

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE QUIMICA**



712

**ANALISIS FISICOQUIMICO DE SISTEMAS**  
**BIOLOGICOS**

**T E S I S**  
**QUE PRESENTA**  
**FCO. VALENTINO OMAÑA PULIDO**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS**  
**(FISICOQUIMICA)**

**México, D. F.**

**1978**

**TESIS CON**  
**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

ESTA TESIS SE HIZO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMEDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO, BAJO LA DIRECCION DEL DR. RAUL CETINA ROSA-  
DO Y DEL M. EN C. FRANCISCO LARA OCHOA.

## CONTENIDO

- I. Introducción.
- II. "Estudio Químico Cuántico de algunos Alucinógenos Indólicos". F. Lara, V. Omaña, R. Cetina.
- III. "Estudio Mecánico Cuántico de las interacciones entre las Bases del ADN utilizando un modelo de Formamida". F. Lara, V. Omaña, R. Soto.
- IV. Desarrollo de *Neurospora Crassa* limitado por  $\text{NH}_4$ . J. Mora, V. Omaña, F. Lara.

INTRODUCCION.

## INTRODUCCION

Debido a la complejidad de los sistemas biológicos, éstos tienen que ser descritos mediante una serie de modelos, donde -- cada uno de ellos describe al sistema desde un nivel de abstracción diferente. Estos niveles de descripción dependen de la dimensión --  
1  
molecular del sistema (fig. 1) la cual tiene relación con los fenómenos observables desde el nivel atómico, hasta el de los seres -- vivos y aún en sociedades de los mismos.

Es importante hacer notar que al pasar de una dimensión -- molecular a otra mayor surgen nuevas propiedades que aunque no -- están en contradicción con las leyes que describen a la primera, -- no necesariamente son deducibles de ella pues son un resultado de -- la mayor complejidad de los sistemas con mayor dimensión molecular, ésto hace necesaria la descripción en todos los niveles.

A cada uno de esos niveles de descripción le corresponde -- un campo bien delimitado. Por ejemplo la descripción microscópica de las moléculas se hace mediante la Mecánica Cuántica y los fenómenos de autoorganización <sup>2</sup> aparecen en sistemas de un gran número de moléculas que son descritos termodinámicamente.

## Dimensión del sistema

Atómica	Diatómica	Poliatómica	Macromolecular	agregados moleculares	Viral
Fenómenos Cuánticos:	Fenómenos Moleculares:	Fenómenos Poliatómicos	Fenómenos de Polimeros:	Excitaciones Múltiples:	Comportamiento viral:
Dualidad onda partícula.	Vibraciones Moleculares	Vibraciones antisimétricas	Efectos conformacionales	Modos Colectivos	Código genético para la replicación de subunidades celulares.
Relaciones de Incertidumbre	Potenciales Moleculares	Transiciones sin radiación	Transiciones de fase	Fenómenos cooperativos.	
Efecto túnel		Efectos estereo-químicos	Formación de complejos macromoleculares ordenados		

---

 celular
 

---

Comportamiento

Dinámico Complejo:

Fenómenos de autoorganización:

Regulación metabólica:

Regulación genética

Etc.

En la actualidad se ha tratado de explicar algunos fenómenos biológicos, a diferentes niveles, mediante la aplicación de conceptos físicoquímicos. A continuación se describe, brevemente, el uso de la Físicoquímica en la descripción a dos niveles distintos de algunos fenómenos biológicos.

### 1. - Bioquímica Cuántica.

Todas las propiedades biológicas de las moléculas que están dentro de una célula, se deben a su capacidad de reaccionar con otras moléculas dentro de la misma célula. Las reacciones intermoleculares que controlan la biosíntesis, catabolismo, almacenamiento, etc., en la célula son interacciones electrónicas que obedecen las leyes de la Mecánica Cuántica y por tanto son susceptibles de ser caracterizadas y estudiadas mediante esta teoría.

La aplicación de las ideas generales y los métodos de la Mecánica Cuántica al estudio de la estructura electrónica de las moléculas biológicas en relación a su comportamiento como sustratos de la vida y a su participación en los procesos bioquímicos y biofísicos en los seres vivos es lo que se conoce como Bioquímica Cuántica.

La aplicación de los métodos cuánticos al estudio de la estructura electrónica o a la investigación de problemas bioquímicos

micos o biofísicos tiene varias ventajas:

1.- El carácter general de los métodos cuánticos y su aplicabilidad ilimitada, es decir, la solución de la ecuación de onda da una serie de resultados que, en principio, son la información completa acerca de todas las propiedades estructurales del sistema atómico o molecular que se estudia. Sin embargo, en el caso práctico lo que se hace es resolver con aproximaciones esa ecuación de onda, y por lo tanto la información es aproximada y parcial aunque abarque una amplia variedad de aspectos del problema estudiado.

2.- Otra ventaja es la posibilidad de que estos estudios pueden preceder a la experimentación en algunos campos donde ésta sea difícil de realizar. Así, los cálculos cuánticos permiten determinar los valores de algunas propiedades fisicoquímicas de los sistemas moleculares que actualmente son difíciles de medir experimentalmente. Algunas de estas propiedades son por ejemplo: momentos dipolares, potenciales de ionización, afinidades electrónicas, energías de resonancia, etc. El cálculo de éstas cantidades permite, con frecuencia, la discusión y predicción de nuevas correlaciones entre estructura y comportamiento de las biomoléculas.

3.- Por último, aunque es probable que en la mayoría de los fenómenos biológicos las reacciones químicas sean en el estado fundamental, existen algunos procesos bioquímicos, fundamentalmente aquellos en donde hay participación de la radiación, en los cuales exis-

ten estados excitados que sólo pueden ser estudiados mediante métodos cuánticos.

Los métodos fundamentales para encontrar soluciones aproximadas a la ecuación de Schroedinger de las moléculas son el método de enlace valencia y el método de orbitales moleculares.

El método de enlace valencia presenta grandes dificultades matemáticas y por lo tanto su uso cuantitativo se ha restringido a moléculas muy simples. El método de orbitales moleculares ha sido usado extensivamente en el cálculo de moléculas complejas y es el método más usado en Bioquímica Cuántica.

Aún dentro del método de orbitales moleculares existen varios procedimientos mecánico cuánticos según su nivel de aproximación (ab initio, semirrigurosos, semiempíricos y empíricos) usados para calcular las estructuras electrónicas de las biomoléculas y sus interacciones. Esos procedimientos han sido ampliamente descritos en la literatura.

## 2.- Comportamiento Dinámico celular y subcelular.

Aún en las células más simples, las funciones metabólicas involucran varios miles de reacciones químicas acopladas que requieren mecanismos complejos para su coordinación y regulación.

El desarrollo de la Biología Molecular ha permitido obtener un conocimiento detallado de los mecanismos químicos de las vías metabólicas. Existe una relación muy grande entre esos mecanismos químicos y la estructura espacio-temporal determinada por las propiedades matemáticas de las ecuaciones cinéticas de esos mecanismos <sup>2,3,4</sup>, es decir el acoplamiento de la difusión y el cambio químico aumentan las posibilidades para generar la estructura y autoorganización de los sistemas bioquímicos.

Las principales dificultades que se presentan en el análisis de un sistema bioquímico complejo son:

1.- Dificultades experimentales para obtener los datos necesarios para caracterizar algunas reacciones.

2.- Dificultades en la descripción de la forma de las ecuaciones cinéticas y.

3. - Dificultades en el análisis matemático de las ecuaciones cinéticas , las cuales pueden resolverse mediante aproximaciones no lineales, linealización y simulación en computadora.

Los primeros dos tipos de problemas son abordados mediante estudios de cinética química enzimática y el tercero que es una consecuencia de la no linealidad de las ecuaciones diferenciales puede ser abordado mediante tres diferentes aproximaciones: solución numérica de las ecuaciones (simulación en computadora) linealización y aproximación no lineal.

Algunos de los sistemas, biológicamente importantes que han sido estudiados <sup>2, 5</sup>, desde el punto de vista anterior son:

A nivel subcelular se ha estudiado procesos regulatorios que generan fenómenos oscilatorios, como son las oscilaciones glicolíticas la síntesis periódica del AMP cíclico y algunas reacciones de enzimas unidas a membranas.

También a nivel celular se ha estudiado el control de la síntesis de proteínas, en donde se presentan procesos de retroalimentación positiva (inducción) y negativa (represión) cuya combinación puede originar oscilaciones sostenidas del tipo de ciclo-límite llamadas oscilaciones epigenéticas.

En fenómenos a nivel de células que interactúan se ha visto como la comunicación celular puede generar patrones espaciales y a la vez controlar el tiempo y la localización de los diferentes procesos involucrados en la formación y mantenimiento de esos patrones. Una ilustración de este fenómeno es el desarrollo embrionario, este problema es muy complicado ya que es un proceso espacio-temporal que implica la regulación precisa de procesos tales como: a) diferenciación celular, crecimiento y mitosis, b) movimientos celulares, c) movimientos colectivos de células. Una descripción detallada que considere de manera cuantitativa todos los aspectos del problema es difícil, y por tanto se proponen modelos simplificados cuyo análisis hace posible correlacionar los aspectos moleculares y los macroscópicos de la morfogénesis.

## BIBLIOGRAFIA.

1. - Kasha, M., Submolecular Bioelectronics and Bioenergetics. Acad. Press. N. Y. Cap. 6. (1977).
2. - Nicolis, G., Prigogine, I., Self Organization in Non Equilibrium Systems. From Dissipative Structure to Order through Fluctuations. J. Wiley, N. Y. (1977).
3. - Savageau, M., Biochemical Systems Analysis. A Study of Function and Design in Molecular Biology. Addison Wesley Pub. Co.. Mass. (1976).
4. - Rosen, R., Dynamical Systems in Biology., Wiley Inter.. N. Y. (1970).
5. - Nicolis, G., Lefever, R., Advances in Chemical Physics. 29. (1975).

ESTUDIO QUIMICO CUANTICO DE  
ALGUNOS ALUCINOGENOS INDOLICOS.

## ESTUDIO QUIMICO CUANTICO DE ALGUNOS ALUCINOGENOS INDOLICOS

### INTRODUCCION

Las propiedades de las drogas se deben a la capacidad de éstas de interactuar con otras moléculas dentro de las células. Un aspecto importante que debe ser estudiado es la relación entre la estructura y estereoquímica de las drogas con su actividad. Varios investigadores han estudiado un tipo de drogas llamadas alucinógenas o psicomiméticas, que tienen efecto sobre el sistema nervioso central y han tratado de establecer similitudes entre ellas.

Snyder<sup>1</sup> hizo un estudio de los factores estéricos que pueden ser importantes para la actividad psicotrópica de algunos derivados del ácido lisérgico, de la triptamina y de la fenetilamina con el cual propone que una característica importante de todos estos compuestos es que pueden adoptar una conformación que origine una estructura semejante al LSD.

Kang y Green<sup>2</sup> hicieron un estudio de las características estéricas y electrónicas de algunos compuestos alucinógenos: LSD, indolalquilaminas y anfetaminas metoxiladas, y basándose en sus efectos y la tolerancia cruzada de esos compuestos proponen que los sitios o centros con los cuales esas moléculas interactúan con el receptor son: el benceno y el nitrógeno alifático equivalente al N (6) del LSD, además proponen que el mecanismo de interacción droga-receptor es la formación de un complejo de transferencia de carga. Sin embargo, existen datos experimentales obtenidos por Aghajanian y Haighler<sup>3</sup> según los cuales el LSD y la mezcalina no tienen el mismo mecanismo de acción. Lo cual hace suponer que los grupos del LSD y las indolalquilaminas que interactúan con el receptor no necesariamente son los propuestos por Kang y Green<sup>2</sup>.

Kaufman<sup>4</sup> calculó las propiedades electrónicas de la bufotenina y la N,N di-metiltriptamina; en su forma básica, en su forma protonada sobre el Nitrógeno alifático, en su forma protonada sobre el Nitrógeno Indólico y protonadas sobre ambos grupos, usando las conformaciones de las moléculas en los cristales. Sin embargo, no se propone cuales son las especies posiblemente activas, ni los posibles mecanismos de interacción. Por otro lado hay considerables evidencias farmacológicas y electrofisiológicas

(5, 6, 7) que sugieren que el LSD y algunas indolalquilaminas pueden producir sus efectos sobre un receptor si éste es también receptor de la 5-hidroxitriptamina (serotonina).

El conocer las conformaciones más estables de los compuestos puede dar información acerca de la topografía del receptor sobre el cual actúan, aunque es posible que en el sitio en donde lo hacen no presenten la conformación calculada debido al efecto del disolvente y de otras moléculas ahí presentes. En adición, el conocimiento de las propiedades electrónicas puede indicar cual es el posible tipo de la interacción entre la droga y el receptor.

En el presente trabajo se hizo el estudio teórico de la serotonina y de algunos derivados indólicos que tienen actividad alucinógena con el objetivo de obtener información adicional sobre las posibles características del receptor y las posibles causas de la actividad biológica de esas moléculas.

