



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería

**ESTUDIO TEÓRICO DE LA INTERACCIÓN
DE CU (II) CON LOS PÉPTIDOS HUMANINA
Y BETA AMILOIDE: IMPLICACIONES
EN EL MAL DE ALZHEIMER**

Tesis que presenta

Jennifer Laureano Ramírez

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS (QUÍMICA)

ASESORA:

Dra. Annia Galano Jiménez

Jurado Calificador:

Presidente: Dra. Annia Galano Jiménez

Secretario: Dr. Fernando Cortes Guzmán

Vocal: Dr. Joel Ireta Moreno

Ciudad de México, Abril 2017.

Dedicada a mi familia:

Para la persona más importante en vida y el motor que me hace seguir día a día. Mi hija Luna Zoe que sin ella nada estaría completo.

A mis padres Marisol y Fortunato por apoyarme en todo momento y que me enseñaron a alcanzar mis metas.

En especial a mi madre por ser un pilar en vida, por todo su amor, su cariño, su paciencia y su ayuda.

Agradezco a mis hermanos: Jovany y Jonathan, más Joni que me ha ayudado en este camino.

Agradecimientos en especial

A mi asesora, Dra. Annia por su apoyo, sus enseñanzas, su tiempo y su paciencia.

A a los amigos que han estado en todo momento.

A mis compañeros que conocí durante mi estancia en la Universidad.

A Erendida por ser una gran amiga y la mejor compañera durante la universidad.

A CONACyT por la beca de Maestría otorgada para la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Super cómputo y Visualización en Paralelo de la UAM-Iztapalapa (LSVP) por las facilidades otorgadas para realizar este proyecto.

Índice

Resumen.....	2
Abstract	3
Abreviaturas	4
Capítulo 1. Introducción.....	5
1.1 La enfermedad o mal de Alzheimer	7
1.2 Humanina	9
Capítulo 2. Antecedentes	12
2.1 Cobre	13
2.2 La enfermedad de Alzheimer y su relación con cobre.	13
Capítulos 3 y 4. Hipótesis y Objetivos	17
3. Hipótesis.....	18
4. Objetivos	18
4.1 Objetivo General:	18
4.2 Objetivos Específicos.....	18
Capítulo 5. Metodología de Cálculo	19
Capítulo 6. Resultados y Discusión.....	25
6.1 Modelo reducido (QM).	26
6.1.1 Ruta RAD	28
6.1.2 Ruta RADA	31
6.1.3 Análisis.....	33
6.2. Modelo Completo (ONIOM).....	35
Capítulo 7. Conclusiones	38
8. Perspectivas.....	41
Referencias.....	43
Anexos.....	50

Resumen

En el presente trabajo teórico se estudió una posible causa de la capacidad protectora del péptido Humanina (HN) en relación con la enfermedad del mal de Alzheimer (EA). Para ello se investigó el poder quelante de dicho péptido hacia Cu (II), que se ha observado como el principal metal que se acumula en el cerebro de pacientes con EA. Se enfatizó el estudio en aquellos aminoácidos que no están presentes en la secuencia del péptido beta amiloide (β A), el cual para este estudio se considera como responsable de la EA. En la primera etapa se usó un modelo reducido para representar los residuos de aminoácidos presentes en HN cuando forman complejos con el ion metálico Cu (II). Este modelo se usó para encontrar el sitio más probable de acuerdo a su energía de formación. Se encontró que la cisteína, que está presente en la HN pero no en el β A, forma el complejo más estable (excluyendo a los complejos bidentados con grupos carboxilatos, que están presentes en ambos péptidos). En la segunda etapa se llevó a cabo un estudio ONIOM (M05/6-31+G(d):PM6+SMD//M05/6-31+G(d):UFF), incluyendo el péptido HN completo. Los resultados obtenidos con el modelo completo confirmaron los resultados obtenidos utilizando residuos aislados. Esto permitió proponer que la mayor capacidad quelante de la HN, comparada con el β A puede ser una de las causas del efecto protector de la HN contra la EA. Se sugiere que la presencia de cisteína en la composición de HN es un factor estructural clave para este comportamiento.

Abstract

This theoretical work explores a possible cause for the protection exerted by the peptide humanine (HN) against the Alzheimer disease (AD). To that purpose the Cu(II) chelating ability of HN was investigated. This metal was chosen because it has been identified as the main metal that accumulates in the brain of patients with AD. Special attention was paid to those amino acid residues that are present in HN but not in the β -amyloid peptide (β A), which is considered responsible for AD. A reduced model was used in the first stage of the study to represent the amino acid residues in HN, when they form complexes with Cu (II). This model was used to identify the most likely chelation site, according to the chelation energies. It was found that cysteine, which is present in HN but not in β A, is involved in the formation of the most stable complex (excluding bi-dentated complexes with carboxylate moieties, which are present in both peptides). The second part of the investigation was carried out using ONIOM (M05/6-31+G(d):PM6+SMD//M05/6-31+G(d):UFF) and including the complete HN peptide. The results obtained with the complete model confirmed those obtained from the calculations with the isolated residues. This agreement allowed to propose that the greater chelating ability of HN, compared to that of β A, might be one of the reasons why HN has protecting effects against AD. The presence of Cys in HN is suggested as the crucial structural factor that promotes such a behavior.

Abreviaturas

β A	Péptido beta amiloide
AA	Aminoácido
Ala, A	Alanina
Arg, R	Arginina
Asn, N	Asparagina
Asp, D	Ácido Aspártico
Cys, C	Cisteína
DFT	Density Functional Theory (Español Teoría de Funcionales de la Densidad)
EA	Enfermedad del mal de Alzheimer
Gln, Q	Glutamina
Glu, E	Ácido Glutámico
Gly, G	Glicina
His, H	Histidina
HN	Humanina (Péptido)
Ile, I	Isoleucina
Leu, L	Leucina
Lys, K	Lisina
Met, M	Metionina
ONIOM	<i>Our own N-layered Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics.</i>
Phe, F	Fenilalanina
PPA	Proteína precursora amiloide
Pro, P	Prolina
RAD	Ruta de acomplejamiento directo
RADA	Ruta de acomplejamiento y deprotonación acoplados
Ser, S	Serina
Thr, T	Treonina
Tyr, Y	Tirosina
Val, V	Valina

Capítulo 1.

Introducción

Gracias a los avances alcanzados en diferentes áreas de la salud, la esperanza de vida de la población mundial y la de México en particular crece sistemáticamente. En 1950, la proporción de personas mayores de 60 años era del 8%; en 2000, del 10%; y en 2050 se proyecta que llegará al 21%.¹ Si bien esto es un logro también representa un envejecimiento demográfico, o lo que es lo mismo que la proporción de adultos mayores aumenta de forma relativa. Esto ha hecho que ciertas enfermedades sean cada vez más frecuentes, en particular las neurodegenerativas. Estas enfermedades se caracterizan por la muerte progresiva de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso, que muchas veces conllevan a la muerte del paciente. Debido a la pérdida progresiva de las células nerviosas aparecen los signos y síntomas neurológicos característicos de dichas enfermedades. La estimulación cognitiva es el primer paso para contrarrestar los efectos; ya que el avance y deterioro en la salud de los pacientes con este tipo de enfermedades es inevitable. Lo que sí se puede conseguir es ralentizar el deterioro cognitivo y funcional en los pacientes para mejorar así su calidad de vida. Algunas de las enfermedades más importantes son: la demencia, el mal de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, entre otras.²

Se sabe que son diversas las causas y factores de riesgo que provocan y estimulan este tipo de enfermedades, entre ellas están factores ambientales, sociales, alimenticios, la edad y el género.³ Se sabe que la acumulación de ciertas sustancias en el cerebro provoca alteraciones en el mismo, como es el caso de los metales. Por ejemplo, se ha observado que la acumulación de cobre en el cerebro conlleva a daños en este órgano.⁴ Así mismo, este metal está involucrado en el llamado daño oxidativo o estrés oxidativo, que es un daño químico causado por un desbalance en los procesos que producen especies oxidantes (principalmente radicales libres) y aquellos que las consumen.

La acumulación de dichas especies provoca daños a moléculas de importancia biológica como lípidos, proteínas y ADN. El cuerpo humano, cuando está sano, mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pre-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes.⁵ La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado

de estrés oxidativo que se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libre y especies reactivas, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes del cuerpo. Debido a esto ocurren alteraciones en los sistemas biológicos que pueden llegar hasta la muerte celular.⁶

Muchos de los oxidantes presentes en organismos vivos son radicales libres. Estos se pueden definir, desde el punto de vista químico, como especies que pueden estar cargadas o no y que presentan un electrón desapareado (o número impar de electrones) en el orbital más externo. Esta característica los hace especialmente reactivos, lo que puede conducir a cambios estructurales de moléculas de alta importancia biológica.^{5,7} Estos cambios se han asociado a mal funcionamiento de enzimas y (de no ser reparados antes de la replicación) a mutaciones permanentes de ADN.

En el caso particular de la enfermedad de Alzheimer (EA), es inevitable mencionar al cobre como un factor de alto riesgo para su desarrollo, junto al daño oxidativo que se produce en el cerebro y que se relaciona directamente con daño cerebral. Es por ello que se es de suma importancia el estudio que relacione la especie reactiva de cobre con el entorno.⁸ En los últimos años se ha incrementado el interés por buscar, descubrir y desarrollar terapias nuevas contra enfermedades neurodegenerativas, como es caso de la EA. Muchas de ellas involucran nuevos péptidos que puedan quelar al cobre, para su estudio y posible tratamiento, en donde se pretende resarcir el daño cerebral causado por el deterioro y avance de esta enfermedad.⁹

1.1 La enfermedad o mal de Alzheimer

La Enfermedad o mal de Alzheimer (EA) es quizá el desorden neurológico más estudiado ya que en los últimos años se han incrementado los registros de pacientes afectados por esta enfermedad. Los efectos que provoca esta enfermedad son alteraciones en el comportamiento, se manifiesta por una lenta pero progresiva pérdida de memoria que es el síntoma inicial, después se alteran otras funciones cognitivas. Llegando hasta la demencia senil donde el enfermo pierde autonomía para las actividades diarias más

elementales y es dependiente de otra persona.¹⁰ Lo más frecuente es que afecte a personas mayores de 60 años, aunque también se han presentado casos de inicio temprano. Se sabe poco sobre el mecanismo que causa la EA ya que los estudios a los pacientes sólo se pueden realizar *postmortem*. Sin embargo se conoce que el factor de riesgo principal es la edad y que puede llegar a ser hereditario, de hecho la herencia genética aumenta el riesgo de padecer esta enfermedad.¹¹ También se incrementa el riesgo de padecer EA por factores ambientales y por el estilo de vida.

