diferentes,, pero con un mismo farmacoforo, en el intentode generar, en una sola etapa, las coordenadas para el conjunto de moléculas, de tal manera que sus grupos reactivos sean superponibles. En el trabajo de Sheridan, se opera con una serie de moléculas agonistas nicotínicos: nicotina, citisina, ferruginina y muscarona.

Para la construcción de la matriz de distancia y la asignación de centros quirales, utiliza una modificación del algoritmo estándar, por medio del programa ENSEMBLE, desarrollado para este modelo. El input del programa son las coordenadas cristalográficas, que determinan las uniones y los ángulos de enlace, los ángulos de dihedros no rotables (C-N en amidas, enlaces de anillos aromáticos etc.), utiliza para los pasos siguientes el programa EMBED de Havel (1983) (21), obtenido de la Universidad de California. San Francisco. Las moléculas elegidas son



(-)-Nicotina (-)-Cytisina (-)-Ferruginina (-)- Muscarona

Figura 17.

por su relativo pequeño tamaño y sus diferencias estructurales, tienen todas las restricciones conformacionales, pero no son tan rígidas que el farmacóforo pueda ser deducido de una sóla molécula. Las coordenadas tridimensionales se obtienen, para cada molécula, del programa CHEMGRAF creado por E.K. Daves.

La selección de los grupos superponibles es la etapa más crítica. Se consideran 3 grupos de átomos, etiquetados como A, B, C. El centro catiónico, común a las 3 moléculas, es equivalente en todos ellos y forma el conjunto A. Los agonistas nicotínicos, casi todos, contienen el centro B, el cual actúa como receptor en un enlace de hidrógeno; para nicotina, citisina y ferruginina consiste en un sólo átomo: un oxígeno del grupo carbonilo, en la muscarona existen 2 oxígenos, se elige el oxígeno carbonilo por razones de coherencia. Como tercer átomo es elegido el carbono carbonílico para todas las moléculas, salvo para la nicotina, para el cual se utiliza un átomo inerte D. La línea que une B y C, define la dirección de un dipolo a lo largo de la cual se forma un enlace de hidrógeno.

Tratanto los 4 agonistas como un conjunto y utilizando el valor de t=0,3 Å, como tolerancia para la superposición, se generan las matrices altas

y bajas; para cada etapa de refinamiento de las estructuras, se utilizan 1000 interacciones.

Sheridan llama a los procedimientos propuestos por Marshall (1979) y Crippen (1979) métodos incrementales.

Según Sheridan y colaboradores, en el método incremental se parte de moléculas individuales, se genera una información de distancias por rotación sistemática y se produce una intersección de la información de cada molécula para encontrar una interagrupación de distancias comunes a todas las moléculas, es decir, la geometría del farmacóforo.

Por el contrario en el método de Sheridan, método ENSEMBLE, parte de una representación de las distancias de un grupo de moléculas, se generan las coordenadas tridimensionales de todas las moléculas y se refinan posteriormente. El farmacóforo se deduce del análisis de las estructuras finales.

Una ventaja importante, según Sheridan, sería la posibilidad de interacciones estéricas entre las moléculas, lo que no sería posible en los métodos incrementales. por otra parte el tratamiento de moléculas flexibles parece ser mejor en el método de Sheridan, que con los métodos incrementales.

BIBLIOGRAFÍA

BAKER, G.B.R., HURLBUT (1967) *J. Med. Chem.* 10, 1124.
BARTON, MARLETTA (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 5825.
BILEZIKIAN; DORNFELD; GAMMON (1978) *Biochem. Pharmacol.* 27, 1445.
BOULU; CRIPPEN (1990) *J. Med. Chem.* 33, 771.
COREY; KANTNER; LANDBURY (1983) *Tetrahedrom Lett.* 24, 265.
CRIPPEN (1979) *J. Med. Chem.* 22, 988.
CRIPPEN (1980) *J. Med. Chem.* 25, 599.
CRIPPEN, HAVEL (1988) Distances Chemistry and Molecular conformation Willey and sons.
DZEMAN, G.H.J., AUE, T., BULTSMA, M.R., LINSCHOTEN, H. TIMMERMAN (1985) *J. Med. Chem.* 28, 1328.
DONNE-OP DEN KELDER, GRETJE J. BULOO AND TEAKE BULTSMA (1986) *Eur. J. Med. Chem.*21, 475.
GHOSE, CRIPPEN (1982)*J. Med. Chem.* 25, 899
GHOSE,CRIPPEN (1983) *HJ. Med. Chem.* 26, 996.
CHOSE,CRIPPEN (1984) *J. Med. Chem.* 27, 901.
GHOSE, CRIPPEN (1985) *J. Med. Chem.* 28, 133.
GHOSE, GORDON M. CRIPPEN, GANAPATHI R. REVANKAR, PATRICIA A. MCKERMAN, DONALD F. SMEE, ROLAND K. ROBINS (1989) *J. Med. Chem.* 32, 746.
HAVEL, KUNTZ,CRIPPEN (1983) *Bull. Math. Biol.* 45, 665.
HOOKE, R., JEEVES, T.A. (1961) *J. Assoc. Comput. Mach.* 8, 212.
KUHL (1984) *J. Med. Chem.* 22, 988.

LINSCHOTEN, TEAKE BULTSMA, AD P. IJZERMAN, HENDRIK TIMMERMAN (1986) 29, 278.
MARSHALL G.R., BARRY C.D., BOSSHARD H.E., DAMMKOEHLER R.A., DUNN D.A (1979) En Computer Assisted Drug Design; Olson E.D., Christoffersen R.E. eds., ACS Symp. Series 112; American Chemical Society. Washington DC. pp 205-226.
MARQUARDT 81963) *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 435.
RAVINDRAN (1972) *Comun. ACM* 15, 818. (1974) 17, 157.
SHERIDAN, RAMAMSWAMY NILAKANTAN, J. SCOTTDIXON, R. VENKATARAGHA (1986) *J. Med. Chem.* 29-899.
WINTER, R.L. DE, BULTSMA, T., NAUTA, W. (1977) *Th. Eur. J. Med. Chem.* 12, 137.

Reconocimiento de Patrones

JOSE ELGUERO
Instituto de Química Médica, CSIC
Juan de la Cierva, 3.- 28006 Madrid

1.0 INTRODUCCION

Este capítulo está basado en dos revisiones bibliográficas: una de 1979, de Kirschner y Kowalski (Kirschner, 1979), y otra de Dunn y Wold, de 1990 (Dunn, 1990). Dado que estos nombres corresponden a los autores más representativos en aplicaciones de reconocimiento de patrones al diseño de fármacos, sólo se añadirán algunas referencias a trabajos personales que, por su carácter menor, no han sido recogidos en las citadas revisiones. Excepcionalmente, algún trabajo muy significativo o muy reciente, no citado en ellas, también será comentado .

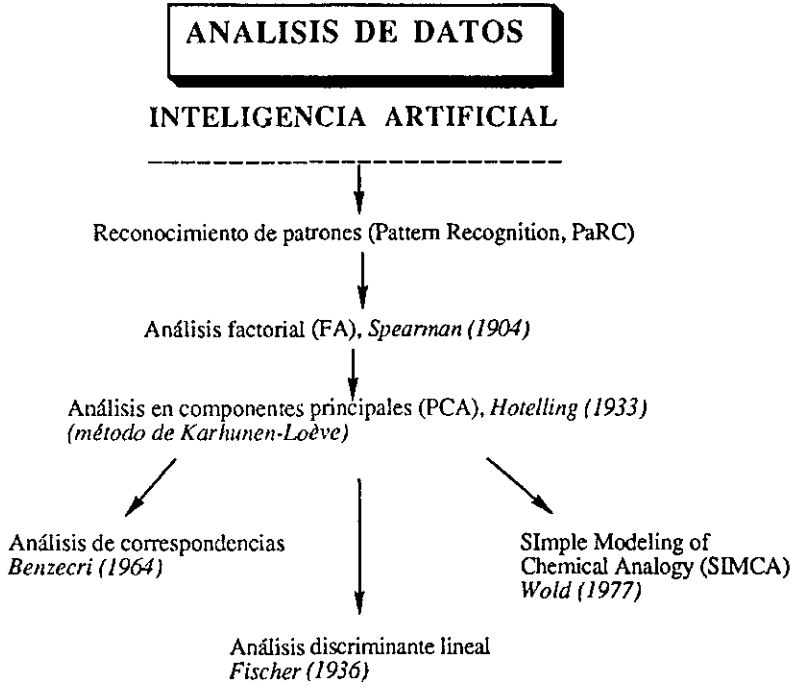
En el esquema 1 figura un ensayo de clasificación de la rama de la ciencia conocida como análisis de datos.

Como puede verse, se trata de métodos clásicos, bien conocidos en estadística, incluso su aplicación al diseño de fármacos tiene ya decenas de años de antigüedad (Martin, 1974). El desarrollo de la microinformática y la disponibilidad de numerosos programas, hacen de estos métodos un útil sencillo de manejar y, por lo tanto, algo que debe formar parte del arsenal de todo investigador en este campo.

Dado que el ser humano es el mejor "**reconocedor de patrones**" en un espacio de dos o tres dimensiones, todos los problemas reales se referirán a espacio de mayores dimensiones.

2.0. FUNDAMENTOS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES EN CUANTO A APLICACIONES EN DISEÑO DE FARMACOS Y METODOS QSAR

El objetivo principal de los métodos QSAR es encontrar modelos que predigan la actividad biológica de compuestos desconocidos o no ensayados. Además, si las predicciones son altamente significativas desde el punto de vista estadístico, deben proporcionar algún tipo de entendimiento acerca del efecto que produce la modificación de la estrucutra (dentro de una serie) sobre la modificación de la actividad biológica. Para que el objetivo de predicción se cumpla, dos condiciones que afectan al modelo y a los datos



Esquema 1.

deben cumplirse. El primero es que el modelo debe reproducir la actividad biológica tan bien como sea posible para los compuestos que han servido para establecerlo. En segundo lugar, las predicciones se deben hacer con el menor número de parámetros posibles comparados con el número de grados de libertad de los datos. Esta segunda condiciones es la más importante y la que más frecuentemente se olvida.

La aplicación del **reconocimiento de patrones** en diseño de fármacos está basada en la misma hipótesis sobre las relaciones entre estructura química y actividad biológica que los otros métodos QSAR: el principio de analogía de Hammett. Este principio dice: "desde sus orígenes la ciencia de la química orgánica ha dependido de la regla emprírica y cualitativa según la cual las sustancias reaccionan de una manera similar y que cambios

similares de la estructura producen cambios similares de la reactividad". Según S. Wold, "la filosofía de la química está basada en gran parte en los conceptos de **similitud** y **analogía**. En este aspecto, la química difiere de la física y está mucho más cerca de la biología y de la medicina. Ello hace a la química un terreno de ensayos ideal para métodos de análisis en términos de **similitud**".

En **reconocimiento de patrones** se habla de objetos. Los objetos pueden pertenecer a dos conjuntos: el conjunto de aprendizaje (training set, learning set o reference set) y el conjunto de prueba (test set). La colección de objetos que poseen alguna propiedad conocida que interesa al investigador forman el conjunto de aprendizaje. Dichos objetos representan el conocimiento previo y, en consecuencia, deben ser seleccionados con el máximo cuidado. Los objetos sin clasificar u objetos para los cuales se desconoce la propiedad que interesa formarán parte del conjunto de prueba. Cada uno de los pasos del **reconocimiento de patrones** utilizará uno, otro o los dos conjuntos y se conocen como **fase de aprendizaje** y **fase de predicción**. He aquí una matriz de las usadas en métodos PaRc.

3.0. INFORMACION OBTENIDA A PARTIR DEL RECONOCIMIENTO DE PATRONES

En todos los métodos de clasificación es posible distinguir cuatro niveles:

Nivel 1.- Clasificar un objeto desconocido como perteneciente a una u otra clase.

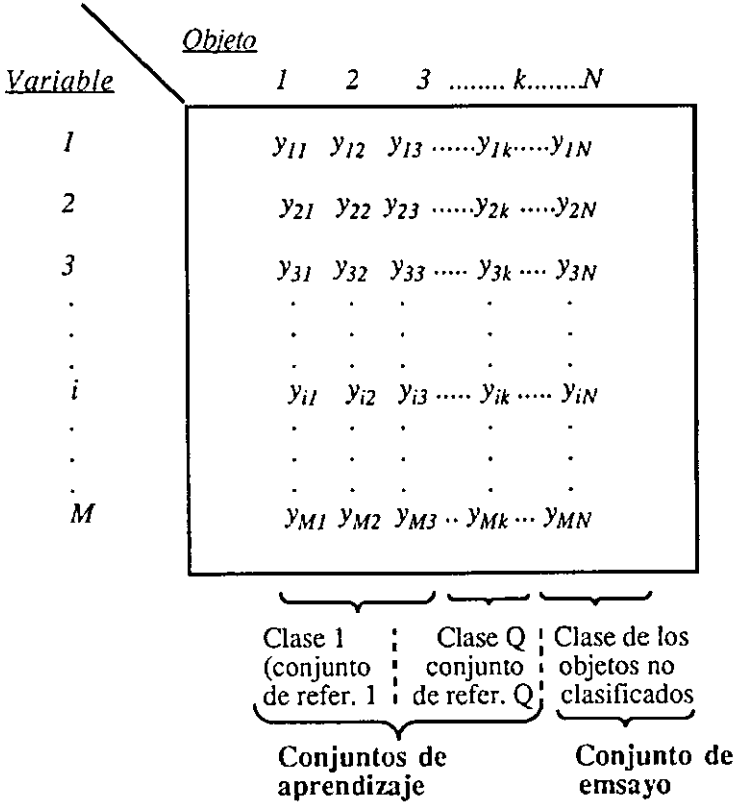
Nivel 2.- Lo anterior y además que tenga la posibilidad de que no sea miembro de ninguna de las clases definidad (es decir, que sea un "outlier" en la terminología de Wold).

Nivel 3.- Que ofrezca además la posibilidad de establecer relaciones cuantitativas entre la actividad (biológica) y la posición del objeto en el espacio de los factores **dentro de una clase.**

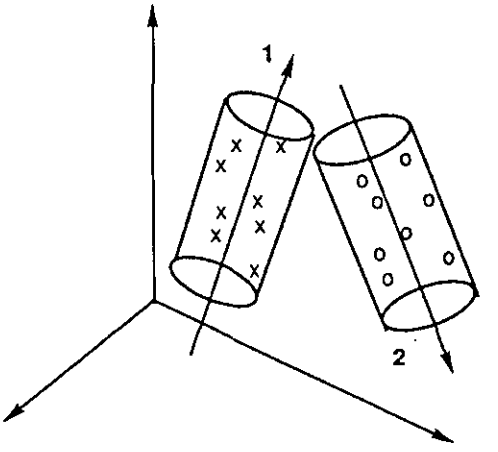
Nivel 4.- Posibilidad de utilizar varias respuestas simultáneamente. Este aspecto es muy importante en investigación farmacéutica, ya que lo que se desea optimizar es, a menudo, un compromiso entre varias respuestas (toxicidad-actividad; varias cepas; diferentes modelos animales, etc.).