Para calcular las energías de cada una de las conformaciones se usó el método PCILO<sup>8</sup>, el cual es apropiado para análisis conformacional y se ha encontrado frecuentemente que sus resultados concuerdan satisfactoriamente con datos experimentales<sup>9,10,11</sup> además de ser un método bastante rápido. Para el cál-

culo de las propiedades electrónicas se usó el método CNDO/2<sup>12</sup> que da estimaciones confiables de algunos parámetros electrónicos<sup>13</sup>. Los datos de distancias y ángulos interatómicos fueron tomados de otros autores<sup>14,15,16</sup>. Para las distancias y ángulos no encontrados se usaron valores estándar.

## RESULTADOS

Las conformaciones más estables según el criterio de mínima energía fueron calculadas con el método PCIO<sup>8</sup>.

Esas conformaciones de mínima energía se encontraron girando los sustituyentes que están sobre el indol. Los átomos que determinan los ángulos diedros y los valores de éstos para la conformación de mínima energía están en la tabla I.

Algunos de los compuestos estudiados (serotonina, bufotenina, N,N-dimetiltriptamina, dihidroxitriptamina, gramina) tienen grupos básicos. Se ha encontrado experimentalmente para la serotonina que el valor del pKa del nitrógeno indólico es 4.9 y el pKa del grupo amino alifático es 9.8, además puede considerarse que los pKas correspondientes a los mismos grupos de los otros compuestos calculados son muy cercanos a los de la serotonina; de lo anterior se podría proponer que, al pH fisiológico el equilibrio ácido-base origina una cantidad pre-

dominante de moléculas con el grupo amino alifático protonado, por lo tanto se calculó la conformación de la base libre y del ácido conjugado.

Habiendo encontrado la conformación de mínima energía, se calculó la distancia entre el nitrógeno indólico y el nitrógeno alifático de la serotonina, bufotenina, N,N-dimetiltriptamina y -gramina; también se calculó la distancia entre los grupos citados y el OH en posición 5 de la serotonina, bufotenina y 5-6-dihidroxitriptamina. También se calculó la distancia entre los nitrógenos de la coharmina y del me dmain. Todos estos resultados están en la tabla II.

A la conformación de mínima energía de todos los compuestos se calculó sus propiedades electrónicas con el método CNDO/2<sup>12</sup>. Las densidades electrónicas están en la figura 1.

En la tabla III. se dan los valores de la energía del orbital más alto ocupado ( $E_{\text{HOMO}}$ ), observándose que todos los compuestos tienen valores de  $E_{\text{HOMO}}$  altos. El valor de  $E_{\text{HOMO}}$  se ha relacionado con la propiedad electrodonadora de un compuesto<sup>17</sup> y para ciertas series de compuestos alucinógenos se ha encontrado una correlación entre potencia y  $E_{\text{HOMO}}$ <sup>2</sup>.

Los momentos dipolares se dan en la tabla IV.

## DISCUSION

Para que los derivados indólicos que tienen actividad alucinógena puedan actuar sobre los receptores que son normalmente <sup>5,6,7</sup> activados por la serotonina deberán tener características -- semejantes a ella.

Se observa que como consecuencia de las conformaciones -- de mínima energía, obtenidas con el método PCLO (tabla I), la -- distancia entre algunos grupos funcionales (tabla II) casi no varía -- de un compuesto a otro.

Se aprecia de la tabla I que los compuestos estudiados, poseen como átomos comunes el nitrógeno indólico y el nitrógeno alifático, la distancia entre ellos varía entre 4.2 y 4.6 angstrom (tabla II) tanto para las bases libres como para los ácidos conjugados excepto en la coharmina y el medmain.

Si se analiza el caso de la 10 metoxi-harmalina (coharmina) y del 5 dimetil-amino 3 etil 2 metil-indol (medmain), <sup>18</sup> compuestos considerados psicomiméticos, se observa que la distancia -- entre sus nitrógenos no es equivalente a la encontrada para los -- otros compuestos. Además esa distancia es fija debido a la rigidez de las moléculas.

Es posible proponer que la presencia de los grupos citados

anteriormente y la distancia adecuada entre ellos son características e estructurales que influyen notablemente en la actividad farmacológica de las moléculas estudiadas, ya sea que las formas activas sean las bases libres o las bases protonadas.

No obstante, debido a la diferencia que existe en la distancia entre los grupos considerados como importantes para la actividad alucinógena, se debe esperar diferente poder alucinante entre los distintos compuestos calculados.

La posible explicación teórica de lo anterior es que según la distribución de Boltzman, la diferencia de energía entre la conformación más estable y la conformación congruente con el receptor originará diferentes cantidades de conformeros apropiados para la interacción con el receptor y, por tanto, se tendrá distintas potencias alucinógenas para los distintos compuestos.

La hipótesis anterior permite explicar, la baja actividad alucinógena del medmain<sup>18</sup>, en comparación con los otros compuestos, que debido a su estructura rígida no puede adoptar una conformación que origine una distancia apropiada entre sus nitrógenos para la interacción con el receptor. Sin embargo, este resultado no concuerda con la actividad alucinógena de la coharmina, la cual probablemente podría explicarse suponiendo

do que no es la coharmina, sino uno de los productos de su metabolismo el que tiene actividad alucinógena como sucede con otros compuestos<sup>19</sup>. Las densidades electrónicas calculadas coinciden esencialmente con las calculadas por Kaufman<sup>4</sup>. De los valores de densidad electrónica (fig. 1) sobre los grupos funcionales anteriormente citados, es posible suponer el tipo de interacciones que se establecen con el receptor.

Aunque existen estudios experimentales<sup>20,21</sup> de RMN y fluorescencia sobre la interacción de derivados de la triptamina con macromoléculas biológicas en los cuales se propone que la principal interacción es de tipo iónico entre el grupo amino alifático protonado de las triptaminas con un sitio negativo o muy polar de la macromolécula, y aunque también se ha hecho estudios para identificar y caracterizar a los receptores cerebrales<sup>19,22</sup> de la serotonina y de algunos alucinógenos, en la actualidad no se conoce con certeza si las moléculas protonadas o las bases libres son las responsables de la actividad alucinógena ni tampoco sobre cuales macromoléculas reaccionan, por lo tanto se propone los probables tipos de interacción tanto para las bases libres como para sus ácidos conjugados con el posible receptor:

a) Si consideramos que las formas activas son las bases libres y basándose en que el nitrógeno de la cadena alifática tiene-

una alta densidad electrónica, se puede suponer que la interacción nucleofílica de ese nitrógeno debe llevarse a efecto con un centro electrofílico del receptor. También se observa que el hidrógeno unido al nitrógeno indólico es electrodeficiente, lo que nos hace sugerir que puede interactuar como electrofílico con un sitio del receptor.

b) Si las formas activas fueran las bases protonadas, los mecanismos de interacción posibles serían: una interacción de tipo electrofílico del hidrógeno unido al nitrógeno indólico con un sitio del receptor y una interacción del grupo amino protonado, que tiene una carga positiva neta distribuida sobre los átomos unidos al nitrógeno, con un sitio del receptor.

Debe hacerse notar que existe una correlación general entre la actividad alucinógena y el alto valor de  $E_{\text{HOMO}}$  (tabla III) para los compuestos estudiados. Se observa que las bases libres tienen valores más altos que los compuestos protonados, por tanto si en la interacción con el receptor hubiese la formación de un complejo de transferencia de carga, como han propuesto algunos autores<sup>23</sup>, entonces los compuestos no protonados, que son más electrodonadores, formarían complejos más estables y serían los más activos.

Se observa de la tabla IV, que los compuestos protonados tienen momentos dipolares mayores que las bases libres. El momento dipolar es un dato importante pues se sabe que los compuestos muy polares no atraviesan la barrera hematoencefálica y por tanto no pueden llegar hasta los receptores cerebrales. Aquí se debe considerar otra vez el equilibrio ácido base de los compuestos. Los compuestos no protonados atravesarán preferentemente la barrera hematoencefálica aunque debemos considerar que el paso de una molécula a través de esa barrera es esencialmente un sistema fuera del equilibrio.

Si se hace un análisis de la estructura de los compuestos estudiados y se pretende dar una explicación de porque la serotonina es el neurotransmisor normal y todos los demás compuestos producen alucinaciones, se puede proponer que además de los nitrógenos indólico y alifático, es también necesaria la presencia del oxidrilo en la posición 5 y que la ausencia de cualquiera de esos grupos o la presencia de sustituyentes sobre los mismos es lo que origina la neurotransmisión anormal y por tanto la confusión perceptiva producida por los alucinógenos. De los compuestos estudiados los que tienen, además de la serotonina, los tres centros citados anteriormente son la bufotenina que tiene 2 meti-

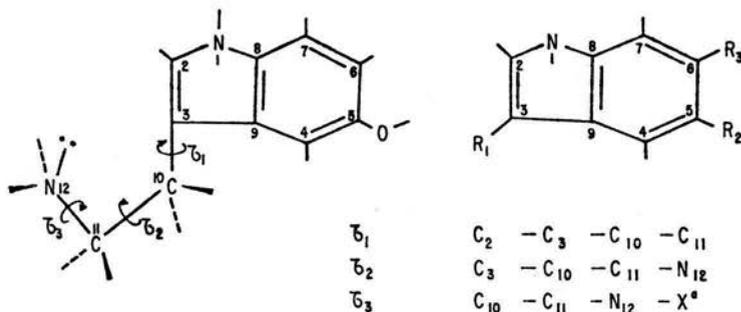
los en el nitrógeno alifático que probablemente sean la causa de que sea alucinógeno y la 5,6-dihidroxitriptamina que difiere de la serotonina por el oxihidrilo en la posición 6, en este compuesto se establece una interacción entre los oxihidrilos del tipo puente de hidrógeno lo que origina que el OH(5) no esté disponible para interactuar con el receptor.

En resumen, se puede proponer la hipótesis de que para una transmisión normal, como la de la serotonina, es necesaria la presencia de los grupos citados anteriormente y que si algún compuesto posee algunas características estéricas y/o electrónicas diferentes a las de la serotonina puede interactuar con los receptores serotoninérgicos y causar las alucinaciones.

## CONCLUSIONES

Es posible suponer que las características importantes para la actividad alucinógena de los compuestos estudiados son: según el valor alto de  $E_{\text{HOMO}}$ , el carácter electrodonador que tienen y la presencia de los grupos citados en la discusión adoptando una conformación adecuada para la interacción. Aunque en la actualidad se sabe que los efectos de los alucinógenos son complejos y que existen diferencias y similitudes entre los diferentes tipos, la hipótesis propuesta da información acerca de los requerimientos geométricos y estructurales de los receptores sobre los cuales actúan los alucinógenos.

TABLA I. CONFORMACIONES MAS ESTABLES DE ALGUNOS DERIVADOS INDOLICOS.



A) Bases Libres

Compuesto	Formula	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$
1. Serotonina	$R_1 = -CH_2 - CH_2 - NH_2$ $R_2 = -OH$ $R_3 = -H$	$288^\circ$	$300^\circ$	$60^\circ$
2. Bufotenina	$R_1 = -CH_2 - CH_2 - N(CH_3)_2$ $R_2 = -OH$ $R_3 = -H$	$-110^\circ$	$60^\circ$	$300^\circ$
3. N,N dimetil-triptamina	$R_1 = -CH_2 - CH_2 - N(CH_3)_2$ $R_2 = -H$ $R_3 = -H$	$-110^\circ$	$70^\circ$	$300^\circ$
4. 5, 6-Dihidroxi-triptamina.	$R_1 = -CH_2 - CH_2 - NH_2$ $R_2 = -OH$ $R_3 = -OH$	$-100^\circ$	$60^\circ$	$300^\circ$

a) Angulo diedro del par electrónico libre.

TABLA I. CONFORMACIONES MAS ESTABLES DE ALGUNOS DERIVADOS INDOLICOS.

(Continuación)

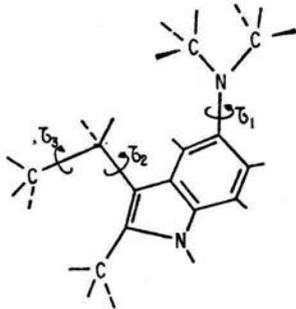
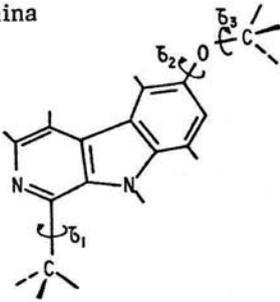
Compuesto	Formula	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$
5. Gramina	$R_1 = CH_2 - N - (CH_3)_2$ $R_2 = H$ $R_3 = H$	180°	40°	
6. Medmain		0°	185°	180°
				
7. Coharmina		180°	180°	60°
				

TABLA I. CONFORMACIONES MAS ESTABLES DE ALGUNOS DERIVADOS INDOLICOS.