Se han considerado ciertas hipótesis posibles para tratar de describir la neuropatología de la enfermedad. Por una parte, se encuentra la producción del péptido β amiloide (β A) en cantidades mayores que las normales. Este se deposita en el cerebro de forma extracelular, con lo que se lesiona progresivamente a las neuronas. Es por ello se relaciona a este péptido con el origen de la EA,¹² de hecho se considera un marcador de ésta. Las placas seniles aparecen como consecuencia del daño infligido del péptido β A en el cerebro y provocan que se limite la comunicación entre neuronas perdiendo funciones normales como lo es la memoria.^{9,13} Otra hipótesis de la aparición de esta enfermedad sugiere que se debe a la fosforilación anómala de la proteína Tau,¹⁴ lo que conlleva a que esta se deposite en forma de ovillos neurofibrilares. Estos son un conglomerado de proteínas insolubles que constituyen una lesión intracelular y pueden comprometer las funciones normales de las neuronas. Esto trae como consecuencia que se pierda la capacidad de transmitir mensajes nerviosos, y provoca los síntomas que caracterizan a la EA.¹⁵

Se ha centrado más el estudio, en la producción de cantidades excesivas del péptido amiloide, entre las causas primeras de la enfermedad. También este péptido se ve alterado cuando existe daño oxidativo. Siendo un estado de estrés oxidativo en donde se induce en la célula efectos tóxicos por oxidación de proteínas y carbohidratos, lo cual produce acumulación de agregados que puede llegar a la muerte celular de neuronas.¹⁶ Este daño oxidativo es común en las enfermedades neurodegenerativas y aún no está claro si contribuye iniciando el proceso o es una consecuencia del mismo. Los radicales libres son en realidad agentes nocivos que causan muerte celular u otras formas de daños

irreversibles. Los β -amiloides en presencia de metales de transición producen también radicales libres.¹⁷

En la EA existen dos lesiones o neuropatologías distinguibles en los estudios de pacientes, antes mencionadas, que son la aparición de ovillos neurofibrilares y la formación de placas seniles.¹⁸ Se ha visto en la Química asociada a la EA,¹⁹ así como en este trabajo, se identifica al péptido β A como causante directo de la neuropatología de esta enfermedad. Este péptido proviene de las fibras amiloides que son depósitos proteicos normales fibrosos y se encuentran en los tejidos.²⁰ La forma más frecuente del péptido β A, la cual tiene relación directa con el mal de Alzheimer, está compuesta por 42 aminoácidos²¹ (H₂N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-COOH). Aunque este péptido es soluble en agua en su forma helicoidal, se ha propuesto que su desdoblamiento anómalo en hojas beta es el causante de que se vuelva insoluble en este medio.²²

En estudios recientes se ha demostrado que la acumulación del péptido β A en el cerebro puede ser inducida por la presencia de Cu(II), ya que este metal puede actuar como puente de unión entre varias unidades de péptido llevando a la agregación.²³ Se ha establecido una relación directa entre la neurotoxicidad y la acumulación de este ión metálico en el cerebro. Es por ello que algunos quelantes específicos, con alta afinidad por el Cu(II) se consideran como una posible alternativa terapéutica para el tratamiento de la EA.²⁴

1.2 Humanina

Recientemente se ha reportado que la neurotoxicidad²⁵ del péptido β A se puede atenuar en presencia de otro péptido conocido como Humanina (HN). Este ha mostrado efectos neuro-protectores ante los embates de la EA, lo que lo ha hecho de gran interés para la comunidad científica.²⁶ El péptido HN fue descubierto hace aproximadamente una década y se caracterizó como un péptido mitocondrial pequeño formado por 24 aminoácidos²⁷

(H2N-Met-Ala-Pro-Arg-Gly-Phe-Ser-Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Thr-Ser-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala-COOH). Como es común en péptidos, HN contiene la región N-terminal de carga positiva, la región hidrófoba central y la región C-terminal de carga negativa.²⁸ El descubrimiento de la HN se hizo en el Laboratorio de Nishimoto²⁹ durante un estudio *postmortem* al cerebro de un paciente con la EA, mientras se buscaban factores de supervivencia en la sección del cerebro afectada. Los estudios se hicieron en cultivo celular, donde se buscaron genes que podrían resistir la muerte celular de neuronas inducida por una forma mutante de la proteína precursora amiloide (PPA).

La Humanina tiene la capacidad de adquirir una conformación helicoidal en entornos hidrófobos. Se ha visto que la región de Pro3 a Pro19 de la HN es una región activa de neuro-protección ante la EA. Los residuos Pro3, Ser 7, Cys8, Leu9, Leu12, Thr13, Ser14 y Pro19 han sido propuestos como esenciales para la neuro-protección que exhibe este péptido.³⁰ Los residuos asumidos como esenciales para la neuro-protección fueron identificados en base a que la mutación de cualquiera de ellos por alanina condujo a la eliminación de dicha actividad. Por el contrario los demás residuos (no esenciales) se pueden sustituir con alanina sin efecto sobre dicha actividad.³¹ También se ha visto que un cambio conformacional en la estructura del péptido, puede estar relacionado con la actividad neuroprotectora de HN.²⁸ Igualmente se encontró que la neuroprotección de HN no solo es contra la EA, sino que protege de otras lesiones neuronales, y depende de la estructura primaria que involucra la región Cys8 - Ser14.³²

En estudios previos se muestra claramente el papel esencial para la neuro-protección de Cys8 en HN. Han mostrado que la actividad neuroprotectora potente de HN requiere la presencia de un grupo tiol libre, que lo proporciona la cisteína. También se ha estudiado la posibilidad de sustituir a la cisteína con Lisina o Arginina, debido a que a veces el grupo tiol de la cisteína puede limitar la función de la HN.²⁹ De la misma manera se ha propuesto que la capacidad protectora de HN, ante la EA, puede estar dada porque interactúa directamente con los β A cambiando la morfología de los agregados β A.³³ Con todos estos detalles se corrobora la capacidad neuro-protectora que ofrece la HN, lo que

justifica el interés de la comunidad científica en este péptido dada su capacidad de evitar la muerte neuronal inducida en especial por el mal de Alzheimer.³⁴

Se sabe que los niveles de Humanina tienden a disminuir con la edad tanto en ratas como en seres humanos. En base a esto se ha sugerido que la HN puede desempeñar un papel en el proceso de envejecimiento.³⁵ Además este péptido tiene otras aplicaciones en enfermedades crónicas como esclerosis y diabetes.³⁶

Capítulo 2.

Antecedentes

2.1 Cobre

Los metales son de gran importancia para el buen funcionamiento del cuerpo humano. Anteriormente se comentó sobre la relación de cobre con la EA, caso en el cual la presencia de este metal se considera un factor de riesgo. Sin embargo, al mismo tiempo, este metal es esencial para el organismo humano. Por ejemplo el cobre es responsable del buen funcionamiento de varias enzimas,³⁷ además de participar en procesos genéticos.³⁸ Se ha mostrado que el Cu (II) es necesario para el crecimiento de los niños, está involucrado en mecanismos de defensa, ayuda a la formación de los huesos, interviene en el metabolismo del colesterol y la glucosa y en el desarrollo del cerebro.³⁹ Las principales fuentes de Cu(II) en la dieta humana son carne (en especial hígado), mariscos (ostras), leche, pan integral, frutos secos (nueces y almendras), papas y huevo. Además el agua potable que se ingiere tiene cierta cantidad de este metal, la cual depende de si se transporta o no por tuberías de cobre.⁴⁰

Por el contrario, cuando se encuentra en exceso puede llegar a ser tóxico. Una de las causas de su toxicidad es la capacidad oxidante que tiene debido al papel que desempeña en la formación de radicales libres tóxicos como el ion radical hidroxilo.⁴¹ El exceso de Cu se ha relacionado no solo con el mal de Alzheimer sino también con la enfermedad de Wilson y con problemas hepáticos.⁴²

2.2 La enfermedad de Alzheimer y su relación con cobre.

Se sabe que algunos metales como aluminio, hierro, cobre y zinc están involucrados en la EA porque se han detectado en altos niveles en el cerebro de pacientes con esta enfermedad.⁴³ En específico los complejos de cobre son de gran interés en la química de la EA por ser de alta afinidad, es por ello que la comunidad científica requiere desarrollar quelantes específicos que se acomplejen con este metal para prevenir los efectos negativos asociados al mismo.¹⁹ De modo que las terapias con agentes quelantes son una alternativa terapéutica.

La participación de cobre en la EA puede deberse a que puede actuar como un catalizador en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).⁴⁴ Además hay un sitio de unión

entre la proteína precursora de amiloide (PPA) y cobre, que modifica a la molécula de esta proteína.⁴⁵ Cuando sucede la unión de cobre con PPA ocurre la reducción de Cu(II) a Cu(I), entonces el electrón restante puede estar implicado en la producción de radicales hidroxilo. Existen trabajos donde proponen que el β A provee de un electrón al Cu(II) unido al péptido para formar Cu(I).⁴⁶

Otros estudios han caracterizado al β A (1-42) como un péptido que puede formar complejos con metales como cobre y zinc. Este péptido se asume como un quelante selectivo hacia Cu(II). Presenta alta afinidad de unión a β A-42 y además muestra tendencia a la agregación en solución acuosa.⁴⁷ Del mismo modo se ha estudiado el complejo formado con tres histidinas, His6, His13 e His14, las cuales se sitúan en la parte hidrofílica del β A N-terminal, que se unen a Cu(II). Algunas investigaciones indican que los residuos de histidina son importantes para la agregación del β A. Esto se debe a que la ausencia de histidinas, o la modificación de estos residuos, disminuyen notablemente la agregación del β A promovida por el cobre, zinc o hierro.⁴⁸

En estudios teóricos anteriores han analizado complejos de Cu(II) y Cu(I) con β A, en concreto con el residuo metionina, donde se concluye que los complejos tetra coordinados son los más estables, por tanto son los considerados relevantes para la EA.⁴⁹ De acuerdo con estudios espectroscópicos EPR, los residuos His13 e His14 están involucrados en la coordinación con Cu(II). Por otra parte His6 y los N-terminal son parte de la esfera de coordinación para Cu(II) y β A lo que implica un patrón de coordinación N4, es decir, cobre enlaza a 4 ligandos siendo más estable la forma tetra coordinada.⁵⁰ Se ha visto que Cu(II) coordinado acidifica a una amida N-H, debido a esto uno o dos grupos amida cercanos al ion Cu(II) pueden ser desprotonados y por tanto se coordinan a cobre a pH fisiológico.¹⁹

Se han realizado investigaciones del acomplejamiento de cobre con β A dentro del marco de la teoría de funcionales de la densidad (DFT). Uno de ellos combinó los estudios de dinámica molecular (DM) con DFT y encontraron que la estructura del complejo se distorsiona en forma tetraédrica y se enlaza a cuatro ligantes. Adicionalmente, calcularon

las energías de complejos de Cu(II)- β A que se unían a tres His, y el cuarto ligando cambiaria entre Asp, Glu, Gln, Ser y Tyr. El resultado fue que Asp1 y Tyr10 son los residuos más probables para ser el cuarto ligando.⁵¹ Otros han estudiado la coordinación del Cu(II) con un β A modelo de 16 aminoácidos, β A (1-16) incluyendo diferentes sitios de coordinación. La estructura tridimensional propuesta consiste en el Cu(II) tetra-coordinado, siendo los ligantes las histidinas 6, 13 y 14 y el grupo carbonilo (CO) de la alanina 2.⁵² También se ha planteado un modelo de 17 aminoácidos, β A (1-17), para el cual la configuración del complejo de menor energía depende del pH, e involucra a His6, His14, el N terminal y el grupo carbonilo (CO) o carboxilato (COO-) del Asp1.⁵³ Debido a su estrecha relación con el estrés oxidativo se realizaron estudios enfocados a estimar potenciales redox de los complejos Cu(II)- β A. También se han estudiado los cambios estructurales ocasionados por la reducción del Cu(II), tanto en el sitio metálico como en la configuración del péptido.⁵⁴

Por otra parte los estudios con HN se han incrementado, incluso se han realizado pruebas experimentales en vivo para confirmar la protección que ofrece contra la neurotoxicidad del β A. En particular un estudio hecho a ratones donde se les inyectaba β A (25-35) presentaba déficits de memoria en un plazo de tres semanas, mejoraron por el tratamiento de inyecciones de humanina modificada (HNG).⁵⁵ Además se vio que HNG administrada a ratones de un año de edad, por un tiempo aproximado de tres meses, logró reducir los niveles de acumulación de β A en el cerebro y por ende reducir déficits de memoria para un modelo específico de la EA.^{55,56}

Estudios recientes han demostrado que S14G-Humanina (HNG), un derivado sintético de la HN (en donde se sustituye a la Ser14 de HN por Gly), tiene una fuerte capacidad neuroprotectora contra los efectos relacionados con la EA. Por este motivo previene los deterioros cognitivos en modelos de animales con β A detectados. Igualmente la HN ayudó a mejorar los déficits cognitivos en ratones de 9 meses de edad, con patologías de acumulación de β A, quienes presentaban una mejora en la memoria y una significativa reducción de acumulación cerebral de β A.⁵⁷

Asimismo se puede decir que HNG pudo suprimir el aumento de los niveles de β A relacionado con la edad en el cerebro de ratones muestra.⁵⁷ Adicionalmente se ha investigado la posibilidad de encontrar descriptores que puedan ser directamente relacionados con la eficiencia potencial de agentes quelantes para prevenir la formación de los complejos Cu(II)- β A, y por tanto ayudar a mantener la integridad química de este péptido.⁵⁸

Capítulos 3 y 4.

Hipótesis y Objetivos

3. Hipótesis

- I. Asumiendo que la formación de complejos con cobre está directamente relacionada con la agregación del péptido β A (y por lo tanto con la EA), si el péptido HN fuera mejor quelante de Cu(II) que el β A esto justificaría su capacidad neuro-protectora.
- II. Se asume que un modelo reducido de aminoácidos, con terminación amida, es suficiente para estimar la energía de unión, por sitio, entre cobre y los residuos de aminoácidos en péptidos y proteínas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General:

Identificar los sitios de acomplejamiento más probables de HN con Cu(II) y estimar la estabilidad relativa de estos complejos, con respecto a los complejos Cu(II)-(His).

