

19



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DEL PÉPTIDO G
PROVENIENTE DEL VENENO DE ALACRÁN *Centruroides noxius*
POR RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C A

PRESENTA

ELIZABETH HERNÁNDEZ MARÍN

MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Profra. Ernestina Cervera Flores
Vocal	Prof. José Federico del Rfo Portilla
Secretario	Profra. Lucía Hernández Garcíadiago
1er. Suplente	Profra. Georgina Artemisa Duarte Lisci
2º. Suplente	Profra Evangelina Camacho Frías

Sitio donde se desarrolló el tema:
Departamento de Bioquímica. Instituto de Química, UNAM

Asesor: Dr. José Federico del Rfo Portilla



Sustentante: Elizabeth Hernández Marín

Elizabeth Hernández

Agradecimiento

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología,
por la beca de licenciatura otorgada
a través del proyecto 32000 N**

No puedo dejar pasar la oportunidad y escribir algunos nombres (mmmh, esto es lo único que se me ocurrió cuando era mi oportunidad de dejar escrito algo verdaderamente chido, tal vez sea por tantas horas de tv). En fin, ahí van:

Teresa y Armando (mis padres), por ser los patrocinadores de toda mi vida. Porque siempre han sido muchísimo más que sólo patrocinadores. Tal vez algún día logre que haya valido la pena.

Liliana *aka* Lil' Lili (mi hermana). Por todas sus obsesiones que van cambiando según la época, por sus gustos musicales, por compartir sus ideas sobre guiones para películas del tipo comedia romántica, porque me convirtió en "fan" de cierto (B)TVShow y a pesar de que le guste Harry Potter.

Teresa (la abue), Malena y Sara(las tías), Aidee (la prima, que por cierto es muy buena poniendo anestesia y a quien le debo ya varias amalgamas), Viviana (una de las primas más jóvenes).

Nancy, Chabela, Bal, Omar. Porque primero sólo compartíamos el mismo salón de clases y el terror de los exámenes de mate, física y demás materias. Porque poco a poco fuimos construyendo algo más entrañable. Porque hace ya varios años que dejamos la Batíz y aún seguimos compartiendo lo que llamamos "capítulos de nuestras biografías" y seguimos construyendo. También Vero y Oly.

Alejandro, Alejandro I. Ana Lilia, Gabriela, Gamaliel, Haide, Javier, Lalo, Lubanski, Mario, Miguel, Morato, Rosalinda, Tere, Toño, Verónica, Xochil, Zenet; compañeros del Universum, porque nos conocimos en el 99.

Águeda, Alma, Edith, Ernesto, Juan, Jonatan, Leti, Marco, Melchor Miriam, Oscar, Victor. Dr. Barrios, Maestra Consuelo; habitantes de Bioquímica I (varios de ellos también chiquillos felices). Sobre todo por nuestra preocupación respecto a la buena alimentación.

Adela, Alfredo, Brenda, Esteban, Eugenia, Itzia, Gloria, Ivonne, Josefina, Joaquín, Michelle, Rosalba, mis compañeros químicos, los de antes y los de ahora. Por aquellos juegos de dominó, por el fut, porque somos algo chismosillos, por las asiduas visitas al cine de los últimos meses (que espero continúen por mucho tiempo).

En especial: Federico del Río, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo, por poner a nuestra disposición todos los medios materiales que le son posibles, por su paciencia, por su preocupación por hacer del laboratorio un mejor lugar para estar, porque no se me ocurre nada más que decir sino que es un tipo genial. Gracias por todo.

Índice general

. Introducción	1
1. Teoría	3
1.1. Resonancia Magnética Nuclear	3
1.1.1. Magnetismo nuclear y condición de resonancia	3
1.1.2. Desplazamientos químicos	6
1.1.3. Acoplamientos escalares	8
1.1.4. Interacciones a través del espacio	10
1.1.5. Pulsos de radiofrecuencia	13
1.1.6. Transformadas de Fourier	16
1.1.7. Resonancia Magnética Nuclear de 2 dimensiones	16
1.2. Proteínas, impulsos nerviosos y veneno de alacrán	19
1.2.1. Generalidades de proteínas	19
1.2.2. Impulsos nerviosos	24
1.2.3. Veneno de alacrán	25
2. Desarrollo experimental	28
2.1. Asignación de la secuencia	29
2.2. Elementos regulares de estructura secundaria	36
2.2.1. Índice de protón	36
2.2.2. Interpretación cualitativa de NOEs	36
2.3. Asignación de NOEs a larga distancia	39
2.4. Medición de constantes de acoplamiento	39
2.5. Cuantificación de NOEs	39
2.6. Determinación y refinamiento de la estructura	40

3. Resultados y discusión	43
. Conclusiones	52
A. Algunos resultados útiles de la física clásica	53
A.1. Giroscopio	53
A.2. Magnetismo	55
B. Espectros COSY y TOCSY de los 20 aminoácidos	65
. Bibliografía	67

Introducción y objetivos

La búsqueda de correlaciones entre observables físicos es una estrategia para explicar algunos fenómenos. El estudio de las relaciones estructura-función de las proteínas constituye un ejemplo. Las proteínas son biopolímeros que tienen diversas funciones: estructurales, enzimáticas, reguladoras, hormonales, entre otras. Entonces resulta de gran importancia determinar la influencia que tiene la estructura tridimensional de la proteína y crear así, por mencionar un ejemplo, proteínas "sintéticas" con una función específica.

De esta manera se presentan, en principio, dos problemas a resolver: determinar la función de la proteína y determinar su estructura. Posteriormente faltaría contar con el número suficiente de "problemas" resueltos para comenzar a proponer correlaciones.

El estudio de los péptidos del veneno de alacrán ha permitido entre otras cosas determinar la topología de canales iónicos [1], o el desarrollo de insecticidas [2]. Por otro lado, se ha mostrado que el patrón de plegamiento de las toxinas de alacrán puede ser empleado como base para crear moléculas estables con diferentes propiedades biológicas [3].

En el caso de la determinación de las estructuras tridimensionales o terciarias de las proteínas se cuenta con dos metodologías: una que emplea la difracción de rayos X y otra que se basa en el uso de espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Mientras que la técnica de difracción de Rayos X exige contar con un monocristal de la proteína, la de RMN permite hacer estudios de la proteína en disolución.

A partir de la década de los 80's la RMN se ha convertido en un método poderoso para la determinación de estructuras de macromoléculas biológicas en disolución debido a tres razones principalmente:

1. Desarrollo de experimentos en 2 y 3 dimensiones que permiten distinguir correlaciones entre núcleos cuyas señales se encuentran traslapadas en espectros de una dimensión;
2. Disponibilidad de magnetos de alto campo (500 y 600 MHz) que permite la fabricación de equipos que proveen un incremento en la relación señal-ruido y mayor dispersión del campo;

3. Creación de algoritmos matemáticos y computacionales para obtener restricciones a partir de los espectros y calcular estructuras tridimensionales por métodos de dinámica molecular.

La principal fuente de información empleada para resolver estructuras protéicas por RMN se encuentra en las interacciones a corta distancia entre los protones suplementada con ángulos de torsión. Las distancias se obtienen midiendo el Efecto Nuclear Overhauser (NOE) y los ángulos se obtienen del análisis de las constantes de acoplamiento. Es por ello que la asignación de cada señal en los espectros de dos dimensiones es una parte integral de la determinación de la estructura.

El objetivo de este trabajo es presentar la metodología que se siguió para obtener la estructura terciaria de un péptido de bajo peso molecular (aprox. 7kD), el cual fue extraído del veneno del alacrán *Centruroides noxius*, empleando espectros de RMN de 2 dimensiones y comparar la estructura encontrada con otras toxinas de características similares.

Por otro lado, este trabajo se ubica dentro del establecimiento “de las bases para utilizar la Resonancia Magnética en la elucidación de la estructura de proteínas en México”¹. La estructura del péptido G es la primera que se determina con experimentos de RMN obtenidos en el país.

¹M. A. Vera, *Determinación de la estructura secundaria del fragmento 1-108 de la proteína SV40 por RMN*, Tesis, UNAM, México, 2001

Capítulo 1

Teoría

1.1. Resonancia Magnética Nuclear

Las relaciones matemáticas que explican el fenómeno de la Resonancia Magnética Nuclear pueden derivarse al extender los resultados encontrados por la física clásica para el comportamiento de los dipolos magnéticos en un campo magnético y la relación entre momento magnético y momento angular (revisar el Anexo, sección *Algunos resultados útiles de la física clásica*). Por otro lado el espín nuclear se considera análogo con el espín electrónico al que se asocia un momento angular, por lo que los resultados encontrados para el electrón pueden aplicarse a los núcleos atómicos.

1.1.1. Magnetismo nuclear y condición de resonancia[5]

La mecánica cuántica permite calcular la magnitud del momento angular (\vec{L}) y de su proyección sobre uno de los ejes (por ejemplo, el eje z) de una partícula:

$$L = \sqrt{I(I + 1)}\hbar$$

$$L_z = m\hbar$$

donde I será denominado número cuántico de espín y puede tener cualquiera de los siguientes valores:

$$I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \dots$$

y m , el número cuántico magnético, toma los valores

$$m = I, I-1, \dots, -I$$

En la tabla 1.1 se muestran los valores de I de algunos núcleos.

I	Núcleo	$\gamma \times 10^7$ $T^{-1} s^{-1}$	Abundancia natural (%)
0	^{12}C	0	98.892
	^{16}O	0	99.063
$\frac{1}{2}$	1H	26.7519	99.985
	^{13}C	6.7283	1.108
	^{15}N	-2.7126	0.37
	^{19}F	25.1815	100
	^{29}Si	-5.3190	4.70
	^{31}P	10.8394	100
1	2H	4.1066	0.015
	^{14}N	1.9338	99.63
$\frac{3}{2}$	^{11}B	8.5847	80.42
	^{23}Na	7.0747	100
	^{39}K	1.2499	93.1
$\frac{5}{2}$	^{17}O	-3.6280	0.037
	^{25}Mg	-1.6389	10.13
3	^{10}B	2.8747	19.58

Tabla 1.1: Números cuánticos de espín, constantes giromagnéticas y abundancias naturales de algunos núcleos.

A una partícula cargada que posee un momento angular se le puede asociar un momento magnético según la ecuación $\vec{\mu} = g \frac{e}{2m_p} \vec{L}$. Haciendo la equivalencia $g \frac{e}{2m_p} \equiv \gamma$ se tiene que

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L} \quad (1.1)$$

donde γ es conocida como la constante giromagnética y es particular para cada núcleo (ver tabla 1.1).

El momento angular puede tomar $2I+1$ orientaciones con la misma energía, sin embargo, al aplicar un campo magnético \vec{B} sobre el eje z cada orientación adquiere una energía diferente y particular. Si el campo se encuentra sobre el eje z es posible calcular la energía de cada orientación:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -\mu_z B$$

$$E = -\gamma L_z B = -\gamma m \hbar B$$

La regla de selección indica que las transiciones permitidas son entre niveles cuyo $\Delta m = \pm 1$. Entonces

$$\Delta E = \hbar \gamma B$$

En los experimentos de RMN las transiciones son inducidas al irradiar la muestra con un campo B_1 (ondas electromagnéticas) cuya energía es igual a la diferencia de energía entre dos niveles permitidos (condición de resonancia).

La ecuación de Planck permite calcular la frecuencia de la radiación electromagnética aplicada:

$$\Delta E = h\nu_1 \quad (1.2)$$

Aplicando la condición de resonancia

$$h\nu_1 = \hbar\gamma B$$

$$\nu_1 = \frac{\gamma}{2\pi} B \quad (1.3)$$

La diferencia de poblaciones entre un nivel de menor energía y uno de mayor energía puede calcularse según la distribución de Boltzmann y desarrollando la exponencial en series hasta el segundo término:

$$\begin{aligned} \frac{N_\beta}{N_\alpha} &= e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{kT} \\ &= 1 - \frac{\gamma\hbar B}{kT} \end{aligned}$$

α se refiere al nivel de menor energía (momento magnético paralelo al campo) y β se refiere al nivel de mayor energía (momento magnético antiparalelo al campo). Si se define $N_\alpha + N_\beta = 1$, al resolver el sistema de ecuaciones se determina que

$$N_\alpha - N_\beta \approx \frac{\gamma\hbar B}{2kT}$$

Para el caso de núcleos de hidrógeno colocados en un campo de 21.15 Tesla (frecuencia de resonancia 900 MHz, comercialmente la más alta posible a la fecha) a 300K, la diferencia de poblaciones es de 0.000072028; es decir que en una población de un millón sólo existen aproximadamente 75 núcleos más en el nivel de menor energía.

La probabilidad de una transición de un nivel menor a uno de mayor energía es igual a la de una transición en sentido inverso y cada transición se asocia a un cambio en la orientación del espín.

Como hay un exceso en la población del nivel de menor energía, la absorción de energía es el proceso dominante. Esto se observa en un espectro de RMN como una señal cuya intensidad es equivalente a la diferencia de población. Sin embargo, de acuerdo al cálculo

realizado puede decirse que sólo es posible detectar a uno de cada $10^4 - 10^6$ núcleos. De ahí la importancia de la cantidad de muestra, la intensidad del campo y que se prefiera realizar experimentos con núcleos cuya γ y abundancia natural sean grandes (por ejemplo el ^1H).

El momento magnético de espín precesa al aplicar un campo magnético. El cálculo de la frecuencia de precesión se hace con la ec. A.26 (del anexo A); si se compara este resultado con el de la ec. 1.3 se encuentra que ambas frecuencias son iguales:

Frec. de precesión (de Larmor) = Frec. asociada a la energía para provocar una transición

La interpretación de los espectros que se obtienen con experimentos de RMN proveen la información necesaria para determinar la estructura de una molécula; dicha información se encuentra principalmente en:

- Desplazamientos químicos
- Acoplamiento escalares
- Efecto Nuclear Overhauser (NOE)
- Integración de las señales

1.1.2. Desplazamientos químicos[5, 7]

Un núcleo aislado de hidrógeno tiene una frecuencia de resonancia de 400 MHz en un campo de 9.4T, pero no todos los núcleos de una molécula tienen la misma frecuencia de resonancia. La frecuencia depende de la distribución local electrónica alrededor del núcleo. Este efecto permite distinguir tres tipos de núcleos de hidrógeno en el etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) tal como se muestra en la figura 1.1.

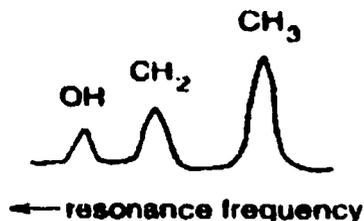


Figura 1.1: Espectro de RMN de baja resolución de una muestra de etanol.(Adaptado de *J. Chem. Phys.*, (1951), 19, 507.)

La existencia de los desplazamientos químicos se debe a que el campo magnético \vec{B} que actúa sobre un núcleo es diferente al campo externo aplicado \vec{B}_o . En un átomo, \vec{B} es ligeramente menor debido a la generación por inducción de pequeñas corrientes eléctricas adicionales dentro del átomo; el sentido de estas corrientes es tal que se genera un campo \vec{B}' opuesto al campo externo aplicado. Se dice entonces que el núcleo está "protegido" por los electrones circundantes ($\vec{B} = \vec{B}_o - \vec{B}'$).

Como \vec{B}' es proporcional a \vec{B}_o se obtiene la relación:

$$\vec{B} = \vec{B}_o - \vec{B}' = \vec{B}_o(1 - \sigma)$$

donde σ es la constante de protección. Como resultado de esta protección la ec. 1.3 queda de la siguiente manera:

$$\nu = \frac{\gamma B_o(1 - \sigma)}{2\pi}$$

En una molécula ocurre casi lo mismo que lo descrito con los átomos, sólo que el movimiento electrónico es más complicado y σ puede tener valores positivos o negativos, pero esto implica que la frecuencia de resonancia será diferente para cada núcleo según el ambiente electrónico que le rodea. En la figura 1.2 se muestra un espectro a 90 MHz ($B_o=2.11T$) de una mezcla de $CHBr_3$, CH_2Br_2 , CH_3Br y TMS [$Si(CH_3)_4$]. Por convención la señal del TMS aparece a la frecuencia del equipo, en este caso, a 90 MHz. El $CHBr_3$ tiene la mayor frecuencia de resonancia, por que su constante de protección es la más pequeña. Las señales en un espectro de RMN se encuentran de forma tal que la constante de protección es inversamente proporcional al valor del desplazamiento químico.

Debido a que la RMN no tiene una escala absoluta, se emplea una escala relativa donde se miden las diferencias de frecuencia $\Delta\nu$ entre las frecuencias de resonancia de la muestra y la de un compuesto de referencia. Como $\Delta\nu$ depende del campo externo se puede definir una cantidad adimensional δ denominada *desplazamiento químico*:

$$\delta = \frac{\nu_{muestra} - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} 10^6$$

El factor 10^6 se introduce para simplificar los valores numéricos que se dan en partes por millón (*ppm*). Si en el denominador se coloca la frecuencia dada por el fabricante del equipo no se introduce un error significativo[5, pág. 22].

En la figura 1.3 se presentan los intervalos típicos de los desplazamientos químicos de 1H en algunos grupos funcionales.

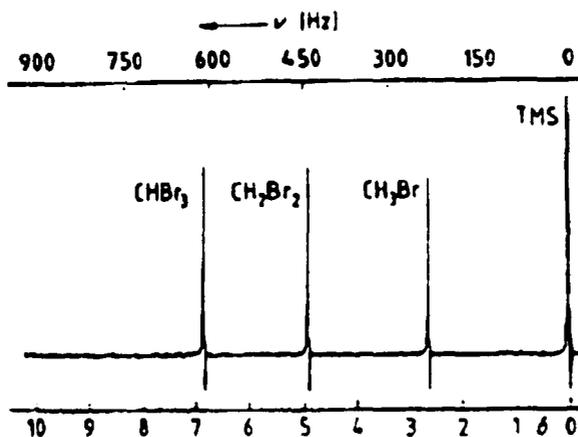


Figura 1.2: Espectro de RMN ^1H a 90 MHz de una mezcla de CHBr_3 , CH_2Br_2 , CH_3Br y TMS. En la parte superior aparecen graficados los valores de $\Delta\nu$.

1.1.3. Acoplamientos escalares [7, 9, 10]

Además de los desplazamientos químicos, un espectro de RMN contiene información acerca de las interacciones magnéticas que se generan entre los núcleos (llamadas acoplamientos indirectos espín-espín, acoplamientos escalares o acoplamientos-J). Los acoplamientos causan que algunas señales se desdoblén en multipletes con intensidades relativas y distancias características.

Si se considera la molécula de $^1\text{H}^{13}\text{CO}_2^-$ (asumiendo que el oxígeno es ^{16}O), los únicos núcleos magnéticos son el ^1H (a partir de este momento H) y el ^{13}C (de ahora en adelante C), ambos con espín $\frac{1}{2}$. En una primera aproximación se esperaría una señal tanto en el espectro de hidrógeno como en el de ^{13}C , sin embargo en ambos espectros aparecen dos señales (figura 1.4a). La distancia en Hz entre las señales es proporcional a la intensidad de la interacción entre los núcleos de hidrógeno y carbono en la molécula, esta distancia es la misma en los dos espectros.

Una descripción simple del mecanismo de acoplamiento escalar considera que el vector de momento magnético de un electrón del enlace C-H alrededor del núcleo de carbono tiende a asumir una orientación paralela a la del vector de momento magnético del núcleo de carbono. Los momentos angulares (los espines) son antiparalelos, pero la constante giromagnética es positiva para el carbono y negativa para el electrón. Por otra parte, los momentos magnéticos de los electrones de enlace son antiparalelos. Esto trae como consecuencia que el momento magnético del núcleo de hidrógeno prefiera permanecer antiparalelo al del núcleo de carbono.

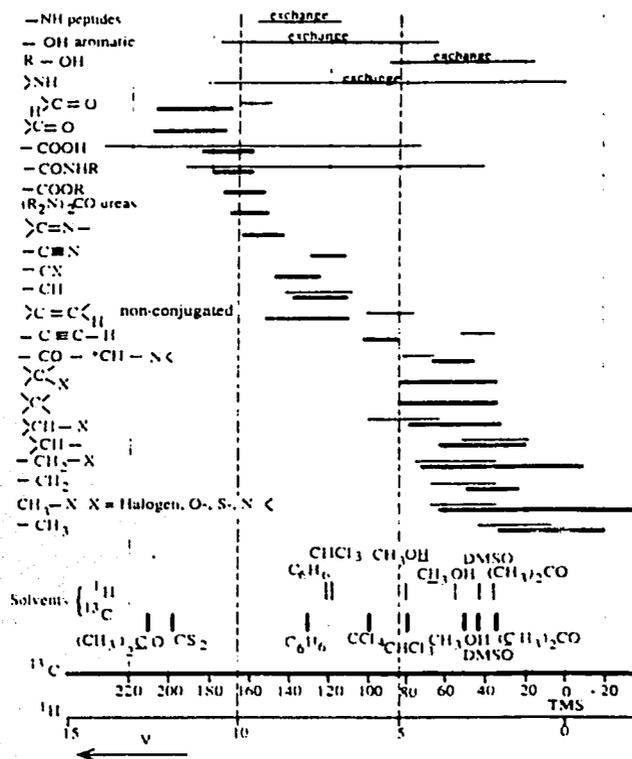


Figura 1.3: Intervalos de los desplazamientos químicos para ^1H y ^{13}C (líneas gruesas), notar que en principio es posible distinguir núcleos pertenecientes a diferentes grupos funcionales.