4.0 LAS BASES GEOMETRICAS DEL RECONOCIMIENTO DE PATRONES

Para clasificar compuestos como miembros de diferentes clases es necesario establecer regiones del **espacio de patrones** ocupadas por los



compuestos de entrenamiento. Los métodos de **reconocimiento de patrones** difieren en cómo llevar a cabo la partición del espacio. Unos (**análisis discriminante, máquina de aprender lineal**) usan hiperplanos y buscan una línea, plano o hiperplano que separe una clase de otra. Los segundos métodos de **reconocimiento de patrones** son aquellos basados en distancias, entre ellos el método del **k-vecino más próximo.** finalmente, el tercer grupo está constituido por los métodos llamados de **modelización de clases** o métodos proyectivos. Tales métodos están basados en la proyección hacia estrucutras latentes (projections to latent structures, PLS) el más conocido delos cuales es el SIMCA de Wold. El esquema 2 representa el resultado de aplicar el método SIMCA a la clasificación de dos conjuntos: uno (cruces), con una determinada propiedad, y otro (círculos), con otra propiedad.Se ha elegido un espacio de tres dimensiones por conveniencia, pero hay que recordar que estos métodos se aplican a espacios multidimensionales con



Esquema 2.

dimensiones muy superiores a tres.

El cálculo de las desviaciones estándar (SD) de los residuales de cada clase permite definir un intervalo de confianza alrededor de cada modelo. Este intervalo (el cilindro) rodea cada clase.

5.0. ETAPAS EN UN ANALISIS POR RECONOCIMIENTO DE PATRONES.

Los estudios de PaRC se llavan a cabo por pasos. En la primera fase del estudio se determinan los objetivos del análisis y el nivel de información requerido. A continuación, se establecen los conjuntos de aprendizaje y se eligen las variables químicas necesarias para describir los compuestos. Se suelen tratar las variables de manera a transformarlas en variables homogéneas por técnicas de tipo autoescalado (una variable escalada tiene una media de cero y una varianza unidad). Se prueban modelos de clasificación, lo cual lleva a eliminar las variables cuya contribución no es importante. Usando el conjunto reducido de variables (es decir, todas aquellos significativas) se establecen nuevos modelos y se procede a su validación usando parte de los datos del conjunto de entrenamiento como si su actividad biológica fuera desconocida. Cuando el modelo se considera satisfactorio, se puede usar para clasificar nuevas sustancias. Eventualmente los nuevos resultados biológicos (que sean aciertos o fracasos de la predicción) se pueden incorporar al conjunto de entrenamiento, robusteciendo así el carácter predictivo del modelo.

6.0 LA NATURALEZA DE LAS VARIABLES QUE SE USAN EN LOS ESTUDIOS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES

La etapa esencial en los procedimientos de **reconocimiento de patrones** es la de selección de las variables que se usan para caracterizar un "objeto". El **reconocimiento de patrones** puede encontrar únicamente tanta información como se encuentra en las características seleccionadas; es decir, los únicos **patrones** que se pueden hallar son aquellos que están presentes en las variables. En primer lugar, las variables deben ser relevantes para el problema biológico considerado. Tales variables son (Manaut, 1993):

- El logaritmo del coeficiente de reparto (log P) (Taylor, 1990).
- La refractividad molar (Silipo, 1990; Taylor, 1990).
- La solubilidad (Taylor, 1990).
- El pK_a o pK_b (Bowden, 1990).
- Las constantes de sustituyente, como las σ de Hammett (Bowden, 1990).
- El parámetro π de Hansch y Fujita (Taylor, 1990).
- Los efectos estéricos, como es E_s de Taft o los B y L de Verloop (Silipo, 1990).
- Los fragmentos subestructurales (Silipo, 1990).
- Los índices de conectividad (Silipo, 1990).
- Los desplazamientos químicos del carbono-13 (Alcalde, 1991).

Como muchos de estos parámetros se pueden calcular fácilmente con un ordenador (ver, por ejemplo (Camilleri, 1993) para el cálculo de 254 propiedades moleculares mediante el programa GENPROP) es fácil tener grandes colecciones de variables. Su análisis con un método inapropiado, por ejemplo con el de los hiperplanos, suele conducir a modelos de escaso poder predictivo. Es bien conocido que tales variables suelen ser redundantes (colinearidad). Por ello es muy importante reducir tales variables a las llamadas **propiedades principales**, mediante un análisis en componentes principales.

Es práctica común en muchas aplicaciones PaRC el uso de variables de tipo "cero-uno" para describir la presencia-ausencia de fragmentos estructurales (conocidas en QSAR kcomo matrices *de novo*, de Free-Wilson o de Fujita-Ban (Elguero, 1982; Baumes, 1983; Cativiela, 1983)). La hipótesis de **continuidad** subyacente en la mayoría de los métodos PaRC, incluido el SIMCA, no se cumple bien con variables "cero-uno". Además, predicciones fuera de rango de substituyentes estudiados, son imposibles. Por ejemplo, no se puede utilizar el conocimiento químico de que un grupo nitro, en ciertos casos, se parece a un grupo ciano.

Los descriptores más cuantitativos, como algunos de los enumerados en la lista anterior, son preferibles. De todos modos, para evitar falsas espectativas, hay que considerar que los parámetros de sustituyente derivan todos de la influencia de dichos sustituyentes en sencillas reacciones de sencillos compuestos orgánicos. Teniendo eso en cuenta, su aplicabilidad a estudios de actividad biológica es sorprendentemente buena. El desarrollo sistemático de sistemas biológicos modelo y el estudio sistemático de la influencia de la estructura de los compuestos orgánicos en esos sistemas biológicos podría llevar a escalas biológicas de sustituyentes. Esto tendría un efecto mucho más trascendental sobre los métodos QSAR que la manipulación matemática de datos "históricos" es decir ya publicados.

Es frecuente que descriptores de los dos tipos sean utilizados simultáneamente. En un estudio de clasificación de sulfoniltioureas y tioureas como hiper o hipoglicemiantes (Dunn, 1980) se utilizaron π, MR (refracción molar) y σ_p para los sustituyentes en el anillo aromático, π y MR para los sustituyentes en el grupo urea, una variable indicadora (-1,0,1) para describir las propiedades electrónicas del anillo aromático y otra variable indicadora (0,1) para diferenciar ureas de tioureas. Finalmente, una variable de tipo R_M se usó para describir la lipofilia de la molécula entera.

Un breve comentario acerca de la respuesta biológica. Aunque ésta es frecuentemente cuantitativa, es bien conocido que está afectada de una gran incertidumbre. Algunos autores (Kirschner, 1979) proponen transformarla en una respuesta cualitativa, lo cual, a primera vista, no parece razonable. Consideremos un ejemplo imaginario. Supongamos una colección de moléculas que han sido ensayadas por su actividad y que los valores encontrados se hallan entre 0.0 (inactivas) y 100.0 (la más activa). Imaginemos que la replicación de los ensayos muestra una incertidumbre en las medidas de actividad del 20% (nada excepcional en ensayos biológicos in vivo). Si hay un número suficiente de moléculas se pueden construir tres categorías: muy activas (de 70 a 100), medianamente activas (de 30 a 70) e inactivas (de 0 a 30). El problema ahora es encontrar un patrón de características que permita clasificar las moléculas en esas tres clases. El químico le pide menos a los datos, pero los datos son más fiables. El procedimiento que hemos descrito está relacionado con los tests no-paramétricos. Tales tests son aplicables en más casos que los tests paramétricos, pero son menos exigentes con los datos.

7.0 ESTRUCTURA DE LOS DATOS EN PROBLEMAS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES

Una de las hipótesis básicas en reconocimiento de patrones es que cada conjunto de aprendizaje forma una agrupación ("cluster") bien definida

en el espacio de patrones. Eso es lo que se hace habitualmente cuando sólo se aplica el análisis QSAR a los compuestos activos, dejando de lado los inactivos (hipótesis subyacente, los inactivos pertenecen a otro "cluster"). Existen dos tipos de estructura de datos claramente diferenciados:

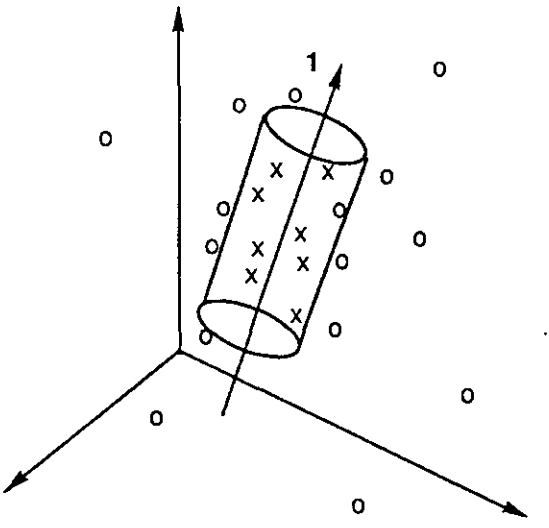
7.1.- Clases bien definidas: estructura de datos simétrica

El hecho de que compuestos que son química y farmacológicamente similares se agrupen en el espacio de los patrones es una consecuencia del principio de analogía de Hammett que hemos discutido previamente. Ejemplos de tal comportamiento se encuentran en compuestos que actúan sobre el mismo receptor, tales como agonistas y antagonistas, inhibidores y activadores enzimáticos, etc.

7.2.- El problema de los compuestos activos frente a los inactivos: estructura de datos asimétrica.

En numerosos casos de estudios sobre relaciones estructura-actividad biológica el problema de clasificación implica compuestos activos frente a compuestos inactivos, por ejemplo, tóxicos/no tóxicos, carcinogénicos/no carcinogénicos, etc. Estos casos han sido llamados con el nombre de **problema de la clasificación asimétrica.** Ello es debido a que una de las clases (la de los no activos) suele ser una clase mal definida e inhomogénea. Ello es fácil de entender, los hidrocarburos aromáticos policondensados forman una clase homogénea y bien definidad de sustancias cancerígenas, pero las sustancias no cancerígenas son un conjunto heteróclito de compuestos, desde el vidrio hasta el agua. Tales conjuntos tienen la apariencia del esquema 3.

En cierto sentido, todos los compuestos no activos (círculos) deben ser considerados "outliers" de la clase de compuestos activos (cruces). Esto lleva necesariamente a la conclusión que un compuesto que es clasificado como no-activo es no-activo **por el mismo mecanismos** que la clase de los activos (si es activo por otro mecanismo, entonces representa una nueva clase de compuestos activos).



Esquema 3.

8.0 APLICACIONES DE LOS METODOS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES EN QSAR Y EN DISEÑO DE FARMACOS

8.1.- Métodos generales

8.1.1. Análisis espectral

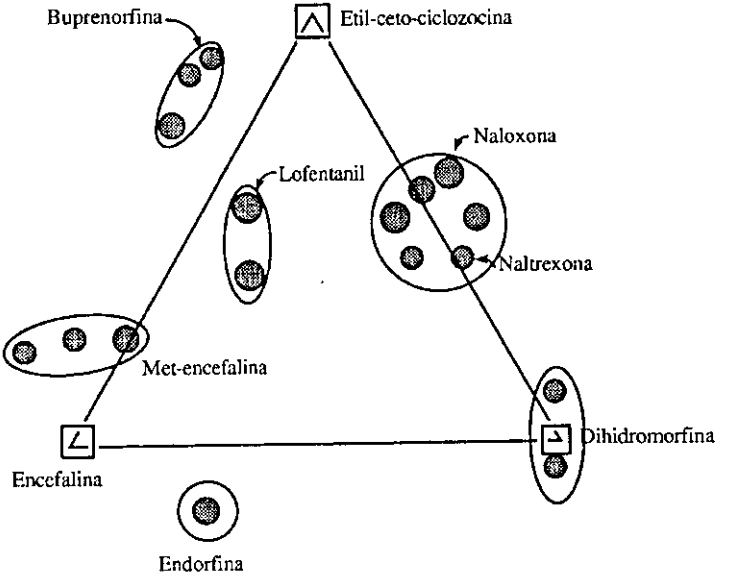
Paul Lewi, de los Laboratorios Janssen (Lewi, 1976; Calomme, 1984) ha desarrollado un método llamado "spectral mapping" (mapeo espectral) que ha aplicado con éxito considerable al análisis de resultados biológicos. El objeto del análisis multidimensional de datos en farmacología es encontrar relaciones entre la estructura de los compuestos ensayados y su actividad biológica. En un segundo paso, las hipótesis resultantes del análisis serán verificadas con nuevos ensayos. Tales datos se presentan generalmente en forma de tablas cuyas filas corresponden a los compuestos o fármacos y cuyas columnas corresponden a organismos vivos, órganos aislados, tejidos homogeneizados, etc.

Por ejemplo, si se analizan 26 narcóticos opioides en cuatro ensayos de afinidad (binding) frente a etilcetociclazocina, dihidromorfina, D-Ala,D-Leu encefalina y naloxona triaciadas (valores en CI_{50}). Tal tabla puede ser vista como las coordenadas de 26 puntos en un espacio de 4 dimensiones: cada compuesto ensayado corresponde a un punto y cada compuesto de

referencia está asociado con un eje. Los valores de CI_{50} serán las coordenadas en los 4 ejes. Como el ser humano tiene dificultades para visualizar los 26 puntos en el espacio de 4 dimensiones, Lewi usa su método (programa DATASCOPE) para reducir esa información a un espacio de 2 dimensiones, con la mínima pérdida de información (Esquema 4). La representación triangular, como en los clásicos problemas de mezclas o en los diagramas de fase, es una inteligente manera de obtener tres dimensiones en un plano, con la restricción de que la suma de las tres coordenadas tiene que ser uno.

El mapa espectral del esquema 4 contiene el 99% de la información. El análisis del mapa es función de los receptores κ, δ y μ, revela que hay muy pocos fármacos potentes frente al receptor κ, pero que algunos analgésicos muy potentes no se unen a tal receptor.

En el centro del triángulo aparecen los analgésicos "neutros" (clase $\mu\delta\kappa$) y las subclases $\mu\kappa$ y $\mu\delta$. Tales conclusiones eran imposibles de deducir del examen de la tabla original.