4.2 Objetivos Específicos

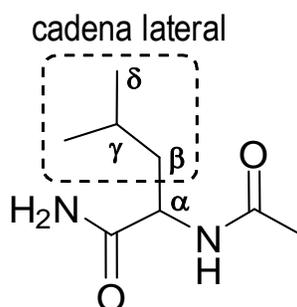
- Utilizar un modelo simplificado para las estructuras de los residuos a estudiar e identificar todo los sitios posibles de enlace con Cu(II) para cada uno de ellos.
- Calcular las energías del acomplejamiento de Cu(II) con los AA presentes en la HN utilizando los modelos simplificados.
- Identificar al complejo de Cu (II) más estable, de acuerdo a su energía.
- Utilizando el método híbrido ONIOM crear un modelo completo de HN, y recalculando las energías de los complejos más probables con este modelo.
- Comparar las energías de complejación con Cu (II) de HN y β A.

Capítulo 5.

Metodología de

Cálculo

Para este trabajo se usaron dos tipos de modelos. El primero es un modelo simplificado donde los extremos de cada AA corresponden a los grupos encontrados en los enlaces peptídicos (amida), en lugar de las terminaciones ácido y amino de los amino ácidos libres. Este tipo de modelo, conocido como “realista” (Esquema 1) fue propuesto por el grupo del Prof. Leo Radom⁵⁹ y ha sido usado con éxito para investigar reactividad de sitio para residuos de AA en proteínas y péptidos.⁶⁰



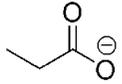
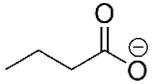
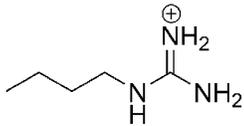
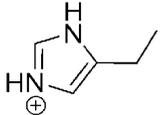
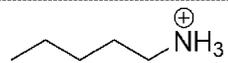
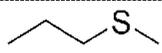
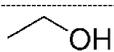
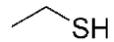
Esquema 1. Esquema representativo del modelo reducido para residuos en proteínas.

Aunque, a primera vista, este modelo pueda parecer demasiado simple, es adecuado para investigar la reactividad de los sitios en la cadena lateral de residuos de aminoácidos, ya que los diferentes residuos están unidos por enlaces σ y por tanto los efectos de grupo no se propagan a distancias mayores a dos enlaces. De modo que el modelo simplificado tiene en cuenta la estructura local de cadena peptídica presente en proteínas y péptidos. Para incluir en la modelación el posible papel de las estructuras primaria, secundaria y terciaria en la reactividad se usó el método híbrido QM/QM-MM y el péptido de HN completo. Esto se hizo luego de identificar los sitios de acomplejamiento más probables según los resultados obtenidos para los modelos simplificados.

Los residuos estudiados con este modelo fueron ocho (Tabla 1), de los veinticuatro presentes en la HN. Se escogieron para este estudio los aminoácidos que tuvieran nitrógeno, oxígeno o azufre en su cadena lateral, ya que se sabe que estos son sitios de complejación más probables que carbono. Adicionalmente se estudió la histidina, porque se ha identificado con anterioridad que en los complejos de cobre con β A este es el sitio

de coordinación más probable. Es importante notar, que en todos los casos se consideró el grado de protonación más probable de los aminoácidos cuando se encuentran en condiciones fisiológicas, o sea en solución acuosa a pH=7.4 que son las condiciones de interés en este estudio. Para cada uno de los aminoácidos a estudiar se consideraron todos los diferentes posibles sitios de acomplejamiento, así como complejos tanto mono-dentados como bidentados.

Tabla 1. Aminoácidos estudiados en este trabajo.

Nombre	Acrónimos	Carga (pH=7.4)	Presente en HN	Presente en βA	Cadena Lateral
<i>Ácido Aspártico</i>	Asp, D	-1	Sí	Sí	
<i>Ácido Glutámico</i>	Glu, E	-1	Sí	Sí	
<i>Arginina</i>	Arg, R	+1	Sí	Sí	
<i>Histidina</i>	His, H	+1	No	Si	
<i>Lisina</i>	Lys, K	+1	Sí	Si	
<i>Metionina</i>	Met, M	0	Sí	Sí	
<i>Serina</i>	Ser, S	0	Sí	Sí	
<i>Treonina</i>	Thr, T	0	Sí	No	
<i>Cisteína</i>	Cys, C	0	Sí	No	

El segundo modelo corresponde a la estructura completa de la HN. En este caso se usó como estructura de partida la elucidada por Benaki y colaboradores²⁷ usando RMN y refiere al péptido en solución acuosa (Figura 1). Los cálculos con este modelo se realizaron usando un método híbrido conocido como ONIOM (*Our own N-layered*

Integrated molecular Orbital and molecular Mechanics)⁶¹⁻⁶³ que fue desarrollado por Morokuma.⁶⁴ En un método de este tipo un sistema grande se divide en múltiples fragmentos o capas, y se usan diferentes métodos teóricos para cada una de ellas.^{65,66}

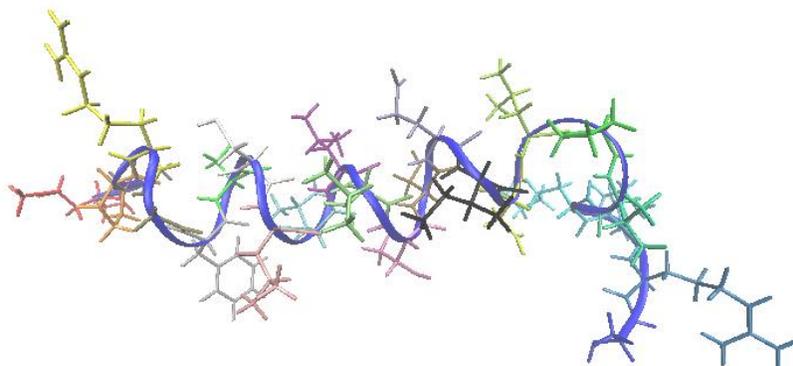


Figura 1. Estructura del péptido HN, elucidada por Benaki y colaboradores.²⁷

En la figura 2 se muestra, como ejemplo, una representación simplificada del método ONIOM de dos capas (que es el usado en el presente trabajo). La parte interna es la primera capa, o capa alta, que incluye la región molecular donde se lleva a cabo la reacción química de interés y por lo tanto esta capa se trata con el nivel de teoría más alto (por ejemplo alguna aproximación de la DFT). La segunda capa, que no está implicada directamente en la reacción química pero puede influenciarla ya que se considera el entorno químico en el que ocurre la reacción, se trata con el nivel más bajo de teoría (por ejemplo mecánica molecular o un método semiempírico).

La energía total de todo el sistema, $E_{QM/MM}$, es la suma de la energía de la capa alta modelada con el método QM (E_{QM}), más la energía de la capa baja obtenida con el método de MM (E_{MM}), menos la energía de interacción (E_{QM-MM}) entre las capas.

$$E_{QM/MM} = E_{QM} + E_{MM} - E_{QM-MM} \quad (1)$$

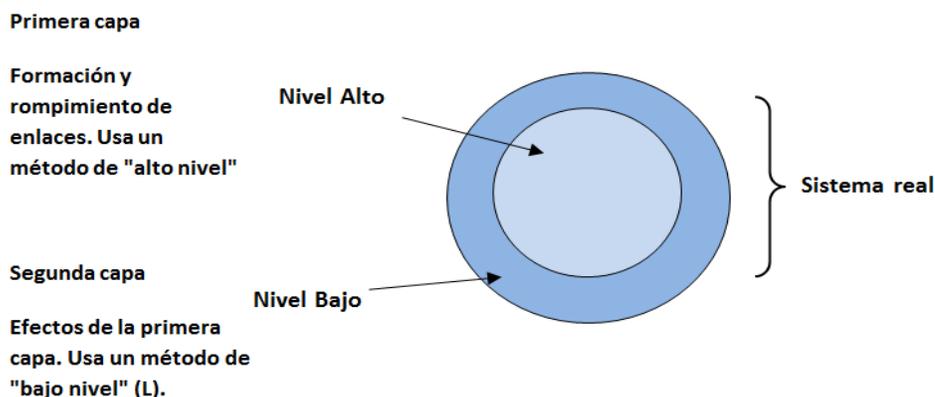


Figura 2. Representación esquemática de las diferentes capas en un modelado por el método ONIOM.

En este trabajo para el modelo completo primeramente se realizaron las optimizaciones de geometría y los cálculos de frecuencia con la aproximación ONIOM QM/MM, en particular utilizando M05/6-31+G(d) para la capa de más alto nivel y el campo de fuerzas UFF⁶⁷ para la capa de menor nivel. Las regiones que componen a ambas capas se muestran en la sección de Resultados y discusión. Las capas se seleccionaron luego de usar el modelo reducido para identificar el sitio de complejación más probable. Además se realizaron cálculos de punto simple, para mejorar las energías, a nivel ONIOM (M05/6-31+G(d):PM6) y usando el modelo continuo SMD⁶⁸ para incluir el solvente (agua).

Para ambos modelos se realizaron optimizaciones completas de geometría, sin ningún tipo de restricciones, cálculos de frecuencia y de energía. Todos los cálculos se realizaron con el paquete de programas Gaussian 09.⁶⁹ Para los modelos simplificados de los residuos de HN se usó el funcional M05 y el conjunto de funciones de base 6-31+G(d), o sea el mismo nivel de teoría que el usado en la capa alta de ONIOM. Este funcional se escogió porque produce mejores resultados para calores de formación, geometrías, descripción de los enlaces de hidrógeno y esta re-parametrizado para distintos elementos incluyendo el cobre.⁷⁰

Se sabe que M05 es un funcional clasificado como meta-GGA el cual incorpora la densidad de espín-electrón, el gradiente de la densidad, el laplaciano de la densidad, la densidad de la energía cinética y el intercambio exacto o Hartree-Fock (HF).⁷¹ En general este funcional se recomienda para aplicaciones termoquímicas, cinética e interacciones no-covalentes entre elementos metálicos y no metálicos.⁷² Por otra parte, SMD^{73, 74} se eligió para incluir los efectos de solvente debido a que puede ser utilizado de forma consistente para cualquier soluto con carga o sin ella, y en cualquier disolvente o medio líquido.⁷³ Cabe señalar que sus desarrolladores afirman que SMD puede ser utilizado con éxito para cálculos tanto de optimización de geometrías como de frecuencias en solución.

Los mínimos locales se identificaron por la ausencia de las frecuencias imaginarias. Las energías relativas se calcularon incluyendo correcciones termodinámica a 298.15 K. Todas las energías de reacción se reportaran para estado estándar 1M. Los iones Cu (II) se modelaron coordinados a moléculas de agua ya que en fase acuosa, como es el caso de sistemas biológicos, así se espera encontrar a los iones cobre “libres”. De modo que este modelo es más adecuado para representar al Cu(II) en las condiciones de interés que si se usaran iones desnudos.⁷⁵ Se eligieron cuatro moléculas de agua para la capa de coordinación, debido a que se conoce que la configuración más probable para complejos de Cu(II) en solución acuosa se corresponde a una geometría tetra-coordinada cuadrado plana.⁷⁶

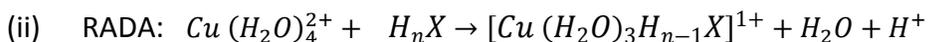
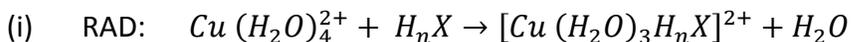
Capítulo 6. Resultados y Discusión

6.1 Modelo reducido (QM).

Las estructuras correspondientes a las geometrías optimizadas de los aminoácidos estudiados con el modelo reducido se muestran en la Figura 3. Muchos de ellos presentan átomos de H en su cadena lateral que pueden comportarse como H ácidos. Teniendo esto en cuenta, para la formación de complejos con Cu(II) se propusieron dos rutas diferentes:

- (i) *Ruta de acomplejamiento directo (RAD)* los amino ácidos (tal como se encuentran al pH de interés, Tabla 1) substituyen al agua como ligante en la esfera de coordinación de cobre, sin que exista ningún otro proceso simultáneo.
- (ii) *Ruta de acomplejamiento y deprotonación acoplados (RADA)*. Al acercarse el cobre al amino ácido que actúa como ligante (en un sitio de acomplejamiento con características de ácido de Bronstead) ocurren simultáneamente el proceso de acomplejamiento y la deprotonación del sitio. En el caso particular de los complejos bidentados de Arg también se da el caso donde se deprotona dos sitios ácidos simultáneamente al formarse el complejo.