Como puede verse, la orientación de un momento magnético nuclear perturba la orientación de un segundo momento magnético nuclear a través del mecanismo electrónico mencionado anteriormente.

El momento magnético del carbono tiene 2 posibles orientaciones: una a favor y otra en contra del campo magnético externo.

Si fuera posible etiquetar a los electrones del enlace C-H, se podrían distinguir las moléculas $\text{H}(e \downarrow e \uparrow)\text{C}\uparrow$ y $\text{H}(e \uparrow e \downarrow)\text{C}\uparrow$ (las flechas indican la orientación del momento magnético a favor (\uparrow) o en contra (\downarrow) del campo). La relación entre el número de moléculas en cada conformación sería la siguiente:

$$\text{H}(e \downarrow e \uparrow)\text{C}\uparrow > \text{H}(e \uparrow e \downarrow)\text{C}\uparrow$$

dado que los momentos magnéticos del electrón y del núcleo tienden a ser paralelos.

De este modo un hidrógeno enlazado a un carbono $\text{C}\uparrow$ queda sometido a la acción de

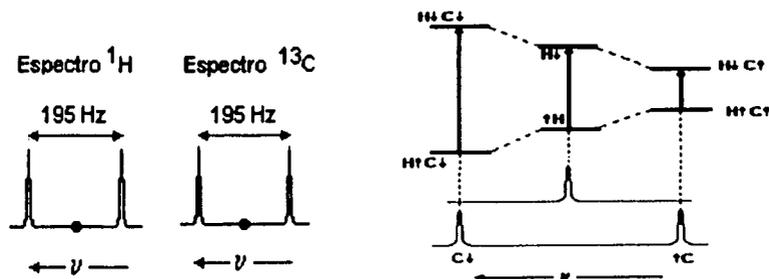


Figura 1.4: (a) Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del $^1\text{H}^{13}\text{CO}_2^-$ (b) Descripción gráfica del desdoblamiento de los niveles de energía que dan origen al doblete en el espectro. Las moléculas con un $\text{C}\uparrow$ tienen transiciones $\text{H}\uparrow\text{C}\uparrow \rightarrow \text{H}\downarrow\text{C}\uparrow$ a una frecuencia menor que la del desplazamiento químico porque se pasa de un estado poco favorable energéticamente (espines paralelos) a uno más favorable (espines antiparalelos).

un campo magnético interno opuesto al campo externo, es decir se encuentra inmerso en un campo magnético total de menor magnitud. Por el contrario, un hidrógeno unido a un $\text{C}\downarrow$ recibirá la influencia de un campo total de mayor magnitud.

Los arreglos cuyos espines nucleares son antiparalelos son más estables, por lo que cada nivel de energía del hidrógeno se divide en dos: uno a mayor -espines paralelos- y otro a menor energía -espines antiparalelos- tal y como se esquematiza en la figura 1.4b.

Por la existencia del acoplamiento escalar es posible identificar núcleos correlacionados a través del enlace, lo que proporciona información valiosa sobre la estructura de la molécula.

1.1.4. Interacciones a través del espacio

Para la identificación de núcleos cercanos en el espacio (no necesariamente correlacionados por enlace químico) se buscan las interacciones dipolares internucleares a través del Efecto Nuclear Overhauser.

Si el núcleo absorbe energía, el ángulo de precesión cambia, es decir que la absorción de la radiación cambia de orientación ("flips") al momento magnético. Una vez que la radiación deja de emitirse los núcleos buscan regresar al equilibrio. La probabilidad de emitir fotones varía con el cubo de la frecuencia; al hablar de radiofrecuencias, esta probabilidad es despreciable. Por lo anterior se deben buscar otros mecanismos de relajación.

Relajación dipolar

El acoplamiento dipolar es la interacción de los momentos magnéticos de dos espines a través del espacio. El campo magnético B_d , generado por el núcleo 2 sobre el núcleo 1, depende de la orientación. La rápida reorientación de las moléculas en disolución produce campos magnéticos variantes sobre los núcleos. Esto lleva a un intercambio de polarización del espín (magnetización z) y causa relajación del sistema de espín. Si existe acoplamiento dipolar entre dos núcleos, éstos no se relajan independientemente.

Este mecanismo de relajación es particularmente importante para moléculas que contienen protones y depende de la constante giromagnética (γ_i), de la distancia entre los núcleos que interactúan (r_{IS}) y del movimiento (representado por τ_c) de la molécula [11]:

$$R = k \gamma_I^2 \gamma_S^2 (r_{IS})^{-6} \tau_c$$

Efecto Nuclear Overhauser [7, pág. 61-63]

Al considerar una molécula que contiene dos protones diferentes, S e I, que no están acoplados escalarmente, es de esperarse que el espectro de ^1H presente dos singuletes. Si mientras se lleva a cabo el experimento para obtener el espectro de dicha molécula, los espines S están saturados (es decir, que sus poblaciones $m=+\frac{1}{2}$ y $m=-\frac{1}{2}$ son iguales) por la aplicación de una radiofrecuencia a la frecuencia de resonancia de S, se destruye la señal debida a S; pero también se puede afectar la intensidad de la resonancia de I si los dos espines tienen una apreciable interacción dipolar. La intensidad de la señal se puede hacer más fuerte o más débil e incluso invertirse. A este fenómeno se le conoce como *Efecto Nuclear Overhauser (NOE)*.

Las rutas de relajación longitudinal (sobre el eje z) de un par de núcleos S e I con espín- $\frac{1}{2}$ se encuentran representadas en la figura 1.5. Igualmente, en dicha figura se muestran los cuatro niveles de energía: $\alpha_I\alpha_S$, $\alpha_I\beta_S$, $\beta_I\alpha_S$ y $\beta_I\beta_S$.

De las seis rutas de relajación, cuatro corresponden al cambio de un solo espín, es decir $\alpha_I \leftrightarrow \beta_I$ ó $\alpha_S \leftrightarrow \beta_S$. Sus probabilidades de transición están denotadas como W_I^1 y W_S^1 , donde el 1 indica que el número cuántico magnético cambia ± 1 , y las letras identifican al núcleo que cambia.

Las otras dos rutas son procesos de relajación cruzada (cross relaxation) en los cuales S e I se relajan juntos, es decir $\alpha_I\alpha_S \leftrightarrow \beta_I\beta_S$ (ambos espines cambian en la misma dirección $-W_{IS}^2$) y $\alpha_I\beta_S \leftrightarrow \beta_I\alpha_S$ (los dos espines cambian en dirección opuesta $-W_{IS}^0$). Estas rutas se deben al movimiento molecular caótico, combinado con la mutua interacción dipolar, el

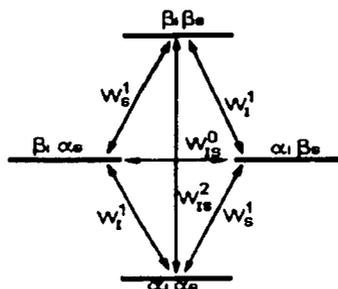


Figura 1.5: Rutas de relajación longitudinal de un par de núcleos S e I.

resultado es que los núcleos pueden cambiar simultáneamente. Los procesos W_{IS}^0 y W_{IS}^2 sólo son rutas adicionales que permiten a las poblaciones regresar al equilibrio.

Ahora, para ver cómo ocurre el NOE, hay que considerar que se aplica un campo de radiofrecuencia al espín S de suficiente fuerza para igualar las poblaciones de los estados $\alpha_I \alpha_S$ y $\alpha_I \beta_S$ y de $\beta_I \alpha_S$ y $\beta_I \beta_S$. La saturación de S no tiene efecto en la diferencia de poblaciones de I.

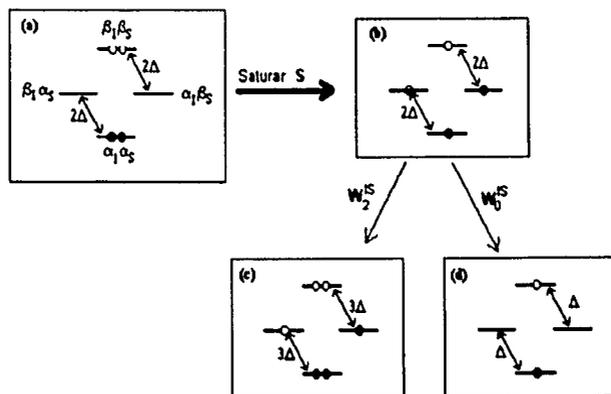


Figura 1.6: Representación de las poblaciones de los niveles energéticos en un sistema de dos espines S e I. (a) Equilibrio térmico. (b) Saturación en las transiciones del espín S. (c) Proceso de relajación cruzada dominante: $\alpha_I \alpha_S \leftrightarrow \beta_I \beta_S$. (d) Proceso dominante: $\alpha_I \beta_S \leftrightarrow \beta_I \alpha_S$

En la figura 1.6, el círculo lleno indica un exceso de población del orden de Δ y el círculo vacío un déficit del mismo orden. Si se considera que la única ruta de relajación predominante es la W_{IS}^2 , la intensidad del pico de I se incrementa en un 50% (la diferencia en las poblaciones es de 3Δ). La relajación cruzada transfirió magnetización del espín saturado S a su espín

acoplado dipolarmente I. Del mismo modo, si S está saturado y el proceso W_{IS}^0 es el que predomina, las poblaciones de los niveles $\alpha_I\beta_S$ y $\beta_I\alpha_S$ regresan a sus valores del equilibrio térmico teniendo como resultado una reducción en el pico de I del 50 %.

1.1.5. Pulsos de radiofrecuencia

Los experimentos de RMN actualmente se basan en el uso de pulsos de radiofrecuencia. Cuando se aplica un pulso de radiofrecuencia (B_1), los espines responden de tal forma que la magnetización neta rota alrededor de la dirección de B_1 . El ángulo de rotación depende de la duración (τ) del pulso y la magnitud del campo:

$$\theta = 2\pi\gamma\tau B_1$$

Un pulso de 90° sobre el eje x rota al vector de magnetización neta en sentido de las manecillas del reloj alrededor de dicho eje hasta que llega al eje y . Un pulso de 180° rotará a la magnetización dejándola sobre el eje $-z$.

Al combinar las ecuaciones A.12, A.3 y 1.1 se encuentra una expresión que muestra la dependencia de la posición y de la magnitud del momento magnético en función del tiempo:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \vec{\mu} \times \gamma\vec{B} \quad (1.4)$$

En adelante, se hablará de la magnetización neta M sobre el eje z (figura 1.7).

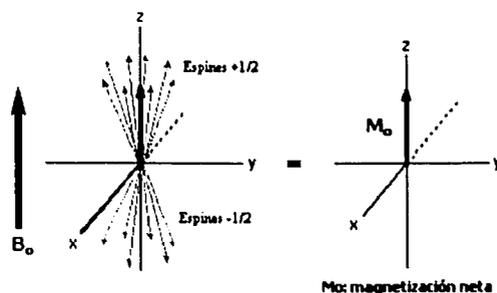


Figura 1.7: Generación de la magnetización neta M_0 sobre el eje z

En 1946 Felix Bloch formuló un conjunto de ecuaciones que describían el comportamiento de la magnetización bajo la influencia de pulsos de radiofrecuencia.

La ec. 1.4 queda modificada al tomar en cuenta procesos de relajación. Cuando el pulso de radiofrecuencia se deja de aplicar, el vector M_0 se ha movido de su posición de equilibrio

y el sistema tiende a volver al equilibrio a través de procesos donde la componente M_z se acerca al valor de M_o , mientras que M_x y M_y regresan a cero.

Bloch asumió que los procesos de relajación seguían una cinética de primer orden y podían ser descritos por dos tiempos T_1 y T_2 .

Si se emplea un sistema de coordenadas rotatorio (rotating frame), en ciertas condiciones se puede considerar a las componentes M_x y M_y como estacionarias y se pueden establecer las siguientes ecuaciones cinéticas:

$$\begin{aligned} \frac{dM_z}{dt} &= -\frac{M_z - M_o}{T_1} \\ \frac{dM_x}{dt} &= -\frac{M_x}{T_2} \quad \frac{dM_y}{dt} = -\frac{M_y}{T_2} \end{aligned} \quad (1.5)$$

Si se suman las ecuaciones anteriores al desarrollo componente por componente del producto vectorial de la ec. 1.4 se tiene que

$$\begin{aligned} \frac{dM_z}{dt} &= \gamma[M_x B_y - M_y B_x] - \frac{M_z - M_o}{T_1} \\ \frac{dM_x}{dt} &= \gamma[M_y B_z - M_z B_y] - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} &= \gamma[M_z B_x - M_x B_z] - \frac{M_y}{T_2} \end{aligned} \quad (1.6)$$

En un experimento de RMN, \vec{B} está compuesto de dos vectores: el campo estático B_o sobre z y el campo de radiofrecuencia B_1 que se puede pensar como rotatorio sobre el plano xy con una frecuencia ω_{rf} . Empleando el sistema rotatorio, la frecuencia de rotación cambia y toma el valor de

$$\Omega = \omega_o - \omega_{rf}$$

Como $\omega = \gamma B$ es posible definir un campo efectivo ΔB :

$$\Delta B = \frac{\Omega}{\gamma}$$

Si se aplica el pulso de radiofrecuencia B_1 sobre el eje x el campo que actúa sobre los núcleos tendrá las siguientes componentes (x, y, z) , $\vec{B} = (B_1, 0, \frac{\Omega}{\gamma})$. Al sustituir los valores de cada componente del campo en las ecuaciones 1.6 éstas se reducen a:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\omega_1 M_y - \frac{M_z - M_o}{T_1}$$

$$\frac{dM_x}{dt} = \Omega M_y - \frac{M_x}{T_2} \quad (1.7)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \omega_1 M_z - \Omega M_x - \frac{M_y}{T_2}$$

Al resolver las ecuaciones anteriores cuando $\omega_1 = 0$ (es decir, cuando se ha dejado de aplicar el pulso de radiofrecuencia), se puede describir el comportamiento de la magnetización después de un pulso de 90° sobre el eje x :

$$M_z(t) = M_o(1 - e^{-t/T_1})$$

$$M_x(t) = M_o e^{-t/T_2} \text{sen}(\Omega t) \quad (1.8)$$

$$M_y(t) = M_o e^{-t/T_2} \text{cos}(\Omega t)$$

Para resolver las ecuaciones sobre los ejes x y y se consideró a M_y y M_x como la parte real e imaginaria respectivamente de un número complejo:

$$M_+ = M_y + iM_x$$

En la figura 1.8 se muestran las gráficas de las componentes de M , a las gráficas de los ejes x y y se le conoce como decaimiento libre de la inducción ó FID (free induction decay).

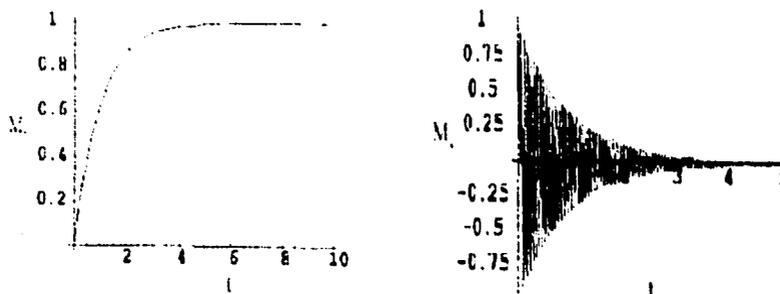


Figura 1.8: Gráficas de las ecuaciones 1.8. A la izquierda se encuentra M_z vs t y a la derecha M_x vs t . En el caso de M_x y M_y se obtiene un FID similar, sólo que M_y comienza en cero.

1.1.6. Transformadas de Fourier

Una transformada de Fourier (TF) es una operación que convierte funciones en el dominio del tiempo, $f(t)$, en funciones en el dominio de las frecuencias, $f(\omega)$. Una TF está definida por la integral

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)[\cos(\omega t) - i\sin(\omega t)]dt$$

Al ser la integral una sumatoria infinita, se puede escribir

$$f(\omega) = \sum_{-\infty}^{\infty} f(t)\cos(\omega t) - i \sum_{-\infty}^{\infty} f(t)\sin(\omega t)$$

Como puede verse, la TF genera un número complejo. Cuando se grafica la parte real se obtiene una señal en modo *absorción* y la parte imaginaria arroja una señal en modo *dispersión*.

Se puede considerar una función arbitraria $f(t) = e^{-\frac{t}{10}} \cos(2t) + e^{-\frac{t}{10}} \cos(5t) + e^{-\frac{t}{10}} \cos(8t)$ y graficar el resultado de $f(\omega)$ real vs ω tomando valores entre 1 y 10 para el tiempo y las frecuencias (ver tabla 1.2 y figura 1.9).

ω	$f(\omega)$
1	$\sum_{t=1}^{10} f(t)\cos(t)$
2	$\sum_{t=1}^{10} f(t)\cos(2t)$
3	$\sum_{t=1}^{10} f(t)\cos(3t)$
...	
10	$\sum_{t=1}^{10} f(t)\cos(10t)$

Tabla 1.2: Valores que se emplearon para graficar la TF de una función en el dominio del tiempo.

1.1.7. Resonancia Magnética Nuclear de 2 dimensiones

Los experimentos de RMN 2D contienen una secuencia de intervalos de tiempo [12]:

1. *Preparación*, en el cual se permite que el sistema alcance su estado de equilibrio. Al final de este tiempo se puede preparar al sistema -según el experimento que se vaya a realizar- por medio de uno o varios pulsos de radiofrecuencia.
2. *Evolución (t_1)*, en este periodo variable de tiempo las señales evolucionan como función de los desplazamientos químicos y/o los acoplamientos escalares de cada núcleo del sistema.

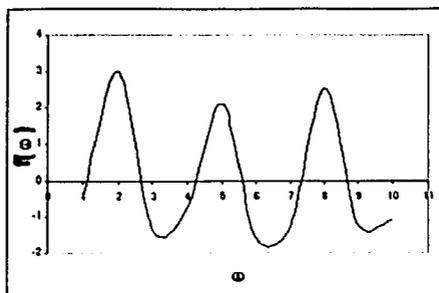


Figura 1.9: Transformada de Fourier de la función $f(t) = e^{-\frac{t}{10}} \cos(2t) + e^{-\frac{t}{10}} \cos(5t) + e^{-\frac{t}{10}} \cos(8t)$. Los valores numéricos de las operaciones propuestas en la tabla 1.2 se calcularon con Excel. Revisar las frecuencias en las que se obtienen máximos y compararlas con lo establecido por los cosenos de la función.

3. *Mezclado*, donde la aplicación de uno o varios pulsos de rf crean una magnetización observable [13], que puede ser producto de la transferencia de información entre dos núcleos acoplados escalarmente o cercanos en el espacio, por mencionar algunos ejemplos.
4. *Detección* (t_2), es decir, la adquisición de las señales moduladas para obtener el FID que contiene información de magnetización vs. tiempo.

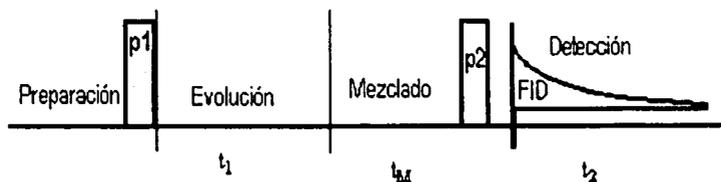


Figura 1.10: Representación de los intervalos de tiempo de un experimento de RMN 2D; p1 y p2 son pulsos de radiofrecuencia, t_M es un tiempo de espera, t_1 y t_2 son tiempos variables.