Esquema 4.

8.1.2. Análisis de correspondencias

Nosotros hemos usado el método de **análisis de correspondencia de Benzecri** para clasificar disolventes (Elguero, 1983). Se trata de un ejemplo

sencillo de cómo se aplican estos métodos, en este caso para clasificar disolventes. A partir del modelo tetraparamétrico de Koppel y Palm (Koppel, 1972) se encuentra un modelo de tres factores, de los cuales los dos primeros dan cuenta del 94% de la varianza de los datos. El análisis muestra, además, que los parámetros de acidez, basicidad, polaridad y polarizabilidad no son "puros", sino que cada uno contiene parte de la información de los otros.

8.1.3. Análisis discriminante lineal

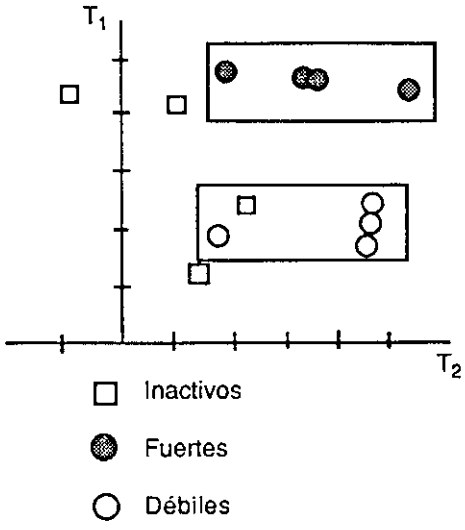
El **Análisis discriminante lineal** de Fischer ha sido aplicado a un conjunto de 66 compuestos (objetos), 30 sedantes y 36 tranquilizantes (Kirschner, 1979) utilizando como descriptores sus espectros de masas (hipótesis subyacente: tanto el espectro de masas como la actividad farmacológica están relacionadas con la estructura). Se eligieron 30 valores de m/z con sus respectivas intensidades, es decir cada uno de los 66 compuestos es un punto en un espacio de 30 dimensiones, cada relación m/z es una coordenada. Para verificar el buen funcionamiento del método de Fischer se recurre a un procedimiento muy frecuente en reconocimiento de patrones que se conoce con el nombre de **validación**: se quitan aleatoriamente, por ejemplo, dos compuestos; se usan los otros 64 como conjunto de aprendizaje y luego el método clasifica los dos restantes como clase 1 (sedantes) o clase 2 (tranquilizantes): ambos compuestos fueron clasificados correctamente. Se puede repetir el procedimiento tantas veces como se quiera. Si los resultados son satisfactorios, el carácter predictivo del modelo es elevado y cabe esperar que el espectro de masas de un producto, antes de ser evaluado farmacológicamente, permita decir si será sedante o tranquilizante (**nota:** sólo funcionará si se trata de una clase homogénea, ver más arriba, esquema 2).

8.1.4. Análisis factorial

El **análisis factorial** ha sido aplicado por Cammarata y Menon (Cammarata, 1976) para clasificar los agentes vasopresores en fuertes y débiles. El método está basado en la obtención de los vectores propios (eigenvectors) que den cuenta de la varianza de los datos. En el ejemplo citado Cammarata y Menon usaron un código topológico sencillo para describir una serie de aminas alifáticas y aromáticas. Dos vectores propios T_1 y T_2 (esquema 5) explican el 80% de la varianza y permiten una separación clara entre los dos niveles de actividad.

8.1.5. Análisis de autocorrelación

Guilles Moreau (Roussel-Ucalf) (Moreau, 1980; Moreau, 1988) ha introducido un método denominado **análisis de autocorrelación**. Este



Esquema 5.

método, conocido por sus iniciales inglesas ATS (Autocorrelation of the Topological molecular Structure) usa como descriptores propiedades de los átomos tales como conectividad, radio de van der Waals, densidad electrónica, etc., todos ellos calculables teóricamente. A partir de esos descriptores se contruye una matriz cuyo vector de autocorrelación se calcula. En su segundo trabajo (Moreau, 1988) este autor presenta un ejemplo de gran relevancia práctica. El objeto es detectar automáticamente nuevas moléculas activas (en el ejemplo citado, ansiolíticos) a partir de grandes colecciones de moléculas no ensayadas, caso frencuente en las empresas que, o bien adquieren moléculas de los laboratorios al azar o bien tienen conocimiento de tales moléculas por las publicaciones y sólo desean adquirir aquellas potencialmente activas en un campo farmacológico dado. En la fase de aprendizaje se logró unos porcentajes de acierto tanto en la clasificación de moléculas activas como en la de inactivas del orden del 85%. En la fase de predicción se calcularon los descriptores de 30.000 moléculas del catálogo de Roussel-Uclaf; la aplicación del método ATS reconoció como activas alrededor del 5% de ellas (unas 1.500), de las cuales 750 estaban disponibles y se ensayaron frente al receptor de las benzodiazepinas: 25 resultaron acticas (3%) porcentaje débil pero hay que tener en cuenta que corresponden a estructuras químicas muy diferentes de las de los ansiolíticos, razón por la cual nunca habían sido ensayadas (la probabilidad de encontrar una

actividad ansiolítica al azar es difícil de estimar, Moreau cita entre un 0,1 y un 1%).

8.1.6. Otros métodos

Diversos grupos han utilizado variantes de los métodos anteriores en sus estudios sobre clasificación de compuestos con actividad biológica. entre ellos podemos citar los trabajos de Horváth sobre análisis multivariado y su aplicación a quinazolinas inhibidoras de dihidrofolato reductasa (Chen, 1979); el método de mínimos cuadrados adaptable y su aplicación a guanidinas hipotensoras (Moriguchi, 1980); la aplicación del método de las nubes dinámicas de Diday por Grassy y colaboradores (Grassy, 1982) al caso de respuestas biológicas múltiples; finalmente el uso de los agrupamientos no-jerárquicos ("Nonhierarchic Cluster Analysis") para seleccionar compuestos destinados a ensayos biológicos (Willett, 1986).

8.2. Métodos de Wold (SIMCA) y PLS)

Una excelente presentación de estos métodos para químicos se encuentra en el libro de uno de los alumnos de Svante Wold (Carlson, 1992) (nosotros hemos utilizado estos métodos para la clasificación de cristales líquidos (Serrano, 1985) y en un estudio quimiométricos de heterociclos pentagonales nitrogenados (azoles) (Ebert, 1990)).

En la mayoría de los métodos PaRC (LDA, linear discriminant analysis; LLM, linear learning machine) el número de variables debe ser limitado, por ejemplo, si hay N objetos en el conjunto de aprendizaje, aproximadamente N/3 es el número máximo de variables permitido (en multiregresión, si el número de variables excede N/4, la regresión se vuelve altamente inestable). Esta limitación no se aplica al SIMCA. La principal diferencia entre el SIMCA y los otros métodos de PaRC es que en lugar de buscar diferencias entre clases, busca parecido dentro de cada clase.

El método SIMCA no opera al nivel 1, ya que la detección de elementos extraños (outliers) es automática. Está basado en el principio de analogía de Hammett y define una **región de analogía** en el espacio de patrones. Si un compuesto no está dentro de esta región (una por clase) es un elemento extraño. Al nivel 2, los datos del problema de **reconocimiento de patrones** eran los elementos de la matriz antes representada. Los niveles 3 y 4 de la clasificación de un compuestos se pueden obtener correlacionando la posición de un compuesto en el espacio fisicoquímico de su clase (dos

clases diferentes tienen variables significativas diferentes) por medio del método PLS (partial least squares).

Recientes aplicaciones de los métodos de Wold (que tienden a llegar a ser los métodos de referencia) se encuentran en un trabajo sobre caracterización de aminoácidos (Cocchi, 1993). Clementi y colaboradores (Baroni, 1993) han efectuado un excelente estudio sobre el uso del método PLS (GOLPE: Generating Optimal Linear PLS Estimations) para manipular problemas QSAR en 3 dimensiones. El método PLS también ha sido empleado con éxito para modelizar las relaciones estructura-actividad de inhibidores de catecol-O-metiltransferasa (Lotta, 1992).

8.3. Redes neuronales

En los últimos años hay una tendencia creciente a la aplicación de las redes neuronales (Artificial Neural Networks, ANN) en problemas de clasifición relacionados con métodos QSAR (Aoyama, 1990a; Aoyama, 1990b; Andrea, 1991; Tetko, 1993).

9.0. CONCLUSIONES

En lo que concierne al conjunto de entrenamiento, es necesario hacer una observación que proviene de otra área, la del diseño de experimentos (Box, 1978; Box, 1987; Atkinson, 1992; Carlson, 1992): si los objetos que forman el conjunto de entrenamiento están mal elegidos con respecto al modelo postulado, todos los esfuerzos serán inútiles. cuanto más se acerquen los puntos a un **diseño óptimo**, más fiables serán las consecuencias que saquemos de su estudio (Elguero, 1981). Si el conjunto nos es dado y nos apercibimos que está mal construido, será necesario añadir algunos objetos más elegidos con un criterio de optimalidad (Pahn Tan Luu, 1992). Para dos aplicaciones de los métodos modernos de construcción de matrices de experimentos óptimas en diseño de fármacos, ver las siguientes poblicaciones: Cativiela, 1983; Claramunt, 1984.

En resumen, el conjunto de métodos estadísticos recogid son de gran utilidad en investigación farmacéutica. En efecto, estos métodos permiten clasificar objetos pertenecientes a un espacio multidimensional (n >3 pero, en general, mucho mayor) de tal manera que las diferentes clases en que se agrupan son aparentes por simple examen visual (espacio de dos o tres dimensiones).

Esta operación de **clasificación** es esencial y debe necesariamente preceder todo intento más cuantitativo (QSAR), que sólo tiene sentido dentro

de una **clase homogénea** (química y biológicamente). Dada la sencillez de su empleo, los investigadores en este campo no deben dudar en aplicarlos, pero deben tener en cuenta:

1) No se puede partir de cero. Es necesario reunir una colección de datos biológicos suficientes para que el conjunto de entrenamiento permita encontrar un criterio de clasificación satisfactorio (en el trabajo de ansiolíticos citado en la sección 7.1.5 (Moreau, 1988) los datos de 3.000 compuestos fueron utilizados en la fase de aprendizaje).

2) Si tienen éxito, el mérito final recaerá sobre el investigador, ya que estos métodos sólo funcionan si el conjunto de descriptores elegidos para caracterizar un compuesto químico son **relevantes para su actividad biológica.**

Agradecimientos: Agradezco a D. Francisco Caballero la ayuda prestada en la preparación de este manuscrito.

10.0 BIBLIOGRAFIA

(1) ALCALDE, E.; DINARÉS, I.; FRIGOLA, J. (1991) *Eur. J. Med. Chem.* 26: 633.
(2) ANDREA, T.A.; KALAYEH, H. (1991) *J. Med. Chem.* 34: 2824.
(3) AOYAMA, T.; SUZUKI, Y.; ICHIKAWA, H. (1990a) *J. Med. Chem.* 33: 905.
(4) AOYAMA, T.; SUZUKI, Y.; ICHIKAWA, H. (1990b) *J. Med. Chem.* 33: 2583.
(5) ATKINSON, A.C.; DONEV, A.N. (1992) *"Optimun Experimental Designs"*, Oxfords Science Publications, Clarendon Press, Oxford.
(6) BARONI, M.; COSTANTINO, G.; CRUCIANI, G.; RIGANELLI, D.; VALIGI, R.; CLEMENTI, S. (1993) *Quant. Struct.-Act. Relat* 12:9.
(7) BAUMES, R.; TIEN DUC, H.N.C.; ELGUERO, J.; FRUCHIER, A. (1983) *An. Quím.* 79C, 128.
(8) BOWDEN, K. (1990) *"Electronic Effects in Drugs"* en Comprehensive Medicinal Chemistry (Hansch, C.; Sammes, P.G.; Taylor, J.B. Eds.), Pergamon Press, Oxford, 4: 205.
(9) BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. (1978) *"Statistics for Experimenters"*, Wiley, New York.
(10) BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. (1987) *"Empirical Model-Building and Response Surfaces"*, Wiley, New York.
(11) CALOMME, G.; LEWI, P. (1984) *"Multivariate Analysis of Sctructure-Activity Data. Spectral Map of Opiod Narcotics in Receptor Binding"*, Actualités de Chimie Thérapeutique, 11ème Série, 121.
(12) CAMILLERI, P.; LIVINGSTONE, D.J.; MURPHY, J.A.; MANALLACK, D.T. (1993) *J. Comput Aided Mol. Design* 7: 61.
(13) CAMMARATA, A.; MENON, G.K. (1976) *J. Med. Chem.* 19: 739.
(14) CARLSON, R. (1992) *"Design and optimization in organic synthesis"*, Elsevier, Amsterdam.
(15) CATIVIELA,C.; ELGUERO, J.; MATHIEU, D.; MELÉNDEZ, E.; PHAN TAN LUU, R. (1983) *Eur. J. Med. Chem* 18: 359.
(16) CHEN, B.K.; HORVÁTH, C.; BERTINO, J.R. (1979) *J. Med. Chem.* 22: 483.
(17) CLARAMUNT, R.M.; ELGUERO, J.; MATHIEU, D.; PHAN TAN LUU, R. (1984) *An. Quím.* 80C: 30.
(18) COCCHI, M.; JOHANSSON, E. (1993) *Quant.Struc.-Act. Relat.* 12: 1.

