

## **5 Discusión de resultados**

*(Esta página está intencionadamente en blanco)*

En este capítulo se procede a la discusión de los resultados presentados en el capítulo anterior.

## 5.1 La naturaleza de las interacciones $\pi$ -catión

Las interacciones con iones son claves para la funcionalidad de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos. En muchos casos estas interacciones involucran contactos salinos con los fosfatos, pero son cada vez más los sistemas en los que se describen interacciones de iones con las nucleobases<sup>1</sup>. En este tipo de interacción el ión ejerce una marcada influencia sobre la distribución electrónica del heterociclo. Especialmente importantes son las interacciones ión-heterociclo fuera del plano (la denominada interacción  $\pi$ -catión) en numerosos procesos, tales como reconocimiento ligando-receptor, reconocimiento ADN-proteína, canales, etc. Los estudios realizados en el apartado 4.1 proporcionan una nueva visión de estas importantes interacciones.

En el apartado 4.1.1 se ha explorado la importancia de los efectos de polarización, catión  $\rightarrow$  sistema aromático, en las interacciones  $\pi$ -catión. Los perfiles energéticos de la interacción  $\pi$ -catión (simulados por un ión  $\text{Na}^+$  y benceno) a diferentes distancias y en diferentes orientaciones han proporcionado un nuevo enfoque de la naturaleza de estas interacciones. A cortas distancias el término repulsivo domina la interacción, mientras que el término electrostático es el que domina a largas distancias. A distancias intermedias (próximas al *hard sphere radius*), la magnitud del término electrostático y del término de polarización, en general, es similar. El término electrostático es positivo para las orientaciones en el plano, a diferencia de la orientación perpendicular al plano, donde es negativo y grande. El término de polarización es siempre negativo. Cuando el ión  $\text{Na}^+$  se aproxima en el plano aromático, el término de polarización es más grande que el electrostático. La existencia de mínimos energéticos demuestra que la polarización aromática estabiliza las aproximaciones en el plano a pesar de la fuerte

repulsión electrostática. La aproximación del  $\text{Na}^+$  perpendicular al plano está claramente favorecida por el término electrostático, aunque sólo a cortas distancias este término es mayor que el término de polarización. Resumiendo, la polarización favorece la aproximación en el plano de los cationes, pero las pequeñas diferencias respecto a la orientación del eje  $z$  no pueden revertir la preferencia electrostática por la orientación perpendicular.

Siguiendo el estudio realizado por Dougherty y colaboradores<sup>2,3</sup>, se examina la contribución de la polarización en la interacción del  $\text{Na}^+$  con una serie de 16 compuestos aromáticos a una distancia fija de 2.47 Å. Los resultados muestran la importancia de la polarización, que en general es similar al término electrostático e incluso en algunos casos mayor. La energía de polarización se encuentra relacionada con el tamaño del sistema aromático. Así, los anillos más grandes proporcionan valores mayores de polarización, siendo aproximadamente de -9.5, -10.5 y -15.0 kcal/mol para anillos aromáticos de 5, 6 y 10 miembros, respectivamente. En cambio, la energía de polarización prácticamente no varía con la naturaleza de los sustituyentes, como se se aprecia en el benceno y sus derivados sustituidos, donde oscila alrededor de las -10.5 kcal/mol, a diferencia de la energía electrostática que varía marcadamente con la naturaleza de los sustituyentes, tal y como mencionaba Dougherty y colaboradores<sup>2,3</sup>. De acuerdo con estos resultados, la naturaleza de la interacción  $\pi$ -catión tiene una gran componente debida a los efectos de la polarización. Aún así, aunque un modelo puramente electrostático no sea capaz de reproducir exactamente este tipo de interacciones, puede proporcionar buenos valores relativos para una serie de compuestos con un núcleo aromático común, en concordancia a los resultados obtenidos previamente<sup>2</sup>.

El estudio realizado ha permitido explorar la utilidad de la metodología GMIPp<sup>4</sup> como alternativa al MEP para describir interacciones  $\pi$ -catión. Para analizar la confianza del modelo puramente electrostático en sistemas de distinto tamaño, se ha examinado la correlación entre los valores MEP y los SCF. Los resultados muestran que dicho modelo funciona bien, aunque peor que cuando se aplica sólo a los derivados del benceno. Así, el modelo explica el 93% de la varianza de los resultados, con una

ordenada en el origen de  $-11.6$  kcal/mol y una pendiente de 1.08. Sin embargo, existen algunas discrepancias entre los valores MEP y SCF, que pueden ser explicados por las contribuciones de la polarización. Así, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la superioridad del modelo GMIPp, que reproduce el 99% de la varianza de los resultados SCF, con una ordenada en el origen de  $-5$  kcal/mol y una pendiente de 0.98. El valor de la ordenada en el origen probablemente refleja el error de superposición de base (*BSSE*), que no ha sido corregido en los valores SCF siguiendo las sugerencias de Dougherty<sup>2,3</sup>, así como la incertidumbre en la evaluación clásica de efectos de dispersión-repulsión y los efectos de transferencia de carga (0.05 electrones se transfieren según un análisis de Bader<sup>5</sup>). Recapitulando, la mejora del modelo GMIPp respecto al modelo MEP ha quedado demostrada con un incremento en la capacidad de descripción de la interacción  $\pi$ -catión, y una reducción en la desviación de la pendiente respecto al valor ideal y en la ordenada en el origen. Además, el GMIPp corrige todas las limitaciones que presentaba el MEP cuando se aplicaba a compuestos derivados de núcleos aromáticos diferentes.

Desde un punto de vista computacional, el GMIPp sólo requiere un limitado incremento de tiempo de cálculo comparado con el MEP, porque no es necesario recalcular la función de onda y la energía de polarización se evalúa utilizando las mismas integrales monoeléctricas involucradas en el cálculo del MEP. Además, el GMIPp está basado en un tratamiento perturbacional, el cual proporciona una partición de la energía de interacción en componentes intuitivas, sin la incertidumbre derivada del error de superposición de base. Todos estos resultados sugieren que el GMIPp es una alternativa poderosa, precisa y rápida para el análisis cuantitativo de las interacciones  $\pi$ -catión.

En el apartado 4.1.2 se han examinado las principales características de la interacción  $\pi$ -catión en términos de las propiedades topológicas de la densidad de carga electrónica, utilizando la teoría de Bader *Atoms in Molecules*<sup>6,7</sup>.

La exploración de los puntos críticos para la interacción de benceno con  $\text{Na}^+$  revela la existencia de 6 puntos críticos (3,-1), que se encuentra simétricamente distribuidos y conectan el catión con los 6 átomos de carbono. El camino de enlace sigue muy de cerca

la línea geométrica que va del átomo de carbono al ión  $\text{Na}^+$ , puesto que la diferencia entre la longitud del camino de enlace y la distancia interatómica es inferior a 0.01 Å. También hay 6 puntos críticos de anillo (3,+1), cada uno localizado a lo largo de la línea que conecta el catión  $\text{Na}^+$  con la mitad del enlace C-C, separando cada par de puntos críticos de enlace (3,-1). Existen pequeñas diferencias entre los valores de la densidad electrónica en los puntos críticos alternados de enlaces y de anillo. Finalmente, la interacción esta caracterizada por la existencia de un punto crítico de celda (3,+3) localizado a lo largo de la línea que conecta el ión  $\text{Na}^+$  con el centro del anillo.

El patrón de puntos críticos que aparece en la complejación del ión  $\text{Na}^+$  con el benceno se ve drásticamente alterado por la introducción de sustituyentes. La diversidad en la distribución de los puntos críticos refleja la influencia del número y de la naturaleza de los sustituyentes en la densidad electrónica del anillo de benceno. Así, la aparición de puntos críticos de enlace en posición *para* al sustituyente en fluorobenceno, anilina y fenol, y un punto crítico de anillo próximo al carbono sustituido, refleja el balance combinado del efecto electroatrayente y resonante de estos sustituyentes. Asimismo, el patrón encontrado en los derivados mono-, di- y trifluorados manifiestan el efecto electroatrayente del átomo de flúor. La distribución topológica de la piridina puede comprenderse en base al efecto desactivante del nitrógeno, que conduce el punto crítico de enlace próximo a C3 y C5 y el punto crítico de anillo próximo al N y al C4. Similarmente, la localización de los puntos críticos de enlace en el naftaleno parece reflejar la tendencia a mantener la resonancia en el anillo de 6 miembros, mientras que el punto crítico (3,-1) en el indol se forma próximo al átomo de carbono en *para* al carbono que está unido al nitrógeno.