A continuación se muestran las reacciones químicas ajustadas para la formación de algunos complejos a través de las diferentes rutas, usando como ejemplo la especie H_nX que representa a un aminoácido:



Como se observa en estos equilibrios, la ruta RAD no está influenciada por el pH (no aparece el protón explícitamente en el equilibrio). Por el contrario el ión H^+ aparece explícitamente en la ruta RADA, es decir estos equilibrios están influenciados por el pH del medio. Si este hecho no se tiene en cuenta, los valores de energías libres de Gibbs de reacción (ΔG) calculados corresponderían a condiciones estándar, o sea a $pH=0$, cuando lo que realmente nos interesa son los valores de ΔG a $pH=7.4$.

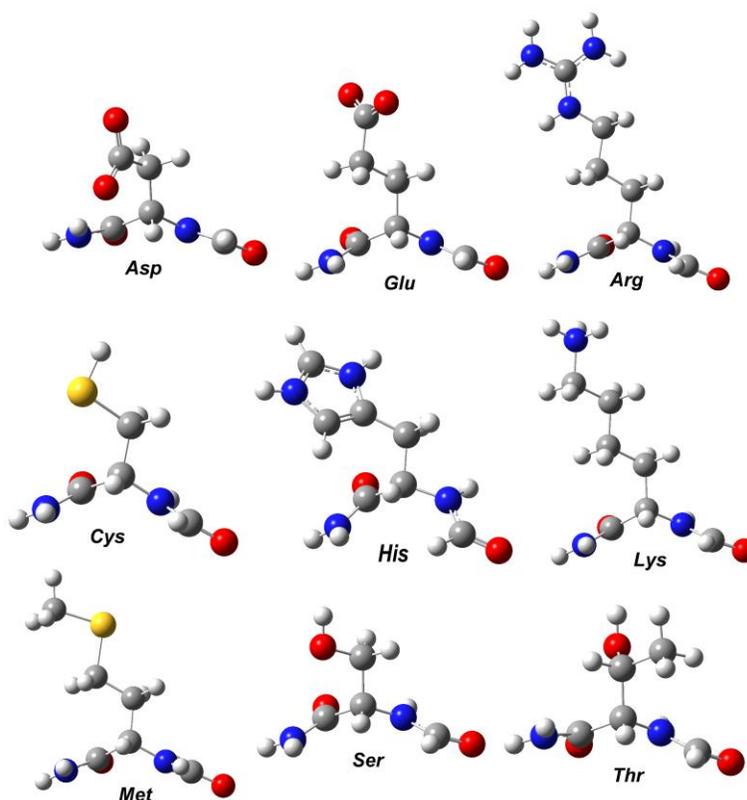


Figura 3. Geometrías optimizadas para los modelos reducidos.

Por eso se debe hacer correcciones correspondientes a la energía, para ilustrar cómo se realiza dicha corrección usaremos la reacción tipo mostrada anteriormente (ii). En este caso la constante de equilibrio estándar para la ruta RADA, con una sola desprotonación, sería:

$$K_{RADA} = \frac{[Cu(H_2O)_3 H_{n-1} X^{1+}][H^+]}{[Cu(H_2O)_4^{2+}][H_n X]} = e^{-\Delta G_{RADA}^\circ / RT} \quad (2)$$

Sin embargo se puede definir una constante de equilibrio condicional para cualquier pH amortiguado, en nuestro caso nos interesa pH=7.4, lo que implica $[H^+] = 10^{-pH} = 3.98 \times 10^{-8}$ M. Esta constante sería:

$$K'_{RADA} = \frac{K_{RADA}}{[H^+]} = \frac{e^{-\Delta G_{RADA-H}^\circ / RT}}{10^{-pH}} = e^{-\frac{\Delta G'_{RADA-H}}{RT}} \quad (3)$$

De lo cual se hace evidente que el valor de ΔG condicional ($\Delta G'$) se puede obtener como:

$$RADA: \quad \Delta G' = \Delta G^\circ - 2.303RT (pH) \quad (4)$$

En el caso de la ruta RADA que involucra doble deprotonación se modifica la constante de equilibrio de la siguiente forma:

$$K_{RADA-D} = \frac{[Cu (H_2O)_3 H_{n-2} X][H^+]^2}{[Cu (H_2O)_4^{2+}][H_n X]} = e^{-\Delta G_{RADA}^\circ/RT} \quad (5)$$

$$K'_{RADA-D} = \frac{K_{RADA-DD}}{[H^+]^2} = \frac{e^{-\Delta G_{RADA-D}^\circ/RT}}{2 * 10^{-pH}} = 2 * e^{-\frac{\Delta G'_{RADA-D}}{RT}} \quad (6)$$

Y por lo tanto:

$$RADA - D: \quad \Delta G' = \Delta G^\circ - 2 * 2.303RT (pH) \quad (7)$$

Las ecuaciones (4) y (7) muestran claramente que la ruta RADA se favorece con el aumento del pH. Es importante hacer notar que para estos cálculos se utilizaron los valores experimentales para las energías del protón, que en solución acuosa son $\Delta G_{gas}(H^+) = -4.39$ kcal/mol, and $\Delta G_{solvatación}(H^+) = -265.89$ kcal/mol y por lo tanto $\Delta G_{solución}(H^+) = -270.28$ kcal/mol. Estos valores se tomaron siguiendo las recomendaciones de Camaioni y Schwerdtfeger.⁷⁷ Se usaron valores experimentales y no calculados en este caso, debido a que se conoce que estos últimos tienen grandes errores para la energía de solvatación del protón.

6.1.1 Ruta RAD

En la Figura 4 se muestran las estructuras de los complejos formados por la ruta RAD, que en total fueron 11. Los complejos monodentados corresponden a ácido aspártico (C1), ácido glutámico (C2), arginina enlazando a N1 (C3), arginina enlazando a N3 (C4), histidina enlazando a N1 (C5), metionina (C6), serina (C7), treonina (C8) y cisteína (C9). Los complejos bidentados se forman con ácido aspártico (C10) y ácido glutámico (C11). En todos los casos aunque se probaron diferentes conformaciones posibles, aquí sólo se reportaran las que corresponden a las de menor energía.

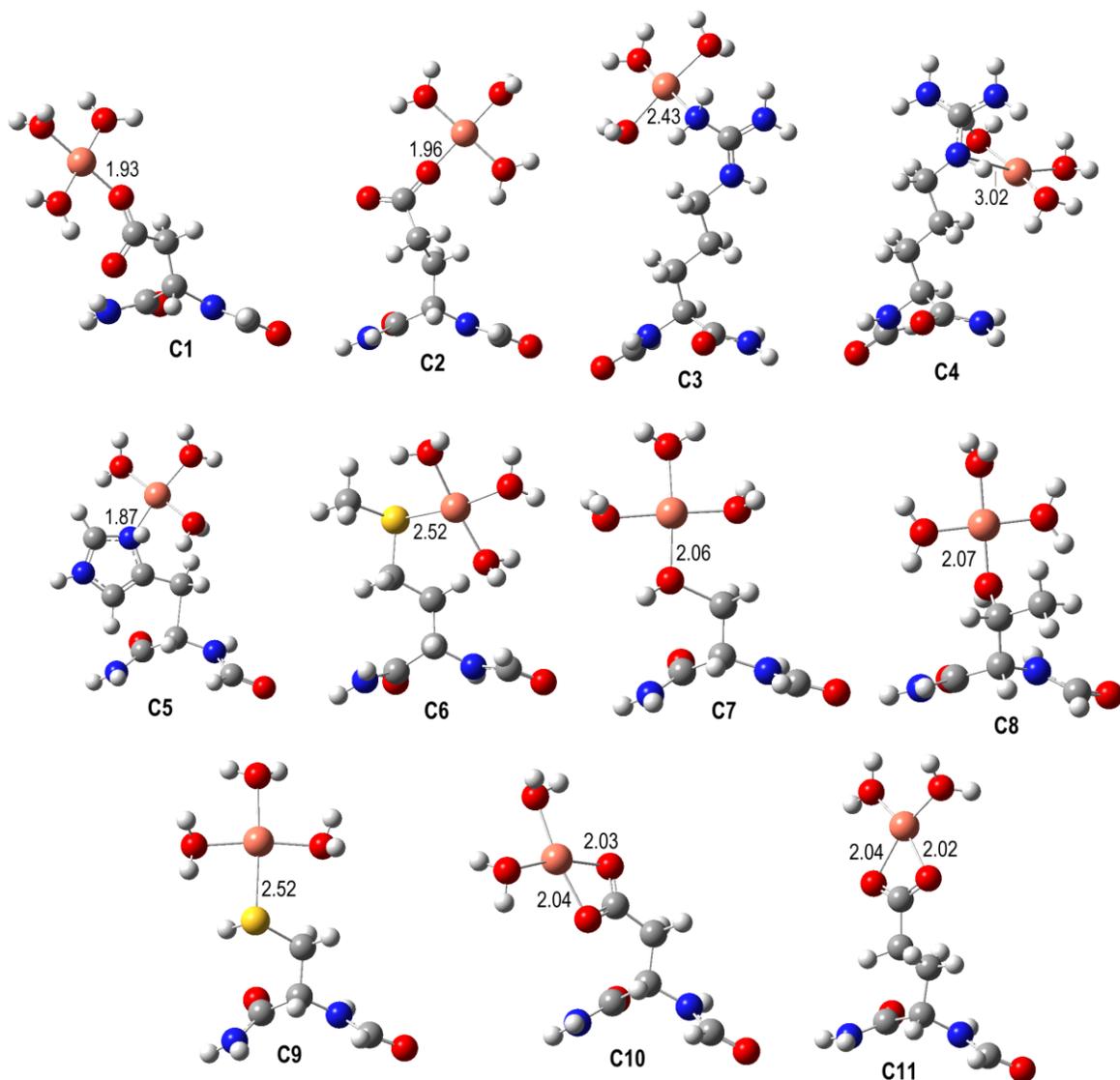


Figura 4 Geometrías optimizadas para los complejos formados con Cu (II) mediante la ruta RAD. El código de colores para los átomos es blanco para H, gris para C, azul para N, rojo para O, rosa/naranja para Cu y amarillo para S.

Las geometrías optimizadas para los complejos formados con cisteína, metionina, serina y treonina son todos monodentados ya que las cadenas laterales de estos aminoácidos solo tienen un sitio probable de ligadura. En el caso de cisteína y metionina este es un S, mientras que para serina y treonina es un O. Comparando las distancias de enlace del mismo tipo de átomo (cisteína con metionina y serina con treonina) no se observan diferencias marcadas. Por el contrario, para los ligantes con sitio de ligadura N, la

distancia de enlace de His es mucho menor que las de Arg, lo que indica que His se enlaza a Cu(II) más fuertemente.

En el complejo C5, que corresponde a histidina, el enlace involucra al sitio N1 y no al N2 debido a que este último está protonado y por tanto no puede formar nuevos enlaces (a no ser que pierda un protón, ver la sección siguiente). Una situación similar se da con esta ruta y los complejos monodentados de arginina. Estos se pueden formar solo con los nitrógenos N1 y N3, debido a la misma razón (que N2 está protonado a pH fisiológico). Además se encontró que para el complejo de arginina (C4) en la posición 3 la distancia de enlace metal ligante es significativamente mayor que para el sitio 1, a pesar de que ambos sitios de ligadura involucran átomos de N. Esto se debe a los efectos estéricos que presenta la posición 3 y que no tiene el sitio 2, por ser terminal.

Tabla 2. Energías libres de Gibbs (Kcal mol^{-1}) y constantes de equilibrio (K), a 298 K, para las reacciones de acomplejamiento a través de las rutas RAD, usando los modelos simplificados.

Complejo	Residuo	Sitio de ligadura	ΔG	K
Monodentado				
C1	Asp	O	-10.04	2.3E+07
C2	Glu	O	-6.31	4.2E+04
C3	Arg	N1	13.49	1.3E-10
C4	Arg	N3	10.51	2.0E-08
C5	His	N1	7.06	6.6E-06
C6	Met	S	6.21	2.8E-05
C7	Ser	OH	3.63	2.2E-03
C8	Thr	OH	1.38	9.7E-02
C9	Cys	S	8.53	5.6E-07
Bidentado				
C10	Asp	O	-16.34	9.4E+11
C11	Glu	O	-16.36	9.8E+11

En la Tabla 2 se resumen las energías obtenidas de los complejos formados por esta ruta, así como el sitio donde ocurre el enlace con Cu(II). Podemos apreciar que los valores de energía calculados en su mayoría son positivos, es decir, son procesos endergónicos. Las únicas reacciones exergónicas que se encontraron con la ruta RAD fueron las que involucran a residuos de Asp y Glu como ligantes. Para estos residuos las energías libres de Gibbs calculadas son negativas tanto para complejos monodentados como bidentados. Sin embargo estos últimos están más favorecidos. La mayor reactividad de Asp y Glu, vía RAD, hacia Cu(II) parece deberse a que solo para estos residuos los sitios de ligadura están cargados negativamente.