La secuencia de pulsos más simple para un experimento en 2D involucra dos pulsos de 90° separados por un tiempo t_1 de libre precesión de los núcleos y seguida de la detección del FID como función de t_2 . Este proceso se repite para diferentes valores de t_1 [7]. Para hacer un análisis de los resultados que se obtienen con esta secuencia, se considerará una muestra con un solo tipo de núcleos. Con la aplicación del primer pulso de 90° , la magnetización resultante del sistema en equilibrio, M_z , comienza a precesar sobre el plano xy con su frecuencia característica (Ω) y se mueve un ángulo Ωt_1 . El segundo pulso -aplicado sobre el eje x - cambia la componente M_y hacia el eje z y deja a la componente M_x intacta. Durante

el tiempo t_2 esta componente vuelve a precesar con la misma frecuencia de modo que el FID tiene una amplitud inicial igual a la magnetización remanente en x antes del segundo pulso, es decir $M \sin(\Omega t_1)$.

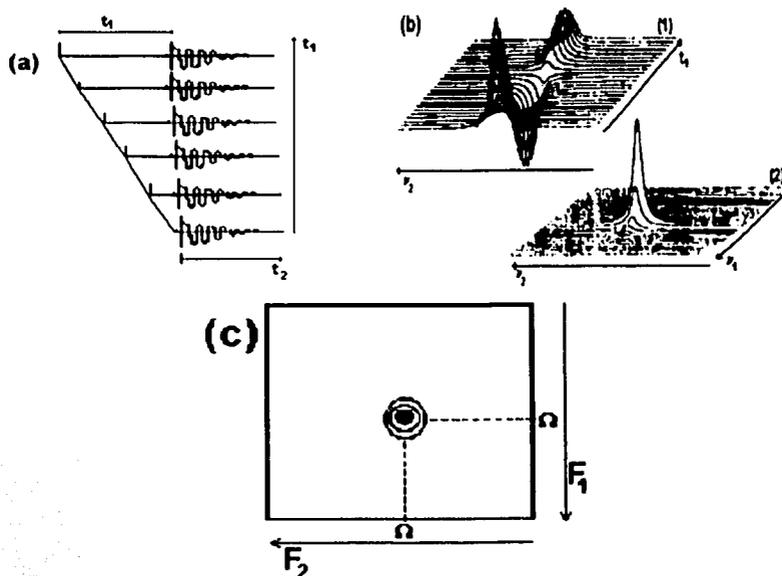


Figura 1.11: (a) Representación de los FID que se obtendrían en un experimento de 2D. (b) Resultado de una transformada de Fourier: 1. Para cada t_1 , sobre los datos obtenidos en t_2 , 2. Sobre t_1 . (c) Espectro de un sistema que contiene un solo tipo de núcleos.

El resultado de los experimentos es un conjunto de datos en función de t_1 y t_2 (figura 1.11a), donde las señales de t_2 son moduladas en amplitud como función de Ωt_1 . Si se aplica una transformada de Fourier en cada una de las dos dimensiones (figura 1.11b), se obtendrá un espectro (figura 1.11c) en función de dos variables de frecuencia (F_1 y F_2). En el ejemplo que se ha manejado, donde la magnetización detectada precesa con frecuencia Ω durante el tiempo t_2 y es modulada en su amplitud a la misma frecuencia durante t_1 , el espectro contiene un pico en (Ω, Ω) .

La espectroscopía de correlación es un método en el cual los picos aparecen en las coordenadas (Ω_1, Ω_2) de dos núcleos relacionados por una interacción mutua (acoplamiento escalar, NOE, o intercambio químico). Algunos de los experimentos de correlación son: COSY (Correlation Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) y NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) [14].

En los experimentos COSY se identifican pares de protones que están acoplados escalarmente.

Con el método TOCSY, se puede obtener en principio una correlación total -de acoplamientos escalares - de todos los protones de un sistema de espín. Por ejemplo, si se tienen tres protones diferentes (K, L y M) y existen acoplamientos entre K-L y L-M, dichos protones forman un sistema de espín. De este modo, en un espectro TOCSY se encontrarían picos en las coordenadas (Ω_K, Ω_K) , (Ω_K, Ω_L) y (Ω_K, Ω_M) ; mientras que en un espectro COSY habría picos únicamente en las coordenadas (Ω_K, Ω_K) y (Ω_K, Ω_L) ; ver figura 1.12.

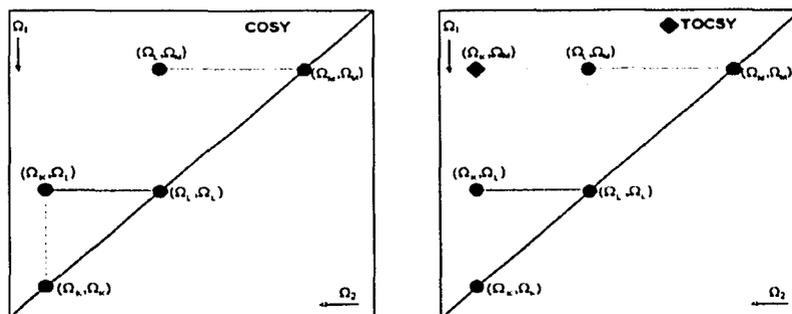


Figura 1.12: Representación de un espectro COSY (izquierda) y TOCSY de tres núcleos K,L,M con acoplamientos K-L y L-M.

Los espectros NOESY permiten identificar pares de núcleos relacionados por el Efecto Nuclear Overhauser y también indican que los protones que correlacionan están separados por una distancia menor que 5 Å. Considerar por ejemplo, que el núcleo K (del párrafo anterior) y el núcleo R se encuentran a varios enlaces de distancia dentro de una molécula por lo que no existe entre ellos señal TOCSY (figura 1.13a); sin embargo, la conformación de la molécula es tal que entre el núcleo R y el núcleo K hay una distancia menor de 5 Å (figura 1.13b) por lo que en un espectro NOESY es de esperar una señal adicional entre los núcleos K y R (figura 1.13c).

1.2. Proteínas, impulsos nerviosos y veneno de alacrán

1.2.1. Generalidades de proteínas [15, 16, 17]

Las células vivas producen gran variedad de macromoléculas tales como ácidos nucleicos, polisacáridos y proteínas. Estas macromoléculas pueden ser descritas como biopolímeros, en el caso de las proteínas, los aminoácidos constituyen las unidades monoméricas.

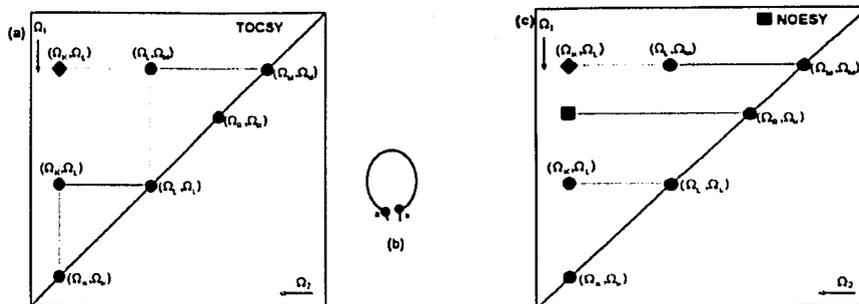


Figura 1.13: (a) Espectro TOCSY de los núcleos K, L, M y R. Los núcleos K y R no están acoplados ya que se encuentran a varios enlaces de distancia. (b) Conformación de la molécula donde se considera que K y R están a menos de 5 Å de distancia. (c) Espectro NOESY, existe una señal que correlaciona a los núcleos K y R, también existen señales NOE entre los núcleos K, L y M porque al estar correlacionados a través del enlace, entre ellos hay menos de 5 Å.

La estructura y muchas propiedades biológicas de las proteínas están determinadas por las clases de aminoácidos presentes y el orden en que están dispuestos en la cadena peptídica.

Todos los aminoácidos poseen dos grupos funcionales: un grupo amino y uno carboxilo. Los dos grupos están unidos al mismo átomo de carbono, nombrado "carbono α ". El C_α también está enlazado a un átomo de hidrógeno y a una cadena lateral R que es diferente para cada uno de los 20 aminoácidos comunes (Figura 1.14). Los carbonos de la cadena R se designan como $\beta, \gamma, \delta, \epsilon$ según se alejan del carbono α .

El grupo α -carboxilo de un aminoácido A_1 puede unirse covalentemente al grupo α -amino de otro aminoácido A_2 eliminando una molécula de agua y formando un enlace amida conocido como *enlace peptídico*. En la figura 1.15, A_1 actuó como el ácido y A_2 como la amina. Si ocurriera lo contrario, se formaría un dipéptido diferente.

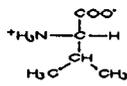
Por convención, las secuencias peptídicas se escriben a partir del residuo (aminoácido) amino terminal (grupo NH_2 libre) que se coloca a la izquierda y termina con el residuo carboxilo terminal. Usualmente se emplea el código de una letra.

Cada molécula proteica posee, en su estado nativo, una forma tridimensional característica que es conocida como su conformación o estructura.

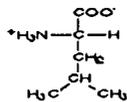
La organización en la estructura se realiza a cuatro niveles diferentes:

- **Estructura primaria.** Orden o secuencia de los aminoácidos que conforman la proteína.
- **Estructura secundaria.** Plegamiento de ciertas regiones de la proteína en conformaciones particulares. Se debe principalmente a fuerzas no covalentes como los puentes

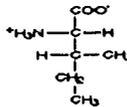
Aminoácidos con cadena lateral hidrofóbica



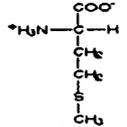
Valina
(Val, V)



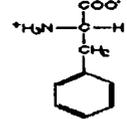
Leucina
(Leu, L)



Isoleucina
(Ile, I)

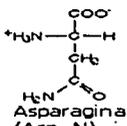


Metionina
(Met, M)

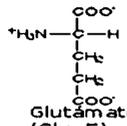


Fenilalanina
(Phe, F)

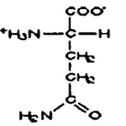
Aminoácidos con cadena lateral hidrofílica



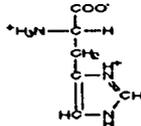
Asparagina
(Asn, N)



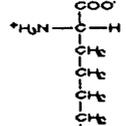
Glutamato
(Glu, E)



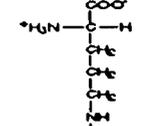
Glutamina
(Gln, Q)



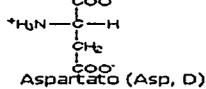
Histidina
(His, H)



Lisina
(Lys, K)

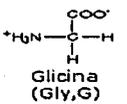


Arginina
(Arg, R)

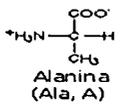


Aspartato (Asp, D)

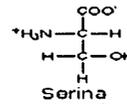
Aminoácidos "intermedios"



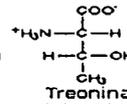
Glicina
(Gly, G)



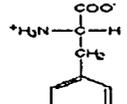
Alanina
(Ala, A)



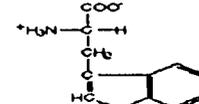
Serina
(Ser, S)



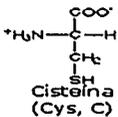
Treonina
(Thr, T)



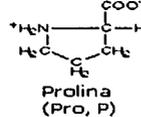
Tirosina
(Tyr, Y)



Triptofano
(Trp, W)



Cisteína
(Cys, C)



Prolina
(Pro, P)

Figura 1.14: Los 20 aminoácidos comunes.

de hidrógeno.

- **Estructura terciaria.** Conformación tridimensional completa de la cadena polipeptídica. Entre las interacciones que contribuyen con la formación de esta estructura se encuentran: puentes disulfuro, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno.
- **Estructura cuaternaria.** Poseen este nivel sólo aquellas moléculas formadas por varias proteínas. Se refiere a las diversas interrelaciones que ocurren entre ellas.

Estructura primaria

Al formarse el enlace peptídico, los átomos N-H-C-O se encuentran en un mismo plano. Las propiedades del enlace peptídico imponen ciertas restricciones en el plegamiento de la proteína. Cada unidad de enlace peptídica se encuentra en un plano, por lo que la cadena

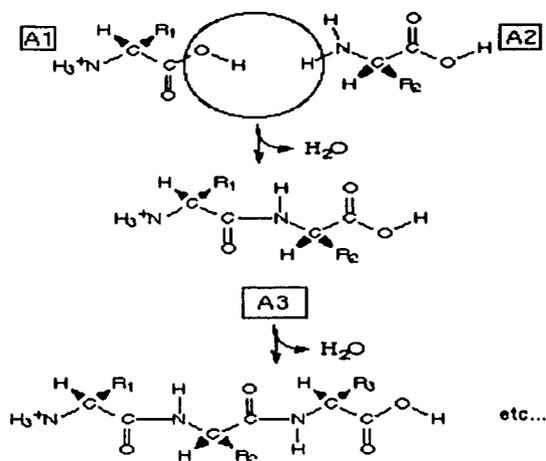


Figura 1.15: Formación de enlaces peptídicos para formar una cadena polipeptídica.

tiene que plegarse por medio de rotaciones de los enlaces establecidos por los carbonos α , estos enlaces se muestran en la figura 1.16 como *psi* (Ψ) y *phi* (Φ).

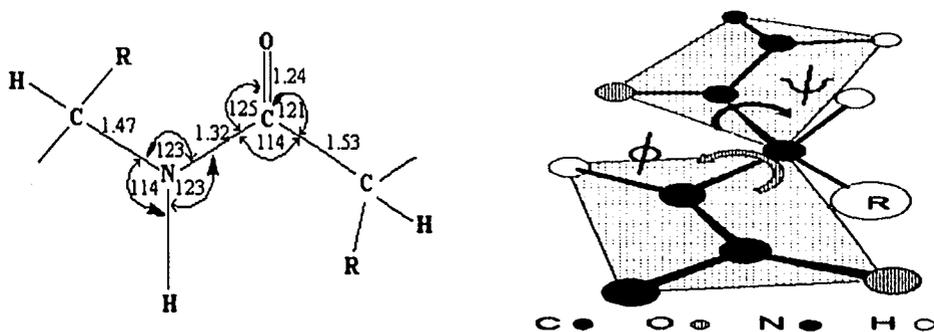


Figura 1.16: Geometría de un enlace peptídico

Estructura secundaria

Las estructuras secundarias que se presentan con mayor frecuencia en la naturaleza son las hélices- α y las hojas- β . En la tabla 1.3 se muestran las distancias y los ángulos característicos de cada una de las estructuras secundarias mencionadas.[18]

Átomos	hélice- α (Å)	hoja- β (Å)
HA(i) - HN($i+1$)	3.4	2.2
HN(i) - HN($i+1$)	2.8	4.2
HB(i) - HN($i+1$)	3.2	3.5
HN(i) - HN($i+3$)	3.5	-
HA(i) - HN($i+3$)	3.4	-
HA(i) - HB($i+3$)	3.4	-
Ángulo		
Φ	-60°	-120°
Ψ	-60°	150°

Tabla 1.3: Distancias características entre los hidrógenos que se encuentran en una hélice- α y una hoja- β . HA y HB se refieren a los hidrógenos unidos al carbono α y al carbono β respectivamente, y HN es el hidrógeno unido al nitrógeno del grupo amino.

Hélice- α

Fue descrita por Pauling en 1951, quien hizo estudios de difracción de rayos-X de cristales de aminoácidos y pequeños péptidos.

Sus características más importantes son:

- 3.6 residuos por vuelta ($n=3.6$).
- La distancia entre elementos iguales de dos aminoácidos consecutivos medida en la dirección del eje principal es $d=1.5\text{Å}$.
- Los grupos R de los aminoácidos se proyectan hacia el exterior de la hélice.
- La ordenación α -helicoidal se debe a la formación de puentes de hidrógeno que se establecen entre el CO de un residuo i y el NH del cuarto residuo que le sigue ($i+4$). Estos puentes son paralelos al eje mayor de la hélice, ya que el oxígeno del carbonilo apunta casi directo al hidrógeno al que está unido.
- La localización habitual de la hélice es a lo largo de la parte externa de la proteína, las cadenas laterales tienden a cambiar de hidrofóbicas a hidrofílicas cada 3 o 4 residuos.
- Los aminoácidos que permiten hélice- α estable son: Ala, Leu, Met, Phe, Tyr, Cys, His, Asn; los que la inestabilizan: Ser, Thr, Gly, Lys, Arg; rompe esta estructura: Pro.

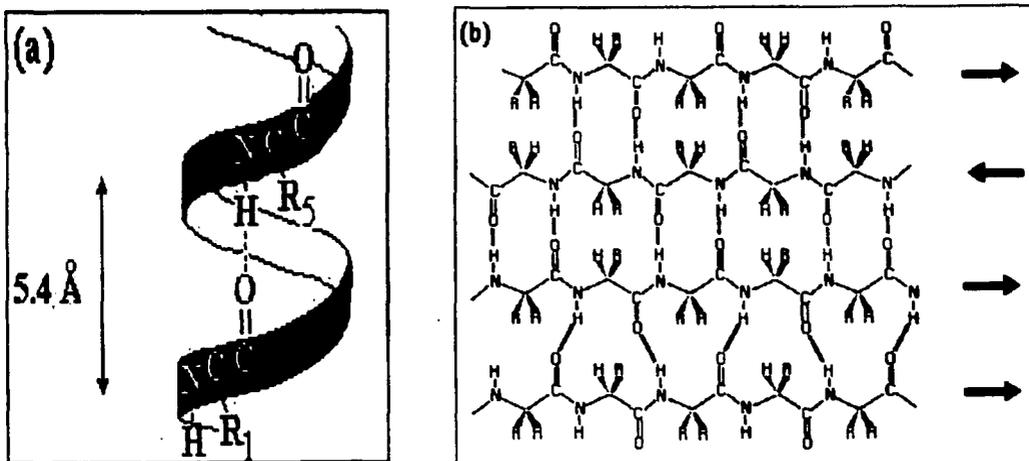


Figura 1.17: Representación de: (a) una hélice- α y (b) estructuras β paralelas y antiparalelas.

Hojas β

Las hojas β están “plegadas” con los $C\alpha$ sucesivamente arriba y abajo del plano de la hoja. Hay dos tipos de hojas β : paralelas y antiparalelas (figura 1.17), que difieren en el patrón de puentes de hidrógeno.

Las hojas paralelas tienen puentes de hidrógeno espaciados regularmente que forman un ángulo respecto a las hebras al enlazarlas. Tiene lugar en hojas con un mínimo de 5 hebras. Están siempre completamente ocultas protegidas a ambos lados por una hélice α . Es menos estable que la hoja antiparalela.

La estructura antiparalela tiene puentes de hidrógeno perpendiculares a las hebras, alternando los enlaces próximos con otros más espaciados. Frecuentemente toma la disposición de un cordón torcido de sólo dos hebras. Tiene un lado expuesto al disolvente y el otro oculto, por lo que presentan alternancia de hidrofobicidad.

Estructura terciaria[19]

La estructura terciaria de una proteína describe el plegamiento de los elementos de estructura secundaria y especifica las posiciones de cada uno de los átomos que forman la proteína; esta estructura tridimensional está directamente relacionada con la función de la proteína. Regularmente, las proteínas con funciones similares tienen estructuras terciarias similares aunque tengan estructuras primarias completamente diferentes.

El conocimiento de la estructura terciaria de una proteína y su comparación con las

estructuras ya determinadas permite anticipar información sobre la función biológica y su origen evolutivo.

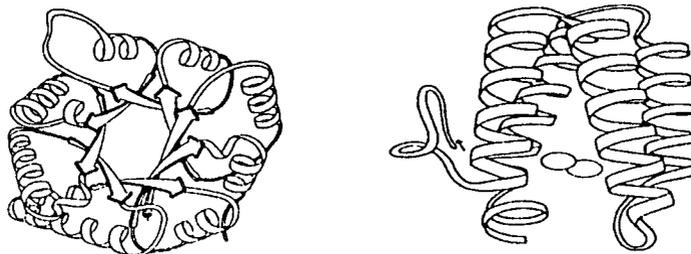


Figura 1.18: Ejemplos de estructuras terciarias (a) Triosa fosfato isomerasa. (b) Miohemeritina.

1.2.2. Impulsos nerviosos [20]

Las neuronas y otras células que forman músculos y glándulas pueden cambiar el potencial eléctrico de su membrana generando señales eléctricas o impulsos nerviosos.

Las señales eléctricas aparecen al cambiar la conductancia de las membranas hacia los iones, esto se logra mediante la apertura y cierre de los canales iónicos presentes en la membrana celular. Estos canales son diferentes de aquellos que siempre están abiertos y que son los responsables del potencial de reposo de la membrana celular.

Algunas células tienen una región especializada en su membrana con canales iónicos que son accionados por estímulos externos. Por ejemplo, una célula táctil que al recibir un estímulo abre los canales de sodio incrementará la conductancia del Na^+ .