La influencia de los sustituyentes también se muestra en los valores de la densidad electrónica en los puntos críticos de enlace y de anillo, que exhiben diferencias notables respecto a los encontrados en el complejo benceno- $\text{Na}^+$ . Para profundizar en el estudio del papel que desempeñan los sustituyentes en el patrón de puntos críticos de enlace, se han examinado diversas propiedades como la laplaciana de densidad de carga<sup>6,7</sup>, la elipticidad de los enlaces C-H, o la concentración de carga<sup>8</sup> sobre cada átomo. Si bien algunas de dichas propiedades han sido empleadas para discutir los efectos activadores-

desactivadores de sustituyentes en sustituciones aromática electrófilas<sup>8</sup>, no se observó ninguna relación directa con la distribución del camino de enlace.

De acuerdo con los estudios realizados sobre otras interacciones intermoleculares<sup>9,10</sup>, se ha estudiado la relación entre las propiedades de los puntos críticos y las características geométricas y energéticas de los complejos. La única característica común en todos los complejos es la existencia de los puntos críticos de celda (3,+3). La comparación de la energía de interacción y de las distancias de equilibrio con las propiedades del punto crítico (3,+3) revelan una serie de tendencias interesantes. Concretamente, hay una marcada correlación entre la densidad de carga en el punto crítico (3,+3) con la energía de interacción ( $r=0.98$ ), así como con la distancia de equilibrio del anillo al catión  $\text{Na}^+$  ( $r=0.99$ ). Finalmente, también hay fuertes correlaciones entre la energía de interacción ( $r=0.94$ ) y la distancia de equilibrio ( $r=0.98$ ) con la laplaciana de la densidad electrónica en el punto crítico (3,+3). Como ya se mencionaba en estudios previos<sup>11,12</sup>, estas relaciones permiten la generalización del concepto de orden de enlace usado en otros complejos a las interacciones  $\pi\text{-Na}^+$ .

Se han examinado las características topológicas de la densidad electrónica para la interacción del  $\text{Na}^+$  con anillos de 5 miembros. El número y la naturaleza de los puntos críticos varían considerablemente entre los diferentes complejos. En contraste con la topología encontrada para los complejos con anillos de 6 miembros, que todos presentaban un punto crítico de celda, este tipo de punto crítico tan sólo aparece en furano, imidazol e indol. De nuevo, la naturaleza del heteroátomo y de los anillos fusionados modula el patrón topológico en los complejos que involucran anillos de cinco miembros, tal como se manifiesta en las grandes diferencias resultantes de reemplazar el grupo -NH- del pirrol por el átomo de oxígeno en el furano. Este hecho refleja la influencia de los efectos resonantes y electroatrayentes. También es remarcable el efecto del anillo de 6 miembros en el indol, que hace que el punto crítico de enlace aparezca en la posición que refuerza la conjugación del par de electrones del nitrógeno con el anillo de benceno fusionado, comparado con los dos puntos críticos de enlace simétricos en el pirrol. Asimismo, las diferencias observadas entre indol y azuleno sugieren que los efectos resonantes están más presentes en el primer

compuesto. De hecho, se conoce que el enlace compartido por los dos anillos en el azuleno es significativamente más largo que el resto de los enlaces C=C, indicando un carácter parcial de enlace simple<sup>13</sup>.

La falta de características topológicas comunes impide establecer relaciones similares a las examinadas anteriormente para los anillos de 6 miembros. En este sentido, los anillos de 5 miembros parecen presentar mayor dificultad para acomodar los cambios en la densidad electrónica suscitados por heteroátomos y sustituyentes, en contra de lo que se observa en anillos de 6 miembros, tal y como sugiere un estudio topológico previo de azinas<sup>14</sup>.

En el último punto se han examinado las características de la interacción  $\pi$ -catión en complejos con otros cationes, así como con el átomo de hidrógeno de dos moléculas neutras dadoras de puente de hidrógeno. El patrón topológico de los puntos críticos de la interacción del benceno con el  $\text{Na}^+$  es reproducido en todos los casos, con la única excepción de la interacción con el  $\text{H}^+$ , donde no se ha detectado ningún punto crítico de celda. Tampoco se ha encontrado ningún punto crítico de anillo en el plano molecular del benceno en el complejo benceno- $\text{H}^+$ , requisito necesario para satisfacer la relación de Hopf-Poincaré. De hecho, cuando se examina el perfil de la densidad electrónica a lo largo de la línea que pasa a través del centro del anillo de benceno desde  $\text{H}^+$ , se observa que la densidad electrónica decrece gradualmente desde el valor máximo, que se da en la posición del  $\text{H}^+$ .

La inspección de los resultados muestran que, aparte del complejo benceno- $\text{H}^+$ , hay una relación entre la energía de interacción y la densidad electrónica en el punto crítico de celda (3,+3) ( $r=0.94$ ). Como todos los complejos exhiben el mismo patrón topológico, el análisis puede extenderse a los puntos críticos de enlace (3,-1). Así, también se observa una fuerte correlación entre la energía de interacción y la densidad electrónica en el punto crítico (3,-1) ( $r=0.96$ ). Además, dicha correlación también aparece cuando se considera la densidad electrónica en los puntos críticos (3,-1) localizados en los enlaces C-C del anillo bencénico ( $r=0.99$ ). Resultados similares se han obtenido a partir de la laplaciana de densidad electrónica. Es destacable la



relevancia de dichas relaciones, pues cubren una variación de 2 ordenes de magnitud en la energía de interacción y permiten el tratamiento simultáneo de la interacción con cationes y moléculas neutras. La influencia del compuesto interaccionante (catión o molécula neutra) sobre la densidad electrónica puede seguirse con la elipticidad de la densidad electrónica en los puntos críticos (3,-1) de los enlaces C-C del anillo bencénico. De nuevo, con la excepción del complejo benceno- $H^+$ , hay una clara relación entre la energía de interacción y la deformación de la densidad electrónica inducida por la molécula interaccionante ( $r=0.99$ ).

Los resultados obtenidos muestran la generalización de las propiedades topológicas de la densidad electrónica en los complejos  $\pi$ -catión de 6 miembros para cationes e incluso moléculas neutras. Como se menciona anteriormente, la única excepción es la interacción del benceno con  $H^+$ , lo que evidencia la naturaleza específica del protón, cuya interacción tiene un importante componente de transferencia de carga (entorno a 0.4 electrones comparados con los 0.05 electrones del  $Na^+$ ).

## 5.2 La naturaleza de los puentes de hidrógeno impropios

Los puentes de hidrógeno influyen decisivamente en la estructura tridimensional y función de las biomacromoléculas. Recientemente, se ha sugerido un nuevo tipo de interacción intermolecular, denominada puente de hidrógeno impropio o *blue-shifting*, fenomenológicamente opuestos a los puentes de hidrógeno convencionales<sup>15</sup>. Los estudios realizados en el apartado 4.2 proporcionan información sobre la naturaleza de este nuevo tipo de interacciones.

En el apartado 4.2.1 se ha examinado la naturaleza de las interacciones C-H... $\pi$  de una serie de complejos representativos tanto del carácter de puente de hidrógeno normal como del carácter de puente de hidrógeno impropio, empleando la teoría AIM<sup>6,7</sup>. Los resultados muestran una variación en la longitud del enlace C-H (que apunta hacia el centro del anillo), asociado a un desplazamiento en su frecuencia de vibración. En contraste con el comportamiento exhibido por los complejos de puentes de hidrógeno convencionales, se encuentran otros complejos con características inversas (acortamiento de la longitud de enlace C-H, y desplazamiento de la frecuencia de vibración al azul) proporcionando las bases para el concepto de puente de hidrógeno impropio<sup>16</sup>. Los cálculos energéticos indican que la estabilización de los complejos con puentes de hidrógeno impropios está dominada por el término de dispersión a diferencia de los puentes de hidrógeno convencionales, en los que predomina el término electrostático.

En las estructuras de mínima energía de los complejos benceno-CH<sub>4</sub> y benceno-HF, el enlace C-H (F-H) se encuentra apuntando hacia un átomo de carbono del anillo, formando un ángulo de ~15° con la línea que pasa por el centro del anillo. La geometría del benceno-HF difiere de la estructura de mínima energía relatada en estudios previos<sup>17,18</sup>, si bien la diferencia energética entre estas estructuras es muy pequeña, lo cual indica que la superficie de energía es muy plana. A pesar de la diferente disposición geométrica de los complejos, los cambios en la longitud de enlace y en la frecuencia de vibración reflejan las tendencias mencionadas anteriormente.

Para completar el estudio de los puentes de hidrógeno impropios se ha realizado un análisis exhaustivo de las características electrónicas de los complejos siguiendo la metodología de Popelier<sup>9,10</sup>.