(Continuación)

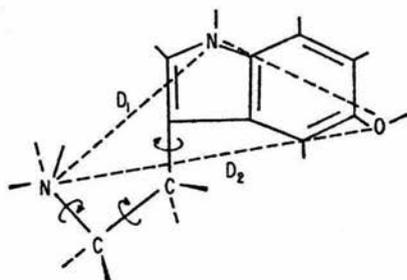
---

**B) Compuestos protonados sobre el N de la cadena alifática**

	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$
1. Serotonina	-126°	10°	300°
2. Bufotenina	-130°	40°	300°
3. N,N dimetiltriptamina	-130°	42°	300°
4. Dihidroxitriptamina	-120°	10°	300°
5. Gramina	-125°	300°	

---

TABLA II. DISTANCIA ENTRE EL N INDOLICO, EL N ALIFATICO Y EL OH EN POSICION 5 DE LOS DERIVADOS INDOLICOS



Bases Libres

	D1	D2
1. Serotonina	4.56 A°	6.49 A°
2. 5,6 Dihidroxitriptamina	4.52	6.70
3. Bufotenina	4.57	6.52
4. N, N dimetiltriptamina	4.33	
5. Gramina	4.23	

Distancia entre los Nitrógenos

6. Medmain	5.45
7. Coharmina	3.77

Bases Protonadas

1. Serotonina	4.34	4.82
2. 5,6 Dihidroxitriptamina	4.36	4.80
3. Bufotenina	4.48	5.40
4. N, N dimetiltriptamina	4.49	
5. Gramina	4.56	

TABLA III. ENERGIAS DEL ORBITAL MAS ALTO OCUPADO ( $E_{\text{HOMO}}$ ) DE ALGUNOS DERIVADOS INDOLICOS.

---

<u>Bases Libres</u>	
Compuesto	$-E_{\text{HOMO}}$ , a.
1. Serotonina	0.382
2. 5,6 Dihidroxitriptamina	0.375
3. Bufotenina	0.382
4. N,N dimetilriptamina	0.384
5. Gramina	0.385
6. Coharmina	0.373
7. Medmain	0.374
 <u>Bases Protonadas</u>	
1. Serotonina	0.540
2. 5,6 Dihidroxitriptamina	0.508
3. Bufotenina	0.521
4. N,N dimetilriptamina	0.520
5. Gramina	0.540

---

TABLA IV. MOMENTOS DIPOLARES DE ALGUNOS  
DERIVADOS INDOLICOS.

---

Compuesto	Bases Libres.	Mom. Dipolar(Debye)
1. -Serotonina		2.5
2. -5,6 dihidroxitriptamina		4.11
3. -Bufotenina		2.56
4. -Gramina		1.15
5. -N,N dimetilriptamina		1.43
6. -Coharmina		4.21
7. -Medmain		2.82
	*	
	Bases Protonadas.	
1. -Serotonina		11.24
2. -5,6 dihidroxitriptamina		11.37
3. -Bufotenina		13.11
4. -Gramina		12.39
5. -N,N dimetilriptamina		13.74

---

\*

Momento dipolar referido al centro de masa.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Snyder, S.H., Richelson, E., Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 206 (1968).
- 2.- Kang, S., Green, J.P., Proc. Nat. Acad. Sci., 67, 62 (1970).
- 3.- Aghajanian, G.K., Haighler, H.J., European Journal of Pharmacology, 21, 53 (1973).
- 4.- Kaufman, J.J., Kerman, E., Int. J. Quantum Chem. Quantum Biology Symp. No. 1, 259 (1974).
- 5.- Aghajanian, G.K., Haighler, H.J., Bloom, F.E., Life Sci. 11, 615 (1972).
- 6.- Anden, N.E., Corrodi, H., Fuxe, K., Hokfelt, T., Br. J. Pharmacol. 34, 1 (1968).
- 7.- Tonge, S.R., Leonard, B.E., Life Sci., 8, 805 (1968).
- 8.- Diner, S., Malrieu, J.P., Theor. Chim. Acta, 15, 805 (1969).
- 9.- Cetina, R., Rubio, M., Novaro, O., Theoret. Chim. Acta, 32, 81 (1973).
- 10.- Pullman, B., Bherrod, H., Theoret. Chim. Acta, 36, 317 (1975).
- 11.- Pullman, B. Quantum Mechanics of Molecular Conformations. John Wiley. N. Y., Cap. 3. (1976).
- 12.- Pople, J.A., Segal, G.A., J. Chem. Phys., 43, 3289 (1966).

13. - Saethre, L., Carlson, T., Kaufman, J.J., Kosky, W.,  
Mol. Pharmacol., 11, 492 (1976).
14. - Thewalt, V., Bugg, C.E., Acta Crystallogr. Sect. B 28,  
82 (1972).
15. - Falkenberg, G., Acta Crystallogr. Sect. B 28, 3075 (1972).
16. - Falkenberg, G., Acta Crystallogr. Sect. B 28, 3219 (1972).
17. - Mulliken, R.S., J. Amer. Chem. Soc., 72, 600 (1950).
18. - Keup, W., Origin and Mechanisms of Hallucinations.  
Plenum Press, N. Y. 353 (1970).
19. - Bennet, J., Snyder, S., Brain Research, 94, 523 (1975).
20. - Helene, C., Dimicoli, D., Biochem., 10, 3802 (1971).
21. - Nogrady, T., Hrdina, P., Ling, G., Mol. Pharmacol.,  
94, 523 (1975).
22. - Lovell, R., Freedman, D., Mol. Pharmacol., 12, 620  
(1976).
23. - Kier, L.B., Molecular Orbital Theory in Drug Research.  
Acad. Press, N. Y. Cap. VIII (1971).

ESTUDIO MECANICO CUANTICO DE LAS  
INTERACCIONES DEL ADN UTILIZANDO  
UN MODELO DE FORMAMIDA.

## ESTUDIO MECANICO CUANTICO DE LAS INTERACCIONES ENTRE LAS BASES DEL ADN UTILIZANDO UN MODELO DE FORMAMIDA.

Se ha aceptado comunmente el que la estabilidad del Acido Desoxirribonucleico (ADN) se debe a la contribución dominante de todos los pares de bases, por la interacción establecida en el plano que los contiene. Esta se origina por la formación de enlaces de Hidrógeno<sup>1</sup>. Este punto de vista, que se confirma con el hecho experimental de encontrar sólo pares coplanares en solventes orgánicos, parece cuestionarse con el hecho de que en soluciones acuosas se presentan solo asociados sobrepuestos<sup>2</sup>.

La posible estabilización en solución acuosa de las bases asociadas origina la interrogante del grado de participación de las fuerzas de interacción entre las bases sobrepuestas, en la estabilización del ADN.

En la estructura reportada para el Acido Nucléico con sus bases sobrepuestas se tiene una distancia entre sus planos de 3.36

$A^\circ$  y un ángulo de  $36^\circ$  con respecto al centroide ó eje de la fibra, en tal forma que la estructura se repite después de cada diez residuos en la cadena. Se ha reportado además que, por exposición del ADN a Bromuro de Etidio<sup>3</sup>, éste se intercala entre pares de bases originando un nuevo ángulo de  $24^\circ$  con respecto al eje de la fibra.

La elección de la Formamida, como modelo simple, para el estudio de las interacciones entre las bases que forman el ADN, se ha sugerido en el artículo de J. Ladik<sup>4</sup>, por permitir este modelo apreciar las propiedades electrónicas del sistema, además de economizar gran cantidad de tiempo de computadora. En este trabajo se pretende analizar con el Método Mecánico-Cuántico Semiempírico PCILO<sup>5</sup> (Perturbative Configuration Interaction Using Localized Orbitals) el grado de participación de las interacciones, entre las bases sobrepuestas y las bases en el plano, utilizando como modelo de interacción a dos moléculas de Formamida.

#### METODO DE CALCULO

Para el cálculo del monómero se utilizó la geometría del medio dímero, determinada por cristalografía de rayos X<sup>6</sup>. Para el cálculo de la estabilidad de los puentes de Hidrógeno de las entidades enlazadas se varió la distancia de separación de las moléculas de Formamida,

colocadas en el mismo plano, conservando el centro de simetría, hasta obtener el punto en que se encuentra el mínimo de energía.

Considerando que los enlaces de hidrógeno que se encuentran en los biopómeros y particularmente en los ácidos nucleicos no son equidistantes<sup>7</sup>, se varió la distancia de los enlaces de hidrógeno considerando las siguientes dos posibilidades: el enlace A 0.09 angstrom mayor que el enlace B y el enlace A 0.12 angstrom mayor que B, ver figura 1.

Para encontrar la distancia de mínima energía para los dos últimos casos considerados, se varió la distancia entre los dos enlaces de hidrógeno en forma similar al dímero simétrico. Con estos resultados se puede conocer la contribución de la asimetría a la disminución de la estabilidad del dímero. También se calculó la energía de la barrera de rotación haciendo girar una de las moléculas y tomando como ángulo de giro los átomos N-H-O, con incrementos de 10° cada vez hasta completar el giro de 180°.

Finalmente, se calculó la interacción que puede existir entre dos moléculas de formamida sobrepuestas, con la finalidad de conocer su contribución a la estabilidad del pólmero. Se colocaron las dos moléculas de formamida sobrepuestas a una distancia de 3.36 angstrom entre ambos planos<sup>4</sup>, y se hizo girar una de ellas alrededor del centroide correspondiente a la forma plana; estos giros se hicieron con

incrementos de  $12^\circ$  cada vez, hasta completar el giro de  $180^\circ$ .

## RESULTADOS Y DISCUSION

En los estudios realizados por Dreyfus, Maigret y Pullman<sup>9</sup> con un método autoconsistente no empírico, que incluye todos los electrones y un conjunto de funciones base tipo Gaussiano (GTF), se encontró al dímero de Formamida 14 Kcal/mol más estable que el monómero, indicando una energía promedio para cada enlace de Hidrógeno de 7 Kcal/mol. Una comparación con el valor experimental de sólidos enlazados por puentes de Hidrógeno<sup>10</sup> muestra que los resultados obtenidos por estos investigadores son razonables.

Pullman y Berthod<sup>11</sup>, empleando el método semiempírico CNDO/2 encuentran una energía de estabilización, para el dímero de Formamida, de 11.7 Kcal/mol, ó sea, 5.8 Kcal/mol por enlace de Hidrógeno; la energía obtenida por enlace de Hidrógeno por dímeros lineales cis y trans son 4.9 y 4.6 Kcal/mol respectivamente.

Momany y colaboradores<sup>12</sup> comparan los resultados obtenidos con el método EHT y el método CNDO/2. La superficie de energía potencial, para el dímero lineal, utilizando el método EHT, no muestra ningún mínimo; las energías de dimerización para el dímero lineal y el dímero cíclico usando el método CNDO/2 fueron de 9.6 Kcal/mol y

de 11 Kcal/mol respectivamente por enlace de Hidrogeno formado.

Las curvas de energía potencial calculadas en este trabajo para el dímero en forma plana simétrica y con una diferencia entre los puentes de Hidrógeno de  $0.09 \text{ \AA}$  y  $0.12 \text{ \AA}$  se muestran en la figura 2. Los valores obtenidos para la diferencia de energía, cuando la curva de energía potencial tiende al infinito y el mínimo de la curva, se muestran en la Tabla 1.

Los valores de la energía de estabilización para los dímeros asimétricos indican que el grado de asimetría va acompañado por una pérdida de estabilidad del dímero. No obstante, como ya se indicó, se seleccionaron estos dos grados de asimetría por ser los reportados en la Literatura<sup>7,8</sup> para los pares de Bases Adenina-Timina. Es conveniente notar de la figura 2 que las curvas de energía potencial, para los tres dímeros cíclicos de Formamida, muestran diferentes distancias para el mínimo de energía, sin embargo, conforme se alejan entre sí las moléculas de Formamida, las diferencias de energía son menos perceptibles. Se consideró necesario, para asegurar que la asíntota de la curva correspondía a una interacción al infinito, hacer un cálculo hasta una distancia intermolecular de  $50 \text{ \AA}$  y se encontró que la diferencia de energía con el último valor indicado en la figura 2 era despreciable.

TABLA 1 . ENERGIA DE LOS PUENTES DE HIDROGENO Y  
 ENERGIA DE LA BARRERA DE ROTACION DE  
 CADA EJE DE GIRO PARA EL DIMERO DE FOR\_  
 MAMIDA (KCAL/MOL)

DIMERO DE FORMAMIDA	ENERGIA DE ESTABILIZACION	BARRERA ROTATORIA	
	DEL DIMERO	EJE B	EJE A
SIMETRICO	10.52	7.39	
ASIMETRICO 0.09 A°	10.36	7.21	7.43
ASIMETRICO 0.12 A°	10.27	7.17	7.36
ENERGIA DEL MONOMERO	24,714.848KCAL/MOL		

La designación A,y B es con respecto a la figura 1.

Es conveniente hacer notar que con el método PCILO se obtiene claramente un mínimo para la curva de energía potencial (figura 2); con una energía de estabilización para el mínimo alrededor de 10 Kcal/mol, valor ligeramente menor al reportado por Pullman y Berthod<sup>11</sup>, utilizando el método CNDO/2.

La energía de la barrera de rotación para el dímero, se estimó tomando la diferencia de energía, cuando la distancia entre las moléculas de Formamida corresponden al mínimo en las curvas de energía potencial (en los tres casos estudiados) y cuando se giró 180° sobre uno de los puentes, en donde se supone que se ha logrado la ruptura del enlace de Hidrógeno. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 1 y las graficas obtenidas en la figura 3.