(19) DUNN, W.J.; WOLD, S. (1990) *"Pattern Recognition Techniques in Drug Design"* en Comprehensive Medicinal Chemistry (Hansch,C.; Sammes, P.G.; Taylor, J.B. Eds.), Pergamon Press, Oxford, 4: 691.
(20) EBERT, C.; ELGUERO, J.; MUSUMARRA, G. (1990) *J. Phys. Org. Chem.* 3: 651.
(21) ELGUERO, J. (1981) *An. Real Acad. Farm.* 47: 137.
(22) ELGUERO, J.; FRUCHIER, A. (1982) *Afinidad* 39: 548.
(23) ELGUERO, J.; FRUCHIER, A. (1983) *An. Quím.* 79: 72.
(24) GRASSY, G.; TEULADE, J.C.; CHAPAT, J.P.; SIMEON DE BUOCHBERG, M.; ATTISO, M. (1982) *Eur. J. Med. Chem.* 17: 109.
(25) KIRSCHNER, G.L.; KOWALSKI, B.R. (1979) *"The Applications of Pattern Recognition to Drug Design" Drug. Design* 8: 73.
(26) KOPPEL, I.A.; PALM, V.A. (1972) *"The Influence of the Solvent on Organic Reactivity"* en Advances in Free Energy Relationships (Chapman, N.B.; Shorter, J. Eds.), Plenum Press, London.
(27) LEWI, P.J. (1976) *Drug Design* 7: 209.
(28) LOTTA, T.; TASKINEN, J.; BÄCKSTRÖM, R.; NISSINEN, E. (1992) *J. Comput.-Aided Mol. Design* 6: 253.
(29) MANAUT, F.; CLARAMUNT, R. (1993) "Parámetros o factores descriptores de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos orgánicos y relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) en el diseño de fármacos" en Introducción a la Química Farmacéutica (Avendaño, C. Ed.), Interamerican-McGraw-Hill, p.73.
(30) MARTIN, Y.C.; HOLLAND, J.B.; JARBOE, C.H.; PLOTNIKOFF, N. (1974) *J. Med. Chem.* 17: 409.
(31) MOREAU, G.; BROTO, P. (1980) *New. J. Chem.* 4: 757.
(32) MOREAU, G.; BROTO, P.; FORTIN, M.; TURPIN, C. (1988) *Eur. J. Med. Chem.* 23: 275.
(33) MORIGUCHI, I.; KOMATSU, K.; MATSUSHITA, Y. (1980) *J. Med. Chem.* 23: 20.
(34) PHARN TAN LUU, R.; MATHIEU, D. (1993). Conjunto de programas NEMROD, Universidad de Aix-Marsella III, Francia.
(35) SERRANO, J.L.; MARCOS, M.; MELÉNDEZ, E.; ALBANO, C.; WOLD, S.; ELGUERO, J. (1985) *Acta Chem. Scand.* B39: 329.
(36) SILIPO, C.; VITTORIA, A. (1990) *"Three-Dimensional Structure of Drugs"* en Comprehensive Medicinal Chemistry (Hansch, C.; Sammes, P.G.; Taylor, J.B. Eds.), Pergamon Press, Oxford 4: 153.
(37) TAYLOR, P.J. (1990) *"Hydrophobic Properties of Drugs"* en Comprehensive Medicinal Chemistry (Hansch, C.;Sammes, P.G.; Taylos, J.B. Eds.) Pergamon Press, Oxford 4:241.
(38) TETKO, I.V.; LUIK, A.I.; PODA, G.I. (19993) *J. Med. Chem.* 36: 811.
(39) WILLETT, P.; WINTERMAN, V.; BAWDEN, D. (1986) *J. Chem. Inf. Computer Sci.* 26: 109.

Diseño de farmacos por conectividad molecular

JORGE GALVEZ ALVAREZ Y RAMÓN GARCÍA DOMENECH

Unidad de Investigación de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular.- Departamento de Quimica Física.- Facultat de Farmacia.- Universitat de Valencia

1. INTRODUCCIÓN

La topología puede definirse como aquella parte del álgebra que estudia las posiciones e interconexiones de los elementos dentro de un conjunto. Aplicada a las moléculas, ha dado origen a una nueva disciplina llamada "topología molecular", que analiza cuales son las posiciones de los átomos dentro de las moléculas. Desde este punto de vista no se aborda el estudio de aspectos tales como la estructura tridimensional del compuesto, los tipos de enlaces, ángulos entre ellos y, a veces, ni siquiera la naturaleza de los átomos enlazados. La cuestión fundamental estriba en qué átomo está ligado a cualquier otro y cúal es el camino para ir de un átomo a otro dentro de la molécula.

El método topológico emplea los llamados "índices" para caracterizar estructuralmente a un compuesto. Para definir dichos índices, el primer paso es representar a los átomos por puntos y a los enlaces por segmentos (a los que se denomina "ejes"), eliminándose los átomos de hidrógeno. De esta manera, se obtiene el "grafo" de la molécula. Despues, se numeran aleatoriamente los distintos átomos (o "vértices" en expresión topológica) y se construye la "matriz topológica" , cuyos elementos t_{ij} valen un número entero o cero dependiendo de que el átomo "i" esté enlazado al "j" o no. A partir de esta matríz y de los algoritmos adecuados, se obtienen los índices topológicos más importantes. Estos índices son, por tanto, descriptores numéricos de la estructura molecular.

Una vez obtenido un índice (o varios), se establecen correlaciones entre ellos y diferentes propiedades moleculares, para grupos de compuestos más o menos homogéneos;así se pueden enunciar ecuaciones que relacionan tales propiedades con la estructura molecular, caracterizada a través de sus índices. Estas ecuaciones se conocen como "funciones de conectividad" (la conectividad representaría el "ensamblaje" topológico entre los elementos). Si se calculan entonces los valores de los índices de nuevas moléculas, es decir de moléculas no utilizadas en la correlación, y se sustituyen en la ecuación, se podrá predecir el valor de la propiedad correlacionada para ese nuevo compuesto, el cual puede incluso no tener aún una existencia física.

El primer índice topológico capaz de caracterizar la "ramificación" de un grafo, fué propuesto por Wiener (Wiener, 1947). El índice se basaba en el concepto topológico de "distancia", entendida como el número de enlaces entre dos átomos por el camino más corto. Aunque desde el principio se comprobó que el índice de Wiener mostraba muy buenas correlaciones con propiedades sencillas (como la temperatura de ebullición), sólo recientemente se ha comprobado su extraordinaria versatilidad, que permite, por ejemplo, el establecimiento de excelentes correlaciones con las energías de enlace de algunas moléculas complejas, como pueden ser los hidrocarburos policíclicos aromáticos o las espiromoléculas, lo que posibilita la predicción de propiedades tan importantes como las frecuencias de aparición de las bandas UV-visible o la conductividad eléctrica, entre otras, para compuestos aún no sintetizados en el laboratorio.

Otros muchos índices se han definido desde finales de los 40, entre los que podemos destacar los de Gordon y Scantlebury (Gordon, 1964), Hosoya (Hosoya, 1971) o Balaban (Balaban, 1982) por citar sólo algunos de los más difundidos; sin embargo, los que han demostrado una mayor eficacia en diferentes aplicaciones han sido los llamados "índices de conectividad molecular", introducidos por Kier y Hall (Kier, 1976a), como generalización del índice de Randic, que había sido definido por este profesor de la Universidad de Drake (Randic, 1975). Dada su importancia, vamos a describirlos con detalle en el siguiente apartado.

2.- LOS INDICES DE CONECTIVIDAD.

El primero en demostrar que una molécula podía ser representada por una matríz fué el matemático Sylvester en el siglo pasado (Sylvester, 1874). Dicha matriz, como antes se apuntó, se llama "**matriz topológica**" o "**adyacente**". Para construir la matriz, en primer lugar se dibuja el grafo correspondiente a la molécula estudiada, suprimiendo los hidrógenos (grafo de hidrógenos-suprimidos). A continuación, se numeran los átomos (o vértices) del grafo sin importar el orden en que se haga (los índices topológicos se llaman también "invariantes de grafo" precisamente porque su cálculo debe ser independiente del orden de numeración seguido). Finalmente se construye la matriz topológica, sabiendo que un término t_{ij} de la misma tendrá el valor 1, 2 , 3 o 4 cuando haya uno, dos, tres o cuatro enlaces o ejes entre el vértice "i" y el vértice "j", respectivamente, y tendrá el valor 0 cuando no haya enlace entre ellos . Esta matríz cuadrada de "n" filas por "n" columnas, siendo "n" el número de vértices del grafo, es simétrica respecto de su diagonal principal. La valencia δ_i de cada vértice es el número de ejes que convergen en él, lo que es igual a la suma de los términos que hay en la fila o columna correspondientes a dicho vértice. Como se aprecia, es una expresión matemática que relaciona la estructura con una descripción

numérica. Su importancia en los estudios estructura-actividad radica en que a partir de ella se calculan la mayoría de los índices topológicos. La figura 1 ilustra la construcción de la matríz topológica para el isopentano y el ciclohexano, junto con los valores obtenidos para las valencias de los diferentes átomos.

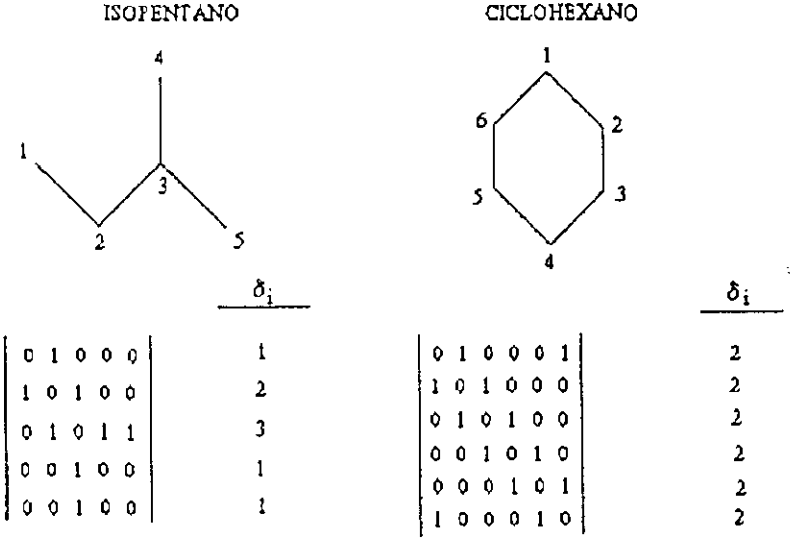


Figura 1.- Representación de estructuras como grafos y matrices

El índice de Rándic, que se define como la suma, para todos los ejes del grafo, de los inversos de las raices cuadradas de los productos de las valencias de los dos vértices adyacentes que limitan cada eje, puede obtenerse fácilmente a partir de la matríz topológica. La figura 2 refleja, con todo detalle, el procedimiento seguido para el cálculo del índice de Randic en el caso del 3metil pentano.

Para definir los índices de conectividad molecular a partir del de Randic, es necesario introducir antes el concepto de **subgrafo,** entendiendo por tal cualquier parte de un grafo constituido por sus vértices ó bién por uno o varios ejes interconectados. Los subgrafos se clasifican según su orden (m) y su tipo (t). El orden de un subgrafo no es más que el número de ejes que contiene, bien entendido que, a los solos efectos de su clasificación, los enlaces múltiples deben considerarse como simples. Los subgrafos se clasifican en cuatro tipos:

- Tipo I o tipo PATH (t = p), que son aquellos subgrafos en los que las valencias de sus vértices son menores o iguales a 2, sin formar un ciclo.

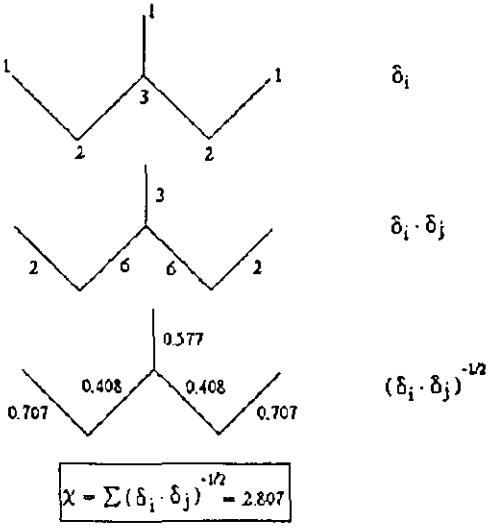


Figura 2.- Cálculo detallado del índice de ramificación de Randic para el 3metil. pentano

- Tipo II o tipo CLUSTER (t = c), constituido por aquellos subgráfos que tienen al menos algun vértice con valencia 3 ó 4, pero ninguno con valencia 2, siempre que no formen un ciclo.
- Tipo III o tipo PATH-CLUSTER (t = pc). Son los subgrafos que incluyen vértices con valencias 2, además de algunos con valores 3 o 4, sin formar un ciclo.
- Tipo IV o tipo CHAIN (t = ch), formado por secuencias de enlaces conteniendo al menos un ciclo.

La figura 3 muestra los distintos subgrafos del isopentano.

Los índices de conectividad ${}^{m}\chi_t$ corresponden en cada caso a la suma, para todos los subgrafos de tipo t y orden m :

$$ {}^{m}\chi_t = \sum_{j=1}^{n_m} {}^{m}S_j $$

donde n_m es el número de subgrafos tipo t y de orden m .

Los términos ${}^{m}S_j$ se definen como el inverso de la raiz cuadrada del producto de las valencias de los vértices integrantes del subgrafo:
donde j define a un subgrafo en particular. El número de valencias a multiplicar δ_i depende del tipo de subgrafo; así, los subgrafos tipo chain

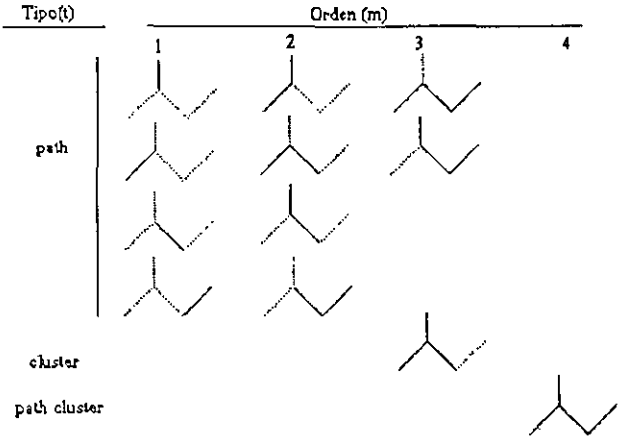


Figura 3.- Subgrafos del isopentano (trazos contínuos)

$$ {}^{m}S_j = [\prod_{i=1}^{m+1} (\delta_i)]^{-1/2} $$

están definidos por m vértices como máximo, mientras que los restantes tipos están definidos por m+1 vértices, siendo m el orden del subgrafo. Los índices de conectividad se obtienen pués como suma, para todos los subgrafos de un mismo tipo, de los inversos de las raices cuadradas de los productos de las valencias de los vértices adyacentes que forman parte de cada subgrafo.

Veamos, detalladamente, el cálculo y significación estructural de cada uno de los índices.

- **Indice de orden cero** (${}^{0}\chi$)

Un subgrafo de orden cero consiste en un vértice aislado, es decir, sin ejes. Por lo tanto ${}^{0}\chi$ es la suma del inverso de la raíz cuadrada de las valencias de todos los vértices del grafo:

$$ {}^{0}\chi = \sum_{i=1}^{m+1} (\delta_i)^{-1/2} $$

Hay solo un tipo de vértice, representados por su valencia δ_i. Por lo tanto, hay un solo tipo de subgrafo de esta clase. Para series homólogas este índice aumenta $2^{-1/2} = 0.707$ por la adición de cada grupo metileno. En su

cálculo no se utilizan relaciones de adyacencia, siendo una simple medida del número y tipo de puntos de enlace de una molécula. Este índice, como se desprende de su misma formulación, da una idea del tamaño de la molécula dependiendo del número de átomos pero reflejando, al mismo tiempo el grado de ramificación. Dada su naturaleza, presenta el mismo valor para un amplio número de compuestos. Así, por ejemplo, es el mismo para el 2-metilpentano y 3-metilpentano.