Propiedades topológicas:

(1) *Topología de la densidad electrónica*. La primera condición para la existencia de un puente de hidrógeno es la identificación de un punto crítico de enlace (3,-1) entre el átomo de hidrógeno y el aceptor asociado con un camino de enlace que unen los correspondientes átomos. En los complejos C-H...benceno, el aceptor es el conjunto de átomos atrayentes formados por los carbonos del anillo de benceno, y la formación del puente de hidrógeno se ve reflejada en la aparición de 6 puntos críticos (3,-1) uniendo el átomo de hidrógeno con cada uno de estos átomos de carbono<sup>18</sup>. Además, una característica común a todos los complejos es la aparición de 6 puntos críticos de anillo (3,+1), que se encuentran entre cada par de puntos críticos de enlace, y de un punto crítico de celda (3,+3). El patrón topológico de la interacción C-H... $\pi$  también ha sido descrito en complejos que involucran la interacción de cationes con el benceno. (Véase el apartado 4.1.2)

El complejo entre cloroformo y fluorobenceno es peculiar porque sólo presenta un punto crítico (3,-1), y el correspondiente camino de enlace conecta el átomo de hidrógeno del cloroformo con el carbono en posición *para* del fluorobenceno. Esta interacción también se caracteriza por la aparición de un punto crítico de anillo próximo a C1 y por un punto crítico de celda sobre el centro del anillo aromático. Esta reordenación topológica también ha sido encontrada en el complejo de fluorobenceno con el catión Na<sup>+</sup> (véase el apartado 4.1.2) y refleja la influencia del átomo de flúor sobre la densidad electrónica del anillo de benceno. Esto sugiere que la superficie del punto crítico de anillo se extiende del camino de enlace del C-H en *para* alrededor de todo el anillo, y como resultado, la topología de la densidad electrónica exhibe un punto crítico de celda en el complejo.

Las estructuras óptimas para los complejos de benceno con CH<sub>4</sub> y HF también exhiben un patrón diferente. En estos casos, un único camino de enlace une el átomo de hidrógeno con el carbono al cual apunta el enlace C-H (F-H). Además, el complejo benceno-CH<sub>4</sub> también exhibe un punto crítico de anillo y un punto crítico de celda con una reorganización parecida a la encontrada en el complejo fluorobenceno-cloroformo. De nuevo, ambas topologías satisfacen la relación de Hopf-Poincaré. Así, a pesar de que la diferencia de energía entre las geometrías optimizadas y aquellas que tienen el grupo C-H (F-H) apuntando hacia el centro del anillo es muy pequeña, hay importantes diferencias topológicas.

(2) *Densidad de carga en el punto crítico de enlace.* La densidad electrónica en los puntos críticos de enlace se encuentra en el rango 0.002-0.034 ua característico de este tipo de interacciones<sup>9,10</sup>. La comparación de los valores de la densidad en los puntos críticos (3,-1) con las energías de interacción de los complejos muestra la existencia de una relación lineal ( $r=0.91$ ), tal como se ha observado en otros complejos<sup>11,12,19</sup>. Dada la existencia de un patrón topológico común, la misma comparación puede realizarse considerando la densidad en los puntos críticos (3,+1) y (3,+3). Concretamente, la relación con la densidad en el punto crítico de celda ( $r=0.92$ ) concuerda con resultados similares obtenidos para los complejos  $\pi$ -catión (véase el apartado 4.1.2). Estas relaciones permiten generalizar los conceptos de orden de enlace descritos para otros tipos de interacciones relacionadas<sup>11,12,19</sup>.

(3) *Laplaciana de la densidad de carga.* El valor de la laplaciana de la densidad electrónica para los puntos críticos (3,-1) en los puentes de hidrógeno es positivo, lo cual indica una disminución de la densidad electrónica desde la superficie interatómica hacia los núcleos interaccionantes. Esta característica se encuentra en todos los complejos y los valores para los puntos críticos de enlace son similares al rango de valores típicos para las interacciones de puente de hidrógeno<sup>9,10</sup>. Otra característica de la laplaciana es la elevada elipticidad de los puntos críticos (3,-1) formados en la complejación. Ello indica una inestabilidad estructural, también revelada por la proximidad entre los puntos críticos de enlace y de anillo.

Finalmente, cabe destacar la relación entre la energía de interacción y la laplaciana de la densidad electrónica en los puntos críticos de enlace y de celda.

(4) *Penetración mutua del hidrógeno y átomos aceptores.* La penetración mutua puede ser determinada por la comparación de los radios ( $r^0$ ) de los átomos de hidrógeno del dador y de los aceptores no enlazados con los correspondientes radios ( $r$ ) en el complejo enlazado. El valor  $r^0$  se ha estimado como la distancia desde el núcleo a un determinado isocontorno de densidad de carga (normalmente se toma 0.001 ua) en la dirección del puente de hidrógeno, mientras que el radio de enlace se determina en base a la distancia del núcleo al punto crítico de enlace formado en la complejación. La penetración se define como la diferencia dichos radios ( $\Delta r = r^0 - r$ ). En todos los casos las penetraciones son positivas y los átomos de carbono del anillo bencénico están más penetrados que el átomo de hidrógeno, de acuerdo con estudios previos de sistemas relacionados<sup>20,21</sup>.

Propiedades atómicas integradas:

(5) *Aumento de la carga neta del átomo de hidrógeno.* Los resultados indican que la formación del complejo desapantalla el átomo de hidrógeno. En todos los casos, hay una transferencia de carga del anillo aromático a la molécula dadora del protón.

(6) *Desestabilización energética del átomo de hidrógeno.* Los resultados muestran un cambio positivo en la energía en todos los casos, concordando con la desestabilización observada en otras interacciones de puente de hidrógeno<sup>9,10,20,21</sup>.

(7) *Disminución de la polarización dipolar del átomo de hidrógeno.* Los resultados muestran una reducción del primer momento, cuya magnitud es comparable a la observada en diferentes complejos de puente de hidrógeno<sup>9,10</sup>.

(8) *Disminución del volumen atómico del átomo de hidrógeno.* La inspección de los resultados indica que el volumen del átomo de hidrógeno disminuye al formarse el complejo. El cambio experimentado por el átomo de hidrógeno es sensiblemente

mayor que las variaciones observadas en el resto de átomos dentro de la molécula, conduciendo a una reducción neta del volumen molecular en todos los casos.

Estos resultados indican que el átomo de hidrógeno involucrado en los puentes de hidrógeno exhibe características topológicas y de propiedades integradas análogas a las encontradas en puentes de hidrógeno convencionales. Asimismo, sugieren que el fenómeno del puente de hidrógeno impropio proviene de la redistribución de densidad electrónica en el enlace C-H inducida por la complejación.

Se han determinado las propiedades del punto crítico (3,-1) asociadas al enlace C-H de la molécula dadora de puente de hidrógeno en los monómeros y en los complejos. Como resultado de la complejación, la distancia entre el punto crítico (3,-1) (BCP) y el carbono aumenta y la separación del punto crítico al hidrógeno decrece. La magnitud de ambos efectos es bastante comparable. Sin embargo, la magnitud relativa de ambos efectos es diferente en aquellos compuestos que exhiben comportamiento de puente de hidrógeno impropio con respecto de aquellos complejos convencionales. Así, el acortamiento de la distancia BCP-H es mayor que la elongación de la distancia C-BCP en los complejos con puente de hidrógeno impropio, conduciendo a una reducción neta de la distancia de enlace. La tendencia inversa se observa en los complejos con puente de hidrógeno normal, siendo el efecto neto de incremento de la longitud de enlace.

La densidad electrónica en el punto crítico (3,-1) es sensiblemente mayor que el valor obtenido para los puntos críticos (3,-1) intermoleculares. La densidad electrónica en el punto crítico de enlace aumenta tras la complejación en todos los casos, menos para el HF donde la densidad electrónica en el punto crítico (3,-1) es más baja en el complejo que en el monómero. Este efecto también se encuentra en las estructuras optimizadas de los complejos de benceno con CH<sub>4</sub> y HF: mientras la densidad electrónica en el punto crítico (3,-1) del enlace C-H en el complejo con CH<sub>4</sub> aumenta, disminuye en el enlace F-H. Este cambio de la densidad electrónica en el punto crítico de enlace se extiende sobre una amplia región alrededor del punto crítico de enlace. Los mayores cambios se encuentran en el complejo cloroformo-fluorobenceno, donde la densidad electrónica en el punto crítico de enlace aumenta, y en el HF, donde ésta se reduce. Además, hay una

variación gradual de la densidad electrónica en el BCP para los complejos de benceno con diferentes átomos de carbono dadores de protones.

Puesto que la densidad electrónica en el punto crítico de enlace proporciona una medida de orden de enlace<sup>9-12,19,20</sup>, se puede asumir que el cambio en la densidad electrónica en el punto crítico (3,-1) tras la complejación da una medida de la variación de la fuerza del enlace. Según esto, dicho cambio debería reflejar, al menos cualitativamente, los desplazamientos en la longitud del enlace y en la frecuencia de vibración para una serie de sistemas químicos relacionados. Esto se observa para los complejos examinados a partir de las correlaciones significativas entre el cambio en la densidad electrónica en el punto crítico (3,-1) del enlace C-H y la correspondientes variaciones en la longitud de enlace ( $r=0.99$ ) y de sus frecuencias ( $r=0.94$ ).