6.1.2 Ruta RADA

Las estructuras de los complejos obtenidos, según la ruta RADA, se muestran en la Figura 5. Se obtuvieron 10 posibles complejos, de los cuales seis son monodentados y cuatro bidentados. Los complejos monodentados corresponden a arginina enlazando a N2 (C12), histidina enlazando a N2 (C13), lisina (14), serina (C15), treonina (C16) y cisteína (C17). Los complejos bidentados se encontraron para arginina enlazando a N1 y N2 (C18), arginina enlazando a N2 y N3 (C19) y complejos donde ocurre doble deprotonación al formarse con arginina enlazando a N1 y N2 (C20) y arginina enlazando a N2 y N3 (C21).

Al igual que para la ruta RAD, se probaron diferentes conformaciones posibles, aunque solo se reportaran las que corresponden a las de menor energía. Se encontró que las distancias de enlace Cu-N en los complejos bidentados son sistemáticamente más cortas que en los monodentados, lo que sugiere ligaduras más fuertes. Esta característica geométrica entonces sugiere que la arginina se acompleja con cobre de manera bidentada preferentemente a monodentada.

Sin embargo, en el caso de la ruta RADA, las distancias de enlace para cada tipo de átomo unido a Cu(II) son muy similares en la mayoría de los casos. Por lo que el análisis de resultados se centró esencialmente en las energías de reacción (Tabla 3). A diferencia de los resultados obtenidos para la ruta RAD, para la ruta RADA se encontró que todas las

reacciones son exergónicas. De modo que puede decirse, que la ruta RADA es más probable que la ruta RAD para la formación de complejos de Cu(II) con la mayoría de los residuos aminoácidos en proteínas (que a pH fisiológico se encuentran tiene carga 0 o 1).

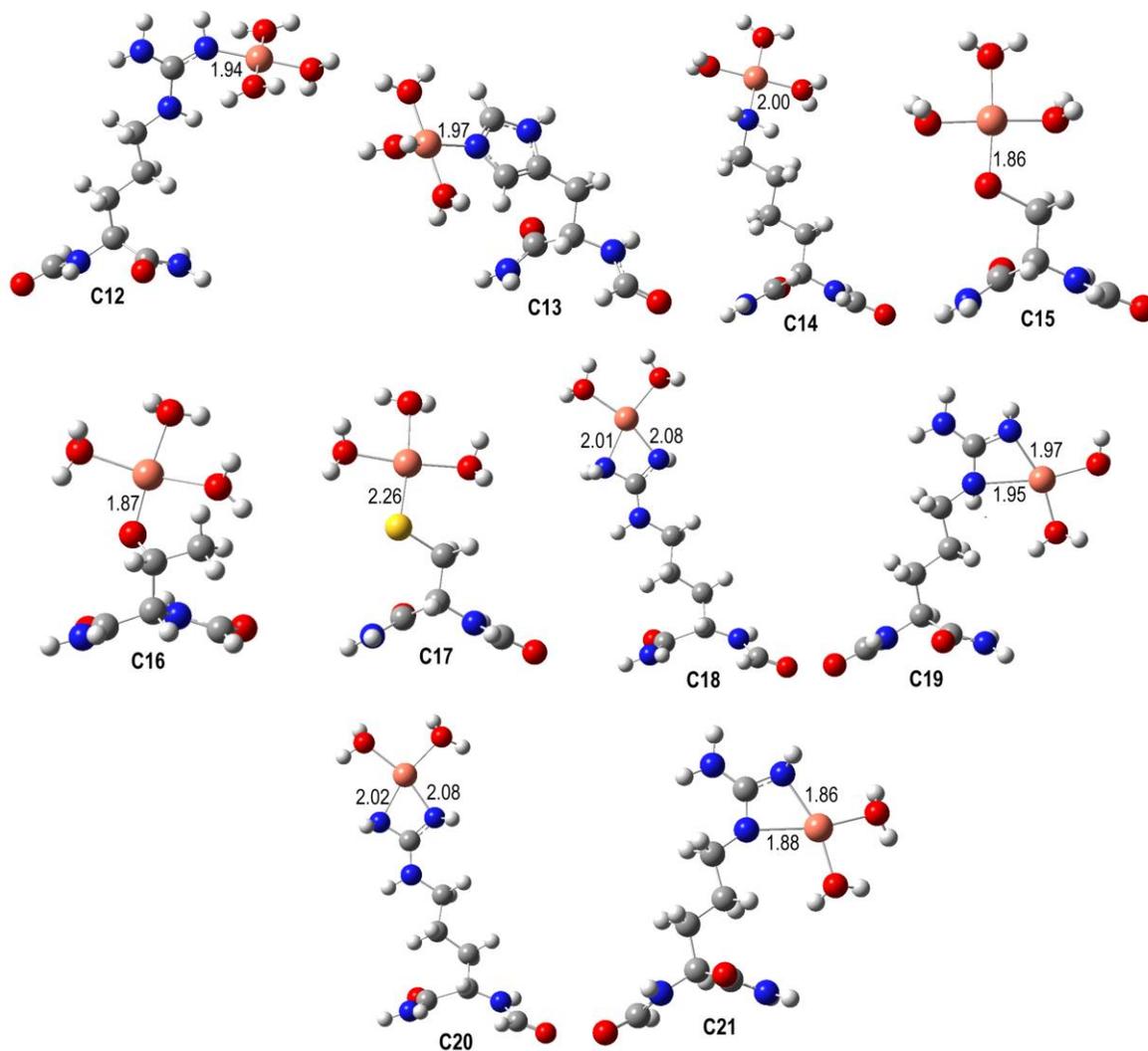


Figura 5 Geometrías optimizadas para los complejos formados con Cu (II) mediante la ruta RADA. El código de colores para los átomos es blanco para H, gris para C, azul para N, rojo para O, rosa/naranja para Cu y amarillo para S.

Por otra parte, la ruta propuesta como viable siempre da lugar a complejos en los que el (o los) sitio(s) de ligadura se encuentran deprotonados. Esto se cumple tanto para complejos monodentados como para complejos bidentados

Tabla 3. Energías libres de Gibbs (Kcal mol^{-1}) y constantes de equilibrio (K), a 298 K, para las reacciones de acomplejamiento a través de las rutas RADA, usando los modelos simplificados.

Complejo	Residuo	Sitio de ligadura	$\Delta G'$ (pH=7.4)	K' (pH=7.4)
Monodentado				
C12	Arg	N2	-2.51	6.9E+01
C13	His	N2	-11.46	2.5E+08
C14	Lys	N	-6.58	6.6E+04
C15	Ser	O	-5.41	9.2E+03
C16	Thr	O	-6.16	3.3E+04
C17	Cys	S	-14.19	2.5E+10
Bidentado				
C18	Arg	N1,N2	-1.06	6.0E+00
C19	Arg	N2,N3	-2.03	3.1E+01
C20	Arg	N1,N2	-3.55	4.0E+02
C21	Arg	N2,N3	-5.48	1.0E+04

6.1.3 Análisis

Considerando de manera conjunta todos los resultados obtenidos con el modelo reducido puede proponerse que los residuos que actúan como mejores ligantes para Cu(II) son aquellos en los que el sitio enlazado a cobre se encuentra deprotonado. Esto se cumple, ya sea que el complejo se haya formado por la ruta RAD o en la ruta RADA. Para el primer caso, que involucra a las especies ácido-base dominantes a pH fisiológico, los únicos complejos termodinámicamente estables son aquellos que tienen a los residuos Asp y Glu como ligantes. Estos residuos están deprotonados al pH de interés, de modo que el sitio de ligadura se corresponde a un grupo carboxilato (aniónico). En el caso de la ruta RADA (que no es viable para Asp y Glu porque ya no tienen protones ácidos a pH=7.4) todos los

complejos con sitio de ligadura deprotonado son también termodinámicamente estables, independientemente de que la deprotonación haya ocurrido en O, N o S.

Para poder comparar simultáneamente los resultados obtenidos para las dos rutas de formación de complejos RAD y RADA, se construyó una gráfica que muestra de manera conjunta los resultados para todas las reacciones exérgicas se muestran en la figura 6. Conjuntamente se señalan los residuos de aminoácidos que actúan como ligantes en la figura. De acuerdo a los resultados obtenidos, los complejos bidentados con residuos que presentan al grupo carboxilato como sitio de ligadura (Asp y Glu) son los de menor energía relativa. Sin embargo estos residuos se encuentran tanto en β A como en HN. De modo que su presencia no explica el por qué HN puede ofrecer la neuroprotección de β A, evitando su agregación.

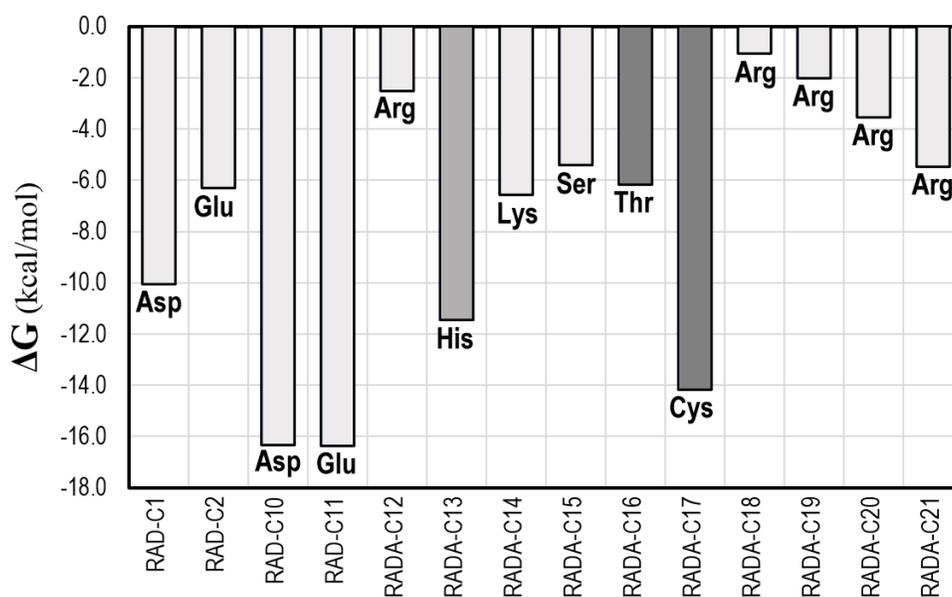


Figura 6. Energías libres de Gibbs para las reacciones de formación de complejos exérgicos. Código de colores: gris claro para residuos que se encuentran tanto en HN como en β A, gris medio para residuos que se encuentran en β A pero no en HN, gris oscuro para residuos que se encuentran en HN pero no en β A.

Los aminoácidos en los que se diferencian estos dos péptidos son His (presente en β A pero no en HN), Thr y Cys (presentes en HN pero no en β A). Es interesante notar que los

complejos que siguen (según la tendencia de menores energías) son RADA-C17 y RADA-C13, en los que el ligante se corresponde a residuos de Cys e His, respectivamente. La diferencia de estabilidad relativa entre estos dos compuestos puede ser relevante en el contexto de esta tesis. Según los resultados calculados, la formación del complejo con Cys como ligante cuesta alrededor de 3 kcal/mol menos que la formación del complejo equivalente pero con His como ligante. Esto sugiere que la afinidad de HN por Cu(II) a través de su residuo Cys, es mayor que la del β A a través de sus sitios de His.

6.2. Modelo Completo (ONIOM).

El método ONIOM ofrece una amplia aplicación en el análisis de la química de sistemas de tamaño grande. Algunos ejemplos son complejos metálicos, sistemas orgánicos, reacciones químicas en clúster y solución, materiales, nanoquímica y procesos enzimáticos.⁷⁸ Debido al tamaño del sistema que nos interesa en este trabajo (HN) se hace imposible realizar cálculos de alto nivel de teoría para el sistema completo. Sin embargo, sería interesante ver si los valores de energías obtenidos con los sistemas reducidos cambian significativamente o no al considerar todo el sistema. Ese fue el objetivo principal de esta parte de la investigación, para la que se empleó el método ONIOM (QM/QM).