Los valores de energía de la barrera rotacional encontrados para cada eje de rotación, que pueden interpretarse como una medida de la energía del puente de hidrógeno, son valores intermedios a los encontrados en la literatura para dímeros lineales y cíclicos de Formamida<sup>11,12,13</sup>, pero estas diferencias se podrían atribuir a que el ángulo Beta resultante, después de hacer el giro a 180° con respecto al dímero cíclico, es de 60° (figura 4).

El esquema obtenido cuando se gira la molécula de Formamida a intervalos de 12° con respecto al centro de giro se muestra en la

figura 5. Y los valores de las diferencias de energía, con respecto a la posición inicial, para estos giros en planos paralelos a una distancia de 3.36 angstrom (moléculas sobrepuestas) se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2. DIFERENCIAS DE ENERGIA PARA EL DIMERO EN PLANOS PARALELOS SEPARADOS 3.36 Å

Angulo de giro (°)	E (KCAL/MOL)	Momento Dipolar (DEBYE)
0	0.000	8.35
12	- 0.054	8.30
24	- 0.953	8.22
36	- 1.148	8.01
48	- 1.13	7.63
60	- 0.678	7.22
72	- 1.073	6.76
84	- 0.392	6.24
96	- 1.440	5.59
108	- 1.618	4.90
120	- 1.954	4.21
132	- 1.842	3.37
144	- 1.938	2.54
156	- 1.994	1.68
168	- 2.030	0.90
180	- 2.036	0.09

El ángulo de giro se refiere al centroide de la figura 1, que representa el dímero simétrico.

La comparación de los datos de energía para el dímero en el plano (Tabla 1), con los valores obtenidos para el dímero en planos paralelos (Tabla 2), nos permite apreciar que la contribución predominante en la estabilidad del dímero son las interacciones en el plano causadas por los enlaces de Hidrógeno, y que la sobreposición de las moléculas de Formamida origina interacciones que desestabilizan esta estructura.

Los resultados teóricos obtenidos dan origen a la conclusión de una contribución decisiva de los enlaces de Hidrógeno a la estabilidad de los asociados considerados, lo cual está de acuerdo con el hecho experimental de descubrir sólo pares coplanares en disolventes orgánicos para nucleótidos, cuyo modelo de interacción de la parte polar se pretendió simular aquí. No obstante, se ha encontrado que en soluciones acuosas solo se forman asociados sobrepuestos<sup>3</sup>. La aparente contradicción entre estos resultados y los datos teóricos, se debe a que en los cálculos de los dímeros, no se consideran las interacciones del disolvente sobre los compuestos calculados.

Las consideraciones del efecto del disolvente, reportadas por Kudritskaya y Danilov<sup>14</sup>, permiten sugerir que la formación de los asociados sobrepuestos se favorece por la existencia de interacciones de tipo hidrofóbico, originando complejos cuya superficie de contacto

con el disolvente es mínima, existiendo una contribución decisiva en la estabilización de las bases sobrepuestas en agua.

### CONCLUSIONES

Los valores de energía obtenidos en este trabajo, en comparación con datos encontrados en la bibliografía, muestran que los resultados obtenidos con el método PCILO son razonables. Los valores de energía de la barrera de rotación, de 7 Kcal/mol, interpretada como una medida de la energía del puente de Hidrógeno coinciden con los valores encontrados experimentalmente<sup>10</sup>.

Con base en los resultados obtenidos y datos en la Literatura, es posible proponer que el factor principal de estabilización en los ácidos nucleicos, se debe a la interacción en el plano, esto es, a la formación de puentes de Hidrógeno y que la estabilización existente en solución acuosa entre bases sobrepuestas, es posible atribuirla a una interacción de tipo hidrofóbico.

### BIBLIOGRAFIA

1. Watson, J.D., *Biología Molecular del Gen.*, pág. 119., Fondo Educativo Interamericano (1974).
2. Ts'o, P.O.P., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 153, 785 (1969).

3. Espejo, R., & Lebewitz., *Anal. Biochem.* 72, 95 (1976).
4. Ladik, J., *Advances in Quantum Chemistry* (P.O. Lowdin, Ed.) Vol. 7, pág. 397-445. Academic Press, New York (1973).
5. Jordán, F., Gilbert, M., Malrieu, J.P., Pincelli, U., *Theoret. Chim. Acta (Berl.)* 15, 211 (1969).
6. Ladell, J., Post, B., *Acta Cryst.* 7, 559 (1954).
7. Spencer, M., *Acta Cryst.* 12, 66 (1959).
8. Struther, et al., *Acta Cryst.* B 25, 2192 (1969).
9. Dreyfus, M., Maigret, B., & Pullman., *Theoret. Chim. Acta. (Berl.)* 17, 109 (1970).
10. Poland, D., Scheraga, H.A., *Biochem.* 6, 3791 (1967).
11. Pullman, A., & Berthod, H., *Theoret. Chim. Acta.* 10, 461 (1968).
12. Momany et al., *J. Phys. Chem.* 74, No. 12, 2424, (1970).
13. Ortega, B.I., y Rubio, M., *Theoret. Chim. Acta.* 36, 221 (1975).
14. Kudritskaya, & Danilov., *J. Theor. Biol.* 59, 303 (1976).

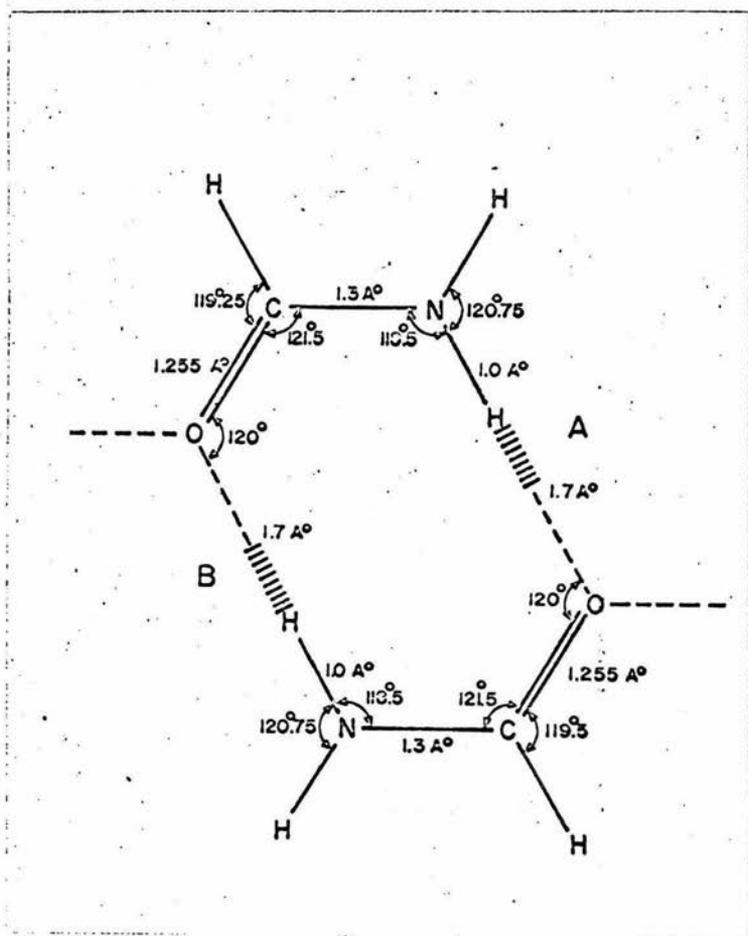


FIGURA 1. DIMERO FORMAMIDA

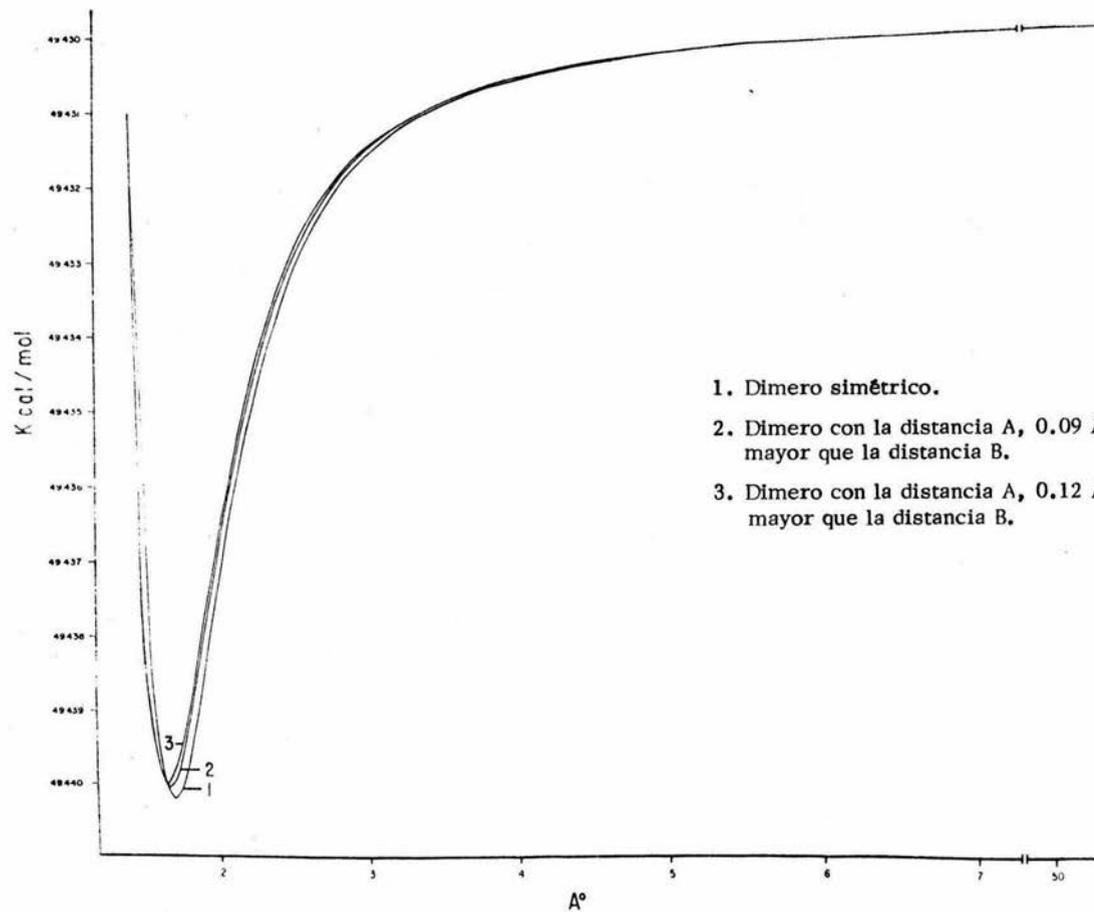


FIGURA 2. CURVA DE ENERGIA POTENCIAL PARA EL DIMERO DE FORMAMIDA EN LOS TRES CASOS ESTUDIADOS.

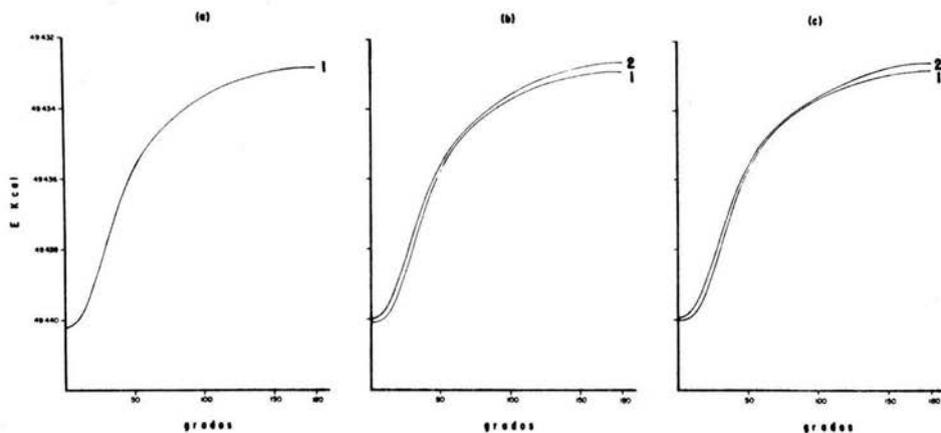


FIGURA 3. ENERGIA DE LA BARRERA ROTATORIA PARA LOS TRES CASOS ESTUDIADOS.