En conjunto, pues, la inspección del conjunto de propiedades topológicas empleado para caracterizar los puentes de hidrógeno convencionales según los criterios de Popelier no muestra diferencias relevantes para una serie de complejos  $H \cdots \pi$ , siendo insuficientes para distinguir entre un puente de hidrógeno normal y un puente de hidrógeno impropio. El análisis de los resultados sugiere que las características específicas de los puentes de hidrógeno impropios se originan por una sutil redistribución de la densidad electrónica del enlace covalente C-H tras la complejación, lo cual evidencia la diferente respuesta –dispersión versus electrostático- del monómero que interacciona para estabilizar el complejo.

En el apartado 4.2.2 se ha realizado el análisis topológico de la densidad electrónica para examinar la naturaleza de los puentes de hidrógeno que se establecen entre los dímeros adenina-uracilo y uracilo-uracilo.

La formación del complejo A·U(WC) conlleva la aparición de 5 puntos críticos. Hay 3 puntos críticos (3,-1) uniendo los átomos  $H6(A) \cdot O4(U)$ ,  $N1(A) \cdot H3(U)$  y  $H2(A) \cdot O2(U)$ , y otros 2 puntos críticos (3,+1) que aparecen entre los puntos críticos de enlace. La densidad electrónica en los puntos críticos de enlace (3,-1) varía dentro del rango determinado para complejos similares que interaccionan por puentes de hidrógeno

<sup>9,10</sup>. El valor de la interacción H2·O2 es ligeramente menor al de las interacciones H6·O4 y N1·H3, lo cual concuerda con las diferencias en las distancias geométricas. Los resultados indican una penetración mutua de los átomos que interaccionan, que es más importante en los contactos H6·O4 y N1·H3, y claramente menor en H2·O2. De acuerdo con los criterios de Popelier<sup>10,22</sup>, los átomos de hidrógeno involucrados en los puentes de hidrógeno exhiben cambios similares en determinadas propiedades atómicas integradas: (i) un incremento en la carga neta, (ii) una disminución del valor absoluto de la energía atómica, (iii) una reducción en el primer momento y (iv) una disminución del volumen atómico. Para los enlaces N-H estos cambios son notables, pero para el enlace C-H son claramente menos marcados. Por otra parte, la dimerización decrece la densidad electrónica en el punto crítico intramolecular (3,-1) de los enlaces N6-H y N3-H, como ocurre en los puentes de hidrógeno convencionales. Sin embargo, la densidad electrónica en el enlace C2-H se mantiene prácticamente inalterada.

La formación de los dos dímeros de uracilo conlleva la aparición de 3 puntos críticos. Hay 2 puntos críticos de enlace (3,-1) entre los átomos O4·H1 y H5·O2 en U·U(7), O4·H3 y H5·O4 en U·U(C), y otro punto crítico de anillo (3,+1) localizado entre los 2 puntos críticos (3,-1) intermoleculares. Las propiedades topológicas de la densidad electrónica en los puntos críticos (3,-1) en ambos dímeros es muy similar, a pesar de la diferente energía de estabilización de los complejos. La densidad electrónica en los puntos críticos (3,-1) y la penetración mutua para los dímeros U·U es mayor que los valores encontrados para H6·O4 y H2·O2 en el par A·U(WC). De nuevo, los cambios en las propiedades atómicas integradas de los átomos de hidrógeno involucrados siguen las tendencias apuntadas por Popelier<sup>10,22</sup>. Sin embargo, dichos cambios son sensiblemente mayores a los encontrados para el átomo de hidrógeno en el enlace C-H del dímero A·U. La inspección de los resultados muestra la existencia de una relación lineal entre la distancia interatómica H··X y el logaritmo de la densidad electrónica ( $r=0.99$ ), que concuerda con los resultados obtenidos en complejos similares<sup>9,11,12,19,23,24</sup>. (Véase el apartado 4.1.2 y 4.2.1)

La densidad electrónica del enlace N-H de los dímeros U·U se reduce, y la del enlace C-H se incrementa por efecto de la dimerización. Estos cambios vuelven a ser



mayores que las correspondientes variaciones observadas en los enlaces N-H y C-H del par A·U. En el enlace N-H, hay una pérdida de densidad electrónica en el punto crítico de enlace al formarse el dímero, y ésta se hace mayor a medida que la distancia interatómica disminuye. Este efecto decrece en el orden: N3-H (A·U) > N1-H (U·U 7) > N3-H (U·U C) > N6-H (A·U). Cuanto mayor es la pérdida de densidad electrónica, más grandes son los cambios en la distancia de enlace y el desplazamiento de la frecuencia hacia el rojo. En los enlaces C-H hay un ligero incremento de la densidad electrónica al formarse el dímero, siendo mayor a medida que la distancia interatómica disminuye. Este efecto decrece en el orden: C5-H (U·U 7) > C5-H (U·U 7) > C2-H (A·U). El comportamiento diferenciado entre los enlaces N-H y C-H refleja probablemente la diferente naturaleza de las fuerzas estabilizadoras en los contactos intermoleculares establecidos. En el primero es de esperar que sea dominado por el componente electrostático, mientras que en el segundo la dispersión es más importante.

El análisis topológico ha permitido confirmar la naturaleza de los contactos intermoleculares, corroborando los resultados obtenidos en el análisis vibracional. Todos los contactos entre los pares de base A·U y U·U son puentes de hidrógeno convencionales siguiendo las tendencias apuntadas por Popelier, con la única excepción del contacto C2-H...O2 en el par A·U, donde los resultados sugieren que no participa en la interacción por puente de hidrógeno.

### 5.3 El efecto de las bases modificadas

En los últimos años ha habido un creciente interés por la química de los ácidos nucleicos y de sus análogos modificados<sup>25,26</sup> debido a sus potenciales aplicaciones biológicas y biotecnológicas. Recientemente, el uso de bases modificadas ha permitido profundizar en la importancia de los puentes de hidrógeno sobre la estabilidad de los ácidos nucleicos. Por un lado, una estrategia útil para medir la estabilidad es la comparación de pares de bases con dobles y triples enlaces de puente de hidrógeno<sup>27</sup>. Sin embargo, no hay que olvidar que el contexto estructural influye fuertemente en las interacciones no covalentes, como son los puentes de hidrógeno<sup>28</sup>. Por otro lado, una estrategia alternativa para medir la importancia de los puentes de hidrógeno proviene de estudios recientes con bases de ADN no polares que mimetizan la forma de las bases naturales<sup>29</sup>. Los estudios realizados en el apartado 4.3 proporcionan información sobre el efecto de las bases modificadas en las propiedades del ADN y sobre la importancia de los puentes de hidrógeno en su estabilidad.

En el apartado 4.3.1 se han examinado los cambios en la estructura, la reactividad y la estabilidad de dúplexes y tríplexes de ADN cuando inosina (I) es mutada a guanosina (G) y 8-aminoinosina (8AI), es decir, el efecto de introducir grupos amino dadores de puentes de hidrógeno.

Las simulaciones de MD de los dúplexes y tríplexes proporcionan trayectorias estables, independientemente de la naturaleza del nucleótido en posición X= G, I ó 8AI. Los análisis estructurales indican que las estructuras encontradas para cada familia son muy similares entre sí y muestrean regiones típicas del espacio configuracional de tipo B<sup>30-32</sup>. No se observan movimientos de respiración ni disrupciones en las hélices, apoyando la estabilidad de la estructura helicoidal a lo largo de las trayectorias (véase el apartado 4.3.2). Estos resultados sugieren que el ADN es suficientemente flexible para acomodar posibles distorsiones locales procedentes de la presencia del grupo 8-amino. Cabe destacar la estabilidad de las estructuras de triple hélice que contienen 2 pasos (G-C-C<sup>+</sup>) contiguos. En estudios previos se sugería que la presencia de 3 pasos (G-C-C<sup>+</sup>)

contiguos desestabilizaba el tríplex<sup>31</sup>. Las simulaciones presentes sugieren que dos de ellos no afectan la integridad del tríplex, en concordancia con resultados de RMN<sup>33,34</sup>. Parece pues, que la transición de 2 a 3 pasos (G·C-C<sup>+</sup>) es la causante de la desestabilización del tríplex.