El modelo escogido incluye en la primera capa a los átomos que corresponden al sitio de ligadura más probable, según los resultados de la estrategia de modelos reducidos. De modo que esta capa incluye la cadena lateral de la cisteína y sus dos enlaces peptídicos. En la segunda capa se encuentran los demás átomos correspondientes al resto del péptido (Figura 8). La ruta de formación de complejos escogida es RADA, ya es la más probable, según los resultados mostrados en la sección anterior.

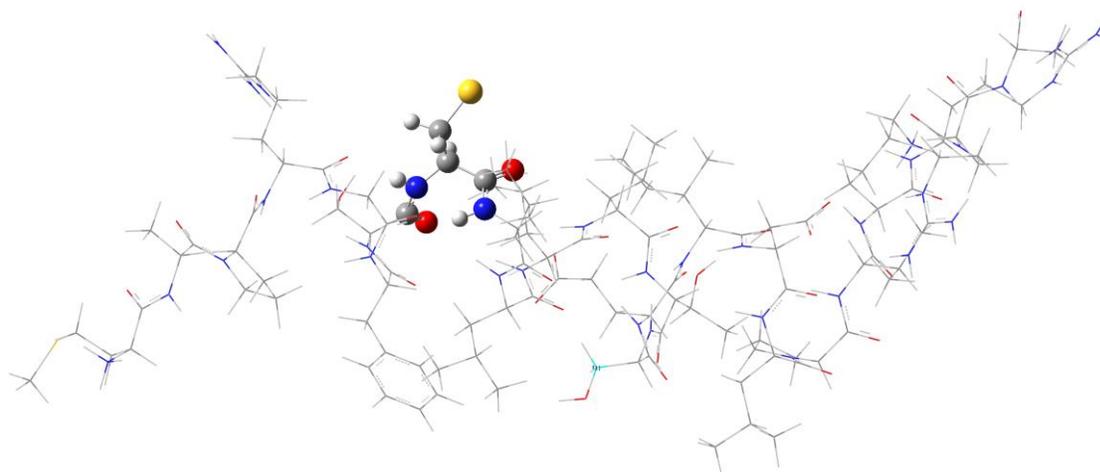


Figura 8. Capas empleadas en los cálculos ONIOM para el péptido HN completo.

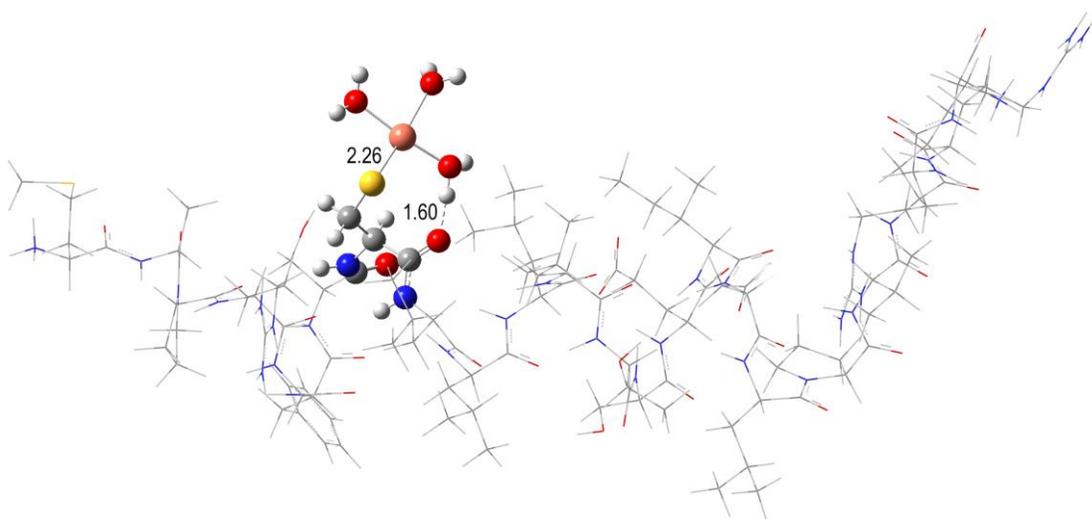


Figura 9. Complejo de Cu(II) con el residuo Cys de HN, obtenido con ONIOM.

Tanto para la humanina como para el complejo de Cu(II) se optimizaron completamente las geometrías. La distancia de enlace S-Cu obtenida con ONIOM es idéntica a la del complejo con el modelo reducido, lo que indica que este es apropiado. La diferencia estructural más importante es que una de las aguas ligadas a cobre forma un puente de H con el O de un enlace peptídico vecino cuando la modelación se hace con ONIOM,

mientras que esta interacción no aparece con el modelo reducido. Esta diferencia se debe a la conformación que adquiere el entorno químico de la cadena lateral de Cys en el péptido, que no se aprecia en el modelo reducido, debido a que solo involucra al residuo y no todo el péptido.

La energía libre de Gibbs calculada usando el modelo ONIOM para la formación del complejo de Cu(II) con el residuo Cys fue de -15.05 kcal/mol. Este valor es solamente 0.86 kcal/mol menor al que se obtuvo con el modelo reducido. La diferencia es menor a la exactitud química (1 kcal/mol) y parece deberse a la formación del puente de H descrito anteriormente. De modo que puede decirse que hay una buena concordancia entre los resultados obtenidos para el modelo completo y los obtenidos con el modelo reducido. Este acuerdo sugiere que los resultados obtenidos con este último son confiables para el estudio de reactividad de sitio en péptidos y proteínas, siempre y cuando esta dependa mayormente de la estructura primaria.

Capítulo 7.

Conclusiones

En este trabajo se estudió, mediante la química computacional, la capacidad quelante del peptido HN que tiene hacia el metal Cu(II). Para ello se utilizaron dos modelos de diferente complejidad: el modelo reducido y el modelo completo. Para el primero se utilizó la DFT y para el segundo el método ONIOM donde se combinó los métodos de MM y QM.

Se consideraron dos tipos de reacciones para la formación de los complejos de Cu(II): la ruta de acomplejamiento directo (RAD) y la ruta de acomplejamiento y deprotonación acoplados (RADA). Ambas tomando como referencia a la especie ácido-base más abundante de los aminoácidos estudiados a pH fisiológico.

Se identificó a la RADA como la ruta más probable para la mayor parte de los residuos estudiados ya que presentan complejos favorables debido a su energía de Gibbs es negativa y por tanto son reacciones espontáneas. Las únicas excepciones fueron Asp y Glu, para los cuales el sitio de ligadura, que se corresponde al grupo carboxilo, ya se encuentra deprotonado al pH de interés.

Según las energías libre de Gibbs de reacción para la formación de los complejos de Cu(II), los sitios que se enlazan más fuertemente son justamente los carboxilatos que es aproximadamente -16 kcal/mol. Sin embargo estos están presentes tanto en HN como en β A. Por lo tanto no son responsables de la diferencia de reactividad de estos dos péptidos hacia cobre.

Se encontró que el sitio de ligadura más probable en la HN (después de los carboxilatos) es el grupo tiol del residuo de Cys con aproximadamente -14 kcal/mol, que está presente en la HN pero no en β A. La energía correspondiente a la formación del complejo Cu(II)-Cys es ~ 3 kcal/mol más baja que la del complejo Cu(II)-His, que es el sitio de ligadura identificado previamente como más probable en β A.

El valor obtenido con ONIOM para la formación del complejo Cu(II)-Cys se diferencia del obtenido con el modelo reducido en menos de 1 kcal/mol. Este buen acuerdo soporta la confiabilidad del modelo reducido para la investigación realizada en este trabajo.

Finalmente la mayor afinidad de Cys, comparada con His, hacia Cu(II) permite sugerir a HN como un mejor quelante de Cu(II) que β A, lo que justificaría (al menos en parte) su mayor característica estudiada en este trabajo que es la capacidad neuro-protectora. Esto asumiendo que la formación de complejos con cobre está directamente relacionada con la agregación del péptido β A , y por ende se relaciona directamente con la EA.

8. Perspectivas

El trabajo realizado podría extenderse incluyendo los siguientes aspectos de interés:

- I. Explorar otras posibilidades de acomplejamiento para HN con Cu (II) enlazado a más de un residuo. Esto se puede realizar tanto con el modelo reducido como con el completo. Para ello se usaría los residuos más probables encontrados en el modelo reducido.
- II. Estudiar la formación de complejos entre otros iones metálicos y HN, sólo que se debe verificar antes si la metodología de trabajo propuesta es la idónea para el metal que se elija.
- III. Investigar la posibilidad de que Cu(II) se enlace al residuo no solo de la forma tetra coordinada, sino que pueda enlazarse como penta coordinado o sexta coordinado.

Referencias

- ¹ “Una sociedad para todas las edades”, Segunda Asamblea Mundial sobre el Envejecimiento, Madrid, abril 2002.
- ² Abril M, Ticó N, Garreta R. Enfermedades neurodegenerativas. *Rehabilitación Madrid*. 2004, 38, 318-324.
- ³ Gálvez R, Landelli P., García M. Epidemiología de las enfermedades degenerativas del sistema nervioso: demencias y enfermedad de Alzheimer. Enfermedad de Parkinson. Piedróla Gil, editor. Medicina Preventiva y Salud Pública. 10. a. ed. Barcelona. 2001, 745-55.
- ⁴ Kim D., Song J, Park J, Choi B. Copper induces the accumulation of amyloid-beta in the brain. *Mol Cell Toxicol*. 2013, 9, 57-66.
- ⁵ Dorado C, Rugerio C, Rivas S. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev. Fac Med UNAM* 2003, 46, 229-235.
- ⁶ Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Med Milit*. 2002. 31,126-133.
- ⁷ Paredes F, Roca J. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular *Offarm* 2002;21:96-100
- ⁸ Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, 2002, 71,621-629.
- ⁹ Wolfe M. Therapeutic strategies for Alzheimer’s disease. *Nat. Rev. Drug Discov*.2002 ,859–866.
- ¹⁰ Puiggrós A., Rovira M. Genética y enfermedad de Alzheimer. *Med Clin (Barc)* 2003, 120, 786-792.
- ¹¹ VanDuijn C, Clayton D, Chandra V, Fratiglioni L, Graves A. Familial aggregation of Alzheimer’s disease and related disorders: a collaborative re-analysis of case-control studies. *EURODEM Risk Factors Research Group. Int J Epidemiol*. 1991, 20, 13-20.
- ¹² Hutton M., Pérez-Tur J., Hardy J. Genetics of Alzheimer’s disease. *Essays in Biochemistry*. 1998 33, 117-131.
- ¹³ Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer’s disease. *Trends Neurosci*. 1997, 20, 154-59.
- ¹⁴ Paglini G, Peris L, Mascotti F, Quiroga S, Caceres A. Tau protein function in axonal formation. *Neurochem Res*. 2002, 25, 37-42.
- ¹⁵ Gra S, Padró N, Llibre J. Péptido beta amiloide, proteína tau y enfermedad de Alzheimer. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2002, 21 ,253-61.