- |        |  |                             |
|--------|--|-----------------------------|
| a)     |  | $E = 7.39 \text{ KCAL/MOL}$ |
| b) 1.- |  | $E = 7.36 \text{ KCAL/MOL}$ |
| 2.-    |  | $E = 7.17 \text{ KCAL/MOL}$ |
| c) 1.- |  | $E = 7.43 \text{ KCAL/MOL}$ |
| 2.-    |  | $E = 7.21 \text{ KCAL/MOL}$ |

\* 1.- Alrededor del puente B  
 2.- Alrededor del puente A

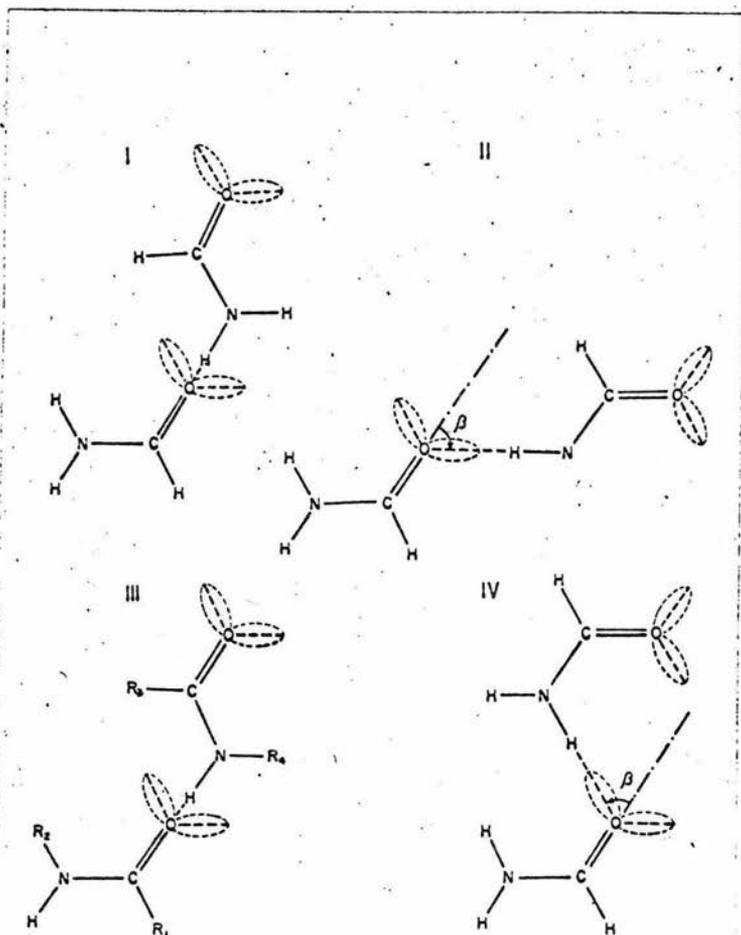


FIGURA 4. GEOMETRIA USADA POR MOMANY ET. AL.  
 II GEOMETRIA USADA POR BLAKE Y RUBIO.  
 III GEOMETRIA USADA POR PULLMAN Y BERTHOD.  
 IV GEOMETRIA USADA EN EL PRESENTE TRABAJO.

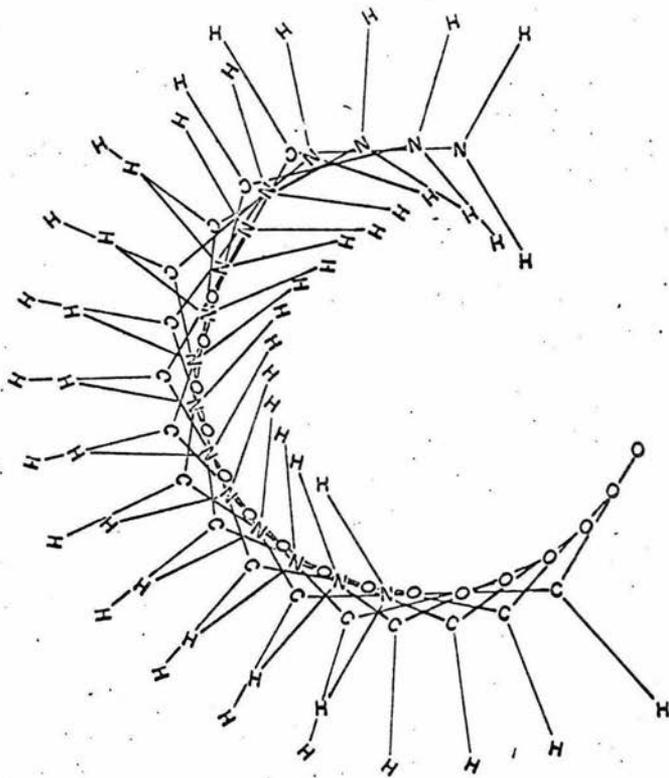


FIGURA 5. ESQUEMA OBTENIDO CUANDO SE GIRA LA MOLECULA DE FORMAMIDA A INTERVALOS DE  $12^\circ$ , CON RESPECTO AL CENTRO DE GIRO.

DESARROLLO DE NEUROSPORA CRASSA  
LIMITADO POR AMONIO.

DESARROLLO DE Neurospora crassa LIMITADO POR  $\text{NH}_4^+$ 

La suposición de que el paso limitante del desarrollo microbiano es una reacción catalizada por enzima<sup>1</sup>, permite explicar la ecuación de Monod por medio de la cual, con una cinética de Michaelis-Menten se describe la utilización de un sustrato esencial para la nutrición de la célula y por lo tanto, la rapidez específica de desarrollo del microorganismo, mediante la siguiente ecuación:

$$(1) \dots\dots\dots \mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

No obstante, es necesario considerar que las vías metabólicas se constituyen por reacciones enzimáticas en serie o paralelo, incluso varios circuitos de control, las cuales no siempre siguen una cinética simple de Michaelis-Menten ya que aquellos efectos de retroalimentación y/o la estructura de la enzima, pueden dar origen a mecanismos complejos de reacción.

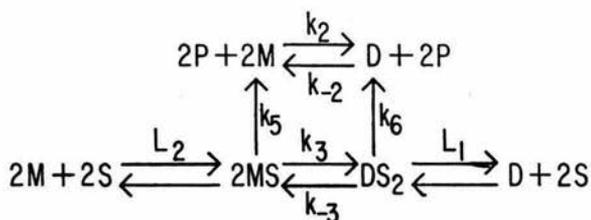
En muchos de los casos de reacciones catalizadas por enzimas, la rapidez de desaparición de un sustrato puede representarse por la razón de polinomios:

$$(2) \dots\dots\dots v_i = \frac{\sum_{j=1}^{m_i} \beta_j S^j}{\sum_{k=1}^{p_i} \xi_k S^{k+1}}$$

la cual adopta una forma sigmoideal en el caso de que la enzima posea más de un sitio de enlace y el sustrato ó un metabolito de la vía metabólica produzcan una activación en la enzima. La respuesta alostérica, se entiende usualmente en términos de control metabólico y economía celular (por ejemplo inhibición por retroalimentación de la primera reacción por un producto final de la vía metabólica).

Sin embargo, otro tipo importante de regulación metabólica no genética, se debe al cambio de actividad de la enzima por reacciones reversibles de asociación-disociación de la propia enzima, en la que una de las formas oligómeras posee mayor actividad y, el cambio lento en la polimerización por cambios en el nivel de sustrato origina un sistema amortiguador dependiente del tiempo para la reacción de algunos metabolitos<sup>2</sup>.

Un mecanismo simple que representa el cambio en el grado de oligomerización de una enzima puede mostrarse con el siguiente modelo:



En el que se ha representado al monomero ó sea la forma de la enzima con menor peso molecular como M y al dimero como D. Se ha supuesto en el modelo, que  $k_5$  es mucho menor que la constante de velocidad específica de formación de los complejos enzima-sustrato (MS, DS) que  $k_2$  y  $k_{-2}$  son muy pequeñas y por ende el equilibrio  $2M \rightleftharpoons D$  se alcanza muy lentamente y que  $k_5$  y  $k_6$  son iguales, obteniendo la siguiente expresión de velocidad:

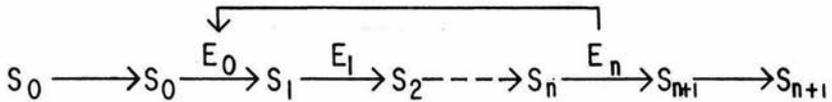
$$v = k_5 E_0 \frac{\frac{S}{L_2} + \left[ \frac{-Z_1 \pm \sqrt{Z_1^2 + \frac{4Z_2 E_0}{K}}}{2Z_2} \left( \frac{S}{L_1} \right) \right]}{1 + \frac{S}{L_2} + \left[ \left( \frac{S}{L_1} \right) \frac{-Z_1 \pm \sqrt{Z_1^2 + \frac{4Z_2 E_0}{K}}}{2Z_2} \right] + \left[ \frac{-Z_1 \pm \sqrt{Z_1^2 + \frac{4Z_2 E_0}{K}}}{2Z_2} \right]}$$

en la que se definió :

$$Z_1 = 1 + \frac{S}{L_2} \quad Z_2 = 1 + \frac{S^2}{L_1}$$

Esta expresión cinética, muestra que la rapidez de reacción es una función asintótica de la concentración de sustrato y describe además el comportamiento de un sistema, en el cuál hay un cambio lento en el grado de oligomerización de la enzima, ante un cambio rápido en la concentración de ligando; las enzimas que obedecen este comportamiento se denominan Histerésicas<sup>2</sup>.

Es posible justificar que el desarrollo microbiano es función de la forma de la ecuación del paso limitante en la síntesis de un metabolito de una vía metabólica (incluyendo en la vía la entrada de sustrato a la célula), si la consideramos como una serie de reacciones, con inhibición de un producto por retroalimentación.



las ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento dinámico del sistema son:

$$(4) \dots\dots\dots \frac{dS}{dt} = V_1 - V_2$$

$$(5) \dots\dots\dots \frac{dS_2}{dt} = V_2 - V_3$$

$$\vdots$$

$$(6) \dots\dots\dots \frac{dS_n}{dt} = V_n - V_{n+1}$$

Si suponemos que el crecimiento celular ha alcanzado un estado estacionario:

$$(7) \dots\dots\dots V_1 = V_2 = V_3 = \dots = V_{n-1} = V_n = V_L$$

ó sea que la velocidad de síntesis de cualquier metabolito en la vía, será igual a la velocidad límite ( $V_L$ ) de algún metabolito que regule la vía<sup>6</sup>.

Por otro lado se tiene, que la velocidad de desarrollo de la célula en un cultivo Batch, es proporcional a la velocidad de utilización de sustrato:

$$(8) \dots\dots\dots \left( \frac{dX}{dt} \right)_{\text{crec}} = -Y \left( \frac{dS}{dt} \right) = -YV_L$$

Por lo que la forma de la ecuación para  $V_L$  nos expresará el tipo de función que es posible esperar para el crecimiento del microorganismo.

Edward<sup>3</sup> ha publicado la velocidad del desarrollo microbiano como función de la síntesis de un intermediario que actúa como limitante en el desarrollo y tiene la forma para el caso de una inhibición por sustrato,

$$(9) \dots\dots\dots V = \frac{V_{\max} S}{(K_g + S)(1 + S/K_i)}$$

En el caso de una enzima alostérica<sup>1</sup>

$$(10) \dots\dots\dots V = \frac{V_{\max} S^n}{K + S^n}$$

que es una forma de la ecuación de Hill.

Las expresiones (9) y (10) son casos particulares de la ecuación (2).

Se ha encontrado<sup>4</sup> para el crecimiento de *Neurospora crassa*, en cultivos alimentados con  $\text{NH}_4^+$  restringido, que el oligómero predominante de la G.S. es el Tetrámero; pero cuando se desarrolla sin limitación de  $\text{NH}_4^+$ , la forma predominante de la enzima es el octámero; esto sugiere que el equilibrio entre las dos formas posibles de la enzima es lo que permite regular la síntesis de proteína y por lo

tanto la velocidad de desarrollo de la N.C. Además, estudios preliminares cinéticos junto con estudios de separación de las formas oligómeras en gradientes de sacarosa, indican que la velocidad de intercambio entre las dos formas es muy lento con respecto a la velocidad de síntesis de glutamina, lo cual sugiere que un control para la biosíntesis de glutamina puede deberse a la asociación lenta de las dos formas de la enzima, por lo que es posible utilizar la ecuación (3) para expresar la velocidad límite de la síntesis de proteína en la vía metabólica:



Las ecuaciones para expresar el comportamiento de un cultivo alimentado<sup>5</sup> son:

Para el crecimiento del microorganismo:

$$(11) \dots \dots \frac{dX}{dt} = -DX + \left( \frac{dX}{dt} \right)_{\text{crec}}$$

Para el sustrato:

$$(12) \dots \dots \frac{dS}{dt} = (S_0 - S)D - \frac{1}{Y} \left( \frac{dX}{dt} \right)_{\text{crec}}$$

Suponiendo que el crecimiento del microorganismo sigue la usual cinética de desarrollo:

$$(13) \dots \dots \dots \left( \frac{dX}{dt} \right)_{\text{crec}} = \mu X$$

y con la ecuación (8)

$$(14) \dots \dots \dots \left( \frac{dX}{dt} \right)_{\text{crec}} = -Y \frac{dS}{dt}$$

y además suponiendo válida la ecuación (3), es posible su sustitución en (14) obteniendo:

$$(15) \dots \dots \dots$$

$$\left( \frac{dX}{dt} \right)_{\text{crec}} = (Yk_5 E_0) \frac{\frac{S}{L_2} + \left[ \frac{-Z_1 \pm \sqrt{Z_1^2 + \frac{4Z_2 E_0}{K}}}{2Z_2} \left( \frac{S}{L_1} \right) \right]}{1 + \frac{S}{L_2} + \left[ \left( \frac{S}{L_1} \right) \frac{-Z_1 \pm \sqrt{Z_1^2 + \frac{4Z_2 E_0}{K}}}{2Z_2} \right] + \left[ \frac{-Z_1 \pm \sqrt{Z_1^2 + \frac{4Z_2 E_0}{K}}}{2Z_2} \right]}$$