Los mapas de potencial de interacción molecular clásico (MIP) y de solvatación de los dúplexes son los típicos de un B-ADN<sup>30,35</sup>. Las regiones reactivas se localizan en el surco menor del ADN definiendo claramente la espina de hidratación. Como era de esperar, la región con mayor potencial electronegativo y mayor solvatación está parcialmente rota en las proximidades de los pares (G·C). Cuando G es substituido por I o 8AI, el MIP en la región de la mutación es más negativo y la solvatación aumenta. Estos resultados apoyan la hipótesis que el grupo amino en la posición 2 de la guanina es responsable de la debilidad de la espina de hidratación en las proximidades de los pasos (G·C) en los dúplexes de ADN. Los análisis de MIP y solvatación de los tríplexes muestran claramente dos regiones capaces de interactuar con pequeñas moléculas polares, que son el surco menor (en el plano de las purinas) y la parte menor del surco mayor (entre planos de tríadas). La presencia de un grupo amino en el surco menor del tríplex disminuye ligeramente la capacidad de este surco para interactuar con pequeños solutos polares. Sin embargo, un grupo amino en la parte menor del surco mayor no conduce a ninguna alteración detectable en los mapas de MIP y solvatación, sugiriendo que el entorno de aguas en el surco menor-mayor no está muy alterado. Esto puede ser entendido considerando que las regiones de mayor MIP negativo y de solvatación preferencial en este surco no se encuentran localizadas en el mismo plano de las purinas.

Se han determinado los cambios en la estabilidad inducidos por las mutaciones G→I y 8AI→I, obteniendo unos perfiles de energía libre para las mutaciones suaves y sin histéresis. La excelente convergencia de los resultados se muestra claramente en los pequeños errores estándar de los promedios de simulaciones independientes. Para comprobar la calidad absoluta de los cálculos MD/TI, se ha calculado la diferencia de energía libre de solvatación entre los pentámeros que contienen una G, I o 8AI central y se ha comparado con los estimados obtenidos de las bases aisladas mediante técnicas

SCRF/MST. La concordancia de los resultados calculados con ambas técnicas es destacable, apoyando la calidad de los cálculos MD/TI.

Los cálculos muestran que la presencia de un grupo amino en posición 2 de la I estabiliza fuertemente los dúplexes respecto a una cadena simple de oligonucleótidos, y los tríplexes respecto a los dúplexes. Por el contrario, la presencia de un grupo amino en posición 8 de la I estabiliza los tríplexes respecto a los dúplexes, pero desestabiliza los dúplexes respecto a una cadena simple de oligonucleótidos. Por lo tanto, un simple recuento de las interacciones por puente de hidrógeno tan solo explica los efectos del grupo 2-amino en los apareamientos WC y del grupo 8-amino en los apareamientos H, pero no explica los efectos del grupo 2-amino en los apareamientos H ni del grupo 8-amino en los apareamientos WC. Estos resultados han sido verificados experimentalmente, proporcionando gran confianza a la metodología teórica utilizada. (Véase el apartado 4.3.1)

Para investigar el efecto de los grupos amino distantes se han realizado cálculos QM-MIPp en las regiones WC y H de la G, I y 8AI. Los resultados sugieren que este sorprendente comportamiento procede de una sutil redistribución electrónica que tiene lugar con la introducción de grupos amino en las purinas. En estudios posteriores<sup>36</sup>, se ha confirmado que los grupos amino incorporados en regiones de la purina distantes de los sitios donde se establecen interacciones por puente de hidrógeno tienen una influencia notable en la estabilidad de los dímeros.

Los resultados sugieren que la introducción de grupos amino para aumentar las interacciones por puente de hidrógeno es una estrategia razonable para diseñar pseudobases estabilizadoras de estructuras de ácidos nucleicos, pero sin olvidar que el diseño de la pseudobase debe realizarse cuidadosamente y no únicamente por un simple recuento de interacciones elementales que puede conducir a conclusiones erróneas.

En los apartados 4.3.2 y 4.3.3 se han examinado los cambios en la estructura, la reactividad, la flexibilidad y la estabilidad inducida en los dúplexes y tríplexes de ADN por la mutación timina (T)→difluorotolueno (F), es decir, el efecto de introducir una

base apolar con muy poca capacidad de establecer puentes de hidrógeno en la posición de una timina.

Las simulaciones de MD de una familia de dúplexes y una familia de tríplexes que contienen T o F proporcionan trayectorias estables y muy similares que concuerdan con los datos de RMN que se disponen<sup>37</sup>. Las conformaciones de estas estructuras son próximas a una forma B tanto en dúplex como en tríplex<sup>30-32</sup> con azúcares en la región Sur-Este y surcos de reactividad característica de la forma B.

A pesar de la gran similitud de las estructuras globales del dúplex normal y modificado, existen algunas sutiles diferencias en la región de la mutación. Así, la mutación conduce a pequeños cambios en las características de reconocimiento de los dúplexes, como evidencian los mapas de MIP y de solvatación. Ambos muestran que el dúplex que contiene F tiene una afinidad por pequeñas moléculas catiónicas y una hidratación reducida en el surco menor en la región próxima al par A·F. Las características generales de reconocimiento y solvatación de los tríplexes se mantienen prácticamente inalteradas por la mutación, pero en la posición WC la mutación T→F debilita la región de potencial negativo en el surco menor, rompiendo parcialmente la espina de hidratación, y disminuye ligeramente la densidad de agua aparente en la parte menor del surco mayor. La misma mutación en la posición Hoogsteen no conduce a cambios importantes en la electronegatividad de los surcos o en la densidad de agua aparente ni tan solo en la posición de la mutación. La falta de diferencias en la parte menor del surco mayor es particularmente interesante, porque éste experimenta una pérdida parcial en las capacidades de interactuar por puentes de hidrógeno como resultado de la mutación. El conjunto de cambios detectados en los análisis de MIP y solvatación pueden ser explicados considerando la alteración en el MEP debido a la falta de pares de electrones en la posición 2 de F y la existencia de movimientos de respiración. Los resultados sugieren que la integridad de las espinas de hidratación es más sensible a la existencia de movimientos de respiración o apertura que a la pérdida parcial de las capacidades de interactuar por puentes de hidrógeno.

El aspecto más importante de la diferencia entre el dúplex normal y el mutado recae en la existencia de movimientos de respiración, los cuales conducen a una apertura reversible parcial o total del par de bases A·F en la escala del nanosegundo, fenómeno no observado en el par A·T. Los movimientos de respiración también se han detectado en los tríplexes que contienen F, y no se han observado en el tríplex de referencia que contiene T. Ambos tríplexes con la mutación presentan aperturas reversibles parciales y movimientos de respiración, que conducen a una pérdida parcial o total de los puentes de hidrógeno debido a un desplazamiento de F hacia el surco mayor. Los resultados sugieren que la respiración en los pares de bases WC no está dramáticamente modificada por la presencia de una tercera cadena, y que la respiración Hoogsteen es un fenómeno menos común que la WC, lo cual sugiere una mayor estabilidad de la tríada d(A·T-F) comparado con la tríada d(A·F-T).

Un estudio más detallado del fenómeno de respiración indica que: (i) la deformación estructural está muy localizada, ya que las bases adyacentes a la mutación se encuentran escasamente afectadas por este fenómeno<sup>38</sup>, (ii) el movimiento es asimétrico, pues tanto puede involucrar la A como el F del par A·F y (iii) el origen de la apertura total o parcial está relacionado con un delicado balance entre las interacciones por puentes de hidrógeno, *stacking* y efectos de solvatación<sup>39</sup>. Los movimientos de respiración pueden tener importantes implicaciones en modular las interacciones de ADN que contienen F con proteínas o fármacos, y pueden estar involucrados en la activación de las señales de reparación de lesiones en el ADN.

Se han determinado los cambios en la estabilidad inducidos por la mutación en una cadena simple de oligonucleótidos, un dúplex y un tríplex de ADN, considerando diferentes conformaciones de partida, ambas direcciones  $T \rightarrow F$  y  $F \rightarrow T$  y usando trayectorias de diferente longitud. Todos los perfiles de energía son suaves y sin aparentes discontinuidades. Además, los cambios de energía libre asociados a una mutación, determinados a partir de diferentes simulaciones, son muy próximos entre sí, proporcionando confianza en la calidad estadística de los estimados. Las diferencias de energía libre que se encuentran para la mutación en una cadena simple de ADN (independientemente del tamaño del oligonucleotido) favorecen la hidratación de T

frente la de F. El valor obtenido concuerda con el estimado SCRF calculado a nivel AM1/MST, lo cual da un mayor grado de confianza a los cálculos MD/TI.