-
- ¹⁶ Manzano-León N, Mas-Oliva J. Estrés oxidativo, péptido β -amiloide y enfermedad de Alzheimer. *Gac. Méd. Méx.* , 2006, 42, 221-238.
- ¹⁷ Simonian NA, Coyle JT. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.*1996, 36, 83-106.
- ¹⁸ Glenner G, Wong W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, 120,885–890.
- ¹⁹ Rauk A. The chemistry of Alzheimer's disease. *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 2698–2715.
- ²⁰ Rambaran R, Serpell C. Amyloid fibrils: A normal protein assembly. *Prion.* 2008, 2, 112-117.
- ²¹ Crescenzi O, Tomaselli S. ,Guerrini R, Salvadori S, D'Urs A, Temussi P, Picone P. Solution structure of the Alzheimer amyloid b-peptide (1–42) in an apolar microenvironment. *Eur. J. Biochem.*2002, 269, 5642–5648
- ²² Serpell L. Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* 1502, 2000, 16-30.
- ²³ Donnelly P, Xiao Z, Wedd A. Copper and Alzheimer's disease. *Chemical Biology.*2007, 11,128–133
- ²⁴ Bush A. Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 2002, 23, 1031-1048.
- ²⁵ Sudo H, Hashimoto Y, Niikura T, Shao Z, Yasukawa T, Ito Y, Yamada Y, Hata M, Hiraki T, Kawasumi M, Kouyama K, Nishimoto I. Secreted A β does not mediate neurotoxicity by antibody-stimulated amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 282, 548–556.
- ²⁶ Yen K, Lee C, Mehta H, Cohen P. The emerging role of the mitochondrial-derived peptide humanin in stress resistance. *J Mol Endocrinol.* 2013, 50, R11–R19
- ²⁷ Benaki D, Zikos C, Evangelou A, Livaniou E, Vlassi M, Mikros E, Pelecanou M. Solution structure of humanin, a peptide against Alzheimer's disease-related neurotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*2005, 329, 152-160
- ²⁸ Niikura T, Yamada M, Chiba T, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I. Characterization of V642I-A β PP-induced cytotoxicity in primary neurons. *J Neurosci Res.* 2004, 77, 54–62
- ²⁹ Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, Kita Y, Kawasumi M, Kouyama K, Doyu M. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum
-

-
- of familial Alzheimer's disease genes and A β . *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, 98 , 6336–6341
- ³⁰ Hashimoto Y, Nikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E, Abe Y, Kita Y, Nishimoto I. Details characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease relevant insults. *Journal of Neuroscience*. 2001, 21, 9235–9245.
- ³¹ Zapala B, Kaczyński L, Kieć-Wilk B, Staszal T, Knapp A, Thoresen G, Wybrańska I, Dembińska-Kieć A. Humanins, the neuro protective and cytoprotective peptides with antiapoptotic and anti-inflammatory properties. *Pharmacological Reports*. 2010, 62 , 767-777.
- ³² Sponne I, Fife A, Koziel V, Kriem B, Oster T, Pillot T. Humanin rescues cortical neurons from prion-peptide induced apoptosis. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 95–102.
- ³³ Maftei M, Tian X, Manea M, Exner T, Schwanzar D, Arnimvon C, Przybylski M. Interaction structure of the complex between neuroprotective factor humanin and Alzheimer's β -amyloid peptide revealed by affinity mass spectrometry and molecular modeling. *Journal of Peptide Science*. 2012; 18:373–382.
- ³⁴ Hashimoto Y, Ito Y, Niikura T, Shao Z, Hata M, Oyama F, Nishimoto I. Mechanisms of neuroprotection by novel rescue factor Humanin from Swedish mutant amyloid precursor protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2001, 283, 460–468.
- ³⁵ Muzumdar R, Huffman D, Atzmon G, Buettner C, Cobb L, Fishman S, Budagov T, Cui L, Einstein F, Poduval A, Hwang D, Barzilai N, Cohen P. Humanin: a novel central regulator of peripheral insulin action. *PLoS ONE*. 2009, 4 , 6334.
- ³⁶ Lee C, Yen K, Mehta H, Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol Metab*. 2013, 24, 222–228.
- ³⁷ Expert Group on Vitamins and Minerals Secretaria, 2003 186-196
- ³⁸ Pandit A, Bhave S. Copper metabolic defects and liver disease: Environmental aspects. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2002, S403–S407.
- ³⁹ Uauy R, Olivarez M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr*. 1998, 952S.
- ⁴⁰ Uriu-Adams J, Keen C. Copper, oxidative stress, and human health *Molecular Aspects of Medicine* 26 , 2005 268–298.
- ⁴¹ Sayre L, Perry M, Smith G, Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol*. 2008, 172.
-

-
- ⁴² Brewer G, Askari F, Wilsons disease: clinical management and therapy. *J. Hepatol.* 42 (Suppl.), 2005 S13–S21.
- ⁴³ Good P, Perl D, Bierer L, Schmeidler J. Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann Neurol.* 1992, 31, 286-292.
- ⁴⁴ Multhaup G, Masters C, Beyreuther K. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Alzheimer Rep.* 1998, 1, 147–154.
- ⁴⁵ Multhaup G. Amyloid precursor protein, copper and Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 1997, 51, 105-111.
- ⁴⁶ Bush A, Lynch T, Cherny R, Atwood C, Goldstein L, Moir R, Li Q, Cabelli D, Multhaup G, Master C, Tanzi R, Huang X. Alzheimer A β functions as a superoxide antioxidant in vitro and in vivo. *Soc. Neurosci. Abstract.* 1991, 25, 14-20.
- ⁴⁷ Atwood C, Scarpa R, Huang X, Moir R, Jones W, Fairlie D, Tanzi R, Bush A. Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid β 1-42. *J. Neurochem.* 2002, 75 (3), 1219-1233
- ⁴⁸ Atwood S, Huang X, Moir R, Bacarra N, Romano D, Tanzi R, Bush A. Dramatic aggregation of Alzheimer A β by Cu (II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem.* 1998 , 273, 12817-12826
- ⁴⁹ Rickard, G , Gomez-Balderas, R., Brunelle, P.; Raffa, D. F.; Rauk, A. Computational Studies of Cu(II)/Met and Cu(I)/Met Binding Motifs Relevant for the Chemistry of Alzheimer's Disease. *J. Phys. Chem.* 2005, 109 8361.
- ⁵⁰ Minicozzi V, Stellato F Comai M, Serra M, Potrich C, Meyer-Klaucke W, Morante S. Identifying the minimal copper and zinc-binding site sequence in amyloid-beta peptides. *J. Biol. Chem.* 2008, 283 , 10784–10792
- ⁵¹ Mantri Y, Fioroni M, Baik M. Computational study of the binding of Cu II to Alzheimer's amyloid-b peptide: Do Ab42 and Ab40 bind copper in identical fashion?. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008, 13,1197–1204.
- ⁵² Alí-Torres J, Marechal J, Rodríguez-Santiago L, Sodupe M. Three Dimensional Models of Cu²⁺-A β (1_16) Complexes from Computational Approaches. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 15008–15014.
-

-
- ⁵³ Rimola A, Alí-Torres J, Rodríguez-Rodríguez C, Poater J, Matito E, Sola M, Sodupe M. Ab Initio Design of Chelating Ligands Relevant to Alzheimer 's disease: Influence of Metalloaromaticity. *J. Phys. Chem. A*. 2011, 115, 12659–12666.
- ⁵⁴ Alí-Torres J, Mirats A, Marechal J, Rodríguez-Santiago L, Sodupe M. 3D Structures and Redox Potentials of Cu²⁺-A β (1-16) Complexes at Different pH: A Computational Study. *J. Phys. Chem. B*. 118, 2004, 4840–4850.
- ⁵⁵ Tajima H, Kawasumi M, Chiba T, Yamada M, Yamashita K, Nawa M, Kita Y, Kouyama K, Aiso S, Matsuoka M, Niikura T, Nishimoto I. A humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid- β -induced memory impairment in mice. *Journal of Neuroscience Research*. 2005, 79, 714–723.
- ⁵⁶ Niikura T, Sidahmed E, Hirata-Fukae C, Aisen P, Matsuoka Y. A humanin derivative reduces amyloid β accumulation and ameliorates memory deficit in triple transgenic mice. *PLoS ONE*. 2001, 6, 169-177.
- ⁵⁷ Zhang W, Zhang W, Li Z, Hao J, Zhang Z, Liu L, Mao N, Miao J, Zhang L. S14G-Humanin improves cognitive deficits and reduces amyloid pathology in the middle-aged APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2012, 100, 361–369.
- ⁵⁸ Gomez-Castro C, Vela A, Quintanar L, Grande-Aztatzi R, Mineva T, Goursot A. Insights into the Oxygen-Based Ligand of the Low pH Component of the Cu²⁺-Amyloid- β Complex. *J. Phys. Chem. B*. 2014, 118, 10052–10064.
- ⁵⁹ Chan B, O'Reilly J, Easton J, Radom L. Reactivities of amino acid and derivatives toward hydrogen abstraction by Cl• and OH•. *J. Org. Chem*. 2012, 77, 9807-9812.
- ⁶⁰ Medina M, Galano A, Alvarez-Idaboy R. Site reactivity in the free radicals induced damage to leucine residues: a theoretical study. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 2015, 17, 4970–4976.
- ⁶¹ Mordasini T, Thiel W. Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Approaches. *Chimia*. 1998, 52, 288-291.
- ⁶² Field M, Bash P, Karplus M. A Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem*. 1990, 11, 700-733.
- ⁶³ Gao J. Methods and Applications of Combined Quantum Mechanical and Molecular Mechanical Potentials. *Rev. Comp. Chem*. 1996, 7, 119-185.
-

-
- ⁶⁴ Dapprich S, Komaromi I, Byun K, Morokuma K, Frisch J. A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. *Journal of Molecular Structure Theochem.* 1991, 1, 461-462.
- ⁶⁵ Maseras F, Morokuma K. IMOMM: A New Integrated Ab Initio + Molecular Mechanics Geometry Optimization Scheme of Equilibrium Structures and Transition States. *J. Comput. Chem.* 1995,16, 1170.
- ⁶⁶ Chung L, Sameera W, Ramozzi R, Page A, Hatanaka M, Petrova G, Harris T, Li X, Ke Z, Liu F, Li H, Ding L, Morokuma K. The ONIOM Method and Its Applications. *Chem. Rev.* 2015, 115, 5678–5796.
- ⁶⁷ Rape A, Casewit C, Colwell K, Goddard W, Skiff W. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114 10024-10035.
- ⁶⁸ Ribeiro R, Marenich A, Cramer C, Truhlar D. Use of Solution-Phase Vibrational Frequencies in Continuum Models for the Free Energy of Solvation. *J. Phys. Chem. B.* 2011, 115, 14556–14562.
- ⁶⁹ Frisch M, Trucks W, Schlegel H, Scuseria G, Robb M, Cheeseman J, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson G, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian P, Izmaylov A, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg J, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery J, Peralta J , Ogliaro F, Bearpark M, Heyd J, Brothers E, Kudin K, Staroverov V, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari, Rendell A, Burant J, Iyengar S, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam J, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, Yazyev O, Austin A, Cammi A, Pomelli C, Ochterski W, Martin R, Morokuma K, Zakrzewski V, Voth G, Salvador P, Dannenberg J, Dapprich S, Daniels A, Farkas Ö, Foresman J, Ortiz J, Cioslowski J, Fox D, Gaussian, Inc. Wallingford CT, *Gaussian 09, Revision D.01* 2009
- ⁷⁰ Zhao Y, Schultz N, Truhlar D. Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. *J. Chem. Theory Comput.* 2006, 2, 364-382.
- ⁷¹ Stewart J. Optimization of parameters for semiempirical methods. V. Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* 2007, 13 , 1173-213.

-
- ⁷² Zhao Y, Schultz N, Truhlar G. Exchange-correlation functional with broad accuracy for metallic and nonmetallic compounds, kinetics, and noncovalent interactions. *J. Chem. Phys.* 2005, 123, 161103
- ⁷³ Ho J, Klamt H, Coote M. Comment on the Correct Use of Continuum Solvent Models L. *J. Phys. Chem. A.* 2010, 114, 13442–13444.
- ⁷⁴ Marenich A, Cramer C, Truhlar D. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J. Phys. Chem. B.* 2009, 113, 6378-6396.
- ⁷⁵ Bryantsev V, Diallo M, Goddard III A. Computational study of copper(II) complexation and hydrolysis in aqueous solutions using mixed cluster/continuum models. *J. Phys. Chem. A.* 2009, 113, 9559-9567.
- ⁷⁶ Ortega-Castro J, Adrover M, Frau J, Donoso J, Muñoz F. Cu²⁺ complexes of some AGEs inhibitors, *Chemical Physics Letters.* 2009, 475, 277–284.
- ⁷⁷ Camaioni D, Schwerdtfeger C. Comment on accurate experimental values for the free energies of hydration of H⁺, OH⁻, and H₃O⁺. *J. Phys. Chem. A.* 2005, 109, 10795–10797.
- ⁷⁸ Vreven T, Morokuma K. On the Application of the IMOMO (Integrated Molecular Orbital + Molecular Orbital Method). *J. Comput. Chem.* 2009, 21, 1419.

Anexos

Anexo I. Teoría de los Funcionales de la Densidad.

La teoría de funcionales de la densidad (DFT, del inglés Density Functional Theory) se usa frecuentemente para describir a moléculas sistemas químicos. Se considera como una opción más económica computacionalmente que los métodos tradicionales basados en la función de onda.

La idea primordial en la cual se basa esta teoría se debe a que la energía del estado fundamental de un sistema poli electrónico depende solamente de la función de densidad electrónica, $U(r)$, de manera que no es necesario conocer la función de onda que describa al sistema. La función de densidad electrónica supone la probabilidad de encontrar un electrón en un volumen con espín arbitrario.