-Indice de primer orden ($^1\chi$)

Es la suma, para todos los subgrafos de orden uno, de la inversa de la raíz cuadrada del producto de las valencias de sus vértices. Hay sólo un tipo de eje y por tanto un solo tipo (path) de subgrafo de orden uno:

$$^1\chi = \sum_{s=1}^{n} (\delta_i \delta_j)_s^{-1/2}$$

donde el número de ejes del grafo es n , y cada enlace viene determinado por los vértices i y j. Como se vé por su formulación, este índice coincide con el de ramificación de Randic. Dado que la relación de adyacencia entre átomos vecinos se tiene en cuenta para su obtención, posee mayor capacidad para distinguir entre isómeros, sin embargo está influido, no sólo por el número y tipo de átomos, sino también por el plegamiento de la cadena. De todos modos no puede considerarse como un descriptor único y así, tienen valores idénticos algunos isómeros (por ejmplo el 3-metilheptano y el 4-metilheptano).

- Indice de segundo orden ($^2\chi$).

Los subgrafos de este orden contienen pares de conexiones, es decir, ejes adyacentes de un único tipo: el tipo path. Cada término contiene el inverso de la raíz cuadrada del producto de las valencias del grafo para los tres vértices (i, j y k) que definen cada subgrafo de orden dos, es decir:

$$^2\chi = \sum_{s=1}^{n} (\delta_i \delta_j \delta_k)_s^{-1/2}$$

donde n es el número de subgrafos de orden dos y s identifica a un subgrafo en particular. Este índice describe la presencia de ramificación o ciclación, como demuestran los estudios de Murray y col. (Murray, 1975). Otros autores proponen este índice como una medida de las formas estructurales de los dobles enlaces. En alcanos no se han detectado redundan-

cias en los valores de $^2\chi$ y esto parece que puede generalizarse para todas las moléculas orgánicas.

- Indice de tercer orden ($^3\chi$)

Este índice engloba tres tipos de términos: path, cluster y chain, medidos por:

donde n es el número de subgrafos de orden tres de cada tipo, y s designa a un subgrafo en particular, formado por los ejes entre los cuatro vértices (i, j, k y l). El término chain $^3\chi_{ch}$ está definido únicamente por tres vértices. Este índice muestra el grado de ramificación de los cuatro átomos que forman el subgrafo. El índice path refleja algunas de las diferencias existentes entre las ramificaciones de los isómeros, mientras que para moléculas orgánicas cíclicas distingue entre los compuestos orto, meta y para. Para el término $^3\chi_c$ no se han detectado redundancias.

- Indice de orden cuarto ($^4\chi$)

Es el primer índice en el que se encuentran todos los tipos de términos: path, cluster, path-cluster y chain. Contiene la suma de todos los tipos y se calcula de la siguiente forma:

$$^4\chi = \sum_{s=1}^{n} (\delta_i \delta_j \delta_k \delta_l \delta_p)_s^{-1/2}$$

donde n es el número de subgrafos de un cierto tipo t , con cuatro ejes y cinco vértices (i, j, k, l y p), y s designa a un subgrafo en particular. Del término que conocemos más datos es el $^4\chi_{pc}$, quizá porque sea de todos ellos el que refleja características estructurales más importantes para el comportamiento de las moléculas orgánicas. Este índice lleva información sobre el número de sustituyentes del anillo bencénico, el modo de sustitución, la longitud de los sustituyentes superiores a tres enlaces y el tipo de heteroátomos que incluyen, apareciendo siempre que existe un punto de ramificación en una cadena o anillo y aumentando su valor con la ramificación. Cada sustituyente del anillo contribuye por lo menos con dos términos a este índice. Es ideal para describir las formas relacionadas con la sustitución del anillo, por ejemplo, en las posiciones orto, meta y para.

Indices de orden superior

Su cálculo se realiza de manera análoga a los anteriores; generalizando para orden m, es decir, subgrafos con m enlaces, tenemos:

$$ {}^{m}\chi = \sum_{s=1}^{n} \{ [\prod_{i=1}^{m+1} (\delta_i)]^{-1/2} \}_s $$

donde n es el número de subgrafos de orden m con m+1 vértices, δ_i es la valencia particular de cada vértice y s designa a un subgrafo en particular. Parece ser que su importancia es bastante menor respecto a los anteriores. ${}^{6}\chi_p$ aumenta del mismo modo que lo hace la longitud de las cadenas laterales cíclicas en contraste con las lineales, siendo un descriptor de la ciclación. Otros señalan a ${}^{6}\chi_{ch}$ como un descriptor de la sustitución en el anillo (Kier, 1986b).

En todo caso la serie completa de índices es una caracterización única de la estructura química, es decir, son específicos de ella y no se repiten, en su conjunto, en ninguna otra, siendo esta una de las mayores ventajas de la conectividad molecular frente a otros métodos R.C.E.A. (Relaciones Cuantitativas Estructura Actividad).

En el caso de moléculas con heteroátomos, que es el más frecuente, es necesario introducir un valor para la valencia del heteroátomo. Aunque se han ensayado distintos algoritmos (Murray, 1976) (Kier, 1976c),el valor más aceptado es:

$$ \delta^v = Z^v - H $$

siendo Z^v el número de electrones de valencia y H el número de átomos de hidrógeno a los que se une el heteroátomo.

La Tabla I muestra los valores de las valencias (δ^v) para los heteroátomos más usuales, calculados por este último método. Según lo expuesto, el valor de δ para los halógenos debería ser 7 para todos ellos, sin embargo esto no conduce a buenas correlaciones, por lo que estos valores se han obtenido de forma empírica a partir de la correlación de los índices de distintas moléculas que contienen halógenos, con la refracción molar. Los valores así calculados se han contrastado frente a la temperatura de ebullición, dando buenos resultados (Hall, 1975). Para el azufre y el fósforo, el valor de las valencias se determina también de forma empírica (Murray, 1975) (Murray, 1976).

TABLA I
Valores de las valencias δ^v para distintos heteroátomos.

GRUPO	δ^v	GRUPO	δ^v
NH_4^+	1	H_3O^+	3
NH_3	2	H_2O	4
N (Amina 1°)	3	-OH	5
N (Amina 2°)	4	-O-	6
=NH	4	=O	6
N (Amina 3°)	5	O (grupo nitro)	6
=N-	5	O (grupo carbox.)	6
N (grupo azida)	4	-F	7
N (grupo nitro)	6	-Cl	0.690
-Br	0.254	-S-	1.33
-I	0.15	=S	0.99
-P-	0.560	S(grupoSO_2)	2.67
=P- y P(5-)	2.22		

Los índices de conectividad calculados teniendo en cuenta la valencia de los heteroátomos, se llaman "de valencia" ($^m\chi^v_t$).

La Tabla 2 muestra los valores de los índices de conectividad, tanto de valencia como de no valencia (es decir calculados considerando a los heteroátomos como si fuesen átomos de carbono) para un grupo heterogéneo de moléculas.

Una vez calculados los índices, se obtiene la función de conectividad para una propiedad molecular P(χ), correlacionándolos con valores experimentales de la propiedad, haciendo uso de paquetes estadísticos de correlación multilineal:

$$P(\chi)=A_0+\sum_{i=1}^{m} A_i\chi_i$$

donde A_0 y el conjunto de términos A_i representan los coeficientes de regresión de la ecuación obtenida y χ_i simboliza a cada uno de los índices de conectividad de un orden y tipo dado.

Si sustituimos ahora los valores de los índices χ_i en la función de conectividad, para moléculas no utilizadas en la correlación, podremos predecir el valor teórico de la propiedad P para ese compuesto, el cual puede incluso no haber sido aún sintetizado en el laboratorio.

TABLA II

Indices de conectividad para un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos.

Molécula	$^0\chi$	$^0\chi^v$	$^1\chi$	$^1\chi^v$	$^2\chi$	$^2\chi^v$	$^3\chi_p$	$^3\chi^v_p$
Butanol	4.121	3.568	2.414	2.023	1.353	1.077	0.707	0.512
2M-Propanol	4.284	3.732	2.270	1.879	1.802	1.576	0.816	0.365
Etanol	2.707	2.154	1.414	1.023	0.707	0.316	0.000	0.000
Fenol	4.387	3.834	2.411	2.134	1.655	1.335	0.941	0.756
Trietilamina	5.699	5.569	3.346	3.070	2.091	1.620	1.732	1.342
Cloroetanol	3.414	3.065	1.914	1.667	1.000	0.826	0.500	0.269
Formaldehido	1.414	1.115	0.500	0.289	0.000	0.000	0.000	0.000
1-Nitrobutano	5.699	4.424	3.270	2.361	2.536	1.398	1.135	0.680
1,3-Butadieno	2.569	2.569	1.150	1.150	0.471	0.471	0.167	0.167
2M-Butano	4.284	4.284	2.270	2.270	1.802	1.802	0.816	0.816
Propanoico	3.914	3.063	1.914	1.488	1.311	0.747	0.604	0.302
Acetofenona	5.594	5.295	3.014	2.865	2.146	1.922	1.267	1.180
Dibutileter	6.950	6.651	4.414	3.992	2.768	2.319	1.707	1.284
Quinolina	5.619	5.489	3.405	3.264	2.347	2.196	1.659	1.512
Piridina	3.464	3.334	2.000	1.850	1.155	1.025	0.667	0.566

Molécula	$^3\chi_c$	$^3\chi^v_c$	$^4\chi_p$	$^4\chi^v_p$	$^4\chi_c$	$^4\chi^v_c$	$^4\chi_{pc}$	$^4\chi^v_{pc}$
Butanol	0.000	0.000	0.354	0.158	0.000	0.000	0.000	0.000
2M-Propanol	0.408	0.408	0.000	0.000	0.000	0.000	0.408	0.183
Etanol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Fenol	0.167	0.075	0.534	0.428	0.000	0.000	0.192	0.086
Trietilamina	0.204	0.158	0.866	0.671	0.000	0.000	0.612	0.474
Cloroetanol	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Formaldehido	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
1-Nitrobutano	0.408	0.058	0.612	0.273	0.000	0.000	0.289	0.041
1,3-Butadieno	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2M-Butano	0.408	0.408	0.000	0.000	0.000	0.000	0.408	0.408
Propanoico	0.250	0.065	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.065
Acetofenona	0.260	0.185	0.723	0.673	0.000	0.000	0.443	0.331
Dibutileter	0.000	0.000	1.030	0.595	0.000	0.000	0.000	0.000
Quinolina	0.167	0.148	1.133	1.016	0.000	0.000	0.385	0.331
Piridina	0.000	0.000	0.385	0.313	0.000	0.000	0.000	0.000

3. ALGUNOS RESULTADOS DE INTERES.

Aunque el método de conectividad molecular ha demostrado ampliamente su utilidad en la predicción de propiedades físicas y químicas de las moléculas (Kier, 1976d) (Randic, 1983) (Ciudad, 1987), surge la pregunta: ¿Es igualmente válido en la predicción de propiedades biológicas? Para responder a esta cuestión, son necesarias algunas consideraciones

previas: En primer lugar, las propiedades "biológicas" no suelen ser de una determinación tan precisa como las fisicoquímicas, siendo, con frecuencia, el resultado de medidas estadísticas, notablemente variables de uno a otro indivíduo o lote. Por otra parte, muchas de las propiedades biológicas son menos específicas que las físicas o las químicas, es decir, están menos ligadas a la estructura molecular y más relacionadas con el tamaño, la presencia de determinados grupos funcionales, el carácter hidrófilo o lipófilo,etc... Aunque estas circunstancias limitan obviamente la aplicabilidad del método al estudio de este tipo de propiedades, diversos autores han llegado a resultados muy sugerentes.Por ejemplo, Murakami y Fukami han establecido interesantes dependencias entre los índices de conectividad y la unión a proteinas celulares de un grupo de pesticidas(Murakami, 1985). Por su parte, Kier y Hall han correlacionado una amplia variedad de propiedades biológicas y farmacológicas (Kier, 1976e), llegando en algunos casos, a notables concordancias entre valores teóricos y experimentales. Como ejemplo señalemos la excelente correlación obtenida para la acción anestésica local con el índice $^{1}\chi$ (Kier,1976f), o la también excelente corrrelación obtenida entre el logaritmo de la concentración de inhibición del *M. Tuberculosis* por un conjunto de alquil-bromofenoles y el indice $^{1}\chi^{v}$ (Kier, 1976g), o incluso, el más curioso aún del sabor dulce de las nitroanilinas (Kier, 1976h).

Particularmente interesantes son los trabajos de aplicación al estudio de fármacos, reseñados por Kier y Hall. Señalemos, a título ilustrativo, la buena correlación obtenida con el potencial de semionda y los índices $^{2}\chi$ y $^{3}\chi_{p}^{v}$, para la inhibición de la MAO por hidrazidas(Kier, 1986a). Otros trabajos han demostrado la potencial utilidad de los índices de conectividad en la predicción de diversas acciones farmacológicas o patogénicas, tales como la antivírica (Kier, 1986b), anestésica (Dipaolo, 1979) (Bindal, 1980) o carcinogénica (Strekowski, 1988).

Todos estos resultados son ya muy significativos en cuanto a las posibilidades de aplicación del método de conectividad molecular al estudio de propiedades biológicas y farmacológicas, sin embargo, es importante señalar que dada la naturaleza compleja de muchas de las propiedades farmacológicas, los datos estadísticos deben ser manejados con precaución. Así por ejemplo, la obtención de altos valores de desviación standard en las correlaciones, no implica necesariamente resultados desechables. En efecto, en muchos casos, la obtención de un aceptable coeficiente de correlación es mucho más significativo y orientativo del ajuste de la propiedad predicha.

Por otra parte, los resultados obtenidos por la ***"Unidad de investigación de diseño de fármacos y conectividad molecular"*** de la Universitat de Valencia, ilustran claramente la eficacia del método en la

predicción de propiedades farmacológicas ,ello a pesar de haber utilizado únicamente los índices hasta el 4^0 orden,en razón de que la experiencia demostró una más que suficiente capacidad descriptora.

Así y por reseñar solo algunos ejemplos significativos, para un grupo de sulfonamidas se han obtenido resultados de interés con propiedades farmacocinéticas; en efecto, se consiguió una aceptable correlación para la semivida de eliminación por orina ($t_{1/2}$), utilizando sólo dos índices $^1\chi^v$ y $^2\chi$. La comparación entre valores observados y calculados junto con la ecuación utilizada, se reflejan en la Tabla III.