Utilizando simple álgebra con las diferencias de energía libre se obtienen todos los datos termodinámicos asociados con el efecto de la mutación T→F sobre la estabilidad de dobles y triples hélices de ADN. Los resultados muestran que la presencia de un único paso d(A·F) desestabiliza el dúplex, pero el ADN resultante es todavía estable a T ambiente en buena concordancia con los valores experimentales encontrados por Kool y colaboradores<sup>40,41</sup>. En la práctica, las mayores diferencias entre el dúplex de ADN que contiene el par A·F y el dúplex natural deberían relacionarse al cambio en la reactividad intrínseca del surco menor, que puede modificar la capacidad del ADN de interaccionar con pequeñas moléculas o con proteínas con motivos de unión al surco menor, y a la existencia de fenómenos de respiración. Este último fenómeno puede afectar la reactividad del ADN y contribuir a la activación de los sistemas de reparación del ADN.

La formación de la mayoría de los tríplexes con motivos paralelos es un proceso de dos etapas. Primero, un dúplex de ADN se forma, y segundo, una tercera cadena de oligonucleótidos (TFO) se une al dúplex para dar un tríplex<sup>42</sup>. La transición de un dúplex con el par d(A·T) a un tríplex con la tríada d(A·T-T) es más favorable que la transición del mismo dúplex a un tríplex con la tríada d(A·T-F). Resulta interesante ver que si el dúplex presenta el par d(A·F), la formación del tríplex con la tríada d(A·F-T) no está desfavorecida con respecto a la formación del tríplex canónico formado a partir del dúplex con el par d(A·T). Este resultado puede explicarse considerando que las características del surco mayor del dúplex que presenta el par d(A·F) son muy similares a las del dúplex de referencia. La similitud de las características de ambos dúplex formadores de tríplexes sugieren que un dúplex de ADN que presente el par d(A·F) tendría, *a priori*, una capacidad similar de interaccionar con la mayoría de las proteínas que se unen al surco mayor del dúplex de referencia.

Los cálculos MD/TI sugieren que la sustitución de T por F en las posiciones WC y H desestabilizan el tríplex en aproximadamente 5 y 3 kcal/mol con respecto al correspondiente tríplex canónico. La mutación T→F en la posición WC afecta a la

interacción por puentes de hidrógeno en mayor medida que la misma mutación en posición H, lo cual puede ayudar a explicar la más alta estabilidad global del tríplex d(A·T-F) comparada con el tríplex d(A·F-T) encontrada en los cálculos MD/TI. La mejor interacción por puentes de hidrógeno del tríplex d(A·T-F) puede atribuirse a los efectos del esqueleto que hacen posible un mejor apareamiento A·F Hoogsteen que WC. Sobre la base de la aproximación empírica de Roberts & Crothers<sup>43</sup>, se esperaría que ambos tríplexes fueran estables a T ambiente como sugieren los resultados de la MD.

El conjunto de resultados sugiere que el desarrollo y el uso de bases no estándar apolares es una estrategia razonable para ser usada en oligonucleótidos formadores de tríplex para terapias *antigene*, donde la falta de capacidad para interaccionar por puentes de hidrógeno puede representar una clara ventaja a la hora de diseñar tríplex estable en secuencias no homopurínicas.



## 5.4 Apareamientos no canónicos

Los apareamientos no canónicos entre bases dan lugar a toda una serie de posibles estructuras secundarias de los ácidos nucleicos, como los dúplexes paralelos y estructuras con más de dos cadenas de oligonucleótidos como los tríplexes o los cuadrúplexes. Recientemente, se ha estudiado un gran número de estructuras dúplex paralelas basadas tanto en el modo de reconocimiento WC reverso como en el modo Hoogsteen<sup>44-47</sup>. Algunos resultados sugieren que determinados tipos de dúplex paralelo de ADN pueden ser usados como patrones para la formación de tríplexes<sup>48</sup>. Los estudios realizados en el apartado 4.4 proporcionan información sobre las propiedades de la doble hélice paralela de ADN.

En el apartado 4.4.1 se han examinado las características estructurales, las propiedades de reconocimiento molecular, la flexibilidad y la estabilidad de una serie de dúplexes paralelos basados en el motivo d(A·T). Los resultados se han comparado con los obtenidos para una serie de dúplexes antiparalelos con la misma secuencia.

Las trayectorias de los dúplexes d(A·T)<sub>n</sub> de los modelos helicoidales WC, rWC y H son estables. Los análisis estructurales sugieren que las hélices H son ligeramente más rígidas que las hélices WC o rWC y que están bien preorganizadas para reconocer una cadena de pirimidina y formar una triple hélice. Este hecho abre un importante abanico de posibilidades para estos dúplexes en terapias *antigene* y *antisense*. Las características helicoidales de los dúplexes están bien preservadas para todos los oligonucleótidos, incluidos los más cortos. Los parámetros de hélice dentro de la misma familia de estructuras son muy similares, independientemente de la longitud del oligonucleotido y entre las tres familias de dúplexes no muestran grandes diferencias. El *rise* es de 3.4 Å, y el *x-displacement* y el *roll* son pequeños en todos los casos. El *twist* en el dúplex H es menor que en los dúplexes WC y rWC, sugiriendo que el pequeño *twist* encontrado en los tríplexes de ADN proviene del bajo *twist* intrínseco del dúplex H<sup>31</sup>. Las diferencias en el *twist* entre los dúplexes WC y rWC están probablemente dentro del error estadístico de la simulación. Todos los *puckering* de los azúcares están en la zona Sur-

Este del ciclo pseudorrotacional. Las mayores diferencias entre las hélices se encuentran en la estructura de los surcos. La hélice WC tiene un surco menor estrecho y un ancho surco mayor, mientras que la hélice rWC tiene dos surcos similares, pero no idénticos. Finalmente, la hélice H tiene un patrón de surcos totalmente diferente: un surco menor muy estrecho, que reproduce el surco menor mayor de un tríplex, y un surco mayor muy ancho, que se relaciona con el surco mayor mayor de un tríplex<sup>31,32</sup>.

Se observan diferencias remarcables entre las tres familias de dúplexes en lo referente a la localización de las regiones más favorables para interaccionar con pequeños cationes y con moléculas de agua. El mapa del MIP para el dúplex WC exhibe el perfil de reconocimiento esperado para un B-ADN, con una región amplia y continua correspondiente a la interacción favorable a lo largo del surco menor. Para una hélice paralela rWC, las regiones con valores más negativos del MIP se localizan en el surco menor, aunque también se encuentran regiones de interacción favorables en el surco mayor. Finalmente, en el dúplex H se genera una región de interacción favorable en el surco menor. El contorno es discontinuo debido al pequeño tamaño del surco, lo que puede conducir a un notable impedimento estérico en la interacción con grandes moléculas catiónicas. Los mapas de solvatación muestran que el surco menor es la región mejor hidratada en el dúplex WC. Ambos surcos aparecen igual de hidratados en el dúplex rWC, mientras que el dúplex H muestra una región preferencial mayor de solvatación a lo largo del surco menor y una región más pequeña repartida a lo largo del surco mayor.

Se han realizado análisis de componentes principales (PCA) para analizar la flexibilidad molecular de los tres dúplexes. Como se ha encontrado previamente<sup>49</sup>, los modos que corresponden a los movimientos de bajas frecuencias explican una parte muy significativa de la varianza estructural de las trayectorias. La inspección de los vectores propios (modos) asociados con los valores propios (frecuencias) muestra que la dinámica esencial de las tres hélices es similar. Esto sugiere que la estructura general helicoidal, más que el patrón específico de secuencia, es lo que determina los movimientos conformacionales más comunes del ADN. Sin embargo, los cálculos de

entropía<sup>50</sup> dejan claro que las tres hélices tienen diferente flexibilidad, siendo curiosamente la estructura antiparalela WC más flexible que las estructuras paralelas.

La estabilidad (energía libre total) de las estructuras helicoidales puede ser determinada como la contribución de un término intramolecular, de un término de solvatación y de un término entrópico. En este estudio no se ha considerado el término entrópico porque su cálculo implicaría simulaciones mucho más extendidas en el tiempo y porque no es de esperar que introduzcan cambios cualitativos en los resultados. Se encuentra una perfecta correlación lineal entre la longitud de la hélice (sin extremos terminales) y la energía libre total de las estructuras helicoidales, que permite obtener estimados precisos de la energía libre relativa de nucleación (las ordenadas al origen de las ecuaciones) y determinar la estabilidad relativa a medida que la longitud de los dúplexes aumenta (las pendientes de la ecuaciones). La pequeña magnitud de los errores en la ordenada al origen y en la pendiente, y la perfecta determinación del coeficiente garantiza la calidad estadística de las ecuaciones ajustadas. Estos resultados muestran una imagen cualitativamente correcta de la estabilidad de los dúplexes  $d(A\cdot T)_n$ , desde la mayor estabilidad de la hélice antiparalela con respecto a las hélices paralelas, a la mayor estabilidad de la hélice rWC con respecto a la hélice H. Es destacable que una parte de los resultados está indirectamente apoyado por datos experimentales de Germann y colaboradores<sup>51</sup>, quienes encontraron valores similares de nucleación para las hélices WC y rWC y un mejor factor de crecimiento para la hélice antiparalela.