Los orígenes de esta teoría se encuentran en un modelo desarrollado por Thomas y Fermi a finales del año 1920. Pero fue hasta mediado del año 1960 con las contribuciones de Hohenberg, Kohn y Sham se establecieron el formalismo teórico en el que se basa esta teoría.

El primer teorema de Hohenberg y Kohn, establece que la densidad electrónica del estado fundamental, $U(r)$, no puede derivar de dos potenciales distintos, salvo que ambos difieran por una constante. En particular, Hohenberg y Kohn mostraron que la energía es un funcional de la densidad a través de la relación donde representa la funcional universal que contiene a la energía cinética, y la interacción electrón-electrón.

$$v(r_i) = - \sum_a \frac{Z_a}{r_{ia}} \quad \text{Ec. 1}$$

Con un segundo teorema se demuestra que la densidad electrónica del estado basal es aquella que minimiza al funcional de energía y por lo tanto define el correcto potencial externo. $0 \leq [U]$

$$E_0 \leq E_v[\rho(r)] \quad \text{Ec. 2}$$

Desde el punto de vista numérico, la función de onda es un objeto muy complejo de manipular, pues para N partículas es una función de 3N variables, mientras que la densidad es más fácil de manejar pues es siempre una función de 3 variables, independientemente del número de partículas.

Modelo de Kohn y Sham.¹

Kohn y Sham, por su parte dieron una forma de aproximar el funcional universal, donde un sistema poli electrónico descrito por una densidad puede ser sustituido por otro sistema que contenga electrones no interactuantes y que tengan la misma densidad. Con esto se puede representar al sistema por medio de un determinante siendo uno de Slater, en donde se representa a los electrones del sistema con funciones. Así la energía cinética corresponde a una suma de energías cinéticas individuales y la densidad corresponde a la suma de las mismas.

Por tanto se puede obtener la densidad mediante la solución de las ecuaciones que presentan la relación entre energía y densidad. Esa ecuación que satisface esa relación en el siguiente.

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla^2 + E_{xc}(r) \right) \phi_i(r) = \varepsilon_i \phi_i(r) \quad \text{Ec. 3}$$

donde ϕ_i representa los llamados orbitales de Kohn-Sham y E_{xc} presenta la energía de intercambio y correlación. El último término en lo que se diferencian las diferentes aproximaciones de la DFT.

¹ Kohn W, Sham L. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. J. Phys. Rev. 1965, 140, A1133

Intercambio y correlación.

Se sabe que cuando el planteamiento de Kohn y Sham es exacto, hasta el momento el funcional de intercambio y correlación exacto, E_{xc} , es desconocido y por lo tanto son necesarias aproximaciones a este funcional.

$$E_{xc}[\rho] = T[\rho] - T_s[\rho] + V_{ee}[\rho] - J[\rho] \quad \text{Ec. 4}$$

Donde un elemento adicional en el modelo de Kohn y Sham es la aproximación a la interacción electrón-electrón $V_{ee}[\rho]$, ya que proponen como parte principal de ésta a la interacción coulombica que se define por $J[\rho]$. Incluye a la energía cinética $T[\rho]$ universal, así como la suma de energías cinética que corresponde a cada orbital de Slater $T_s[\rho]$.

La clasificación a estas aproximaciones se puede encontrar en la escalera de Jacob definida por John. P. Perdew. La primera aproximación conocida como Aproximación de Densidad Local (LDA) es el primer eslabón a la escalera de Jacob y la manera más sencilla posible para calcular la energía de correlación e intercambio. Consiste en suponer que en cada punto, la energía de intercambio y correlación depende sólo de la densidad en ese punto. Este valor se considera como el que tendría un gas de electrones libres de esa densidad. Se obtienen resultados sorprendentemente precisos para algunas propiedades.

El segundo peldaño de la escalera de Jacob es la Aproximación de Gradiente Generalizado (GGA), estas son semilocales, ya que consideran en cada punto el valor de la densidad y sus gradientes. Un ejemplo de esta aproximación es el funcional reportado por Perdew, Burke y Ernzerhof. Para algunas propiedades estas

aproximaciones dan mejores resultados que LDA, en particular para geometrías moleculares y energías del estado fundamental, aunque para otras no representan una mejora sustancial .

Aún con esta aproximación, no se conoce la forma funcional para las energías de correlación electrónicas y energía de intercambio. Estas corresponden a la interacción cuántica entre electrones, la primera debido a la parte cuántica de la repulsión coulombica y la segunda debido al principio de exclusión de Pauli entre electrones del mismo espín. Una solución a este problema es el desarrollo de métodos híbridos como el B3LYP, pero existen otros métodos dentro de la propia teoría del funcional de la densidad.

Una serie de funcionales más sofisticados puede obtenerse al suponer que la energía de intercambio y correlación depende explícitamente de los orbitales de Kohn-Sham. El más común de estos funcionales es el de Intercambio Exacto (E_{xx}), que incluye de manera completa la energía de intercambio electrónico y que puede derivarse desde primeros principios. El problema de este tipo de funcionales es que computacionalmente son más costosos de tratar.

Anexo II. Conjuntos de funciones de base

Al conjunto de funciones matemáticas a partir de las cuales se construye la función de onda, se le conoce como conjunto de funciones de base. Se sabe que se puede obtener la expresión exacta de la función de onda sólo para átomos hidrogenoides. Sin embargo con estos se pueden construir funciones más complejas como lo son orbitales moleculares. Los conjuntos de bases más grandes constituyen una aproximación más exacta de los orbitales por imponer menos restricciones sobre la localización de los electrones en el espacio. Los conjuntos de base para cálculos de estructura electrónica son combinaciones lineales de funciones para formar cada orbital. El éxito de los cálculos está directamente relacionado con la correcta elección de la base. Las expresiones matemáticas para orbitales atómicos se define como:

$$\psi_{n,l,m} = (r, \theta, \phi) = R_{n,l}(r)Y_{m,l}(\theta, \phi) \quad \text{Ec. 4}$$

Donde el primer término corresponde a la parte radial y el segundo a la parte angular. Hay dos tipos de funciones que son las funciones tipo Slater (STO, por sus siglas en inglés: Slater Type Orbitals) y las funciones tipo Gaussianas (GTO, por sus siglas en inglés: Gaussian Type Orbitals).

Las STO son los tipos de funciones de base que describen mejor las características de los orbitales atómicos, la cúspide nuclear y la forma asintótica correcta. Sin embargo, se usan más las de tipo GTO, debido a que son computacionalmente menos costosas. Se utilizan funciones obtenidas como combinación lineal de GTOs de manera que su forma sea lo más similar posible a una STO para describir mejor a los orbitales. Para las GTOs existen dos tipos: las gaussianas primitivas que se representa por una sola función GTO y las gaussianas contraídas que son una combinación lineal de gaussianas primitivas. Los conjuntos de funciones de base se pueden clasificar de la siguiente forma:

1. Base mínima. Comprende el número mínimo de funciones de base necesarias para cada átomo, este conjunto incluye los orbitales internos y de valencia. El

conjunto de bases llamado STO-nG corresponde a una base mínima donde cada orbital es una función gaussiana contraída formada por n gaussianas primitivas.

2. Bases dobles y triples. Las bases dobles utilizan 2 funciones contraídas por cada orbital atómico y las bases triples requieren del uso de 3 funciones contraídas por cada orbital.

3. Bases de valencia desdoblada. Cada electrón de la capa interna se describe con una función contraída, una combinación lineal de 3 o 6 funciones primitivas GTO: Los electrones de la capa de valencia se describe con 2 funciones, una interna formada por combinación lineal de 2 o más funciones primitivas y una externa que es una función primitiva multiplicada por un coeficiente.

4. Bases con polarización. A cada átomo diferente del átomo de hidrógeno, se le añade un conjunto de orbitales d o f . Para bases con doble polarización adicionalmente a lo anterior, para cada átomo de hidrógeno se añaden un conjunto de orbitales p .

5. Bases con funciones difusas. Se añade un conjunto de funciones difusas (con densidades electrónicas a distancias lejanas a los núcleos), las cuales tienen coeficientes orbitales muy pequeños.

Anexo III. Cálculos termodinámicos con el programa Gaussian

Para los cálculos de las energías de formación, se incluyeron las correcciones termodinámicas a 298.15 K, las cuales se obtienen con el programa Gaussian mediante los componentes de las funciones de partición las cuales son: traslacional (q_t), electrónica (q_e), rotacional (q_r) y vibracional (q_v).

Estas se definen como:

$$q_t = \left(\frac{2\pi m K_B T}{h^2} \right)^{3/2} \frac{K_B T}{P} \quad \text{Ec. 4}$$

$$q_e = \text{la multiplicidad} = 2S + 1 \quad \text{Ec. 5}$$

$$q_r = \frac{\pi^2 m l K_B T}{\sigma h^2} \quad (\text{para especie lineales}) \quad \text{Ec. 6}$$

$$q_r = \frac{8\pi^2 (8\pi^3 I_A I_B I_C)^{1/2} (K_B T)^{3/2}}{\sigma h^3} \quad (\text{Para especies no lineales}) \quad \text{Ec. 7}$$

$$q_v = \prod_i q_{vi} = \prod_i \left(\frac{1}{1 - e^{-h\nu_i/K_B T}} \right) \quad \text{Ec. 8}$$

$$\text{Siendo} \quad \nu_i = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{K_f}{m_R} \right)^{1/2} \quad \text{Ec. 9}$$

Para las componentes de la entropía (S) y la energía (E), se obtiene de la siguiente forma:

$$S_t = R \left(\ln q_t + \frac{5}{2} \right) \quad \text{Ec. 10}$$

$$S_e = R(\ln q_e) \quad \text{Ec. 11}$$

$$S_r = R(\ln q_r + 1) \quad \text{para especies lineales} \quad \text{Ec. 12}$$

$$S_t = R \left(\ln q_r + \frac{3}{2} \right) \quad \text{para especies no lineales} \quad \text{Ec. 13}$$

$$S_v = R \sum_i S_{vi} = R \sum_i \left(\left(\frac{h\nu_i}{K_B T} \right) \left(\frac{1}{e^{-h\nu_i/K_B T} - 1} \right) - \ln(1 - e^{-h\nu_i/K_B T}) \right) \quad \text{Ec. 14}$$

$$E_t = \frac{3}{2} RT \quad \text{Ec. 15}$$

$$E_e = 0 \text{ para } T_{amb} = 298.15 \text{ K} \quad \text{Ec. 16}$$

$$E_r = RT \text{ para especies lineales} \quad \text{Ec. 17}$$

$$E_r = \frac{3}{2} RT \text{ para especies no lineales} \quad \text{Ec. 18}$$

$$E_r = R \sum_i E_{vi} = R \sum_i \left(\left(\frac{h\nu_i}{K_B} \right) \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{e^{h\nu_i/K_B T} - 1} \right) \right) \quad \text{Ec. 19}$$

Así la entalpía (H) y la energía libre de Gibbs (G) serán:

$$H_{corr} = E_{tot} + K_B T \quad \text{Ec. 20}$$

$$G_{corr} = H_{corr} - TS_{tot} \quad \text{Ec. 21}$$

Donde

$$E_{tot} = E_t + E_e + E_r + E_v \quad \text{Ec. 20}$$

$$S_{tot} = S_t + S_e + S_r + E_v \quad \text{Ec. 21}$$

Anexo IV. Parámetros optimizados de M05.²

Parámetros	M05		
	a_i	$C_{\alpha\beta,i}$	$C_{\sigma\sigma,i}$
0	1.00000	1.00000	1.00000
1	0.08151	3.78569	3.77344
2	-0.43956	-14.15261	-26.04463
3	-3.22422	-7.46589	30.69913
4	2.01819	17.94491	-9.22695
5	8.79431		
6	-0.00295		
7	9.82029		
8	-4.82351		
9	-48.17574		
10	3.64802		
11	34.02248		
X		28	

a_i = Coeficientes de intercambio meta-GGA

$C_{\alpha\beta,i}$ = Coeficientes de correlación de espín opuesto

$C_{\sigma\sigma,i}$ = Coeficientes de correlación de espín paralelo

X= % de intercambio exacto

² Zhao, Y.; Schultz, N. E.; Truhlar, D. G. Design of Density Functionals by Combining the Method of Constraint Satisfaction with Parametrization for Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions. J. Chem. Theory Comput. 2006, 2, 364