También se obtuvieron buenas correlaciones para el porcentaje de unión a proteinas plasmáticas de un grupo de hipolipemiantes. La Tabla IV ilustra dichos resultados (Cercós, 1993).

En cuanto a propiedades microbiológicas, podemos destacar los buenos resultados obtenidos para la concentración inhibitoria mínima del *Staphylococcus aureus* con cefalosporinas (Tabla V) (Moliner, 1989).

TABLA III

Comparación entre valores observados y calculados para la semivida de eliminación por orina ($t_{1/2}$) de un grupo de sulfonamidas.

Compuesto	Valor Obs*(h.)	Valor Calc #(h.)	Residual
Sulfisomidina	6.5	7.2	-0.7
Sulfadiazina	17.0	26.9	-9.9
Sulfamerazina	24.0	16.4	7.6
Sulfadimidina	7.0	5.7	1.3
Sulfametoxipiridazina	34.0	31.2	2.8
Sulfametoxazol	11.0	11.9	-0.9
Sulfametomidina	27.0	26.9	0.1
Sulfadimetoxina	40.0	37.9	2.1
Sulfatiazol	4.0	5.8	-1.8
Sulfisoxazol	5.5	6.6	-1.1
Sulfactidol	6.0	9.6	-3.6
Sulfacetamida	13.0	9.8	3.2

* (Arviza, 1985)

Utilizando la ecuación: $t_{1/2} = -13.76 + 64.23\ ^1\chi^v - 79.08\ ^2\chi^v$

n = 12 r = 0.9391 SD = 4.24 F = 33.61

TABLA IV

Comparación entre los valores observados y calculados para la Unión a Proteínas Plasmáticas (UPP) de un grupo de fármacos hipolipemiantes.

Compuesto	Valor Obs*(%)	Valor Calc #(%)	Residual
Probucol	5.0	5.7	-0.7
Doxazosina	98.5	98.8	-0.3
Lovastatina	95.0	100.7	-5.7
Simvastatina	95.0	83.0	12.0
Pravastatina	55.0	60.2	-5.2
Fenofibrato	99.0	100.1	-1.1
Gemfibrozilo	96.0	91.0	5.0
Bezafibrato	95.0	93.7	1.3
Clofibrato	96.4	102.9	-6.5
Acifran	88.0	84.1	3.9
Ciprofibrato	69.5	71.8	-2.3

* (Cercós, 1993)

Utilizando la ecuación: $UPP = 111.1 - 26.75\,{}^{0}\chi + 32.00\,{}^{0}\chi^{v} - 32.45\,{}^{3}\chi_{c}$

n = 11 r = 0.982 SD = 6.48 F = 63.57

TABLA V

Comparación entre los valores observados y calculados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para Staphylococcus aureus con cefalosporinas

Compuesto	Valor Obs* (mg/L)	Valor Calc # (mg/L)	Residual
Cefalotina	0.20	0.42	-0.22
Cefazolina	0.25	-0.26	0.51
Cefradina	3.00	2.61	0.39
Cefalexina	3.00	2.83	0.17
Cefotetan	6.00	6.43	-0.43
Cefoperazona	1.20	1.29	-0.09
Cefoxitina	1.50	2.08	-0.58
Moxalactam	6.00	4.75	1.25
Cefamandol	0.15	0.08	0.07
Cefotaxima	1.50	1.77	-0.27
Ceftizoxima	2.06	1.17	0.89
Cefuroxima	0.62	0.54	0.08
Ceftriaxona	4.12	3.34	0.78
Cefacetrilo	0.70	1.24	-0.54
Cefaloridina	0.06	-1.12	1.18
Ceftazidima	6.00	5.59	0.41
Cefsulodina	4.00	3.56	0.44
Cefmenoxima	0.25	1.40	-1.15

* (Molíner, 1989)

Utilizando la ecuación: $CMI = 0.54 - 2.04\,{}^{3}\chi_{p} + 4.18\,{}^{4}\chi_{pc} - 0.34N^{a} + 1.19R^{b}$

n = 18 r = 0.955 SD = 0.64

[a] N es el número de átomos distintos de hidrógeno de la molécula.

[b] R es el número de ramificaciones de la estructura molecular.

Otros muchos resultados (Kier, 1975) (Soler, 1992) (García, 1991) demuestran claramente la eficacia de los índices de conectividad en la predicción de propiedades farmacológicas.

4. DISEÑO DE FARMACOS. APLICACION DE LA TOPOLOGIA MOLECULAR.

En la actualidad, podemos distinguir claramente tres corrientes en el campo del diseño molecular,definidas por los métodos empleados:

a) Métodos tradicionales, en los que la investigación se basa, por un lado, en la obtención de nuevos descriptores moleculares, y, por otro, en el desarrollo de nuevos métodos estadísticos para obtener correlaciones entre estos descriptores y las propiedades de las moléculas.

b) Métodos mecano cuánticos,bastante más complejos que los precedentes, que obtienen las posiciones y energías de los átomos y electrones,siendo capaces de encontrar las conformaciones minimoenergéticas (que serán las más estables) de una molécula con actividad biológica o farmacológica.De su estudio se puede obtener orientación sobre la estructura tridimensional que deben poseer compuestos que actuarán de forma análoga o incluso superior al analizado inicialmente.

c) Métodos basados en la mecánica molecular. Estos métodos permiten la obtención de la conformación mínimo energética en base a principios de la mecánica clásica y al uso de la tecnología de representación gráfica más avanzada, Estos sistemas se basan en el uso de programas "modeladores-constructores", que permiten al usuario la construcción del esquema tridimensional de la molécula, que podrá ser modificado hasta llegar a la conformación deseada, y refinado posteriormente mediante cálculos de energía conformacional.

Es frecuente la utilización conjunta de los tres tipos de métodos.

Tal era el estado de la cuestión cuando el equipo de la *"Unidad de investigación de diseño de fármacos y conectividad molecular"* de la Universitat de Valencia inició, a comienzos de la década de los ochenta, una nueva vía para el diseño, asistido por ordenador, de nuevos fármacos, basada en la topología molecular (Galvez, 1991).

4.1.Descripción del método de diseño.

La esencia del método consiste en la utilización de las funciones de conectividad de forma inversa a la convencional, es decir, en lugar de emplearlas para predecir el valor que una determinada molécula va a poseer

para una propiedad dada, se trata de usarla para obtener la molécula o moléculas que posean un valor prefijado de esa propiedad.El desarrollo del método se lleva a cabo en distintas etapas:

- *Selección del grupo farmacológico a investigar.* La primera etapa consiste en la selección del grupo farmacológico a investigar. Dicha selección estará en función del interés que pueda presentar dicho grupo, de las disponibilidades bibliográficas, de las posibilidades de realización de futuros ensayos farmacológicos, etc...

- *Obtención de las funciones topológicas.* Tras el cálculo de los índices topológicos se obtienen,haciendo uso de potentes programas estadísticos, las funciones de conectividad, que nos establecen las ecuaciones de correlación entre las distintas propiedades estudiadas y los índices, entre los cuales se encuentran tanto los índices de conectividad como otros índices topológicos (García, 1991) .

- *Selección de las propiedades y condiciones limitantes.* Un aspecto de capital importancia es el establecimiento de las propiedades que nos van a definir el carácter farmacológico buscado en las nuevas estructuras diseñadas. La selección se realiza en base a los propios criterios establecidos en la bibliografia (por ejemplo, el carácter farmacológico puede ir ligado a la inhibición de determinados enzimas o a la acción sobre receptores específicos, etc...) así como atendiendo a criterios estadísticos,basados en el análisis discriminante,en los que se incluyen tanto propiedades farmacológicas como fisicoquímicas,así como índices topológicos.
- *Diseño molécular.* Esta etapa la constituye la ejecución de un paquete informático original que contiene varios módulos o subrutinas, encaminados a construir las posibles estructuras químicas, calcular sus correspondientes índices topológicos y seleccionarlas o no en función de que sus valores teóricos para las propiedades limitantes estén o no dentro de los márgenes prefijados. El sistema se estructura a diversos niveles, de manera que, en una primera aproximación, selecciona, dentro de intervalos muy amplios, las posibles "estructuras base" que pudiesen presentar acción farmacológica, para posteriormente, por medio de aproximaciones sucesivas, ir barriendo las estructuras derivadas que con condiciones más restrictivas puedan suponer unas mejores propiedades farmacológicas.La figura 4 ilustra un esquema de los módulos constitutivos del sistema así como sus interrelaciones. Como puede apreciarse,el conjunto se compone de seis módulos o subrutinas.Las cuatro primeras tienen como objeto la formación de enlaces carbono-carbono, mientras que la quinta cumple la función de agregar los distintos grupos funcionales.Por último,la sexta tiene la misión de calcular los índices topológicos y efectuar la selección molecular.En esencia,pués,el sistema opera construyendo fragmentos moleculares,que pueden constituir una nueva

molécula o bién adiciones a una estructura "base" previa, incorporando los grupos funcionales, calculando sus índices topológicos, sustituyéndolos luego en las funciones de conectividad y seleccionando la nueva estructura o no, en función de que los valores calculados estén o no dentro de los márgenes prefijados.

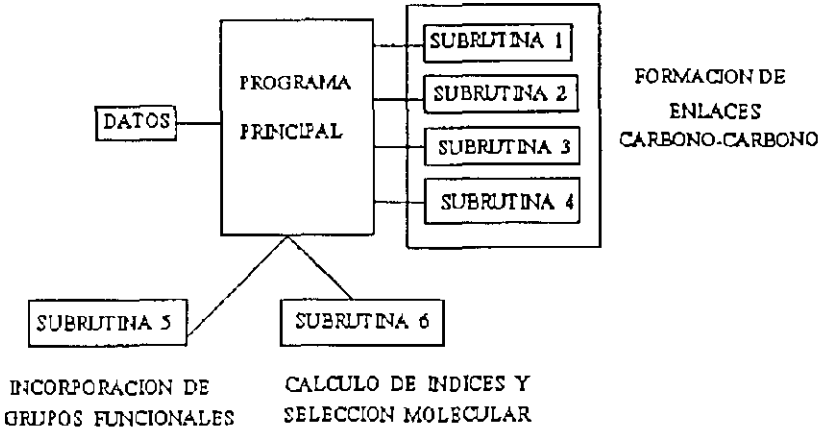


Figura 4.- Esquema de funcionamiento del sistema

La figura 5 refleja la secuencia de cuestiones que el sistema formula al usuario.De ellas, destacamos las relativas a los conceptos de "**combinación de valencias**" así como el de "**nivel de submuestreo**".Por la primera, entendemos el conjunto de valencias topológicas (es decir el número de ejes que convergen en cada vértice) que definen a una estructura.El sistema puede trabajar de dos formas: O bién "barriendo" todas las posibles combinaciones de valencia o seleccionando sólo aquellas elegidas por el usuario. Es evidente, pués, que para cada combinación de valencias puede haber un número muy alto de estructuras y de moléculas diferentes. Así, por ejemplo, el 2metil pentano,el 3metil pentano y el 2 pentanol poseen una misma combinación de valencias: la 3,2,2,1,1,1. Se hace necesario,en consecuencia,especificar al sistema el "nivel de submuestreo" deseado, que viene a representar la amplitud del barrido, en cuanto a heterogeneidad estructural, para un número dado de estructuras a ensayar. Así, por ejemplo si se pide al sistema que ensaye 1000 estructuras con nivel de submuestreo cero, probará las 1000 primeras de entre todas las posibles, mientras que si se le pide que lo haga con el máximo nivel de submuestreo, ensayará las 1000 estructuras lo más homogéneamente repartidas entre todas las posibles.

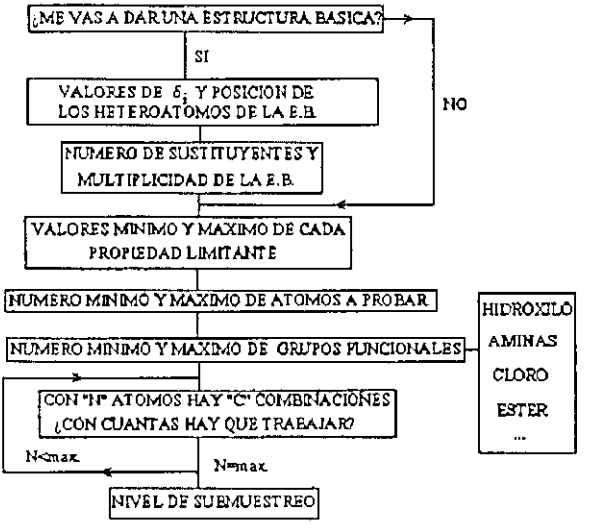


Figura 5.- Esquema de la entrada de datos para el diseño

-Comprobación analítica.

Antes de proceder a la utilización del sistema informático, se contrastó su correcto funcionamiento, así como su capacidad operativa. Se trataba, por tanto, de comprobar:

a) Si era capaz de construir todas las posibles estructuras químicas comprendidas en el intervalo de átomos deseado.

b) Si realizaba todas las combinaciones de grupos funcionales indicados por el usuario y los incorporaba posteriormente a las estructuras susceptibles de ello.

c) Si llevaba a cabo los dos puntos anteriores en el caso de habersele suministrado una estructura química base.

d) Finalmente si el sistema era capaz de "rediseñar" moléculas ya conocidas dándole los adecuados valores de las propiedades limitantes.

Los puntos a) y b) fueron comprobados poniendo en marcha el sistema con unos datos que permitiesen una fácil comprobación del correcto funcionamiento (así, se le pidió constituyese moléculas con 4 y 5 átomos que pudiesen incluir grupos ester, eter y amina primaria).El apartado c) fué desarrollado dándole como estructura básica un anillo aromático con dos sustituyentes en "orto" e incluyendo grupos amino, hidroxilo y eter.Po último, el apartado d) fué contrastado rediseñando dos moléculas: el acetato de propilo, a partir de los datos de la temperatura de ebullición de un grupo de esteres alifáticos, así como un fármaco del grupo de los beta-bloqueantes:

el oxoprenolol, basándonos en cuatro de sus propiedades farmacológicas (Bernal, 1988).

4.2.- Resultados

El método de diseño molecular que se describe puede aplicarse, en principio, a cualquier grupo terapéutico dentro del campo farmacéutico. De hecho, se han realizado estudios teóricos en diferentes grupos de fármacos tales como hipnóticos (Cantero, 1987) o betabloqueantes (Vicent, 1987), con resultados teóricos sumamente interesantes, si bien no se han confirmado experimentalmente.