Dado que la concentración inicial de la enzima ( $E_0$ ), es proporcional a la concentración de células presentes:

$$(16) \dots\dots\dots E_0 = k'X$$

al sustituir en (15) la (16) se obtiene:

$$(17) \dots\dots\dots$$

$$\left(\frac{dX}{dt}\right)_{\text{crec}} = (Yk_5k'X) \left\{ \frac{\frac{S}{L_2} + \left[ \frac{-Z_1 \pm \sqrt{Z_1^2 + \frac{4Z_2k'X}{K}}}{K} \left(\frac{S}{L_1}\right) \right]}{1 + \frac{S}{L_2} + \left[ \left(\frac{S}{L_1}\right) \frac{-Z_1 \pm \sqrt{Z_1^2 + \frac{4Z_2k'X}{K}}}{2Z_2} \right] + \left[ \frac{-Z_1 \pm \sqrt{Z_1^2 + \frac{4Z_2k'X}{K}}}{2Z_2} \right]} \right\}$$

$F_S$

y comparando con (13) se tiene:

$$\mu = Yk_5k'F_S$$

$$(18) \dots\dots\dots$$

$$\mu = \mu_{\max} F_S$$

Al hacer uso de las ecuaciones ( 17 ) y ( 18 ) para a sustituir en las ecuaciones de cultivo alimentado ( 11 ) y ( 12 ) se obtiene:

$$( 19 ) \dots \dots \dots \frac{dX}{dt} = -DX + \mu_{\max} X F_S$$

$$( 20 ) \dots \dots \dots \frac{dS}{dt} = (S_0 - S)D - \frac{1}{Y} \mu_{\max} X F_S$$

Estas ecuaciones se simularon en una computadora Burroughs 6700 usando un programa llamado Dynamo. Para  $D$ ,  $X_0$ ,  $\mu_{\max}$  y  $S_0$  se usó los valores experimentales .

## RESULTADOS

Cuando se simula las ecuaciones ( 19 ) y ( 20 ) usando diferentes valores para el rendimiento (Fig. 2), se observa que los valores de crecimiento calculados, se acercan más a los valores experimentales (Fig. 1) con un rendimiento de 3.3, el cuál coincide con el valor experimental<sup>4</sup>.

Cuando se probó el efecto de variar los valores de la L (Fig. 3) ó sea las constantes de disociación enzima-sustrato, se obtuvo linealidad para valores de  $L_2$  hasta de 0.005 manteniendo a  $L_1$  igual a 0.5 mM que es la constante de Michaelis para amonio reportada para G. S. de Candida utilis, la cual por resultados de cinéticas preliminares efectuadas en nuestro laboratorio parece ser del mismo orden a la constante de Michaelis de G.S. de Neurospora crassa. Para valores de  $L_2$  menores a 0.001 se obtienen valores negativos en la concentración de sustrato a ciertos tiempos. Para valores de  $L_2 > L_1$  se obtiene un crecimiento exponencial hasta  $L_2 < 1000$  en el que se alcanza nuevamente un desarrollo lineal.

Con el objetivo de probar que el modelo desarrollado no se cumple únicamente por efecto de las condiciones de dilución<sup>7</sup> se simuló las ecuaciones de cultivo alimentado, usando la ecuación 1 para expresar

el desarrollo específico. Se aprecia de la figura 4 que para los diferentes valores de rendimiento, el tipo de crecimiento es exponencial ó el valor de la pendiente es menor al crecimiento experimental. El efecto de variar  $K_S$  en esta ecuación se observa en la figura 5 y se aprecia que para valores de  $K_S$  mayores de 0.01 se obtiene un crecimiento exponencial. En la figura 1 se compara el crecimiento experimental con los valores teóricos obtenidos al usar la ecuación de Histéresis y la de Monod con  $K_S$  igual a 0.01.

La acumulación de sustrato en el medio con el modelo de asociación de la enzima no altera las condiciones de desarrollo en el intervalo de  $86.4 \times 10^{-4}$  mg/l (equivalente a 1 minuto de acumulación) hasta  $86.4 \times 10^{-2}$  mg/l (equivalente a 100 minutos de acumulación).

Cuando se cambia la concentración de cloruro de amonio en la alimentación, la velocidad de dilución y se permite un crecimiento de hasta 52 horas se observa un cambio de pendiente en el desarrollo experimental, al comparar en la figura 6 los valores obtenidos con la ecuación de Histéresis, se obtiene una aproximación aceptable con los valores experimentales.

El efecto sobre la simulación del crecimiento, con las ecuaciones 18 y 19, al variar la dilución en el intervalo de  $0.001 \text{ hr}^{-1}$  hasta  $0.0096 \text{ hr}^{-1}$

se muestra en la figura 8 para simular estas curvas se emplearon los mismos parámetros que para la gráfica correspondiente a la figura 1.

En la figura 9 se muestra el efecto de variar la concentración del sustrato límite ( $S_0$ ) en el intervalo de 50 mg/l hasta 660 mg/l, los parámetros para la simulación son los mismos que para el caso anterior.

En la figura 7 se muestra la simulación cuando se supone un desarrollo en el que la velocidad límite se da por medio de la ecuación de Hill (ecuación 10) y en la que se ha variado "n" en el intervalo de 0.2-6.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos al simular el desarrollo de Neurospora crassa con las ecuaciones de cultivo alimentado, usando para la tasa de crecimiento específico el modelo de oligomerización de la glutamino sintetasa usando la ecuación (3), parecen explicar el comportamiento experimental observado al limitar la concentración de amonio al medio de cultivo.

El sustituir la ecuación de Monod, por una ecuación que explique en términos moleculares la velocidad específica de desarrollo en microorganismos, ya se ha sugerido previamente en la literatura<sup>1,3</sup>; sin embargo no se ha encontrado ningún caso en el que el paso limitante para el desarrollo es el equilibrio que se establece en la asociación entre dos formas activas de una enzima.

Estudios preliminares en la regulación de biosíntesis de glutamina en *Cándida utilis* con inhibidores de la síntesis de proteínas, condujeron a proponer que la inactivación de la enzima es un proceso irreversible y que la restauración de la actividad catalítica requería nueva síntesis de la enzima<sup>8</sup>. Sin embargo en un trabajo posterior, Sims y Col<sup>9</sup>, encontraron que la enzima G.S. de *Cándida utilis* es una enzima octamérea constituida por dos mitades débilmente enlazadas y que la

inactivación de la enzima "in vivo" involucraba inicialmente la disociación de G.S. en tetrámeros, los cuales tienen una actividad biosintética menor. Estos tetrámeros se podrían reasociar "in vitro" para formar enzima con actividad biosintética normal.

Los resultados obtenidos al simular el desarrollo de Neurospora crassa, usando para la tasa de crecimiento específico el modelo de oligomerización de la glutamina sintetasa, parecen indicar que el equilibrio entre las dos formas activas de la enzima, es un mecanismo para el control fino de la actividad de la enzima, en el que el paso a la forma de tetrámero, permite un aumento en la actividad de la enzima. Estos resultados, que coinciden con los valores experimentales previamente reportados<sup>4</sup>, se diferencian de la regulación similar reportada para *Candida utilis*<sup>9</sup>, en que la forma de la enzima de menor peso molecular resulta ser de menor actividad que el octámero.

Previamente se ha encontrado<sup>4</sup>, que el desarrollo de la cepa 74-A en medio mínimo, da origen únicamente a la forma octámera de la G.S. y que el crecimiento de la cepa AM-1, que carece de la actividad biosintética de la Deshidrogenasa glutámica, da origen en medio mínimo únicamente a la forma tetrámerica de la G.S. Cuando se desarrolla la cepa 74-A en un medio con glutámico como fuente de nitrógeno, la G.S. se encuentra solo en forma de octámero. En condiciones de limitación de

amonio se encontró<sup>4</sup>, después de 12 hrs de crecimiento, un incremento de 12 veces la concentración intracelular de ácido alfa-cetoglutarico, mientras que las concentraciones de glutamina disminuyen 10 y 12 veces respectivamente en comparación con el desarrollo en exceso de sustrato.

Estos datos sugieren que el cambio lento en la oligomerización de la enzima por cambios en el nivel de sustrato, se debe al ácido glutámico, el cuál actúa como un ligando regulador que promueve la asociación de la enzima.

La viabilidad del modelo se confirma al utilizar la ecuación de Hill como velocidad límite, la cuál, de acuerdo con la literatura<sup>10</sup> describe el efecto de la asociación de una enzima, con una velocidad lenta para el establecimiento del equilibrio, en comparación con la velocidad enzimática; esto corresponde a una cooperatividad cinética negativa con respecto al sustrato y ésta es representativa de un modelo de oligomerización en la que  $n$  (coeficiente de Hill) debe tener valores menores que la unidad. De los resultados mostrados en la figura 9 se aprecia que la gráfica que mejor concuerda con los valores experimentales es con  $n = 0,5$

De estos resultados es posible suponer que el paso limitante de la síntesis de proteína en cultivos restringidos de  $\text{NH}_4^+$  de Neurospora crassa, es la síntesis de glutamina, o que la regulación no genética para la síntesis de proteína, está sujeta al grado de oligomerización de la

enzima glutamino sintetasa, existiendo un equilibrio lento, comparado con la velocidad de síntesis de glutamina entre las dos formas activas de la enzima, una forma octámera de menor actividad y una forma tetrámera de actividad mayor.

## CONCLUSIONES

El modelo matemático propuesto en el cuál se supone que la velocidad de desarrollo de la Neurospora crassa, es función de la velocidad que limita el crecimiento permite obtener en términos moleculares las ecuaciones de ese crecimiento. Adaptando entonces la ecuación del desarrollo específico a una forma dada por la cinética enzimática que involucre el paso limitante con las suposiciones consideradas, se evita la utilización de ecuaciones empíricas provenientes del ajuste de los datos experimentales.

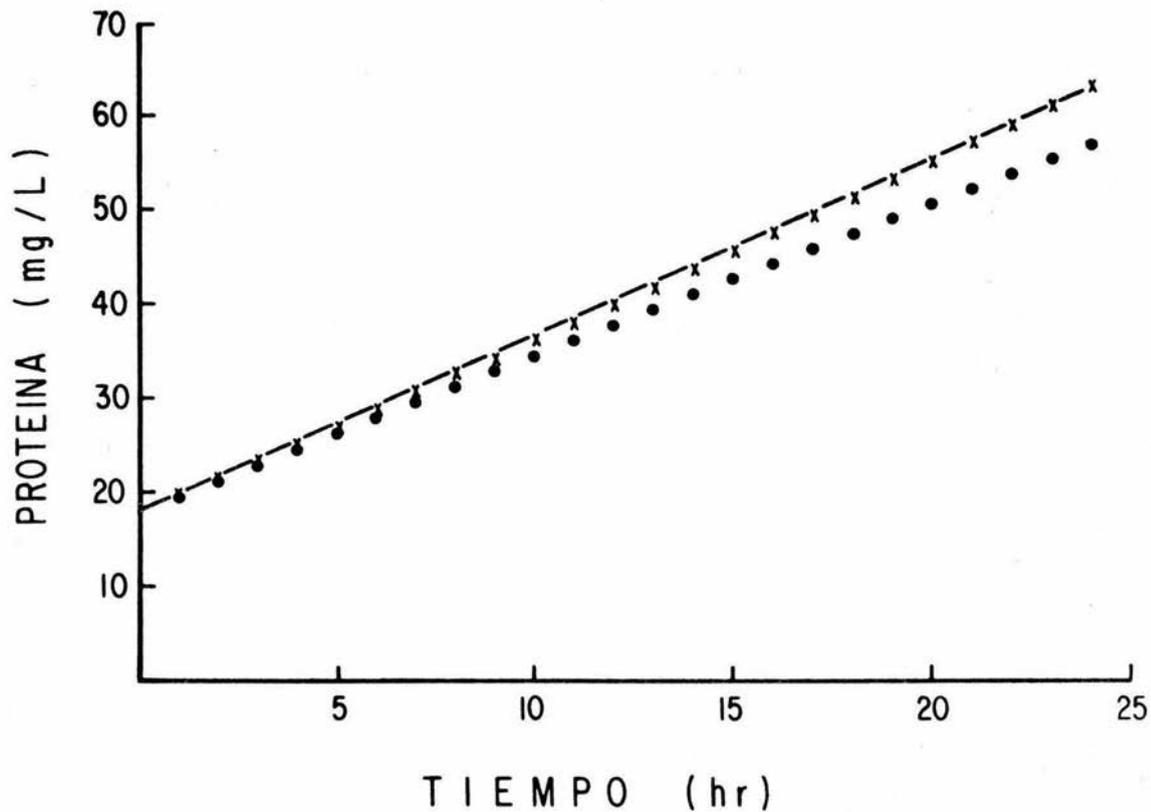


Fig. 1. Simulación del crecimiento de *Neurospora crassa* en un medio de cultivo limitado de  $\text{NH}_4^+$  utilizando la ecuación de Histeresis ( x ) con rendimiento de 3.3,  $L_1=0.5$ ,  $L_2=0.01$ ; la ecuación de Monod ( . ) con rendimiento de 3.3,  $K_S=0.01$  comparadas con la curva experimental (curva continúa).