En general, el incremento de la conductancia de cualquier ión genera un cambio en el potencial de la membrana. Dado que la membrana está polarizada (el potencial de reposo es de -70 a -50 mV), un cambio del potencial a valores mayores se llama *depolarización* (como en el caso del Na^+) y un cambio hacia valores más negativos se denomina *hiperpolarización*.

Cuando una membrana con canales de sodio que responden en función del potencial es depolarizada más allá de cierto valor umbral (*threshold potential*), genera un potencial de acción (señal eléctrica que puede viajar por toda la célula sin disminuir su intensidad). Estos canales permanecen abiertos por un breve periodo (menos de 1 ms) y luego se inactivan (se cierran) provocando que el potencial de la membrana regrese al valor del potencial de reposo.

1.2.3. Veneno de alacrán [21, 22, 23]

Los alacranes o escorpiones son artrópodos venenosos de la clase de los arácnidos, relacionados cercanamente con las arañas, garrapatas y ácaros. Existen aproximadamente 1300 especies localizadas en el norte de África, India, Paquistán, Turquía, sureste de Asia, Australia, Brasil, Argentina, Centroamérica, parte de Suramérica y el suroeste de Estados Unidos, entre otros. En México, las especies de importancia (por su peligrosidad hacia el hombre) son las del género *Centruroides* spp.

Los alacranes prefieren climas cálido-secos, aunque pueden llegar a localizarse en zonas húmedas. Tienen hábitos nocturnos y se alimentan de una variedad de insectos y arañas. Emplean su veneno para defenderse o capturar a su presa.

En general, los venenos de alacrán contienen mezclas de varios componentes, principalmente péptidos cuyo peso molecular es de aproximadamente 8kD que actúan como neurotoxinas (es decir, que afectan al sistema nervioso de la víctima). Los componentes de bajo peso molecular, como histamina y derivados del indol se han detectado en algunos venenos en muy bajas concentraciones.

Por su importancia médica, las neurotoxinas han recibido mayor atención por parte de los investigadores. Estas toxinas son consideradas como específicas hacia un blanco: algunas tienen una mayor actividad contra insectos, otras son más letales hacia los moluscos y otras atacan células nerviosas de mamíferos.

Se ha mostrado que las toxinas de alacrán afectan la permeabilidad iónica de algunas células al reconocer a los canales iónicos y receptores de las membranas de células excitables[24]. Hasta el momento han sido descritas cuatro familias de toxinas que interactúan específicamente con canales iónicos de sodio, potasio, cloro y calcio.

Las toxinas que interactúan con los canales de sodio son proteínas de 60 a 70 residuos que modifican la permeabilidad hacia el Na^+ modulando el mecanismo de apertura del canal, en lugar de bloquearlo.

Se dividen en dos grandes grupos:

Toxinas- α . Retrasan la inactivación de los canales; y

Toxinas β . Desplazan el intervalo de activación de los canales hacia potenciales más negativos, lo que disminuye valor del potencial que desencadena los potenciales de acción. En estas condiciones, pequeñas depolarizaciones que normalmente no desencadenarían señales resultan en impulsos nerviosos “espontáneos”.

La estructura tridimensional de varias toxinas moduladoras de los canales de sodio ha sido determinada por cristalografía de rayos X o por Resonancia Magnética Nuclear[25, 26,

27, 28]. Todas las moléculas cuya estructura ha sido determinada están caracterizadas por la presencia de cuatro puentes disulfuro y un arreglo de estructuras secundarias altamente conservado que consisten en tres hojas- β antiparalelas y una hélice- α [29]. La hélice está unida a la hoja β_3 , por dos puentes disulfuro. El par de cisteínas de la hélice- α está separado por tres aminoácidos (...CXXXC...), mientras que en la hoja β_3 sólo hay un residuo entre las dos cisteínas (...CXC...). Si se numeran progresivamente las cisteínas a partir del N terminal, la hélice contiene los residuos Cys3 y Cys4 y la hoja β_3 incluye a Cys6 y Cys7. Otro puente disulfuro contiene una cisteína de la hoja β_2 (Cys 5) y la Cys2. Estos puentes participan en la estabilización de la estructura. El cuarto puente disulfuro se forman entre las cisteínas 1 y 8.

Capítulo 2

Desarrollo experimental

Se trabajó con un péptido extraído del veneno del alacrán *Centruroides noxius*. Dicho péptido, de 67 aminoácidos, fue aislado y secuenciado en el Instituto de Biotecnología por el grupo del Dr. Lourival Possani. A la fecha no existen referencias bibliográficas sobre el mismo, que por el momento será nombrado "péptido G" y cuya estructura primaria es:

```

          10           20           30
RDGYPLASNG CKFGCSGLGE NNPTCNHVCE
          40           50           60
KKAGSDYGYC YAWTCYCEHV AEGTVLWGDS GTGPCRS

```

Los experimentos de RMN se hicieron con una disolución del péptido aproximadamente 1mM. Se corrieron experimentos COSY, TOCSY y NOESY homonucleares (^1H) empleando dos disolventes diferentes ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, $\text{pH}=3.1$ y D_2O) en un equipo Varian Unity Plus 500.

Las condiciones de los experimentos fueron las siguientes:

Frecuencia del espectrómetro: 499.896 MHz

Ventana espectral 7500.469 Hz

COSY (H_2O): $ni^1=256$, SP: $\frac{\pi}{2} - t_1 - \frac{\pi}{2} - t_2$

TOCSY (H_2O): $t_{mix}=35\text{ms}$, $ni=256$, SP: $\frac{\pi}{2} - t_1 - \text{spin lock} - t_2$

NOESY (H_2O): $t_{mix}=80\text{ms}$, $ni=288$, SP: $\frac{\pi}{2} - t_1 - \frac{\pi}{2} - t_{mix} - \frac{\pi}{2} - t_2$

COSY (D_2O) $ni=192$

TOCSY (D_2O) $t_{mix}=35\text{ms}$, $ni=256$

¹ ni es el número de incrementos de t_1 , t_{mix} es el tiempo de mezclado y SP se refiere a secuencia de pulsos

NOESY (D₂O) t_{mix} = 65ms, ni=256

Para obtener los espectros se procesaron los FIDs de cada experimento con el programa NmrDraw, que es la interface gráfica del sistema de procesamiento de espectros multidimensionales NMRPIPE [35].

En términos generales la metodología para la determinación de estructuras consiste en las siguientes etapas (no necesariamente consecutivas) [4, 36]:

1. Asignación de la secuencia
 - Identificación de aminoácidos con espectros que muestren correlación a través del enlace.
 - Identificación de aminoácidos vecinos a través de señales NOE.
2. Identificación de elementos regulares de estructura secundaria
 - Interpretación cualitativa de desplazamientos químicos.
 - Interpretación cualitativa de NOEs.
3. Asignación de NOEs a larga distancia
4. Medición de constantes de acoplamiento a 3 enlaces de distancia
5. Cuantificación de NOEs para obtener restricciones de distancia
6. Determinación y refinación de la estructura tridimensional.

2.1. Asignación de la secuencia

Por ser experimentos homonucleares, en los espectros se presenta una diagonal que muestra los desplazamientos químicos de los núcleos tal como en un espectro de una dimensión; además existen señales fuera de la diagonal (*cross-peaks*) que establecen una correlación entre las señales de la diagonal (figura 2.1).

En primer lugar se deben identificar los sistemas de espín; cada sistema de espín pertenece a un aminoácido de la proteína. Los espectros COSY y TOCSY permiten ésta identificación.

Algunos aminoácidos tienen un sistema de espín característico, como son alanina, treonina, leucina, valina e isoleucina. Por otro lado, existen aminoácidos cuyo sistema de espín es similar, tal es el caso de cisteína, serina, ácido aspártico, asparagina y los protones alifáticos de los aminoácidos aromáticos (histidina, fenilalanina, triptofano y tirosina) porque todos ellos tienen un hidrógeno α y 2 hidrógenos β .

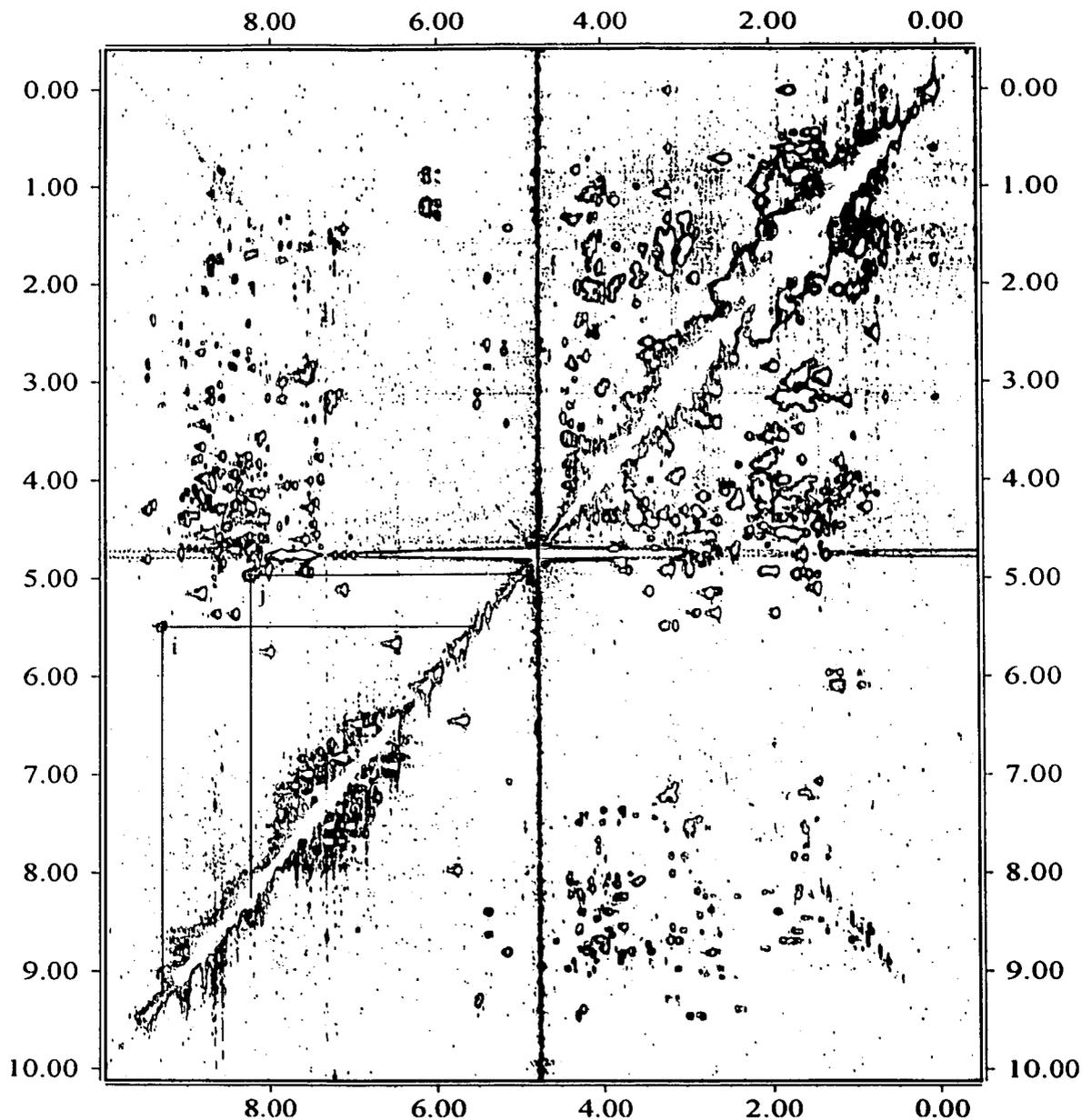


Figura 2.1: Espectro TOCSY (H_2O) del péptido G. Las señales fuera de la diagonal correlacionan dos núcleos, la correlación es a través del enlace. En este caso, por ejemplo, las señales marcadas como *i* y *j* se encuentran en la región HA-HN, es decir, cada una de ellas indica la correlación entre un HA y un HN de un aminoácido.

En el Anexo B se muestra la representación esquemática de los patrones observados en los espectros COSY y TOCSY de cada uno de los 20 aminoácidos.

Las señales del espectro COSY permiten identificar hidrógenos que están a 3 enlaces de distancia (figura 2.2). De este modo, en un espectro COSY es de esperar señales fuera de la diagonal entre hidrógenos de amida (HN) e hidrógenos α (HA), hidrógenos β (HB) e hidrógenos γ (HG), de un mismo aminoácido.

El espectro TOCSY permite identificar por completo al sistema de espín, por lo que en principio es posible identificar a un aminoácido al revisar el espectro TOCSY sobre un desplazamiento químico específico en la región delimitada entre 7-10 ppm. Por ejemplo, en la figura 2.2b, se puede trazar una línea horizontal en 8.44 ppm y notar que hay 4 señales en 4.18, 2.13, 0.97 y 0.94 ppm que corresponden a cada tipo de hidrógeno de la valina.

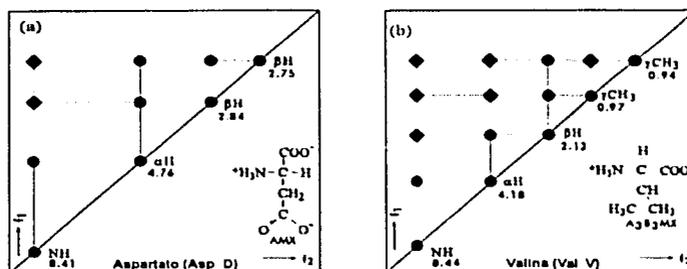


Figura 2.2: Representaciones de los espectros COSY y TOCSY de (a)Ácido aspártico y (b)Valina. Los rombos son señales TOCSY y los círculos son señales COSY.

En la figura 2.3 se presentan algunos sistemas de espín identificados en el espectro TOCSY del péptido G. Nótese en esta figura y en el anexo B, que los sistemas aromáticos no pueden ser identificados completamente con los espectros COSY y TOCSY, ya que los hidrógenos aromáticos (que aparecen en promedio entre 6-7 ppm) no correlacionan con la cadena alifática. En el espectro NOESY existen señales (que no desaparecen con agua deuterada) que correlacionan a los hidrógenos β con los hidrógenos del sistema aromático.

Debido a la naturaleza del enlace peptídico existe sólo un hidrógeno unido a nitrógeno por cada aminoácido (a excepción de arginina, asparagina, glutamina y lisina). Estos hidrógenos son los únicos con un desplazamiento químico entre 7 y 10 ppm. Por ello, al revisar la región de correlación HN-HA en los espectros COSY y TOCSY corridos en agua, es muy probable que cada señal corresponda a un aminoácido diferente. Por eso, para iniciar la identificación de los sistemas de espín, se localiza una señal en la región antes mencionada y se buscan más señales a lo largo de ese desplazamiento químico que permitan establecer un sistema de espín y posteriormente asociarlo con uno o varios aminoácidos.

En el espectro TOCSY de un polipéptido hipotético NALSD AG sería posible identificar 2 sistemas de espín (SS1 y SS2) correlacionados con la alanina, pero no existe ningún criterio para decidir si SS1 es la alanina 2 o la alanina 6; lo mismo sucede con SS2. La información necesaria para obtener las conectividades secuenciales entre sistemas de espín vecinos se obtiene del análisis de la región que contiene las señales HA-NH, NH-NH, y HB-NH en el espectro NOESY en H₂O. Nuevamente, es de gran utilidad trabajar con la sobreposición de los espectros TOCSY y NOESY.

Las distancias secuenciales d_{AN}, d_{NN}, d_{BN}^2 dependen de los ángulos de torsión entre los enlaces sencillos. Para los L-aminoácidos d_{AN} varía entre 2.20 y 3.55 Å para $-180^\circ \leq \Psi \leq 180^\circ$ (figura 2.4). En las hojas β , d_{AN} es cercano a 2.2 Å y para las hélices- α es 3.5 Å. La distancia entre los hidrógenos de amida varía entre 2.2 y 4.7 Å. [38].

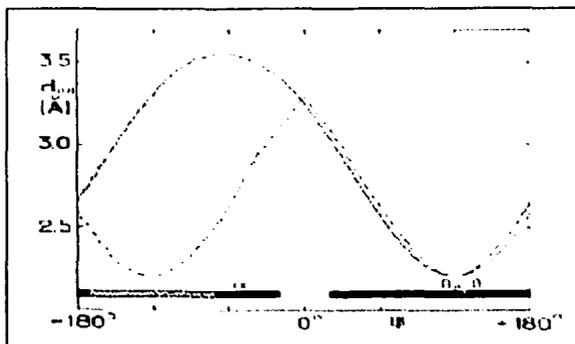


Figura 2.4: Relación entre el ángulo Ψ y la distancia HA(i)-HN($i + 1$).

Como las señales de un espectro NOESY correlacionan núcleos cuya distancia entre ellos es menor a 5 Å, las conectividades más importantes para la asignación secuencial son las que correlacionan al hidrógeno α de un sistema de espín y a un hidrógeno de amida de un sistema diferente, un hidrógeno β y un hidrógeno de amida y dos hidrógenos de amida. Se establece entonces que los hidrógenos α y β pertenecen al aminoácido i y que el hidrógeno de amida es del aminoácido $i + 1$.

Regresando al polipéptido hipotético, considérese que el sistema de espín asociado a la leucina se llama SS3 y el asociado a la glicina, SS4. Si en el espectro NOESY existiera una señal entre el HA del SS1 y el HN de SS4 la asignación secuencial sería SS1-SS4. Una señal NOESY entre el HA de SS2 y el HN de SS3 llevaría a la secuencia SS2-SS3. Por lo anterior sería posible establecer las correlaciones siguientes: SS1 es la alanina 6 y SS2 la alanina 2.

² d_{AN} se refiere a la distancia entre el hidrógeno α de un aminoácido y el hidrógeno de amida del siguiente; d_{NN} es la distancia entre los hidrógenos de amida de los aminoácidos secuenciales; d_{BN} es la distancia entre el hidrógeno β de un aminoácido y el hidrógeno de amida del siguiente.

Una vez encontrados casi todos los sistemas de espín, se procedió a buscar las señales NOE para determinar la secuencia. Es importante señalar que se debe contar de antemano con la secuencia primaria de la proteína porque de esta manera la asignación de las señales NOE permite identificar inequívocamente a cada sistema de espín con un aminoácido dentro de la secuencia de la proteína. Para iniciar la secuenciación en el espectro NOE es preferible comenzar con un sistema de espín asociado a alanina, valina o treonina y buscar señales NOE entre el HA de dicho sistema y algún hidrógeno de amida. Una vez encontradas esas señales se revisan los sistemas de espín de cada HN para ver si alguno de ellos es consistente con la secuencia primaria. Cuando se ha determinado la asignación secuencial, se repite el proceso anterior con el nuevo sistema de espín y así sucesivamente. La existencia de varios núcleos con el mismo desplazamiento químico³ y la señal del agua dificultan el análisis del espectro NOESY. En la figura 2.5 se muestra la región ...TCYCYEHVAE..., residuos 44 a 52 del péptido G. En dicha figura se muestra sólo una banda correspondiente al desplazamiento químico del HN de cada aminoácido, de esta manera resulta más sencilla la visualización de las señales del espectro NOESY que permiten definir la asignación secuencial: señales entre HA(*i*) y HN(*i* + 1) -marcadas con un línea en la figura-.

El trabajo de análisis de los espectros se realizó a través del programa XEASY [37].

³Considerar que existen 2 hidrógenos α en el mismo desplazamiento químico, por lo que en el mejor de los casos se encontrarán dos señales NOE que indiquen interacción con hidrógenos de amida y si no se conoce la estructura primaria no existe ningún criterio para establecer la secuencia. Por otro lado, recordar que hay aminoácidos con el mismo sistema de espín, de este modo, aún cuando se logre encontrar la secuencia en los sistemas de espín no sería posible establecer una estructura primaria única.