Cuando se examina el término intramolecular y el término de solvatación resulta interesante ver la existencia de una dependencia polinomial de segundo orden en ambos componentes energéticos con la longitud de la hélice. Esto indica fuertes efectos cooperativos, efectos que se cancelan mutuamente al combinar ambos términos, dando lugar a la dependencia lineal de la energía libre total con la longitud de la hélice. La inspección de los resultados muestra la interdependencia entre los términos intramolecular y solvatación. En general, una hélice muy estable desde un punto de vista intramolecular no está bien solvatada, y *viceversa*. La dependencia polinomial de segundo orden de la energía libre de solvatación con la longitud del dúplex puede ser fácilmente comprendida considerando la dependencia de la energía libre de solvatación

con el cuadrado de la carga<sup>52</sup>. El origen de la dependencia de la energía intramolecular con la longitud del dúplex está menos claro, lo que conduce a analizar determinados componentes de la energía intramolecular.

1. *Interacciones por puente de hidrógeno*. Se encuentra una dependencia lineal con la longitud de los dúplexes para todas las estructuras helicoidales. Las interacciones Hoogsteen son más fuertes que las interacciones WC y rWC, que son muy similares entre sí, concordando con datos *ab initio* conocidos en fase gas<sup>53,54</sup>.

2. *Interacciones por stacking*. También se encuentra una dependencia lineal con la longitud de los dúplexes para todas las estructuras helicoidales. La hélice H también tiene las mejores interacciones de *stacking*, seguida de la hélice WC y finalmente la hélice rWC.

Como era de esperar, la dependencia de la energía total de pares de bases con la longitud del dúplex es lineal, y sugiere el sorprendente orden de estabilidad:  $H > WC > rWC$ . Este orden es diferente al predicho a partir de la energía libre total y a los datos encontrados experimentalmente. Esto demuestra que la estabilidad de una hélice no sólo viene determinada por la estabilidad relativa de las interacciones entre bases.

3. *Repulsión entre fosfatos*. La magnitud de la repulsión fosfato-fosfato es claramente mayor que la de las interacciones por puente de hidrógeno y *stacking*, lo cual indica que cualquier estructura helicoidal debe ser definida para minimizar la repulsión fosfato-fosfato. La repulsión fosfato-fosfato crece con la longitud del dúplex siguiendo una dependencia polinomial de segundo orden, indicando que esta repulsión es la responsable de la cooperatividad negativa de la energía intramolecular de los dúplexes de ADN. Para el rango de oligonucleótidos estudiado (de 5 a 15 pasos) la mayor repulsión entre fosfatos se encuentra para la hélice H, mientras que las hélices WC y rWC presentan valores similares.

En el apartado 4.4.2 y 4.4.3 se han examinado las características estructurales y las propiedades de reconocimiento molecular de una serie de dúplexes paralelos basados en

secuencias mixtas d(A·T) y d(G·C). También se ha examinado el efecto de los 8-amino derivados sobre la estabilidad de estas estructuras. Los resultados obtenidos se han comparado con los obtenidos para un dúplex antiparalelo con la misma secuencia.

Las simulaciones de MD de los dúplexes Hoogsteen muestran trayectorias estables. Las únicas distorsiones apreciables son una ligera curvatura en el extremo terminal d(G·C) y la existencia de movimientos que conllevan a la pérdida de puentes de hidrógeno en el extremo terminal d(A·T). Similares características ocurren en la hélice antiparalela de control. Es destacable la existencia de dos pares protonados d(G·C<sup>+</sup>) consecutivos que no introducen grandes alteraciones estructurales a la hélice confirmando los resultados obtenidos en MD de tríplexes (véase el apartado 4.3.1) y en concordancia con los datos de RMN<sup>33,34</sup>. Los análisis estructurales muestran que ambas simulaciones están convergidas y muestrean regiones similares del espacio conformacional próximas a la cadena Hoogsteen de un tríplex de ADN. Por lo tanto, las simulaciones sugieren que la estructura de las cadenas Hoogsteen de un tríplex no está muy distorsionada cuando la cadena de pirimidinas WC se elimina. En contraste con estos resultados, las simulaciones de dúplexes rWC partiendo del modelo de RMN<sup>55</sup> o del modelo canónico<sup>56</sup> divergen muy rápidamente distorsionando las estructuras, a pesar de los esfuerzos hechos para reforzar el equilibrado del sistema y los apareamientos entre bases. La tercera simulación, que parte de un modelo derivado de una trayectoria previamente equilibrada de un dúplex poli (A·T), permanece estable durante un periodo más largo, pero la hélice está muy distorsionada al final de la simulación. Los análisis de las trayectorias sugieren que la repulsión entre los grupos amino de la G y la C es el principal factor que causa la desestabilización de la hélice, a pesar de los esfuerzos para reducir la repulsión promoviendo el apareamiento *wobble* d(G·C)<sup>45</sup>. Las simulaciones de MD sugieren que, al menos para la secuencia considerada, el dúplex rWC no es estable, al contrario que las conformaciones Hoogsteen. Los resultados apoyan la existencia de motivos Hoogsteen para dúplexes paralelos en ADN con una población similar de pares d(A·T) y d(G·C).

La estabilidad de las simulaciones con motivos H permiten analizar la estructura helicoidal de estos dúplexes paralelos por primera vez. La hélice paralela es similar a la

estructura de las cadenas Hoogsteen en un tríplex de ADN. El *twist* promedio es de  $31^\circ$  y el *rise* de 3.4 Å. Las bases son bastante perpendiculares al eje de la hélice. Los azúcares están en las regiones Sur y Sur-Este con un ángulo de fase promedio de  $124^\circ$ , un valor muy próximo a los encontrados experimentalmente para dúplexes paralelos rWC<sup>55,57</sup> y tríplexes<sup>31,32,58,59</sup>. Presenta un surco muy estrecho que denominamos menor, correspondiente a la parte menor del surco mayor en un tríplex de ADN, y un amplio surco que denominamos mayor correspondiente a la parte mayor del surco mayor en un tríplex de ADN<sup>32</sup>. Esto evidencia grandes diferencias con los dúplexes paralelos rWC, donde se han encontrado dos surcos casi equivalentes<sup>54,55</sup>.

Los mapas de MIP permiten trazar las regiones donde el ADN tiene mayor propensión a interactuar con moléculas catiónicas. Como era de esperar por estudios previos en tríplexes<sup>31,32</sup>, el surco menor es la región más reactiva. Es destacable que la capacidad del dúplex H para interactuar con moléculas no es diferente de la que muestra el dúplex antiparalelo de la misma secuencia, a pesar del hecho que todas las citosinas en posición Hoogsteen estén protonadas. Esta claro que la corta distancia entre fosfatos en los dúplexes H crea un fuerte potencial negativo en las proximidades de las citosinas Hoogsteen que apantalla su carga positiva. Los mapas de solvatación muestran que el dúplex H está muy bien hidratado. La mayor densidad de agua aparente se encuentra en el surco menor, que es suficientemente ancho para permitir la inserción de una cadena de aguas ordenadas. Hay también regiones de gran densidad de agua en las proximidades de los grupos fosfatos en el surco mayor. Las densidades de agua aparentes alrededor del dúplex H y de la hélice antiparalela son muy similares, confirmando los resultados obtenidos de los cálculos cMIP. Resumiendo, el dúplex paralelo H es una nueva estructura que comparte muchas características con los tríplexes de ADN, pero que también exhibe una serie única de características reactivas derivadas principalmente de la existencia de dos surcos muy diferentes.

En artículos previos (véase el apartado 4.3.1)<sup>58,59</sup>, se presenta el diseño, la síntesis y la evaluación de una serie de 8-amino derivados de bases púricas. Estas moléculas estabilizaban fuertemente el tríplex de ADN, lo cual estaba relacionado entre otros factores a la interacción por puente de hidrógeno extra que se establecía entre el grupo

8-amino y el grupo carbonilo de la citosina o timina en posición Hoogsteen. También se ha encontrado que el grupo 8-amino promueve la desestabilización de los apareamientos WC, al menos en los pares d(G·C) y d(I·C)<sup>36</sup>. De acuerdo con esto, se podría esperar que la presencia de los grupos 8-amino desestabilizara el dúplex paralelo rWC e incrementara la estabilidad del dúplex H. Esta hipótesis se ha estudiado a partir de cálculos MD/TI realizados en el dúplex H. Desafortunadamente la inestabilidad del dúplex rWC evita cualquier cálculo con esta metodología.