Los resultados contrastados experimentalmente que se tienen de la aplicación del método de diseño molecular se han centrado, hasta el momento, en el campo de los analgésicos no narcóticos, antimicrobianos , hipoglucemiantes orales y antivíricos.

A continuación se pasa a detallar los resultados más significativos obtenidos con cada grupo.

4.2.1.-Analgésicos no narcóticos

Un grupo de diecisiete compuestos fue seleccionado, de entre todos los catalogados por el ordenador como "teóricas moléculas con acción analgésica", en función principalmente de su fácil obtención, bién a través de síntesis o de catálogo comercial. Entre ellas hay derivados de estructuras químicas de reconocida acción analgésica (ácido acetil salicílico, pirazolonas, ...) y estructuras que pueden considerarse como inéditas en este campo y que pudieran constituir nuevas "cabezas de serie" como analgésicos (García-March, 1990). Ninguna de ellas había sido descrita con anterioridad como molécula con actividad analgésica.

Las pruebas farmacológicas que se han llevado a cabo con estos productos han sido tres:

1.- Confirmación de la actividad analgésica.
2.- Determinación de la dosis eficaz-50.
3.- Estudios de toxicidad aguda (dosis letal-50).

Todas ellas se han realizado con animales de laboratorio, (ratones de 20 - 30 g.) en número suficiente como para poder considerar fiables los resultados desde el punto de vista estadístico. La administración se realizó por vía intraperitoneal.

Las pruebas de analgésia se desarrollaron siguiendo el protocolo descrito por Witkin y colaboradores (Witkin,1961).

Los resultados se recogen en la Tabla VI y figura 6. Como puede observarse, de las moléculas ensayadas, hay diez que presentan una aceptable acción analgésica. En particular, el 2-(1-PROPENIL) FENOL (Patente nº P.9101034), con estructura totalmente diferente de las comercializadas en este campo y con un porcentaje de analgesia casi el doble que el ácido acetilsalicílico. La 2',4'-DIMETILACETOFENONA (Patente nº P.9101134) es otra estructura inédita en el campo de los analgésicos y con características parecidas a la anterior. A estas diez moléculas que presentaban una muy significativa actividad analgésica, se les realizaron pruebas de toxicidad aguda y eficacia. Los resultados obtenidos para la dosis letal-50 (DL50) y dosis eficaz-50 (DE50) ,de acuerdo con el protocolo de Miller y colaboradores (Miller, 1944), aparecen en la Tabla VI.

TABLA VI

Resultados obtenidos en el estudio de la actividad analgésica siguiendo el protocolo de Witkin para un grupo de estructuras químicas diseñadas y seleccionadas por el ordenador.

No.	Molecula	Analgesia (%)(mg/Kg)		DE_{50} (mg/Kg)	DL50
	Acido acetil salicílico (AAS)[a]	49.1	***	100.8	500.2
1	2-(1-Propenil)fenol	85.1	***	34.5	720.1
2	2',4'-Dimetilacetofenona	80.1	***	45.5	700.1
3	p-Metilpropiofenona	56.1	***	100.3	590.2
4	1-(para clorofenil) propanol	78.1	***	83.2	720.3
5	2-(1-Hidroxi-3-butenil)fenol	41.4	*	114.5	780.2
6	Acido 3-clorosalicílico	31.1	***	106.1	900.3
7	4-Benzoil-1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona	77.2	***	52.6	190.3
8	Sulfadiazina	43.5	*	112.1	> 2000
9	3-Amino-4-carbetoxi-pirazol	64.2	**	87.5	500.3
10	3-Metilpiridazina	45.2	***	121.1	> 2000
11	4-Hidroxiantipirina	14.1	*	---	---
12	p-cloropropiofenona	11.1		---	---
13	Acido vanillico	28.6	---		---
14	Acido 5-clorosalicílico	6.2	---	---	
15	3',4'-Dimetilacetofenona	6.3	---	---	
16	2-Metil-3-pentanol	21.4	---	---	
17	1-(p-clorofenil)propilamina	---	---	--	

* $p < 0.050$ ** $p < 0.010$ *** $p < 0.001$

[a] El AAS se tomó como fármaco de referencia en los ensayos de analgesia.

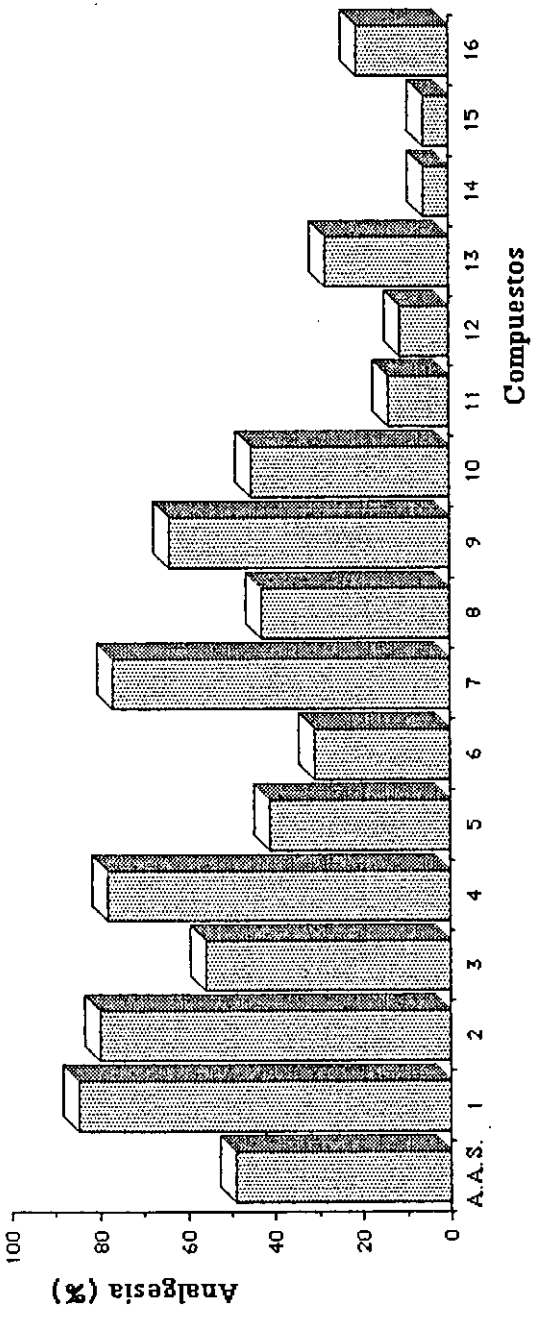


Figura 6.- Actividad analgésica de los compuestos 1 al 16 (numerado en la Tabla VI) en relación con la del ácido acetil salicílico

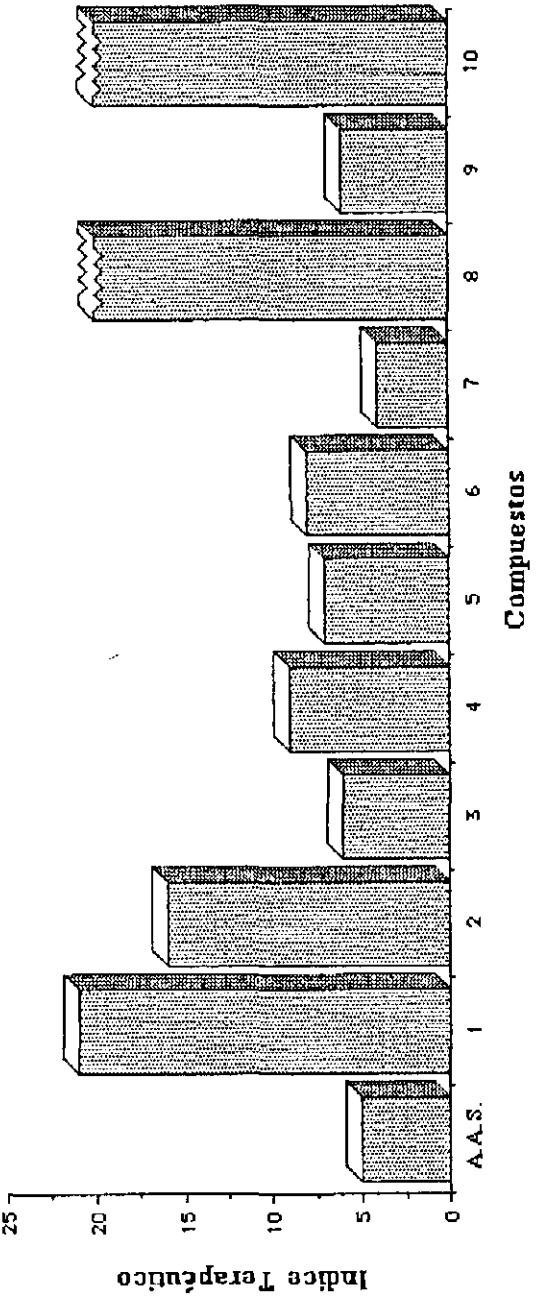


Figura 7.- Indices terapéuticos obtenidos para los compuestos del 1 al 10 (numerados en la Tabla VI) en relación con el ácido acetil salicílico

Es importante obtener ciertas relaciones cuantitativas entre los tipos de dosis estudiados, con el fin de establecer el grado de inocuidad de un medicamento; en este sentido, el valor más empleado es el índice terapéutico (relación entre la dosis letal 50 y la dosis eficaz 50). Para que un medicamento pueda considerarse seguro, dicho índice debe ser igual a 10 o más, aunque en algunas circunstancias es menor, en cuyo caso el medicamento debe ser empleado con cuidado; un ejemplo lo constituye el barbitúrico pentobarbital, cuyo índice terapéutico es 2.0 (Litter, 1986).

En este caso hay de destacar los índices terapéuticos obtenidos para el 2-(1-PROPENIL) FENOL, IT = 21, la 2',4'-DIMETILACETOFENONA, IT = 16 y la SULFADIAZINA, IT > 18, que ponen de manifiesto un muy aceptable grado de inocuidad, en cuanto a su toxicidad aguda, para los mismos (ver figura 7).

La figura 8 muestra algunos derivados de estos compuestos con posible actividad analgésica.

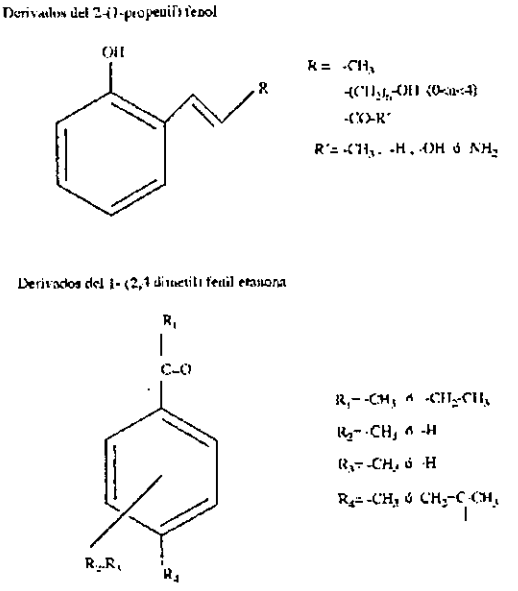


Figura 8.- Derivados del 2-(1-propenil)fenol y del 1-(2,4 dimetil)fenil etanona con posible actividad analgésica.

4.2.2.-Quimioterápicos Antimicrobianos

De entre las distintas estructuras químicas diseñadas por el ordenador como "teóricas moléculas con actividad antimicrobiana", se seleccionaron un grupo de siete. A todas ellas se les realizaron los correspondientes ensayos

microbiológicos siguiendo los métodos de difusión y de diluciones dobles progresivas, ambos en agar.

El método de difusión en agar se utiliza para confirmar la actividad antimicrobiana de las moléculas seleccionadas. Se basa en la difusión del producto en disolución, contenido en un cilindro vertical, a través de una capa de agar solidificado en una placa Petri, de tal manera que se inhibe el crecimiento del microorganismo añadido en un área circular alrededor del cilindro, denominada "halo de inhibición" (Formulario AEFI, 1988).

Se procede en primer lugar a seleccionar, para el antimicrobiano a valorar, el medio de cultivo. En nuestro caso se ha elegido el agar Mueller-Hinton para la siembra de microorganismos tipo Gram positivos (*Staphylococcus aureus* CECT* 240, *Staphylococcus epidermidis* CECT 231, *Micrococcus luteus* CECT 241) y Gram negativos (*Escherichia coli* CECT 405, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108 y CECT 110), y agar Malta para el hongo *Sacharomyces cerevisiae* CECT 1324.
*CECT = Colección Española de Cultivos Tipo. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universitat de Valencia.

TABLA VII
Sensibilidad de diferentes cepas de microorganismos frente al grupo de compuestos seleccionados. Concentración = 1 mg/mL.

MICROORGANISMO Y CEPA	COMPUESTO I	II	II	IV	V	VI	VII
Micrococcus luteus CECT 241	++	-	-	-	±	±	++
Staphylococcus aureus CECT 240	+	±	-	±	±	-	±
Staphylococcus epidermidis CECT 231	++	-	-	-	+	±	++
Escheridia coli CECT 405	+	++	++	+	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa CECT 108	±	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa CECT 110	++	-	-	-	-	-	-
Sacharomyces cerevisiae CECT 1324	+++	-	-	-	NE	NE	NE

(+)...sensible (-)...resistente
NE = producto no ensayado.
CECT = Colección Española de Cultivos Tipo. Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universitat de Valencia.
I: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno
II: Acido 5-nitroorótico (sal potásica monohidratada)
III: L-5-hidroxitriptófano
IV: 3-etil-2,5-dihidrotiofeno-1,1-dióxido
V: 3-cloro-5-nitroindazol
VI: 1-(4-nitrofenil)piperazina
VII: 1-fenil-3-metil-2-pirazolín-5-ona

La Tabla VII muestra la sensibilidad observada frente al grupo de moléculas seleccionadas.

Como se aprecia, el 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno muestra una destacada acción inhibitoria, que se ha puesto de manifiesto también en otras cepas ensayadas.

La Tabla VIII muestra la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el 1-fenil-3-metil-2-pirazolín-5-ona frente a distintas cepas, siguiendo el protocolo de Alvarez y col. (Alvarez, 1988).

TABLA VIII

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolin-5-ona, frente a distintas cepas de microorganismos.

MICROORGANISMO Y CEPA	Concentración (µg/mL) 5000	2500	1250	625	312	156	78	39
Micrococcus luteus CECT 241	+	+	+	+	+	+	-	-
Staphylococcus aureus CECT 240	+	+	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus epidermidis CECT 231	+	+	+	+	+	+	+	_

(+) inhibición del crecimiento.