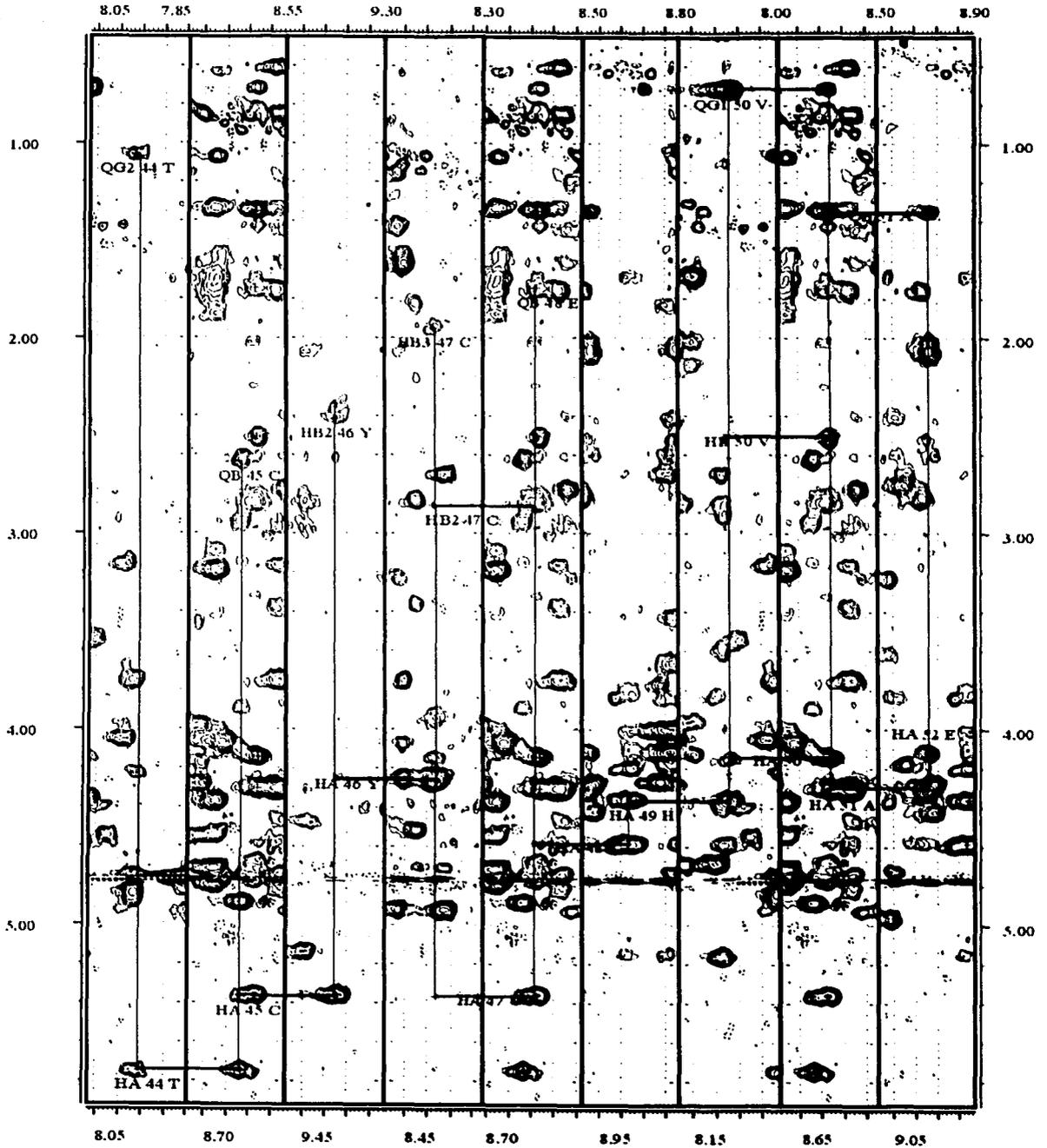


Figura 2.5: Secuenciación 44-52 (...TCYCYEHVAE...) del péptido G.

2.2. Elementos regulares de estructura secundaria

2.2.1. Índice de protón

Se ha desarrollado un método para la determinación de la estructura secundaria basado en el desplazamiento químico del hidrógeno α [39].

Residuo	$\delta(\text{HA})$ (ppm)	Residuo	$\delta(\text{HA})$ (ppm)
Ala	4.35 \pm 0.10	Met	4.52 \pm 0.10
Cys	4.65 \pm 0.10	Asn	4.75 \pm 0.10
Asp	4.76 \pm 0.10	Pro	4.44 \pm 0.10
Glu	4.29 \pm 0.10	Gln	4.37 \pm 0.10
Phe	4.66 \pm 0.10	Arg	4.38 \pm 0.10
Gly	3.97 \pm 0.10	Ser	4.50 \pm 0.10
His	4.63 \pm 0.10	Thr	4.35 \pm 0.10
Ile	3.95 \pm 0.10	Val	3.95 \pm 0.10
Lys	4.36 \pm 0.10	Trp	4.70 \pm 0.10
Leu	4.17 \pm 0.10	Tyr	4.60 \pm 0.10

Tabla 2.1: Valores de los intervalos de desplazamiento químico del HA usados para la determinación de la estructura secundaria.

En este método se emplean los valores de desplazamiento químico de la tabla 2.1 como guía bajo los siguientes criterios para cada residuo de la proteína:

- Si el desplazamiento químico es mayor que el intervalo de la tabla 2.1 se asocia un "1" (índice de desplazamiento químico) al aminoácido.
- Si el desplazamiento químico es menor que el intervalo de la tabla 2.1 se asocia un "-1" al aminoácido.
- Si el desplazamiento químico se encuentra en el intervalo, se asocia un "0" al aminoácido.

Se hace una gráfica de número de residuo contra índice de desplazamiento químico (CSI) y cualquier agrupamiento de cuatro o más "-1" no interrumpido por un "1" es una hélice. Cualquier agrupamiento de tres o más "1" no interrumpido por un "-1" es una hoja- β .

2.2.2. Interpretación cualitativa de NOEs

En una estructura secundaria además de las distancias secuenciales existen distancias entre los núcleos de hidrógeno lo suficientemente pequeñas para ser observadas en un espectro

NOESY.

Para el caso de las distancias d_{NN} , en las hélices- α tiene un valor de 2.8 Å. En las hojas- β antiparalelas es de aproximadamente 4.3 Å y en las hojas paralelas es de 4.2 Å.

La hélice- α está caracterizada por la cercanía entre los residuos i e $i + 3$ y los residuos i e $i + 4$. En la figura 2.6 se muestra la región 21-30 del péptido G, a partir de la treonina 24 se establece la existencia de una hélice- α (que se extiende hasta el residuo 32) debido a la existencia de señales HN-HN secuenciales.

En las estructuras β cada lámina consiste de segmentos extendidos cuyos elementos no se encuentran cercanos entre sí, pero que se encuentran a corta distancia de otra lámina (ver figura 1.17b), dichas distancias adoptan los siguientes valores:

$$\begin{aligned}d_{\alpha\alpha}(i,j) &= 2.3\text{Å} \\d_{\alpha N}(i,j) &= 3.2\text{Å} \\d_{NN}(i,j) &= 3.3\text{Å}\end{aligned}$$

Con la información anterior, es posible encontrar señales en el espectro NOESY que permitan determinar la existencia y la extensión de estructuras secundarias.

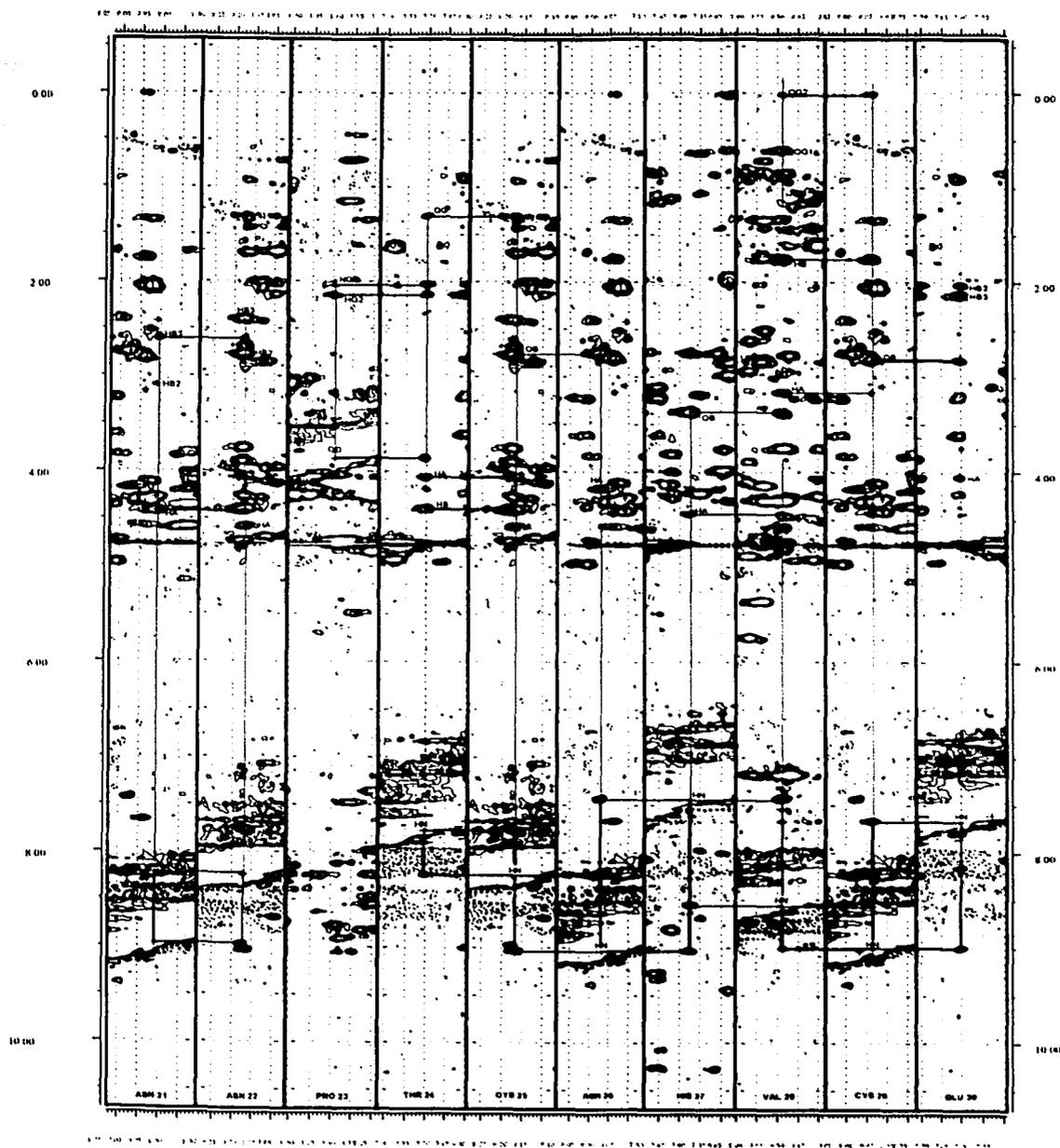


Figura 2.6: Secuencia 21-30 (...NNPTCNHVCE...) del péptido G (espectro NOESY en agua). La existencia de señales entre los hidrógenos de amida permiten establecer que a partir del residuo 24 se presenta una hélice- α . La prolina no tiene hidrógeno de amida, por lo que no existe señal secuencial HA23-HN24, la secuencia se estableció entre el HA23 y el HD24.

2.3. Asignación de NOEs a larga distancia

Una señal NOE a larga distancia se establece entre núcleos pertenecientes a residuos que cumplen con la condición $|i - j| > 5$ donde i y j son las posiciones de cada aminoácido en la estructura primaria.

Las proteínas se pliegan de tal forma que hidrógenos que se encuentran lejanos en la estructura primaria pueden estar cercanos en el espacio. Para determinar la estructura terciaria es necesario identificar las señales del espectro NOESY que se producen debido a esta cercanía.

La convergencia de los cálculos de las estructuras se basa en gran medida en el número de NOEs a larga distancia que se proporcionen. La asignación de estas señales se realiza una vez que se ha establecido la secuencia en los espectros y cada sistema de espín identificado correlacione con un residuo específico dentro de la secuencia primaria. En ciertos casos, la asignación de NOEs a larga distancia resulta ambigua debido a la existencia de varios núcleos con el mismo desplazamiento químico, sobre todo en la región de los hidrógenos de la cadena lateral de los aminoácidos. Para iniciar los cálculos de estructuras se deben proporcionar algunas restricciones debidas a NOEs a larga distancia y trabajar simultáneamente el análisis del espectro NOESY y los cálculos para facilitar de alguna manera la búsqueda de más NOEs a larga distancia y refinar los cálculos.

2.4. Medición de constantes de acoplamiento

Las constantes de acoplamiento a tres enlaces de distancia (3J) proveen información suplementaria a la proporcionada por los NOEs. Los intervalos de los ángulos de torsión pueden ser estimados a partir de los valores de las constantes de acoplamiento.

Las constantes más fáciles de determinar en proteínas son las $^3J_{HNHA}$ que pueden ser obtenidas a partir del espectro COSY con las señales fuera de la diagonal que correlacionan al hidrógeno α con el hidrógeno de amida. En la figura 2.7 se grafica la dependencia de $^3J_{HNHA}$ en función del ángulo de torsión.

Se empleó el programa JDSIMANTI [41, 42, 43] para calcular las constantes de acoplamiento con las señales HA-HN en antifase del espectro COSY.

2.5. Cuantificación de NOEs

Como se señaló previamente, la intensidad de un NOE depende de las distancias entre los núcleos y de los tiempos de correlación τ_c (relacionado con la rotación efectiva de la

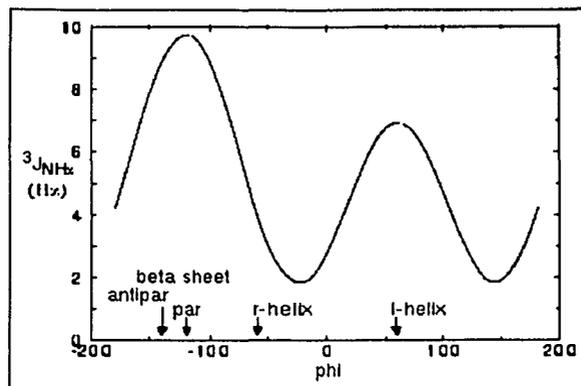


Figura 2.7: Relación empírica de Karplus entre la constante de acoplamiento ${}^3J_{HNH\alpha}$ y el ángulo de torsión.

molécula):

$$NOE \propto \frac{1}{r_c^6} f(\tau_c)$$

El valor de la función de correlación $f(\tau_c)$ está definido por los efectos del movimiento de rotación molecular que depende del tamaño y la forma de la proteína, por lo que τ_c puede variar en diferentes regiones de la proteína. Por lo anterior, se pueden establecer solamente los límites superiores de las distancias entre los núcleos.

El programa XEASY permite marcar cada señal en los espectros y generar una lista con la información necesaria para correlacionar cada señal (o pico) al par de núcleos involucrados. Adicionalmente se genera una lista que identifica cada núcleo que ha sido asignado. En el primer caso se obtiene un archivo con extensión *.peaks* y en el segundo, un archivo *.prot*. El programa PEAKINT (asociado a XEASY) calcula la intensidad (volumen) de cada señal marcada en un espectro (en este caso, el NOESY). La calibración es la conversión de las intensidades de las señales NOE en distancias (que son empleadas como restricciones en los cálculos de dinámica molecular). Dado un archivo con la lista de los núcleos (**.prot*) y un archivo con la lista de picos (**.peaks*), las señales son calibradas automáticamente por medio del programa de calibración CALIBA [40].

2.6. Determinación y refinamiento de la estructura

Las técnicas que se emplean para la determinación de estructuras tridimensionales de proteínas a partir de datos de RMN se basan principalmente en las relaciones entre

las distancias intramoleculares protón-protón y la conformación molecular. Los métodos computacionales para generar estructuras involucran la búsqueda del mínimo global de una función P que está construida con las restricciones obtenidas en los experimentos de RMN un ejemplo es el método de "simulación de templado dinámico" (Dynamical Simulated Annealing)

Este método computacional combina cálculos de dinámica molecular y de restricciones de distancia [44]. La estructura inicial es la proteína extendida que es calentada para establecer un espacio grande donde pueden encontrarse los átomos de la proteína y posteriormente la temperatura va disminuyendo lentamente. Durante la simulación, la temperatura es calculada y mantenida usando la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{2} = \sum_{i=1}^N m_i v_i^2 = \frac{3}{2} N k T$$

La dinámica molecular usa la segunda ley de Newton para determinar el movimiento de los átomos:

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = F(x) - f \frac{dx}{dt} + R(t)$$

donde $F(X)$ es la fuerza sobre el átomo, f es el coeficiente de fricción y $R(t)$ es la fuerza motriz, por ejemplo colisiones con el solvente.

La fuerza se calcula a partir del gradiente de una función P :

$$F = -\nabla P$$

P está dada por:

$$P_{total} = P_{exp} + P_{cov} + P_{noen}$$

P_{exp} contiene los datos experimentales de RMN, tales como restricciones de distancia calculados a partir de los NOEs, puentes de hidrógeno y constantes de acoplamiento. P_{cov} contiene información acerca de la distancia de enlaces covalentes, ángulos entre los enlaces, geometría de anillos aromáticos, en algunos casos quiralidad de los carbonos y linealidad de los puentes de hidrógeno. P_{noen} aporta el traslape en los radios de van der Waals de los átomos no enlazados. Para los cálculos de las estructuras se empleó el programa CNS [45], que emplea una estrategia similar a la descrita anteriormente.

La precisión de la determinación de la estructura se evalúa al comparar un grupo de conformeros calculados para los mismos datos experimentales, pero con el uso de diferentes condiciones iniciales [36]. El cálculo de una sola estructura que sea compatible con los resultados de los espectros de RMN no es suficiente para demostrar que esa estructura es

única, es por ello que se deben realizar varios cálculos para obtener un conjunto de estructuras de baja energía consistentes con los datos experimentales.

La convergencia de los cálculos se juzga a partir de las violaciones a las distancias experimentales proporcionadas.

El resultado final de una estructura se presenta comúnmente como una sobreposición de todas las estructuras calculadas que tienen un mínimo de violaciones a las restricciones y la raíz cuadrada de la desviación media (RMSD) también tiene un valor mínimo.

Capítulo 3

Resultados y discusión

Una vez que se asignaron aproximadamente 55 sistemas de espín se comenzó con la secuenciación por medio del espectro NOESY. No fue posible encontrar un sistema de espín igual al mostrado en el anexo B para la fenilalanina, probablemente porque los hidrógenos 3, 4 y 5 tienen el mismo desplazamiento químico.

Se debe hacer notar que los HA de cada aminoácido aparecen entre 4 y 5 ppm, por lo que en un intervalo de 1 ppm se encuentran, en este caso, aproximadamente 50 núcleos diferentes. Igualmente, existen varios sistemas de espín cuyo HN tiene el mismo desplazamiento químico. Por ejemplo existen dos sistemas de espín (marcados como 41 y 13) cuyo desplazamiento químico del HN el mismo: 9.44 ppm (ver figura 3.1 franja del extremo izquierdo). HA41 se encuentra a 4.8 ppm y corresponde a un aminoácido aromático. En la estructura primaria del péptido G existen la siguientes regiones: ...FGC... y ...YAW... La señal del agua interfiere con el HA 41, pero es posible definir señales NOE en 8.53 y 8.68 ppm. En 8.86 ppm existen a su vez dos sistemas de espín: uno asociado a glicina (HA1 58) y otro asociado a alanina; en 8.53 ppm hay un sistema de espín de glicina. De este modo no es posible en principio establecer la identidad del sistema aromático cuyo HA está en 4.8 ppm. Lo mismo sucede con HA13, al encontrar dos señales NOE en 8.57 y también en 8.53 ppm. En el caso de la figura 3.1 ya se muestran los sistemas de espín debidamente identificados, luego de superar los inconvenientes derivados de la sobreposición de más de dos núcleos con el mismo desplazamiento químico.