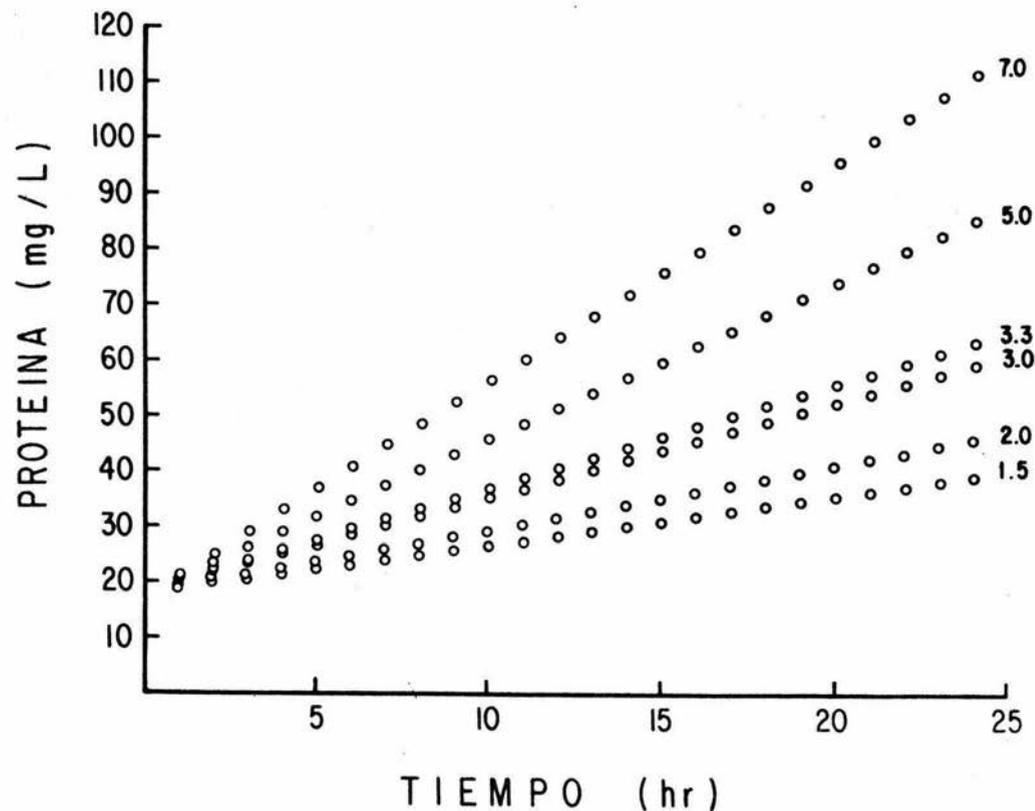


Fig. 2. Simulación del crecimiento de *Neurospora crassa* en cultivo limitado de  $\text{NH}_4^+$ ; las diferentes curvas corresponden a diferentes rendimientos desde 1.5 hasta con  $L_1=0.5 \text{ mM}$  y  $L_2=0.01$

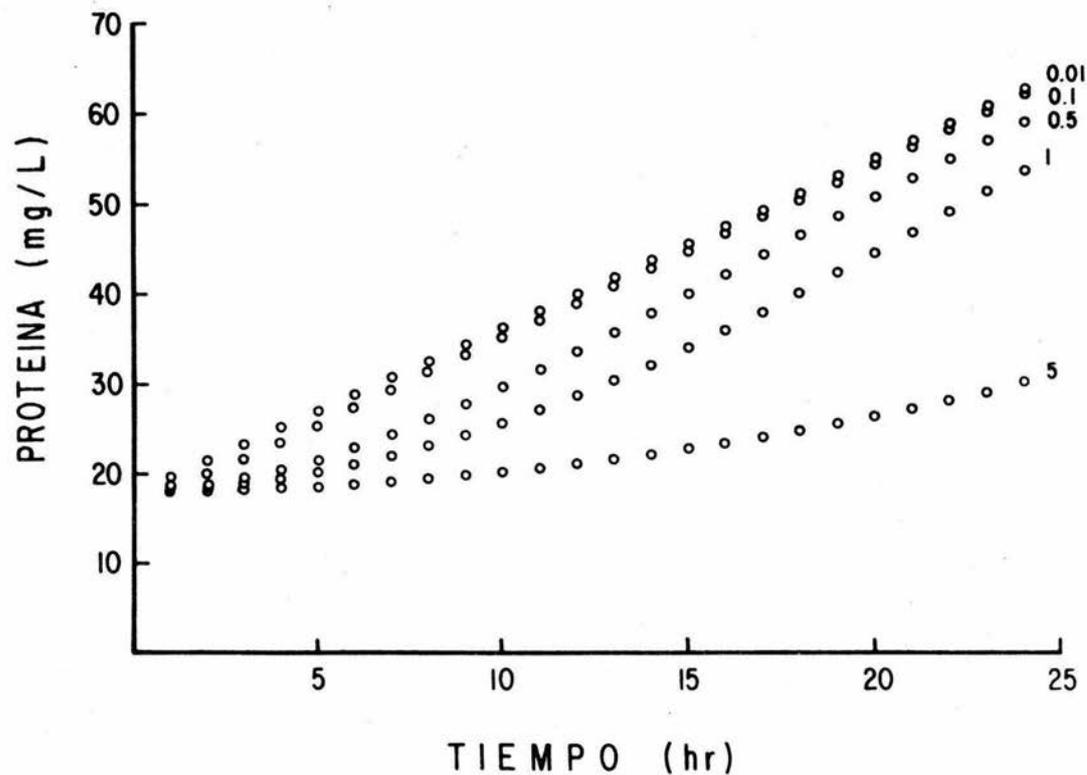


Fig. 3. Simulación del crecimiento de *Neurospora crassa* en cultivo limitado de  $\text{NH}_4^+$  las diferentes curvas corresponden a diferentes valores de  $L_2$  (constante de disociación del complejo tetrámero-sustrato) en el intervalo de 0.01 hasta 5 manteniendo constante  $L_1=0.5$  mM y rendimiento de 3.3

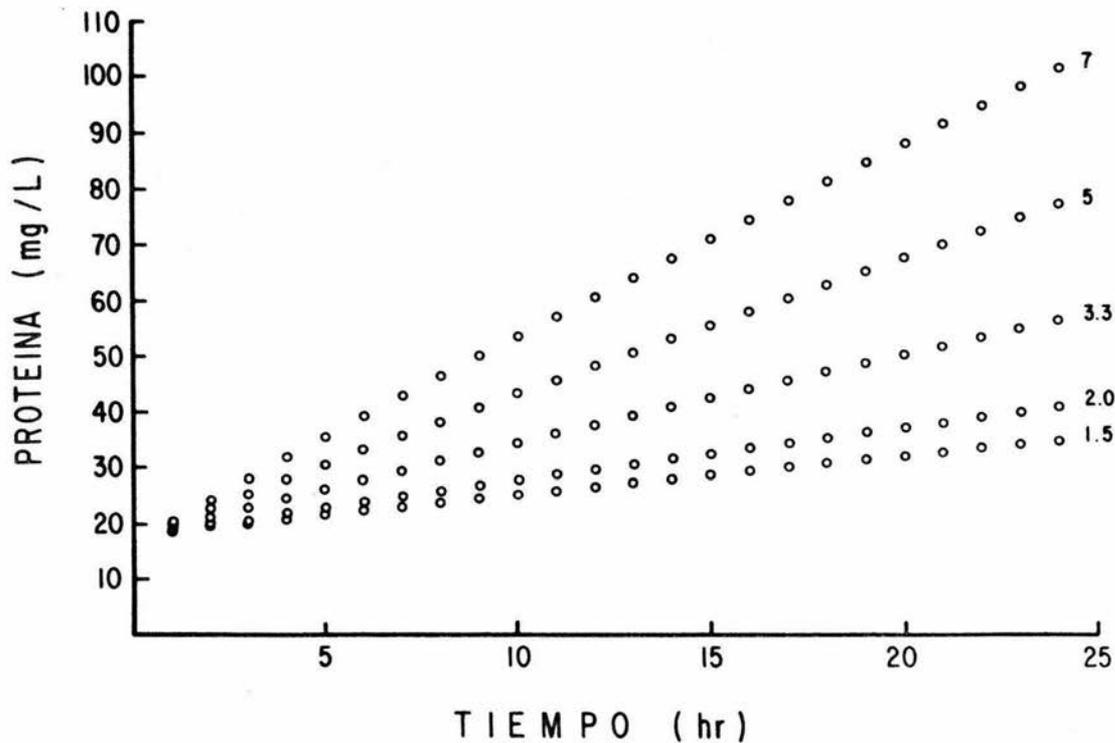


Fig. 4. Simulación del crecimiento de *Neurospora crassa* en cultivo limitado de  $\text{NH}_4^+$  utilizando la ecuación de Monod; las diferentes curvas corresponden a distintos rendimientos en el intervalo de 1.5 hasta 7 con un valor de  $K_s=0.01$ .

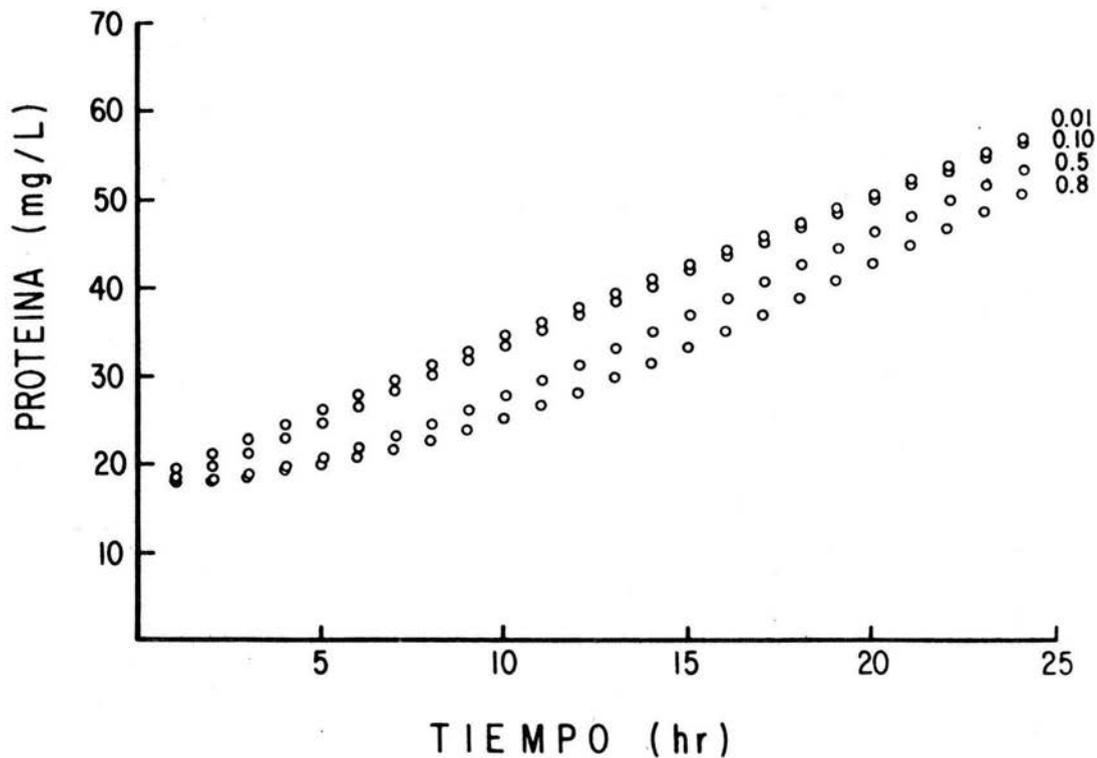


Fig. 5. Simulación del crecimiento de Neurospora crassa en cultivo limitado de  $\text{NH}_4^+$ , usando la ecuación de Monod, con un rendimiento de 3.3 y variando el valor de  $K_s$  en el intervalo de 0.01 hasta 0.8