Como puede observarse, el compuesto estudiado muestra una clara actividad antimicrobiana, actuando a bajas concentraciones sobre bacterias Gram positivas, especialmente sobre *Staphylococcus luteus* y *Staphylococcus epidermis* (Salabert, 1993).

4.2.3.-Hipoglucemiantes Orales

Los resultados obtenidos en este campo terapéutico son muy significativos. Tras seleccionar a un grupo de nueve moléculas de las diseñadas por el ordenador, se procedió a realizar los ensayos farmacológicos correspondientes.

Los ensayos seguidos en la determinación de la actividad hipoglucemiante se realizaron atendiendo a dos posibles mecanismos de acción: sobre los niveles basales de glucemia y sobre los niveles hiperglucémicos conseguidos mediante sobrecarga oral de glucosa (D'Alo, 1978). Se trabaja con ratas de la raza Wistar las cuales se mantienen las 18-24 horas anteriores a la experiencia en ayunas. Las ratas se dividen en distintos lotes (patrón vehículo, patrón glucosa, problema y control) con un número igual de ratas en cada uno de ellos.

Se administra el fármaco de referencia (Tolbutamida) al lote de ratas control por via oral con ayuda de una sonda esofágica, a una dosis de 300 mg/Kg de peso corporal, en una suspensión de metilcelulosa al 0.5%. Al mismo tiempo, se le administra por via oral al lote problema la misma dosis del producto objeto de estudio, e igualmente el vehículo utilizado al lote correspondiente. Doshoras después se administra la sobrecarga oral de glucosa (2 g/Kg) a todos los lotes de ratas excepto al lote patrón vehículo. A los treinta minutos de la administración de la glucosa, se procede a la extracción de las muestras de sangre a distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 minutos).

El acetato de 3-hidroxibutilo mostró actividad hipoglucemiante sobre los niveles normoglucémicos provocando un descenso del 20% de la glucemia basal (figura 9), mientras que el ácido 4-(3-metil-5-oxo-2-pirazolin-1-il) benzóico (figura 10) y el 1-(mesitilen-2-sulfonil)1H-1,2,3-triazol, presentaron marcada actividad hipoglucemiante en relación al fármaco de referencia (tolbutamida) (Anton,1992) en base a:

- Conseguir una hiperglucemia máxima inferior en un 30% a la obtenida con la tolbutamida.

- Restablecer los niveles normales de glucemia en el mísmo intervalo de tiempo que la tolbutamida.

- No provocar posterior hipoglucemia al no actuar sobre los niveles basales.

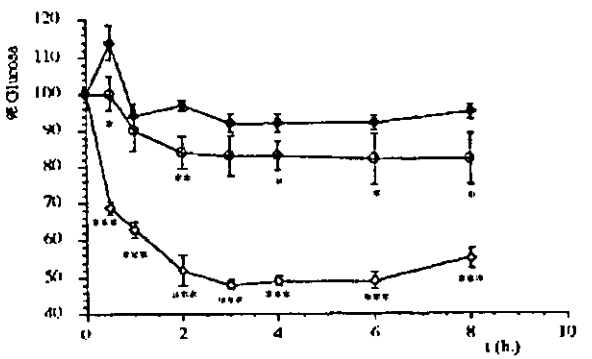


Figura 9.- Porcentaje de glucosa basal frente al tiempo para el acetato de 3-hidroxibutilo.

-o- Acetato de 3-hidroxibutilo

-◆- Vehículo.

-◇- Tolbutamida.

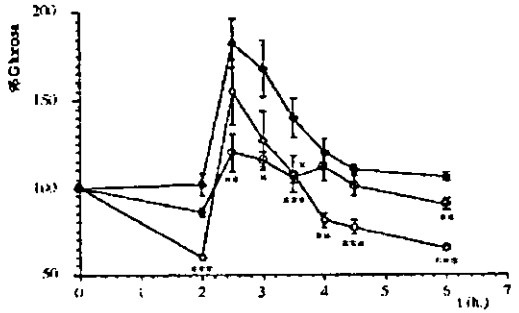


Figura 10.-Porcentaje de glucosa frente al tiempo para el ácido 4-(3-metil-5-oxo-2-pirazolin 1 il) benzóico, tras una sobrecarga oral de glucosa.
-o- ácido 4-(3 metil-5-oxo-2-pirazolin-1-il) benzóico
-♦- Vehículo.
-◇- Tolbutamida.

4.2.4.-Antivíricos

También se han obtenido resultados muy interesantes en cuanto al diseño de nuevas estructuras con actividad antivírica, cuya eficacia ha sido comprobada a través de ensayos en cultivos celulares tipo "Vero", siguiendo el protocolo de Daniel (Daniel, 1971) para virus de la familia *Herpesviridae*, en particular el *Herpes Simplex-tipo I.*

Los valores de Dosis-Eficaz-50 para distintas moléculas activas se ilustran en la Tabla IX.

TABLA IX
Actividad de diversos compuestos seleccionados, frente al vírus Herpes Simplex-I

Compuesto	Dosis eficaz-50 (µg/mL)
Malonato disódico	15920
Acido barbitúrico	6639
Acido 1,3,5-tris-(2-hidroxietil)cianúrico	3500
Acido succínico	2478
Acido glutárico	1116
Acido malónico	840
Acido adípico	317
Nitrofurantoina	<250
Acido 1,2,3-triazol-4,5-dicarboxílico	<250

Aunque estos valores son altos, son significativos, al mostrar los compuestos seleccionados actividad inhibitoria de la replicación viral. Más en concreto, los valores que presentan compuestos como la nitrofurantoina o el ácido 1,2,3 triazol-4,5 dicarboxílico (inferiores a 250μg/mL) son del orden de magnitud de los de algunos fármacos de uso clínico.. En particular, el último compuesto es completamente inédito en cualquier campo farmacológico.

5.- CONCLUSIONES MAS IMPORTANTES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.

Los resultados obtenidos con la aplicación del método de diseño topológico utilizado y expuesto en el apartado anterior, ponen de manifiesto el sorprendente grado de acierto conseguido (aproximadamente un 50%, como media, de las sustancias seleccionadas, mostraron la acción farmacológica prevista) en la búsqueda y selección de estructuras con actividad farmacológica, en diversos campos terapeúticos. Además hay un aspecto a destacar: se han obtenido estructuras que pueden considerarse como "nuevas cabezas de serie", lo que convierte al método en una herramienta de trabajo sumamente interesante para la obtención de nuevos fármacos, tanto más cuanto que la infraestructura informática necesaria para su desarrollo es muy elemental.

El método,no obstante,posee algunas limitaciones,que se derivan tanto de su carácter semiempírico como de su propia naturaleza (por ejemplo,no distingue isómeros ópticos o geométricos).Por ello,se hace conveniente el refinamiento posterior de las estructuras diseñadas, por otras vías, en particular por las basadas en la mecánica molecular o en cálculos mecano-cuánticos.

Estos resultados demuestran, sin embargo, que los métodos que utilizan la topología molecular representan un enfoque nuevo y original del estudio de la estructura molecular y constituyen una poderosa herramienta para la búsqueda de nuevos compuestos en diversos campos,y muy en particular en el farmacológico,lo que permite pronosticar que habrán de ser tenidos muy en cuenta en el futuro.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores desean expresar su agradecimiento a las personas e instituciones siguientes:

- Al Dr. Salmerón, del centro de Farmacobiología de Majadahonda y a la Dra. Gimeno del Dpto de Microbiología de la Universitat de Valencia por su inestimable ayuda en la realización de los ensayos antivirales.

- A los Prof. Dres Uruburu y García-López, del Dpto de Microbiología de la Universitat de Valencia por su colaboración en los ensayos microbiológicos.
- Al Dpto de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universitat de Valencia y muy en particular al Dr. J. Peris por su aportación a las pruebas hipoglucemiantes.
- Igualmente al Dpto de Farmacología de la Universitat de Valencia por su asesoramiento técnico en cuanto a ensayos de analgesia.

Finalmente, los autores expresan su mayor gratitud a los miembros del equipo de la Unidad de Investigación de Diseño de Fármacos y Conectividad Molecular del Departamento de Química Física de la Universitat de Valencia que se relacionan a continuación, sin cuya aportación no hubiese sido posible el desarrollo de la linea de investigación:

Prof. Dr. D. José Luís Moreno Frigols.
Prof. Dra Dña. Mª Teresa Salabert Salvador.
Prof. Dr. D. Facundo Pérez Gimenez.
Prof. Dr. D. Francisco García March.
Dr. D. Juan Bernal Montañés.
Dra. Dña. Rosa Soler Roca.
Dr. D. Gerardo Antón Fos.
Dr. D. Vicente de Julian Ortiz.

6. BIBLIOGRAFIA

Alvarez, M.V., Boquet, E y De Fez, J., (1988), *"Quimioterapia y antibioterapia"*, Manual de Técnicas en Microbiología Clínica., Ed. Garsi, S.A., Madrid.
Anton,G. (1992) *"Aplicación de la conectividad molecular al diseño de nuevos hipoglucemientes orales. Síntesis y ensayos farmacológicos"*. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia.
Arviza, M.P. (1985) *"Predicción e interpretación de algunas propiedades fisico-químicas y biológicas de un grupo de barbitúricos y sulfonamidas por el método de conectividad molecular"*. Tesis Doctoral.Universitat de Valencia.
Balaban, A.T. (1982) *Chem. Phys. Lett.* 89,399.
Bernal Montañés, J. (1988) *"Desarrollo de un nuevo método de diseño molecular asistido por ordenador. Su aplicación a fármacos betabloqueantes y benzodiazepínicos"*. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia.
Bindal, M.C.;Singh, P. y Gupta, S.P. (1980) *Arzneim.-Forsch.* 30, 234
Cantero,A. (1987) *"Predicción e interpretación de algunas propiedades farmacológicas de benzodiazepinas por el método de conectividad molecular"*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia.
Cercós del Pozo, R.A., (1993) *"Aplicación del método de conectividad molecular al diseño de nuevos fármacos hipolipemiantes"*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universitat de Valencia.
Ciudad, J.; García Domenech, R. y Gálvez, J. (1987). *An. Quim.* 83, 385
D'alo, G., Dalla Vedova, R., Cadel, S., Campi, G., Wassermann, A., (1978) *Boll. Chim. Farm.* 117, 348-367.
Daniel, M.D. y col. (1971) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 136, 1192-1196
Dipaolo, T.D.; Kier, L.B. y Hall, L.H.(1979) *J. Pharm. Sci.* 68 ,39.
Formulario A.E.F.I. (1988) *"Métodos de análisis y control de fármacos"*. Ed.Consejo General de Colegios Oficiales de Farmaceúticos.
Gálvez, J; Gárcia Domenech, R; Bernal,J. y García March, F.J. (1991) *An. Real. Acad. Farm.* 57, 533-546.
García Domenech, R.; Gálvez, J.; Moliner, R. y García March, F.J. (1991) *Drug. Invest.*3 (5), 344-350.
Gordon,M. y Scantlebury, G.R. (1964) *Trans. Faraday Soc;* 60, 605.
Hall, L.H.; Kier, L.B.; Murray, W.J. (1975).*J. Pharm. Sci.* 64, 1971-74.
Hosoya,H. (1971) *Bull. Chem. Soc. Japan;* 44, 2332.
Kier, L.B. and Hall, L.H. (1976a) *"Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research"*, Academic Press, London .46-79
Kier, L.B. and Hall, L.H. (1976b) *"Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research"*, Academic Press, London .150
Kier, L.B. and Hall, L.H. (1976d) *"Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research"*, Academic Press, London. Capítulos 4 y 5.
Kier, L.B. and Hall, L.H. (1976e) *"Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research"*, Academic Press, London. Capítulos 6 y 7.
Kier, L.B. and Hall, L.H. (1976f) *"Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research"*, Academic Press, London .172
Kier, L.B. and Hall, L.H. (1976g) *"Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research"*, Academic Press, London. 192
Kier, L.B. and Hall, L.H. (1976h) *"Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research"*, Academic Press, London. 194

Kier, L.B. and Hall, L.H. (1986a) *"Molecular Connectivity in Structure-Activity Analysis"*. Research Studies Press, Letchworth, England, 207.
Kier, L.B. and Hall, L.H. (1986b) *"Molecular Connectivity in Structure-Activity Analysis"*. Research Studies Press, Letchworth, England, 217.
Kier, L.B.; Hall, L.H.; Murray, W.J.; Randic, M. (1975) *J. Pharm. Sci.* 64: 1971-1974.
Kier, L.B.; Hall, L.H.; Murray, W.J.; Randic, M. (1976c). *J. Pharm. Sci.* 65, 801-805.
Litter, M. (1986) *"Farmacología Experimental y Clínica"*, 7ª Edición, Ed. Ateneo, Buenos Aires. 151.
Miller, L.C. y Tainter, M.L. (1944) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 57, 261-264
Moliner Llusar, R.,(1989) *"Aplicación del M todo de Conectividad Molecular al estudio de algunas propiedades farmacológicas de cefalosporinas"*. Tesis de Licenciatura. F. Farmacia. Universitat de Valencia.
Murakami, M. y Fukami, J. (1985) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 775-779.
Murray, W.J.; Kier, L.B.; Hall, L. H. (1975) *J. Pharm. Sci.* 64, 1978-1981.
Murray, W.J.; Kier, L.B.; Hall, L.H. (1976)•*J. Med. Chem.* 19, 573-578.
Randic, M.(1975) *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 6609-6615.
Randic, M.; Krais, G.A.; Deonauv-Jerman-Blazic, B. (1983) *"Chemical applications of topology and graph theory"*, King R.B., Elsevier, Amsterdam. 192-205.
Salabert, M.T.; Soler, R; Galvez, J. y col. (1992) *Ars Farm.* (En prensa).
Soler,R.;Garcia March,F.J.;Gálvez,J.y Garcia Domenech,R.(1992) *An. Quim.* 88, 382.
Strekowski,L.;Mokrosz,M.;Mokrosz,J.L. y Strekowska,A.(1988) *Anti-Cancer. Drug. Design*, 3, 79-89.
Sylvester, J.J. (1874) *Am. J. Math.* 1, 64.
Vicent A. (1987) *"Aplicación del método de conectividad molecular al estudio de algunas propiedades farmacológicas de medicamentos betabloqueantes"*. Tesis de Licenciatura. F. Farmacia. Universitat de Valencia.
Wiener, H. (1947a) *J. Am. Chem. Soc.*, 17, 2636.
Wiener, H.(1947b) *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 425, 1082.
Witkin, L.B.; Huebner, C.F.; Galdi, F. (1961) y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 133, 400.