El ejemplo anterior es una muestra de las dificultades que se encuentran en la secuenciación por medio del espectro NOESY. Este mismo problema existe cuando se asignan las señales NOE a larga distancia y resulta ser más grave, porque en el caso de la secuenciación, al continuar buscando señales y con ayuda de la estructura primaria conocida se puede identificar cada sistema de espín. En la asignación de NOEs a larga distancia no existe ningún criterio para decidir con cuál de los núcleos ocurre la correlación. Es sólo hasta el análisis de los cálculos de dinámica molecular (al revisar las violaciones de distancias

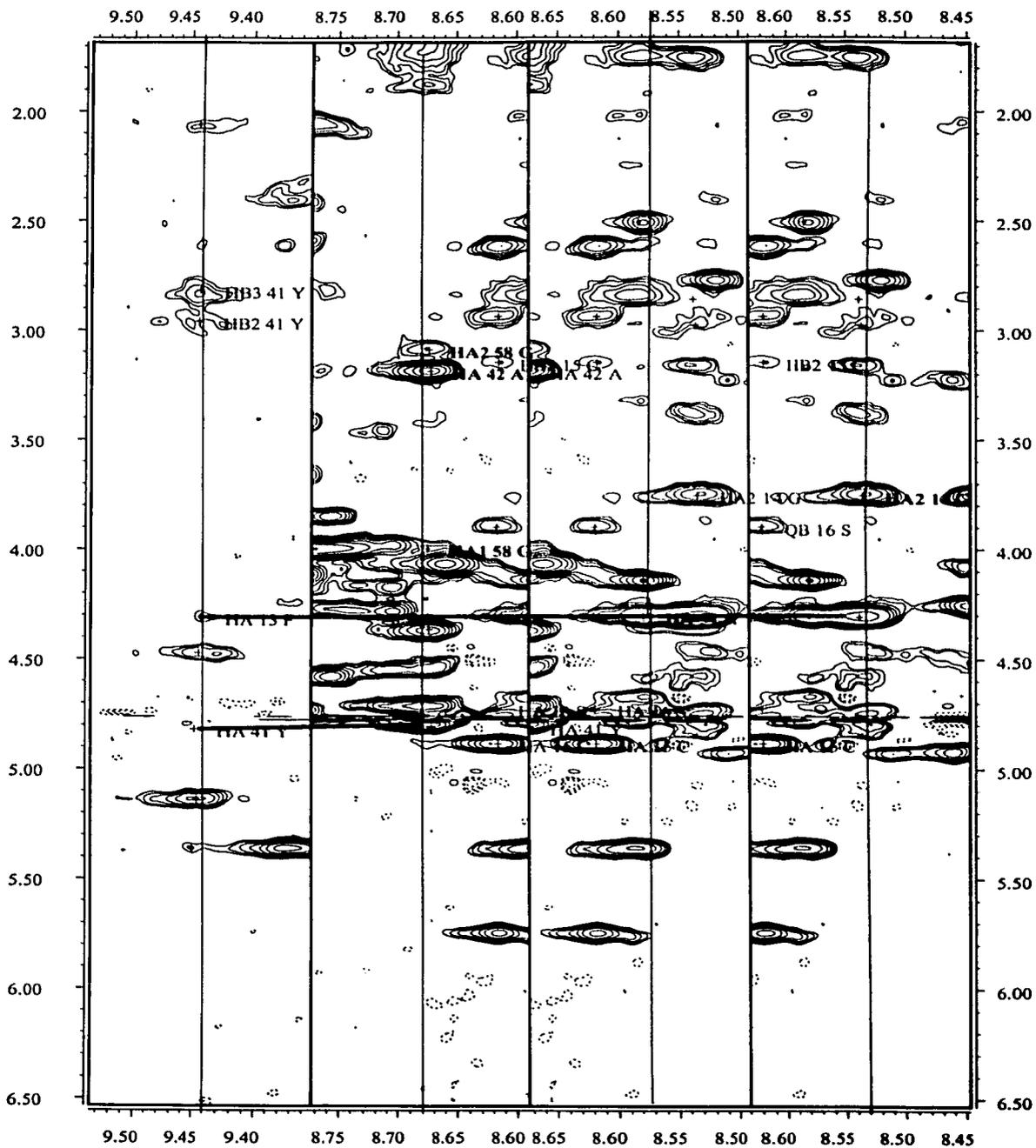


Figura 3.1: Problemas en la asignación secuencial (revisar texto)

existentes) que se pueden definir las correlaciones correctas.

La asignación secuencial se realizó en el espectro NOESY por medio de las señales HA-HN y/o señales de la cadena lateral con HN. Fue posible establecer señales para las secuencias que comprenden los residuos 1-4, 6-10, 11-22, 23-31, 32-63 y 64-66. Para la secuencia K31-K32 sólo se encontró un NOE entre los hidrógenos de amida. No existe algún NOE para la secuencia 10-11 ni 66-67¹. En el caso de la secuenciación X-Pro, se encontraron señales entre el HA del residuo X y algún HD de un sistema de espín asociado a prolina.

La gráfica de índice de protón (figura 3.2) predice la existencia de 4 estructuras secundarias: hélices- α en las regiones que contienen a los aminoácidos 6-10 y 21-32, y estructuras β en las regiones 2-5 y 38-41.

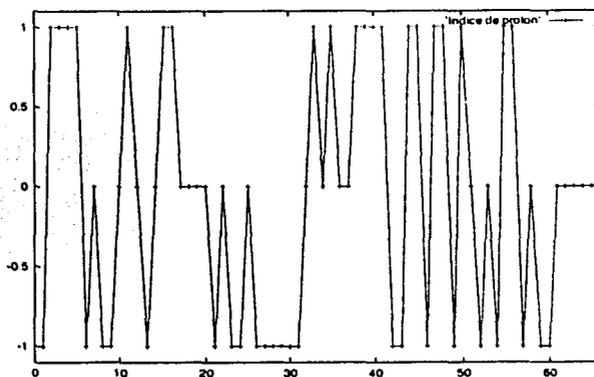


Figura 3.2: Gráfica de índice de protón. Predice la existencia de estructuras α (regiones 6-10 y 21-32) y β (regiones 2-5 y 38-41).

El análisis del espectro NOESY, llevó a establecer una hélice- α entre los aminoácidos 24-32 mediante las señales intensas entre hidrógenos de amida secuenciales y débiles entre el HA y el HN siguiente. No existen suficientes señales NOE para establecer una hélice entre los residuos 6-10. Respecto a las estructuras β , las señales NOESY indican que se forma una hoja β plegada antiparalela de 3 hebras que comprenden a los residuos 2-4, 37-40 y 45-48. (figura 3.3).

La gráfica de índice de protón es consistente en sus predicciones, excepto en el caso de la estructura β de la región 44-48, sin embargo las señales NOESY constituyen una prueba de la formación de la hoja β antiparalela.

Para realizar los cálculos se usaron cuatro tipos de restricciones: distancias (propor-

¹Dado que algunas de las variables que determinan la intensidad de una señal NOE tienen que ver con el movimiento en la molécula y con el tiempo en que se relajan los núcleos, es natural que no se logren observar todas las correlaciones existentes.

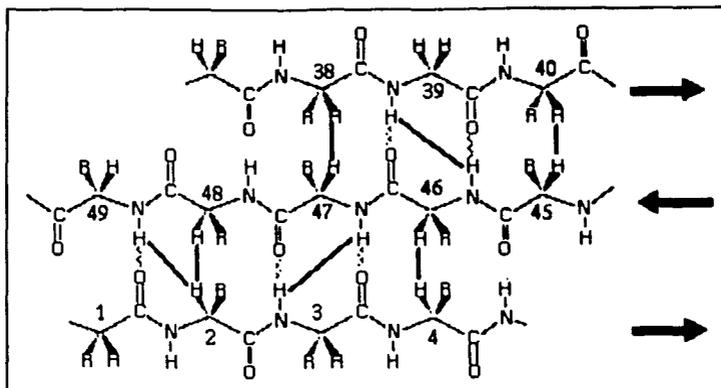


Figura 3.3: Hoja β plegada antiparalela del péptido G. Esta estructura es propuesta a partir de las señales en los espectros NOESY en H_2O y en D_2O . las líneas sólidas indican a los pares de hidrógenos cuya correlación se encontró a través de dichos espectros.

cionadas a partir de la calibración de los NOEs), puentes de hidrógeno, ángulos de torsión y constantes de acoplamiento.

La visualización de las estructuras calculadas se hizo a través del programa MOLMOL [48]. Igualmente, todas las figuras subsecuentes se obtuvieron con dicho programa.

En la figura 3.4 se muestra la sobreposición de los elementos regulares de estructura secundaria de las 10 estructuras de menor energía y en la tabla 3.1 se muestran los valores de RMSD para cada elemento de estructura secundaria y de la proteína completa. El RMSD estimado es para la sobreposición del esqueleto del péptido (enlaces peptídicos, en inglés *backbone*).

Estructura	Región	RMSD
Completa	1-67	3.006
Hélice- α	24-32	0.165
Hebra 1	2-4	0.269
Hebra 2	37-40	0.163
Hebra 3	45-48	0.124
Hélice y hoja- β		0.482

Tabla 3.1: Valores de RMSD, por regiones, de la sobreposición del esqueleto del péptido G.

Como era de esperar, existen valores bajos en los casos de las regiones con estructura secundaria ya que se proporcionó el número suficiente de restricciones para definir su conformación en el espacio. En el caso de la estructura completa, el valor de RMSD aumenta porque existen regiones donde hay pocas restricciones de distancia, lo que permite libertad

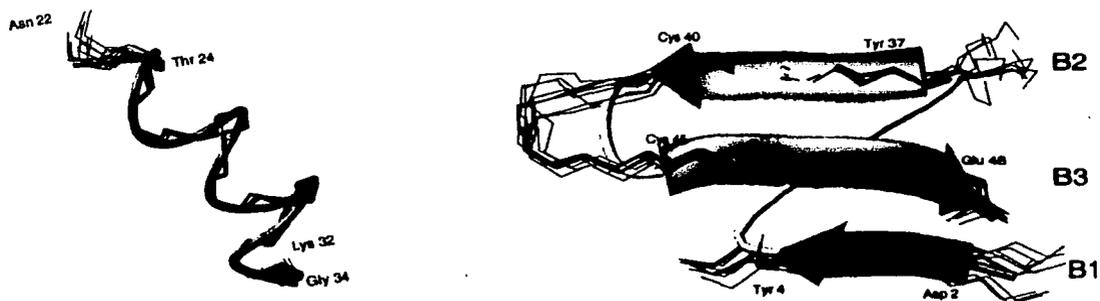


Figura 3.4: Representación de los elementos regulares de estructura secundaria del péptido G. A la izquierda hélice- α y a la derecha hoja- β .

de movimiento en el cálculo.

En la figura 3.5 se muestran las 10 estructuras de menor energía. La sobreposición de las estructuras se hizo a través de los esqueletos de las regiones con estructura secundaria.

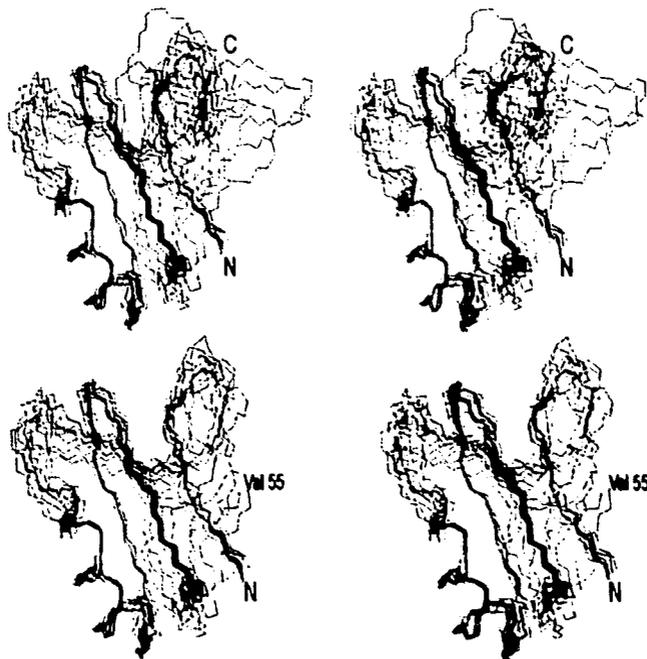


Figura 3.5: Vistas estéreo de la sobreposición de las 10 estructuras de menor energía del péptido G.

En el péptido G existen 4 puentes disulfuro [Dr. L.D. Possani, sin publicar]: Cys25-Cys45, Cys29-Cys49, Cys11-Cys65 y Cys15-Cys40. La hélice- α está unida a la hebra- β 3 por los puentes C25-C45 y C29-C49. Estos puentes, así como el patrón de plegamiento hélice- α /hoja- β ($CS\alpha\beta$) que presenta el péptido G se conservan en todas las toxinas de alacrán [29]. Adicionalmente, el patrón $CS\alpha\beta$ se encuentra en muchas proteínas con actividades antibióticas o tóxicas [46].

En la figura 3.6 se muestran las estructuras primarias de las toxinas PG (péptido G), Cn2 (del alacrán *Centruroides noxius*, tóxica hacia mamíferos [28]), Ts1 (del alacrán brasileño *Tityus serrulatus*, toxicidad contra mamíferos [46]), AahSTR1 (alacrán de África del Norte *Androctonus australis hector*, sin actividad tóxica [47]) y AaHII. Los péptidos Cn2, Ts1 y AahSTR1 son toxinas- β y el péptido AaHII es considerado como prototipo de una toxina- α , todas ellas son moduladoras de los canales iónicos de sodio.

PG	RDGYPLASNG-CKFGCSGLGENNPTCNHVC-EKKAGSDY---GYCYAW-----TCYCEHVAEGTVLWGDSTGTPCRS
Cn2	KEGYLVDKNTGCKRYEC-LKLGDNNDYCLREC--RQYQKGA-GGYCYAF-----ACUCTHLYEOAIVWPLPNKRCS
Ts1	KEGYLMDHE-GCKLSC--FIRPSGYCGRECGIKKGS-----SGYCAWP-----ACYCYGLPNWVKVWDRATNKC
AahSTR1	ARDGYIVHDGTNCKYSC-EFGSEYKYCGPLC-EKKKART---GYCYLF-----ACWCIEVPDEVRVWGEDGFHCWS
AaHII	VKDGIVDD-VNCTYFCGRNA----YCNEEC-TKLKGE---SGYCQWASPYGNACYCYKLPDEVRTKGPGRCH

Figura 3.6: Estructuras primarias de diferentes toxinas de alacrán moduladoras de los canales de sodio.

Existen dos tipos de toxinas moduladoras de los canales de sodio: toxinas- α y toxinas- β . un análisis de sus estructuras primarias muestra algunas diferencias características entre unas toxinas y otras. Las toxinas- β tienen en el N-terminal a un aminoácido básico (Arg o Lys) y en las toxinas- α el aminoácido básico se encuentra en la posición 2 o 3. La lisina 12 se conserva en todas las toxinas- β y en las toxinas- α en la misma posición se encuentra una treonina o una valina. Por otro lado, en las toxinas- α se conserva un residuo básico en la posición 58, cosa que no ocurre en las toxinas- β [46].

La información anterior y la comparación de la estructura primaria del péptido G con las otras toxinas de la figura 3.6 permite proponer que el péptido G sea considerado como una toxina- β . Sin embargo, se ha encontrado que este péptido no tiene actividad tóxica [L.D. Possani, sin publicar]. Estudios de modificación química y mutagénesis sobre las neurotoxinas han identificado algunos residuos que pueden estar involucrados en las interacciones con los canales de sodio. Todas las toxinas de cadena larga (60-70 aminoácidos) pierden significativamente su actividad cuando se modifica el residuo básico en el N-terminal. Otro residuo que ha mostrado una funcionalidad importante es la Lisina 12 de las toxinas- β . También la conservación de una superficie hidrofóbica en las toxinas de alacrán ha sido

tomada como evidencia de su participación en el reconocimiento del canal de Na^+ [46], esta región se encuentra del lado de la hoja- β [28].

El péptido G cuenta en su estructura con el aminoácido básico N-terminal y con la lisina 12, así como con la región hidrofóbica sobre la estructura β (figura 3.7b) por lo que la explicación de su inactividad tóxica debe encontrarse en otra región del péptido.

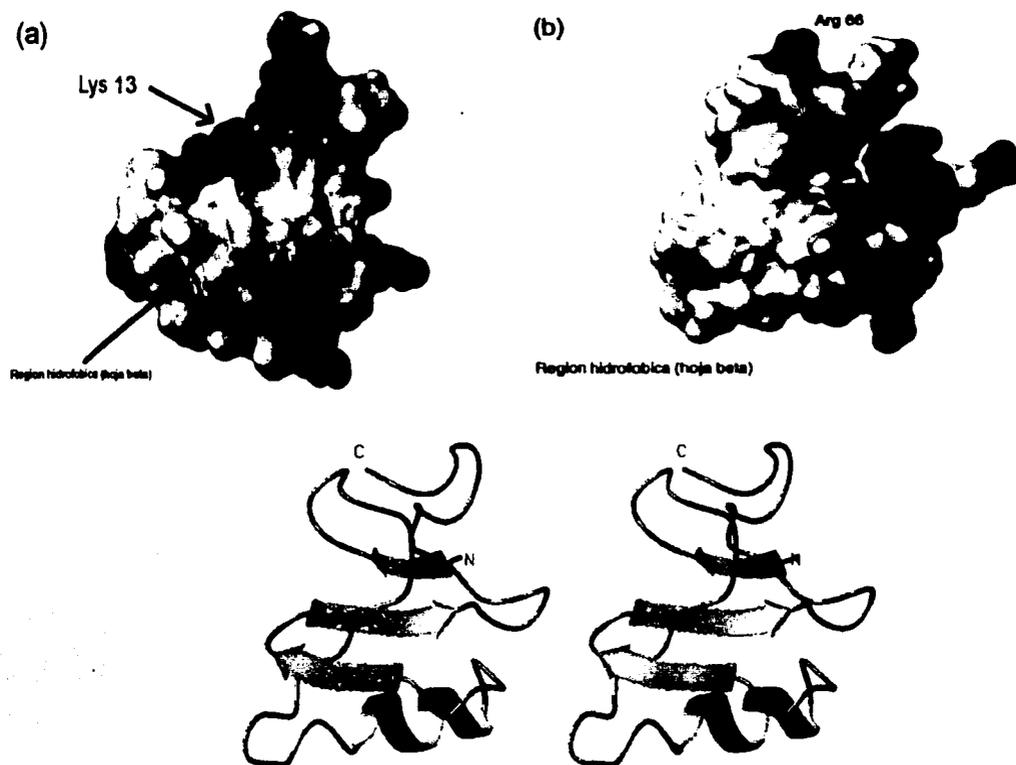


Figura 3.7: Superficies electrostáticas de las toxinas (a)Cn2 y (b)PG. En (c) se muestra una visión estérero de la orientación del péptido G que corresponde a las superficies mostrada. El color rojo indica carga negativa y el azul, positiva. En la superficie del péptido G no existe una región positiva correspondiente a Lys 13 de Cn2.

En la figura 3.8 se muestran las estructuras de la toxina activa Cn2 y del péptido G donde se observa una diferencia importante en la orientación de la región que contiene al aminoácido 12 (ver también figura 3.7). En el péptido G, la lisina 12 no se encuentra expuesta hacia el exterior, contrario a lo que sucede en la toxina Cn2 por lo que es posible que la actividad de la toxina esté en función de la orientación de este aminoácido básico (potencial electrostático positivo).



Figura 3.8: Sobreposición de las toxinas Cn2 (azul), PG (rojo). Existe un plegamiento diferente a partir del residuo 4 lo que provoca que la posición de Lys 12 sea totalmente diferente.

En varias toxinas- β activas, se encuentra presente la secuencia Pro-Leu-Pro casi al final de la cadena [47] o un equivalente, como en la toxina Ts1 (Asp-Arg-Ala). Esta secuencia en el caso de la toxina AahSTR1 y del péptido G están sustituidas por Gly-Glu-Asp y Asp-Ser-Gly, respectivamente. Blanc [47] establece que este cambio de aminoácidos desestabiliza la estructura. Sin embargo, la comparación de las estructuras terciarias contradice esta hipótesis.

En la figura 3.9 se encuentran las superficies electrostáticas (el cálculo se hizo sobre orientaciones similares) de diferentes toxinas: Cn2, Ts1, LqhaIT (toxina del alacrán *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, tóxica hacia insectos [49]) y PG. Las dos primeras toxinas actúan sobre mamíferos y tienen en común una región negativa y regiones positivas en lados opuestos (K35 y K31 por un lado y K63 y K52 por el otro). En el caso de la toxina que actúa sobre insectos, existe en el mismo sitio una región negativa. En el caso del péptido G se encuentra que se forma una superficie hidrofóbica, esto podría resultar en que no sea posible la interacción entre el canal de sodio y la toxina.

El plegamiento de las proteínas determina la posición de cada aminoácido en el espacio y la carga electrostática en la superficie de la proteína se debe a la naturaleza de los aminoácidos que se encuentran expuestos hacia el exterior. Por las características de la superficie del péptido G y su comparación con las de otras toxinas activas, es muy probable que el reconocimiento de las toxinas por parte de los canales iónicos de sodio sea a través de interacciones dipolares.