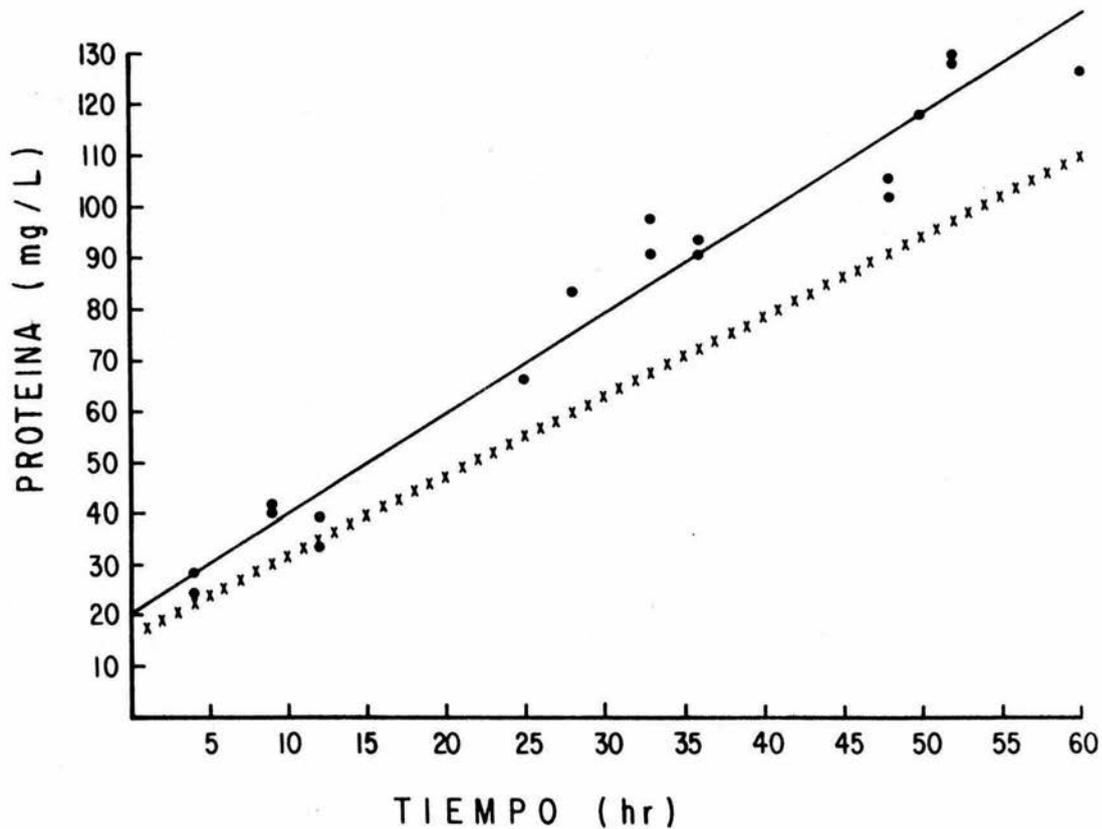


Fig. 6. Crecimiento de Neurospora crassa en cultivo limitado de  $\text{NH}_4^+$  con  $D = 0.00015 \text{ hr}^{-1}$ ,  $S = 3150 \text{ Mg/l}$ , comparada con la gráfica obtenida al simular las ecuaciones (19) y (20). La gráfica continua corresponde a la recta de mínimos cuadrados.

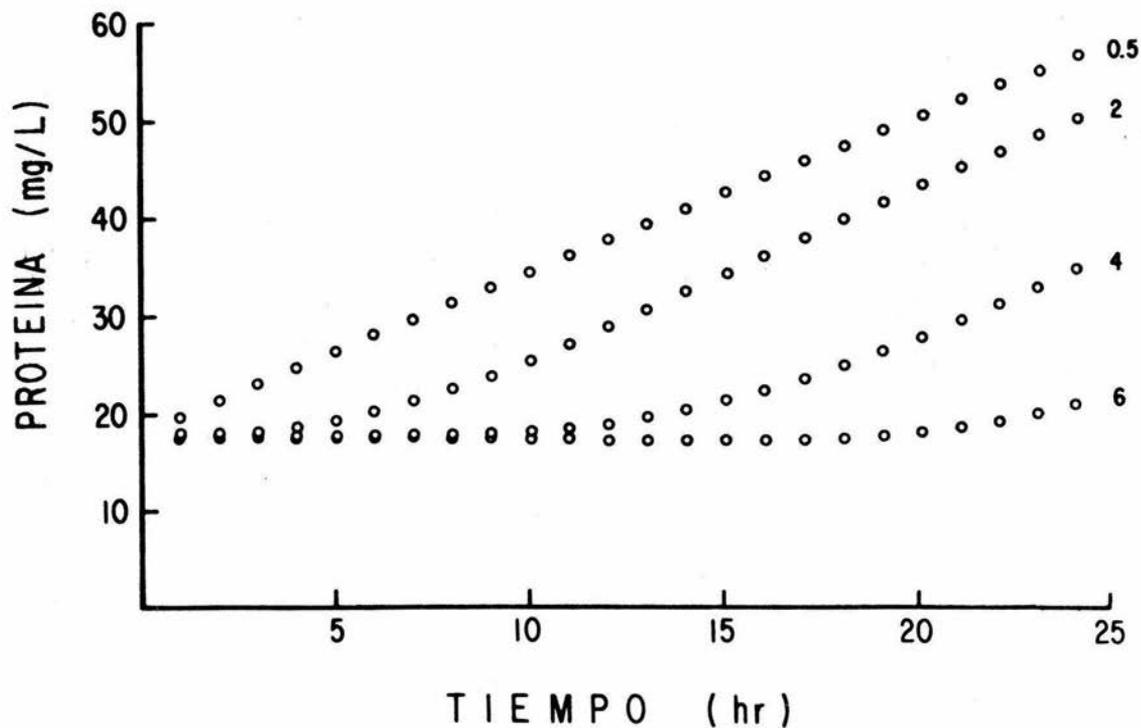


Fig. 7. Simulación del crecimiento de *Neurospora crassa* en cultivo limitado de  $\text{NH}_4^+$  utilizando la ecuación de Hill con un valor de  $K_s=0.1$ ; las diferentes curvas corresponden a diferentes valores de  $n$  en el intervalo de 0.5 hasta 6

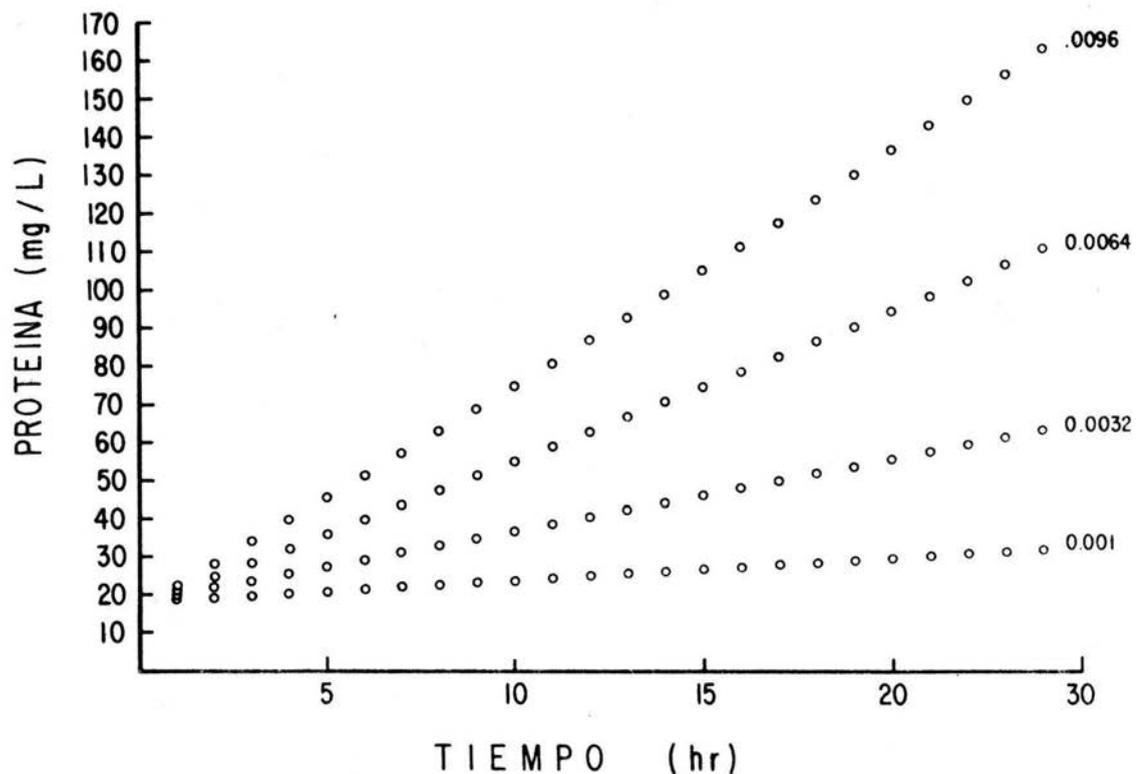


Fig. 8. Simulación del crecimiento de *Neurospora crassa* en cultivo limitado de  $\text{NH}_4^+$ ; las diferentes curvas corresponden a diferentes valores de D (dilución), en el intervalo de 0.001 hasta 0.0096

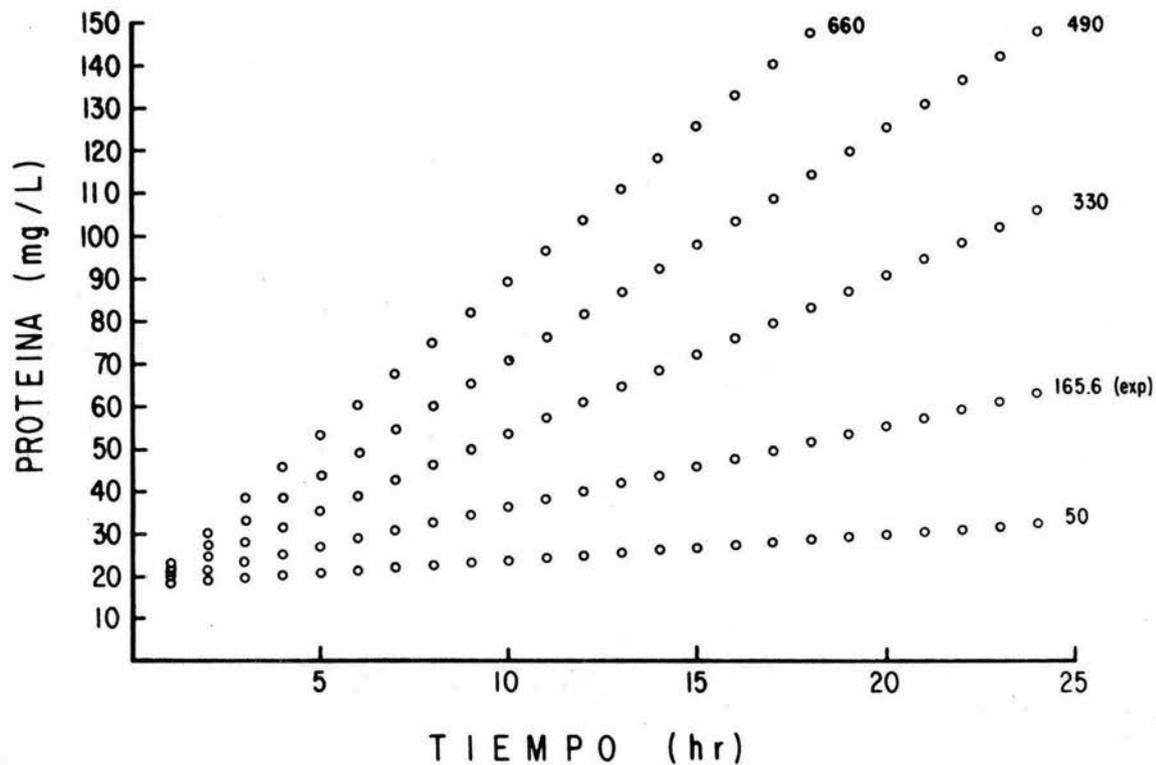


Fig. 9. Efecto de incrementar la concentración de la alimentación  $S_0$ , en la simulación del crecimiento de Neurospora crassa en cultivo limitado de  $NH_4^+$

## BIBLIOGRAFIA

1. Kargi, F., J. Appl. Chem. Biotechnol. 27, 704 (1977).
2. Frieden, C., J. Biol. Chem., 245, 5788 (1970).
3. Edwards, V., Biotech, Bioeng., 12, 679 (1970).
4. Limón-Lasson, J., Lara, M., Resendiz, B., Mora, J. Biochem. and Biophys. Res. Comm., 78, 1234 (1977).
5. Dunn, I. J. and Mora, J. R. Biotech. and Bioeng., 17, 1805 (1975).
6. Viniegra-González, G. In "Biological and Biochemical Oscillators" B. Chance, E.K., Pye, A.K., Ghosh and B. Hess (eds.), Academic Press, New York, pp. 41-59.
7. Yamane, T. and Hirano, S., J. Ferment. Technol., 55, 380 (1977).
8. Ferguson, A. R. and Sims, A. P., J. Gen. Microb., 80, 159 (1974).
9. Sims, A. P., Toone, J. and Box, V., J. Gen. Microb., 84, 149 (1974).
10. Kurganov, B. I., Dorozhko, A. I., Kagan, Z. S. and Yakovlev, V. A., J. Theor. Biol., 60, 271 (1976).