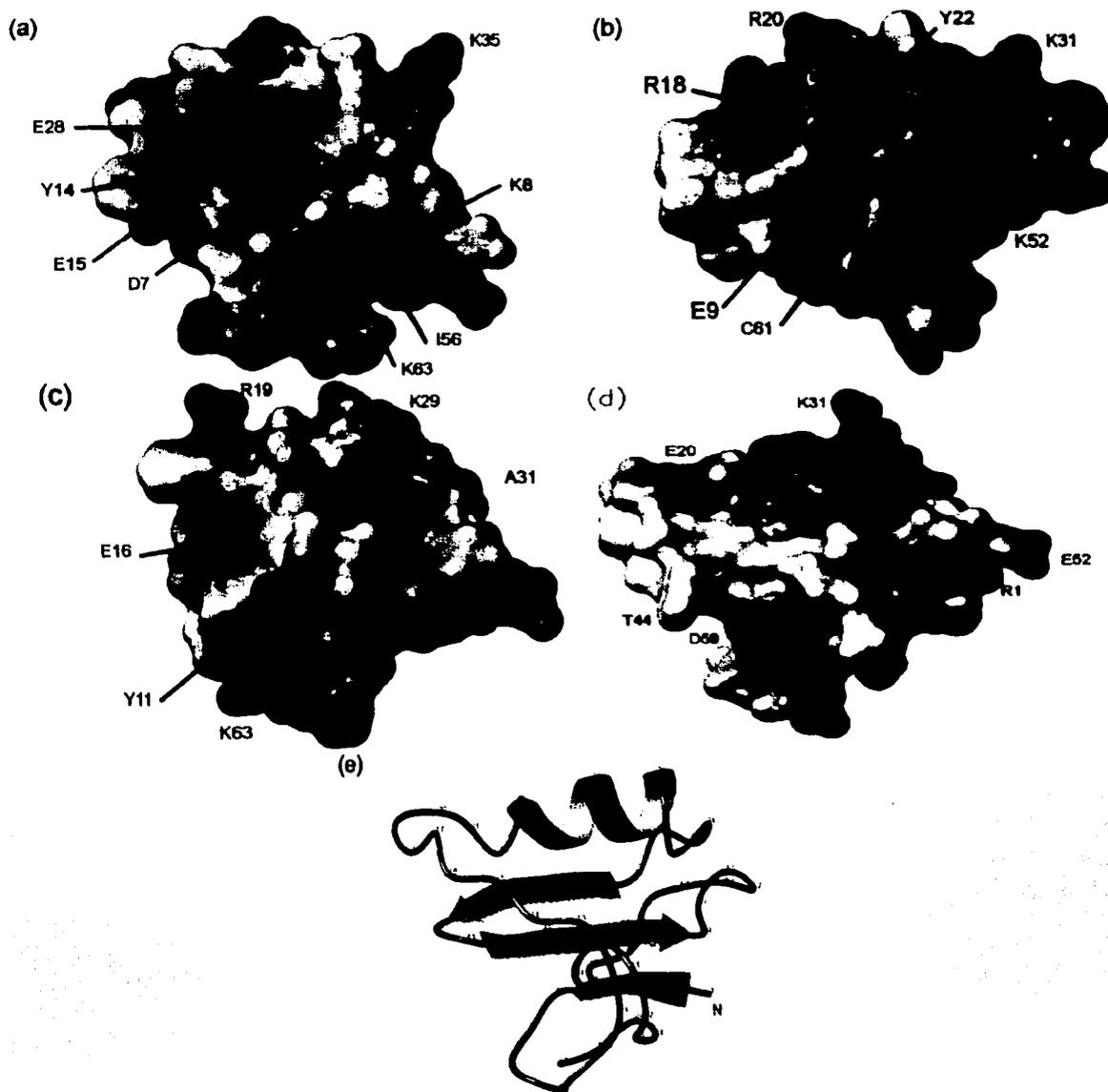


Figura 3.9: Superficies electrostáticas de las toxinas (a)Cn2,(b)Ts1, (c)LqhaIT y (d)PG. En (e) se encuentra la orientación del péptido G para realizar el cálculo de la superficie, esta orientación es similar en los casos de las otras toxinas.

Conclusiones

1. Los elementos de estructura secundaria del péptido G son:
 - hélice- α entre los residuos 24 a 32.
 - hoja- β plegada antiparalela de tres hebras: residuos 2-4, hebra 1 (B1); 37-40 hebra 2 (B2) y 45-48 hebra 3 (B3). El arreglo de las hebras es B1-B3-B2
2. Los elementos regulares de estructura secundaria forman un patrón conocido como $CS\alpha\beta$, que se conserva en todas las toxinas del veneno de alacrán y en otras proteínas con actividad antibiótica y tóxica.
3. Por las características de su estructura primaria, el péptido G puede ser considerado como una toxina- β .
4. El patrón $CS\alpha\beta$ y la naturaleza hidrofóbica de la superficie de la hoja- β no son los únicos elementos responsables de la actividad de una toxina.
5. Al encontrarse presente la lisina 12 en el péptido G y dado que se ha mostrado que el cambio de este residuo hace que la toxina pierda su actividad, no es sólo la presencia de dicha lisina sino su orientación, una de las causas probables de la actividad tóxica de las toxinas- β de los alacranes. Al existir actividad tóxica dicho residuo se encuentra hacia el exterior.
6. Esta es la primera proteína que se obtiene en México y con experimentos obtenidos en el país se determina su estructura por RMN.

Anexo A

Algunos resultados útiles de la física clásica

El fenómeno en el que se basa la Resonancia Magnética Nuclear puede ser explicado basándose en algunos resultados de la física clásica, los cuales son más cercanos a nuestra realidad y percepción. Por lo anterior, se desarrollarán algunos temas desde un punto de vista clásico para facilitar la visión de los fenómenos que ocurren al colocar un núcleo dentro de un campo magnético.

A.1. Giroscopio[30, 31]

La rotación se asocia con un cambio angular de la posición de un cuerpo con respecto al tiempo. La torca o momento de torsión puede pensarse como la tendencia de una fuerza a realizar una rotación. Vectorialmente, la torca se define como:

$$\vec{\tau} = \vec{r} \times \vec{F} \quad (\text{A.1})$$

El momento angular \vec{L} de una partícula que está rotando alrededor de un punto O se define matemáticamente con el producto vectorial:

$$\vec{L} = \vec{r} \times \vec{p} \quad (\text{A.2})$$

donde \vec{r} se mide relativo a O y $\vec{p} = m\vec{v}$ es el momento lineal o cantidad de movimiento.

A partir de la segunda ley de Newton, $\vec{F} = \frac{d\vec{p}}{dt}$, y combinando las ecuaciones A.1 y A.2 se puede deducir la relación entre el momento angular y la torca:¹

¹A los núcleos atómicos se les caracteriza con el número cuántico de espín que es directamente proporcional a la magnitud del momento angular de espín. El momento angular de espín acepta un tratamiento vectorial clásico. Entonces es posible decir que si el espín cambia su orientación en el espacio se debe a un momento

$$\vec{\tau} = \frac{d\vec{L}}{dt} \quad (\text{A.3})$$

Para un objeto que se encuentra en un movimiento circular, L se define como la masa por la velocidad por el radio de la circunferencia; por otro lado, la velocidad es igual a la velocidad angular por el radio ($v = \omega r$). Entonces:

$$L = m_i v_i r = m_i r_i^2 \omega \quad (\text{A.4})$$

Al sumar respecto a todas las partículas que forman al objeto, se obtiene:

$$L = I\omega \quad (\text{A.5})$$

La expresión anterior es análoga a la del momento lineal, donde la velocidad se reemplaza por la velocidad angular y la masa por el momento de inercia (I).

Un tipo de movimiento familiar es el que se observa al hacer girar un trompo alrededor de su eje de simetría como se observa en la figura A.1a. Dicho movimiento alrededor de la vertical es conocido como *precesión*.²

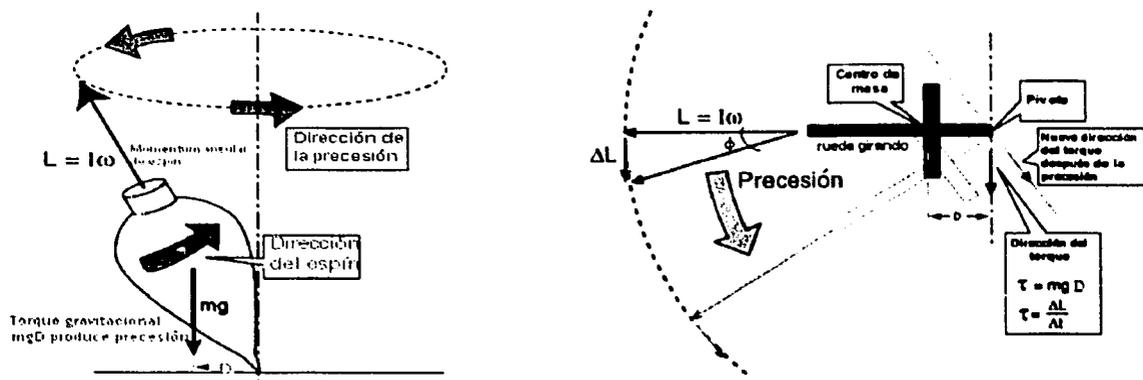


Figura A.1: (a) Representación del movimiento de un trompo. (b) Giroscopio.

Para ilustrar de manera sencilla las características de un movimiento como el del trompo, se considerará a un giroscopio simple (figura A.1b), el cual consta de una rueda que puede girar y que está sujeta a un eje cuyo pivote se encuentra a una distancia D . Hay dos fuerzas de torsión que actúa sobre él (que puede ser generado por un campo magnético).

²Al hablar de núcleos magnéticos, el campo que causa la torca es el campo magnético en analogía con el campo gravitatorio que actúa sobre el trompo.

externas actuando sobre el sistema (rueda y eje) que son el peso Mg y la normal del soporte sobre el eje que no produce torca. De esta manera la torca externa sobre el sistema es

$$\vec{\tau} = MgD \hat{i}$$

La dirección de esta torca es perpendicular al eje de la rueda (perpendicular a \vec{L}). Este momento de torsión hace cambiar al momento angular en la dirección de la torca (ver ec. A.3), es decir que el eje se mueve en el plano horizontal:

$$d\vec{L} = \vec{\tau}dt = MgDdt \hat{i}$$

El momento angular total es la suma del momento angular de espín (debido al giro de la rueda) más el que se origina por la precesión de la rueda en torno al pivote. Para simplificar, la contribución debida a la precesión es despreciable, lo que es una buena aproximación si la frecuencia de precesión (ω_p) es mucho menor que la frecuencia de "espín" (ω_s).

En el diagrama vectorial de la figura A.1b se muestra que en el tiempo dt el vector \vec{L} gira describiendo un ángulo $d\phi$. Se puede calcular el cambio angular con la siguiente expresión:

$$d\phi = \frac{dL}{L} = \frac{MgDdt}{I\omega_s} \quad (\text{A.6})$$

La rapidez con la que precesa el eje es $\frac{d\phi}{dt}$, por lo tanto:

$$\omega_p = \frac{d\phi}{dt} = \frac{MgD}{I\omega_s} \quad (\text{A.7})$$

Este resultado es válido sólo cuando $\omega_p \ll \omega_s$.

A.2. Magnetismo

La torca sobre una espira de corriente[32]

En la figura A.2 se muestra una espira rectangular de alambre de longitud a y ancho b colocada sobre un campo magnético \vec{B} de tal forma que los lados (1) y (3) siempre son perpendiculares a la dirección del campo. La normal nn' al plano de la espira forma un ángulo θ con la dirección de \vec{B} (fig. A.2b). La corriente fluye en el sentido de las manecillas del reloj.

La fuerza neta sobre la espira es la resultante de las fuerzas en cada uno de los 4 lados de la espira.

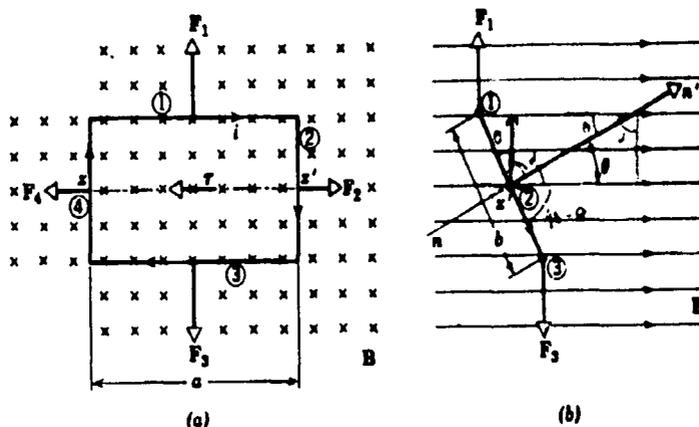


Figura A.2: Efecto de un campo magnético \vec{B} sobre una espira de corriente. Las cruces indican que la dirección del campo es hacia adentro de la hoja. (a) Debido al paso de corriente, sobre cada lado de la espira se ejerce una fuerza \vec{F}_i . (b) La acción de \vec{F}_1 y \vec{F}_3 ocasiona que la espira gire sobre x' .

Podemos definir un vector $\vec{\ell}$ sobre cada uno de los lados de la espira que apunte en la dirección de la corriente. Con la relación

$$\vec{F} = i\vec{\ell} \times \vec{B}$$

podemos encontrar la dirección y la magnitud de cada una de las fuerzas que actúan sobre los lados de la espira.

En el lado (2), $\vec{\ell}$ tiene magnitud b y el ángulo entre dicho vector y el campo magnético es de $90^\circ - \theta$.

Como \vec{F} es un producto cruz, la dirección de \vec{F}_2 es tal que sale de plano de la figura A.2b. El lado (4) tiene la misma magnitud que el lado (2), pero la corriente va en sentido contrario por lo tanto \vec{F}_4 tiene la misma magnitud que \vec{F}_2 , pero apunta en la dirección opuesta. Por lo tanto \vec{F}_2 y \vec{F}_4 no tienen efecto alguno en el movimiento de la espira y como dichos vectores se encuentran sobre la misma línea de acción, la torca total debida a estas fuerzas es cero.

Para los lados (1) y (3), $\vec{\ell}$ tiene magnitud a y el ángulo que forma con \vec{B} es 90° , por lo que

$$F_1 = F_3 = iaB \text{ sen}90^\circ = iaB$$

\vec{F}_1 y \vec{F}_3 se encuentran en direcciones opuestas, de tal forma que no tienden a mover la espira como un todo. Sin embargo, si la espira está en la posición mostrada en la figura A.2b, las fuerzas no se encuentran sobre la misma línea de acción por lo que existe una torca neta que tiende a girar la espira en dirección de las manecillas del reloj en torno a la línea xx'

La magnitud de la torca total $\vec{\tau}$ se calcula con el valor de la torca producida por \vec{F}_1 en torno al eje xx' y duplicándola, ya que \vec{F}_3 ejerce la misma torca:

$$\begin{aligned}\vec{\tau} &= \vec{\tau} \times \vec{F} \\ \tau &= \frac{b}{2} \quad F = iaB \\ \tau &= 2iaB \left(\frac{b}{2}\right) \text{sen}90^\circ \\ \tau &= iabB\end{aligned}$$

donde ab es al área (A) de la espira, por lo que

$$\tau = iAB\text{sen}\theta \quad (\text{A.8})$$

Una espira de corriente que se orienta en un campo magnético externo asemeja la acción de la aguja de una brújula en el mismo campo. Las brújulas, los imanes de barra y las espiras de corriente pueden considerarse como dipolos magnéticos. Para mostrarlo, se emplearán resultados encontrados para dipolos eléctricos.

Una estructura recibe el nombre de *dipolo eléctrico* si

a) Al colocarse en un campo eléctrico externo experimenta una torca cuyo valor está dado por la ecuación

$$\vec{\tau} = \vec{p} \times \vec{E} \quad (\text{A.9})$$

$$\tau = pE \text{sen}\theta \quad (\text{A.10})$$

donde \vec{p} es el momento dipolar eléctrico; y

b) Establece un campo eléctrico propio.

Estos dos requisitos no son independientes, si uno de ellos se cumple, el otro también.

Comparando las ecuaciones A.8 y A.10 se observa que en las dos aparece un campo (magnético o eléctrico) así como también el término $\text{sen}\theta$. Esta comparación sugiere que iA en la ec.A.8 puede considerarse como el momento dipolar magnético μ que corresponde a p en la ec.A.10, entonces la ec. A.8 queda como

$$\tau = \mu B \text{sen}\theta \quad (\text{A.11})$$

Esta última expresión indica que la torca sobre una espira de corriente puede escribirse en forma de producto vectorial, en analogía a la ecuación A.9:

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{B} \quad (\text{A.12})$$

Cuando se coloca una espira de corriente (o cualquier otro dipolo magnético) dentro de un campo magnético siempre existe una torca. Por lo anterior, un agente externo debe realizar trabajo para cambiar la orientación de tal dipolo. Consecuentemente, un dipolo magnético tiene una energía potencial asociada con su orientación en un campo magnético externo. Se puede considerar que ésta energía es cero cuando $\vec{\mu}$ y \vec{B} forman un ángulo recto. La forma de escoger la configuración de energía $E=0$ es arbitraria debido a que sólo interesan los cambios de energía que ocurren cuando el dipolo gira.

La energía potencial magnética en una posición θ se define como el trabajo (producto $\tau\theta$) que debe realizar un agente externo para hacer girar al dipolo de su posición de energía cero ($\theta = 90^\circ$) a una posición dada θ . Por consecuencia

$$E = \int_{90}^{\theta} \tau d\theta = \int_{90}^{\theta} \mu B \sin\theta d\theta = \mu B \int_{90}^{\theta} \sin\theta d\theta = -\mu B \cos\theta$$

Que en términos de vectores se escribe como:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (\text{A.13})$$

Como se estableció anteriormente, el movimiento de una carga eléctrica (corriente) en una espira produce un momento magnético cuya magnitud es

$$\mu = iA \quad (\text{A.14})$$

Considerando ahora una espira circular que se encuentra sobre el plano xy , entonces se puede escribir una expresión para la corriente eléctrica

$$i = \frac{q}{t} = \frac{qv}{2\pi r} \quad (\text{A.15})$$

donde v es la rapidez de la carga y r es el radio de la espira. Sustituyendo ec.(A.14) en ec.(A.15) y como $A = \pi r^2$, se tiene que

$$\mu = \frac{qv}{2\pi r} \pi r^2 = \frac{qvr}{2} \quad (\text{A.16})$$

Generalizando, cuando la espira de corriente no es circular, la ecuación del momento magnético es:

$$\vec{\mu} = \frac{q}{2} (\vec{r} \times \vec{v}) \quad (\text{A.17})$$

Es posible expresar a $\vec{\mu}$ en términos del momento angular (\vec{L}) empleando el hecho de que dicho término se define por:

$$\begin{aligned}\vec{L} &= \vec{r} \times \vec{p} ; \quad \vec{p} = m\vec{v} \\ \vec{L} &= \vec{r} \times m\vec{v} \\ \vec{L} &= m(\vec{r} \times \vec{v})\end{aligned}\tag{A.18}$$

La relación entre el momento magnético y el momento angular es:

$$\begin{aligned}\vec{\mu} &= \frac{q}{2}(\vec{r} \times m\vec{v}) = \frac{q}{2} \frac{\vec{L}}{m} \\ \vec{\mu} &= \frac{q}{2m} \vec{L}\end{aligned}\tag{A.19}$$

Para un electrón $q = -e$ por lo que se puede reescribir a la ec. A.19 de la siguiente forma:

$$\vec{\mu} = -\frac{e}{2m_e} \vec{L}\tag{A.20}$$

Como quedó establecido, la energía potencial de un dipolo es:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}\tag{A.21}$$

Considerando al campo magnético y al momento angular sobre el eje z , entonces la ecuación de la energía se convierte en:

$$E = -\mu_z B_z$$

Empleando la ec. A.20 se tiene que:

$$E = \frac{eB_z}{2m_e} L_z\tag{A.22}$$

Precesión de un momento magnético[30]

El resultado de la ec. A.20 es válido para el movimiento orbital de un electrón en un átomo, pero el electrón también tiene un *espín* que tiene asociado un momento angular y por lo tanto un momento magnético.

En cualquier átomo existen varias combinaciones de espín y movimiento orbital por lo que la ec. A.20 se reescribe como:

$$\vec{\mu} = -g \frac{|e|}{2m_e} \vec{L}\tag{A.23}$$

donde g es un factor característico de cada átomo y es conocido como "factor de Landé".

En los núcleos atómicos hay protones y neutrones que tienen, como el electrón, una rotación intrínseca o espín. Entonces se puede escribir una relación entre el momento angular y el momento magnético análoga a la anterior:

$$\vec{\mu} = g \frac{e}{2m_p} \vec{L} \quad (\text{A.24})$$

Por la existencia del momento magnético, se puede considerar a los átomos como imanes. Una de las consecuencias de que en los átomos el momento magnético sea proporcional al momento angular es que al colocar un átomo en un campo magnético, su momento magnético adquiere un movimiento de precesión.

Es posible emplear los resultados de la física clásica (del giroscopio) para describir la precesión de los momentos magnéticos de las partículas subatómicas. Si se supone que existe un momento magnético suspendido libremente en un campo magnético uniforme, dicho momento sufrirá una torca que intentará alinearlo en la dirección del campo. Por la existencia del momento angular, la torca no hará que el imán termine alineado: en lugar de eso, el momento magnético precesará alrededor de un eje paralelo al campo magnético.

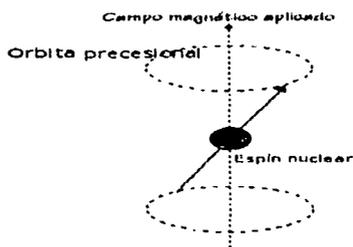


Figura A.3: Representación de la precesión de un momento magnético en un campo magnético externo.

A partir de la figura A.3 y de la ecuación A.6 se puede escribir que

$$d\phi = \frac{dL}{L \sin\theta}$$

y así calcular la velocidad de precesión:

$$\omega_p = \frac{d\phi}{dt} = \frac{1}{L \sin\theta} \frac{dL}{dt}$$

de acuerdo a las ecuaciones A.3 y A.12 se tiene que:

$$\omega_p = \frac{1}{L \sin \theta} \tau = \frac{1}{L \sin \theta} \mu B \sin \theta$$

$$\omega_p = \frac{\mu}{L} B = g \frac{|e|}{2m} B \quad (\text{A.25})$$

Como puede verse, la rapidez de precesión es proporcional a la magnitud del campo. La frecuencia de precesión para un protón es:

$$\nu_p = \frac{\omega_p}{2\pi}$$

$$\nu_p = \frac{g e}{2m_p} \frac{B}{2\pi} \quad (\text{A.26})$$

Es claro que la frecuencia de precesión es mucho mayor para el caso del electrón, por lo que la energía asociada a dicha frecuencia nos permitiría discernir entre un espín nuclear y uno electrónico.

Cuantización del momento angular [30, 33]

Clásicamente, un objeto con un momento angular total L podría tener, por ejemplo, para su componente z cualquier valor entre $+L$ y $-L$; cuánticamente, la componente z sólo puede tener ciertos valores discretos: si a un sistema se le puede asociar un número característico I (en el caso del electrón sería el número cuántico ℓ), la componente de su momento angular en cualquier eje (para simplificar, el eje z) sólo puede tomar uno de los siguientes valores:

$$I\hbar, (I-1)\hbar, (I-2)\hbar, \dots, -I \quad (\text{A.27})$$

Para un I dado, hay $(2I+1)$ posibles valores para la componente z de un momento angular. De esta manera, si se conoce la energía y el número I habrá exactamente $(2I+1)$ estados con la misma energía, cada estado correspondería a uno de los diferentes valores posibles.

Si se toma al azar cualquier sistema de I conocido y se mide la componente z del momento angular es igualmente probable obtener cualquiera de los valores posibles. Es posible calcular el valor esperado de la magnitud del vector L [30].

$$L = \sqrt{I(I+1)}\hbar \quad (\text{A.28})$$

Al hacer un análisis con los resultados de la mecánica cuántica, se encuentra que los vectores de momento angular tienen perfectamente determinada su magnitud (ec. A.28) y su

componente z cuyo resultado (para los electrones) está relacionado con el número cuántico m [33]:

$$L_z = m\hbar \quad (\text{A.29})$$

Efecto Zeeman[34]

Los resultados de la física clásica mostrados hasta el momento han puesto de manifiesto que existe una interacción entre los campos y los dipolos magnéticos.

En 1896 Peter Zeeman encontró que las líneas espectrales de emisión de un átomo, al ser colocado dentro de un campo magnético se desdoblaban en multipletes; este fenómeno es conocido como "efecto Zeeman".

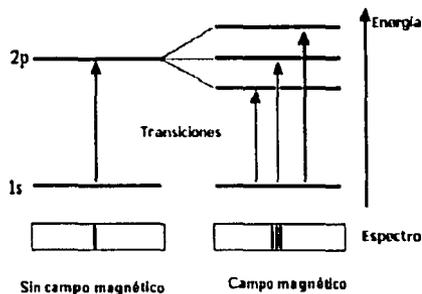


Figura A.4: Efecto de un campo magnético externo sobre un átomo de hidrógeno.

Para mostrar el origen de este desdoblamiento se emplearán algunos resultados de la mecánica cuántica. Si en la ec. A.22 reemplazamos L_z por su operador equivalente \hat{L}_z , entonces dicha ecuación nos dará la parte del hamiltoniano de un átomo de hidrógeno debida a un campo magnético externo.

Entonces el operador hamiltoniano cuando existe un campo magnético externo es:

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \frac{eB_z}{2m_e} \hat{L}_z$$

donde \hat{H}_0 es el hamiltoniano en ausencia del campo magnético.

La correspondiente ecuación de Schrödinger es

$$\begin{aligned} \hat{H}\Psi &= E\Psi \\ \hat{H}_0\Psi + \frac{|e|B_z}{2m_e} \hat{L}_z\Psi &= E\Psi \end{aligned} \quad (\text{A.30})$$

Como las funciones de onda son eigenfunciones de \hat{H}_0 y \hat{L}_z , también lo son de \hat{H} . Resolviendo la ec. A.30 se encuentra que los niveles de energía son

$$E = \frac{-\mu e^4}{8\varepsilon_0^2 h^2 n^2} + \beta m B_z \quad (\text{A.31})$$

$$n = 1, 2, 3, \dots \quad m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm \ell$$

donde $\beta = \frac{eh}{2m_e}$ recibe el nombre de magnetón de Bohr y numéricamente equivale a $9.274 \times 10^{-24} \text{ JT}^{-1}$.

La ec. A.31 muestra que un estado con determinados números cuánticos n y ℓ se separa en $2\ell + 1$ niveles de energía debido a la presencia de un campo magnético externo.

En la figura A.4 se muestran gráficamente los resultados para el estado 1s y 2p de un átomo de hidrógeno. El estado 2p se divide en tres niveles.

Experimento de Stern-Gerlach[30]

Se ha mencionado la existencia de una propiedad de las partículas subatómicas denominada *espín* que suele pensarse como el giro de dichas partículas sobre su propio eje.

En 1925 Samuel A. Goudsmit y George E. Uhlenbeck postularon la existencia del espín al indicar que el electrón poseía un momento angular intrínseco.

Como una prueba de la existencia del espín electrónico se tomarán los resultados de un experimento realizado en 1922 por Otto Stern y Walter Gerlach.

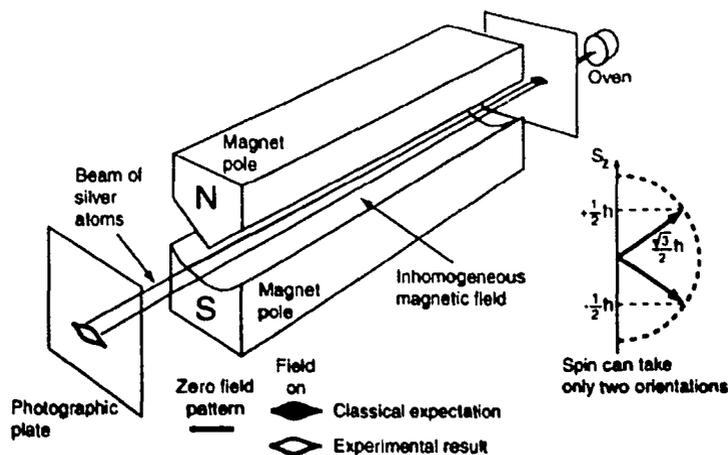


Figura A.5: Descripción del experimento de Stern-Gerlach.

Stern y Gerlach idearon un experimento para medir el momento magnético de los átomos de plata. Produjeron un haz de átomos de plata y lo hicieron pasar verticalmente entre los polos de un imán cuyo campo magnético era no homogéneo.

La hipótesis planteada se sustentaba en la física clásica: Si un átomo de plata tenía un momento magnético μ al ser colocado en un campo magnético se produciría un torca cuya energía asociada sería igual a

$$\Delta E = -\mu B \cos\theta$$

El hecho de tener un campo magnético variable produciría una variación en la energía y se generaría una fuerza sobre los momentos magnéticos cuya dirección dependería del valor del coseno de θ y los átomos serían atraídos hacia arriba o abajo por una fuerza proporcional a la derivada de la energía magnética

$$F_z = -\frac{\partial E}{\partial z} = \mu \cos\theta \frac{\partial B}{\partial z}$$

Al salir del horno los momentos magnéticos apuntarían en cualquier dirección y se encontraría cualquier valor para θ . Por lo anterior, cuando el haz abandonara el imán, los átomos se distribuirían de acuerdo a sus componentes verticales del momento magnético (ver la figura A.5).

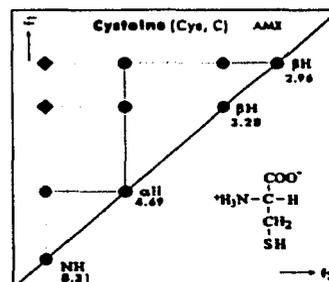
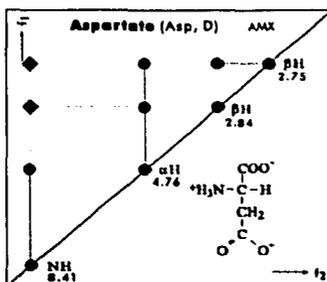
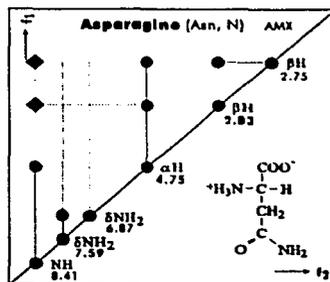
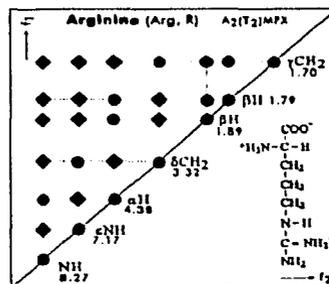
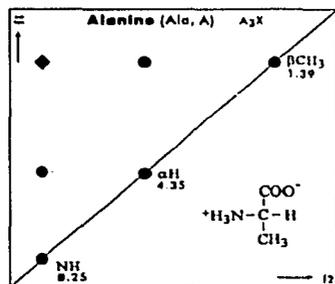
El resultado que obtuvieron no estaba de acuerdo con su hipótesis ya que obtuvieron sólo dos manchas sobre la placa.

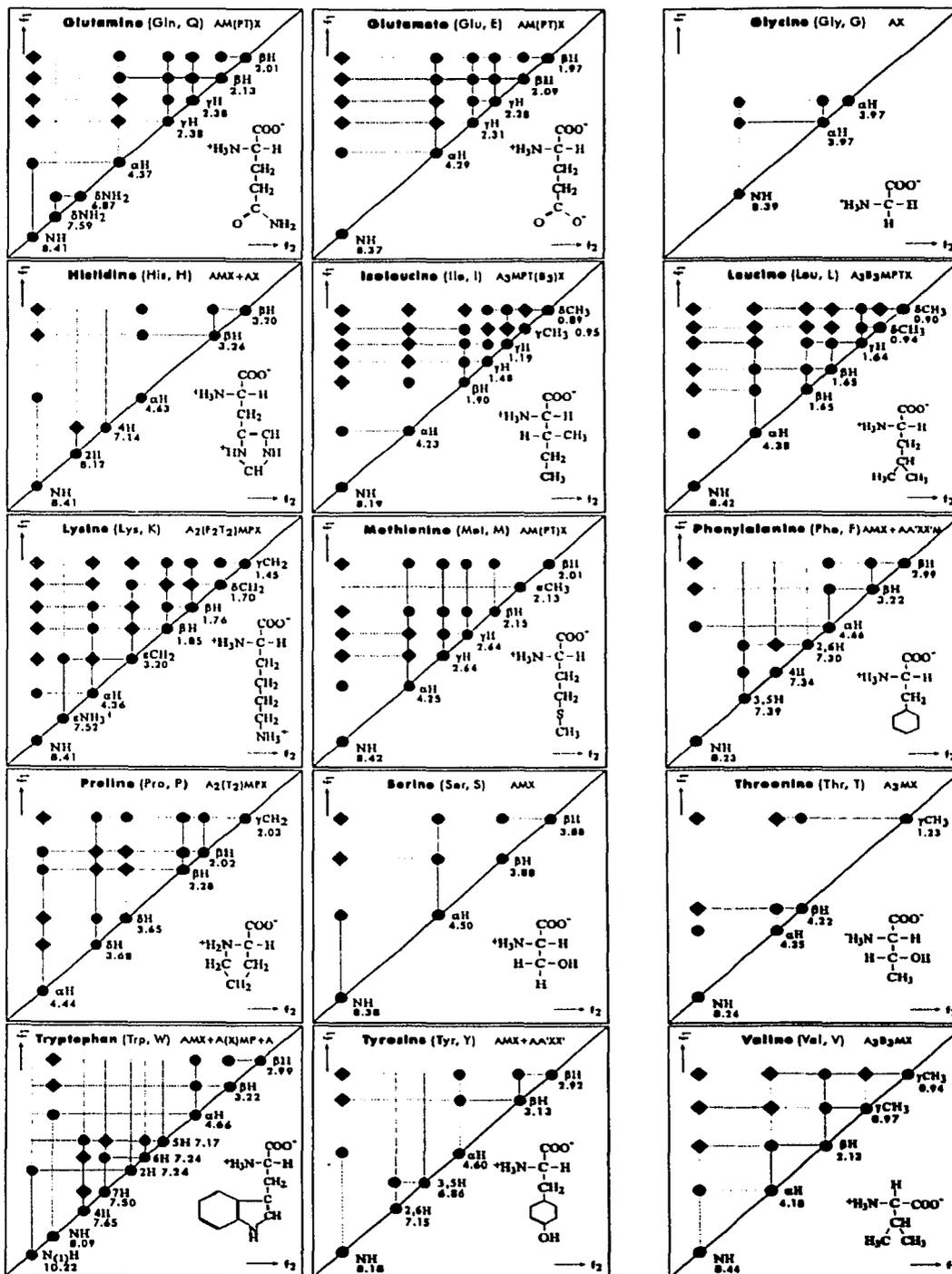
El número atómico de la plata es 47, y el electrón más externo tiene un número cuántico $\ell=0$ (orbital s), y su momento angular es cero por lo que no se esperaría ninguna interacción con el campo magnético. Los resultados indican que sí hay interacción, por lo que se puede intuir que existe un momento magnético adicional independiente de los movimientos orbitales; es decir, el espín electrónico. Por otro lado al obtener dos manchas sobre la placa, existe una indicación de que sólo son posibles dos valores para θ (es decir, están cuantizados).

Anexo B

Espectros COSY y TOCSY de los 20 aminoácidos

A continuación se muestra una representación esquemática de las señales que deben aparecer en los espectros de correlación por enlace para cada uno de los aminoácidos comunes[50]. Los círculos muestran correlaciones COSY y los rombos, correlaciones TOCSY. Los desplazamientos químicos indicados son para aminoácidos en una geometría al azar (random coil).





Bibliografía

- [1] J. Aiyar, J.M. Withka, J.P. Rizzi, *et. al.*, (1995) *Neuron* **15**, 1169-1181
- [2] O. Froy, N. Chejanovsky, J. Anglister, *et. al.*, (2000) *Pest. Manag. Sci.* **56**, 472-474
- [3] C. Vita, C. Roumenstand, F. Toma, A. Ménez, (1995) *Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6404-6408
- [4] A.M. Gronenborn, G.M. Clore, (1990) *Anal. Chem.* **62**, 2-15
- [5] H. Friebolin, *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, 2a. ed., VCH, Alemania, 1993.
- [6] F.J. Van de ven, *Multidimensional NMR in liquids*, VCH, Alemania, 1995, 7-10.
- [7] P.J. Hore, *Nuclear Magnetic Resonance*, Oxford University Press, Inglaterra, 1995.
- [8] D. Canet, *Nuclear Magnetic Resonance. Concepts and methods*, John Wiley and Sons, Inglaterra.
- [9] T.L. James, *Nuclear Magnetic Resonance in biochemistry*, Academic Press, Estados Unidos, 1975, 10-11 96-97.
- [10] K.F. Purcell, J.C. Kotz, *Química Inorgánica*, Reverté, España, 1979, Tomo 1, 142-144.
- [11] <http://www.chem.queensu.ca/FACILITIES/NMR/nmr/webcourse/t1.htm>
- [12] http://www.univ-lille1.fr/lcom/RMN2D/index1.htm#resum2D_us/index_us.htm
- [13] Braun, Kalinowski, Berger, *100 and more basic NMR experiments*, VCH, Alemania, 1996, 273.
- [14] K.R. Williamns, R.W. King, (1990) *J. Chem Educ.* **67**, A100-A105.
- [15] W.H. Li, *Molecular evolution*, Sinaver Associates, Estados Unidos, 1997, 17-21.

- [16] D. Pacheco Leal, *Bioquímica estructural y aplicada a la medicina*, IPN, México, 1996, 105-130.
- [17] http://broccoli.mfn.ki.se/pps_course_96/ss_960723_1.html
- [18] www.cm.utexas.edu/hoffman/peptide.intro3.pdf
- [19] D. Voet, J.D. Voet y C.H. Pratt, *Fundamentals of biochemistry*, John Wiley and Sons, Estados Unidos, 1999, 138-142.
- [20] www.med.umich.edu/lrc/coursepages/M1/mcb/mcelectricalsignals.pdf
- [21] M. López Torres, *Arácnidos y serpientes venenosos*, Trillas, México, 1994, 27-35.
- [22] M.S. Blum, *Chemical defenses of arthropods*, Academic Press, Estados Unidos, 1981, 288-308.
- [23] <http://ci.mond.org/9522/952214.html>
- [24] W.A. Catterall, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 15-43.
- [25] H. Darbon, C. Weber, W. Braun, (1991) *Biochemistry* **30**, 1836-1845.
- [26] W. Lee, M.J. Jablonsky, D.D. Watt, R. Krishna, (1994) *Biochemistry* **33**, 2648-2475.
- [27] F. Lebreton, M. Delepierre, (1994) *Biochemistry* **33**, 11135-11149.
- [28] A. Pintar, L.D. Possani, M. Delepierre, (1999) *J. Mol. Biol.* **287**, 359-367.
- [29] L.D. Possani, M. Delepierre, B. Becerril, J. Tygat, (1999) *Eur. J. Biochem.* **264**, 287-300.
- [30] Feynman, Leighton, Sands, *Física*, Fondo Educativo Interamericano, Estados Unidos, 1971, Vol. I, 20-7 - 20-11.
- [31] R.A. Serway, *Física*, McGraw Hill, México, 1987, 235-237.
- [32] R. Resnick., *Física*, CECSA, México, 1994, 179-182.
- [33] Garritz, Chamizo, Cruz, *Estructura atómica*, Addison-Wesley Iberoamericana, Estados Unidos, 1987, 309-324, 543-554 .
- [34] D.A. McQuarrie., *Quantum Chemistry* , University Science Books, Estados Unidos, 1983, 237-242.

- [35] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax (1995), *J. Biomol. NMR.* **6**, 277-293.
- [36] K. Wüthrich, (1989) *Science* **243**, 45-50.
- [37] C. Bartels, T. Xia, M. Billeter, P. Güntert, K. Wüthrich, (1995) *J. Biomol. NMR* **6**, 1-10.
- [38] K. Wüthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley and sons, Estados Unidos, 1986
- [39] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, (1992) *Biochemistry* **31**, 1647-1651.
- [40] P. Güntert, C. Mumenthaler, T. Herrmann, *Dyana. User's manual*,
<http://www.mol.biol.ethz.ch/dyana/Manual.pdf>
- [41] A. Garza-García, G. Ponzanelli, F. del Río-Portilla, (2000) *J. Magn. Reson.* **148**, 214-219.
- [42] F. del Río-Portilla, R. Freeman, (1994) *J. Magn. Reson. A* **111**, 132-135.
- [43] F. del Río-Portilla, R. Freeman, (1994) *J. Magn. Reson. A* **108**, 124-129.
- [44] http://stingray.bio.cmu.edu/~web/nmr/struc_c/index.html
- [45] A.T. Brünger, P.D. Adams, G.M. Clore, *et. al.*, (1998) *Acta Cryst.* **D54**, 905-921.
- [46] I. Polikarpov, M. Sanches, S. Maragoni, M.H. Toyama, A. Teplyakov, (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 175-184.
- [47] E. Blanc, H. Darbon, O. Hassani, *et. al.*, (1997) *Eur. J. Biochem.* **247**, 118-126.
- [48] R. Koradi, M. Billeter, K. Wüthrich, (1996) *J. Mol. Graphics.* **14**, 51-55.
- [49] V. Tugarinov, I. Kustanovich, J. Anglister, *et. al.*, (1997) *Biochemistry* **36**, 2414-2424.
- [50] http://btepxx.che.uni-bayreuth.de/NMR/nmr_alltocsy.html