Tal y como se ha encontrado en otros sistemas relacionados, los perfiles de mutación son suaves sin ninguna discontinuidad aparente, lo cual señala la inexistencia de histéresis. Los errores estándar en los valores de energía libre son pequeños indicando la buena convergencia en los estimados. Los resultados obtenidos indican una fuerte estabilización del dúplex H tras la introducción de las 8-amino purinas (con valores similares a los encontrados previamente<sup>58,59</sup>), sugiriendo que estas moléculas pueden ayudar a estabilizar horquillas basadas en los dúplexes paralelos H. Sin embargo, el hecho que la mutación G/I→8AG/8AI estabilice menos el dúplex H que la mutación A→8AA, lo cual concuerda con cálculos previos en tríplex, no está de acuerdo con los experimentos de fusión ( $T_m$ ) en las horquillas Hoogsteen. Esto sugiere que cuando 8AG (ó 8AI) está presente, el reconocimiento Hoogsteen no tiene porque estar en el motivo d(8AG·C<sup>+</sup>), y podría tratarse de un apareamiento *wobble* d(8AG·C)<sub>w</sub><sup>60</sup>. La mutación d(G/I·C<sup>+</sup>)→d(8AG/8AI·C)<sub>w</sub> es muy difícil técnicamente debido a la aniquilación de una carga neta. Para investigar esto se han realizado las mutaciones G→8AG y I→8AI en presencia de una citosina neutra en la posición complementaria Hoogsteen (el resto de las citosinas están protonadas). Los resultados sugieren que la presencia de 8-amino derivados estabiliza el apareamiento *wobble*. La diferencia de energía libre obtenida para los apareamientos *wobble* es 0.5 kcal/mol mayor que la encontrada para la mutación A→8AA y más de 2 kcal/mol que la estabilización debida a la misma mutación cuando las citosinas Hoogsteen están protonadas. De acuerdo con estos resultados, se puede sugerir la hipótesis que la presencia de 8AG y 8AI favorecen la existencia de motivos Hoogsteen neutros en lugar de las protonadas.

## 5.5 Referencias bibliográficas

- 1) McFail-Isom, L., Shui, X. & Williams, L.D. (1998) *Biochemistry*, **37**, 17105.
- 2) Mecozzi, S., West, A.P. & Dougherty, D.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10566.
- 3) Mecozzi, S., West, A.P. & Dougherty, D.A. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2307.
- 4) Luque, F.J. & Orozco, M. (1998) *J. Comp. Chem.*, **19**, 866.
- 5) Bader, R.F.W., Carroll, M.T., Cheeseman, J.R. & Chang, C. (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7968.
- 6) Bader, R.F.W. (1991) *Chem. Rev.*, **91**, 893.
- 7) Bader, R.F.W. (1990) *En Atoms in Molecules – A Quantum Theory*. Oxford University Press, Oxford.
- 8) Bader, R.F.W. & Chang, C. (1989) *J. Phys. Chem.*, **93**, 2946.
- 9) Koch, U., Popelier, P. (1995) *J. Phys. Chem.*, **99**, 9747.
- 10) Popelier, P.L.A. (1998) *J. Phys. Chem. A*, **102**, 1873.
- 11) Boyd, R.J. & Choi, S.C. (1986) *Chem. Phys. Lett.*, **129**, 62.
- 12) Bader, R.F.W., Tang, T.H., Tal, Y. & Biegler-König, F.W. (1982) *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 946.



- 
- 13) Hanson, A.W. (1965) *Acta Crystallogr.*, **19**, 19.
- 14) Wiberg, K.B., Nakaji, D. & Breneman, C.M. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4178.
- 15) Hobza, P. & Havlas, Z. (2000) *Chem. Rev.*, **100**, 4253.
- 16) Hobza, P., Spirko, V., Selzle, H.L. & Schlag, E.W. (1998) *J. Phys. Chem. A*, **102**, 2501.
- 17) Møller, C. & Plesset, M.S. (1934) *Phys. Rev.*, **46**, 618.
- 18) Tang, T.H., Hu, W.J., Yan, D.Y. & Cui, Y.P. (1990) *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **207**, 319.
- 19) Mallison, P.R., Wozniak, K., Smith, G.T. & McCormack, K.L. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 11502.
- 20) Rozas, I., Alkorta, I. & Elguero, J. (1997) *J. Phys. Chem. A*, **101**, 9457.
- 21) Alkorta, I., Rozas, I. & Elguero, J. (1998) *Theor. Chem. Acc.*, **99**, 116.
- 22) Rozas, I., Alkorta, I. & Elguero, J. (1998) *J. Phys. Chem. A*, **102**, 9925.
- 23) Alkorta, I., Rozas, I. & Elguero, J. (1998) *Struct. Chem. Acc.*, **9**, 243.
- 24) Alkorta, I. & Elguero, J. (1999) *J. Phys. Chem. A*, **103**, 272.
- 25) Kool, E.T. (1997) *Chem. Rev.*, **97**, 1473.
- 26) Loakes, D. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2437.

- 27) Turner, D.H., Sugimoto, N., Kierzek, R. & Dreiker, S.D. (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3783.
- 28) SantaLucia, J.Jr., Allawi, H.T. & Seneviratne, P.A. (1996) *Biochemistry*, **35**, 3555.
- 29) Schweitzer, B.A. & Kool, E.T. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 1863.
- 30) Soliva, R., Luque, F.J., Alhambra, C & Orozco, M. (1999) *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **17**, 89.
- 31) Soliva, R., Laughton, C.A., Luque, F.J. & Orozco, M. (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11226.
- 32) Shields, G., Laughton, C.A. & Orozco, M. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 7463.
- 33) Radhakrishnan, I. & Patel, D.J. (1994) *Biochemistry*, **33**, 11405.
- 34) Asensio, J.L., Brown, T. & Lane, A.N. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3677.
- 35) Dickerson, R.E. (1992) *Methods Enzymol.*, **211**, 67.
- 36) Rueda, M., Luque, F.J. & Orozco, M. (2001) Pendiente de publicación.
- 37) Guckian, K.M., Krugh, T.R. & Kool, E.T. (1998) *Nature Struct. Biol.*, **5**, 954.
- 38) Chen, Y.Z., Mohan, V. & Griffley, R.H. (1998) *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **16**, 765.
- 39) Kool, E.T (1988) *Biopolymers*, **48**, 3.
- 40) Moran, S., Ren, R.X.F. & Kool, E.T. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10506.

- 41) Liu, D.Y., Moran, S. & Kool, E.T. (1997) *Chem. Biol.*, **4**, 919.
- 42) Marky, L.A. & Breslauer, K.J. (1987) *Biopolymer*, **26**, 1601.
- 43) Roberts, R.W. & Crothers, D.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4320.
- 44) Westhof, E. & Sundaralingam, M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1852.
- 45) Mohammadi, S., Klement, R., Shchyolkina, A.K., Liquier, J., Jovin, T.M. & Taillandier, E. (1998) *Biochemistry*, **37**, 16529.
- 46) Lavelle, L. & Fresco, J.R. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2692.
- 47) Hashem, G.M., Wen, J.D., Do, Q. & Gray, D.M. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3371.
- 48) Kandimalla, E.R. & Agrawal, S. (1996) *Biochemistry*, **35**, 15332.
- 49) Sherer, E.C., Harris, S.A., Soliva, R., Orozco, M. & Laughton, C.A. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5981.
- 50) Schäfer, H., Daura, X., Mark, A.E. & van Gunsteren, W.F. (2001) *Proteins*, **43**, 45.
- 51) Germann, M.W., Kalisch, B.W., Pon, R.T. & van de Sande, J.H. (1990) *Biochemistry*, **29**, 9426.
- 52) Orozco, M. & Luque, F.J. (2000) *Chem. Rev.*, **100**, 4187.
- 53) Hobza, P. & Šponer, J. (1999) *Chem. Rev.*, **99**, 3247.

- 54) Hobza, P., Kabelac, M., Šponer, J., Mejzlik, P. & Vondrasek, J. (1997) *J. Comp. Chem.*, **18**, 1136.
- 55) Yang, X.L., Sugiyama, H., Ikeda, S., Saito, I. & Wang, A.H. (1998) *Biophysical J.*, **75**, 1163.
- 56) Pattabiraman, N. (1986) *Biopolymers*, **25**, 1603.
- 57) Zhou, N., Germann, M.W., van de Sande, J.H., Pattabiraman, N. & Vogel, H.J. (1993) *Biochemistry*, **32**, 646.
- 58) Soliva, R., Güimil-García, R., Blas, J.R., Eritja, R., Asensio, J.L., González, C., Luque, F.J. & Orozco, M. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4531.
- 59) Güimil-García, Ferrer, E., Macías, M.J., Eritja, R. & Orozco, M. (2000) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1991.
- 60) Soliva, R., Luque, F.J. & Orozco, M. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2248.

## **6 Conclusiones**

*(Esta página está intencionadamente en blanco)*

1. La polarización juega un papel clave en la estabilización de las interacciones catión  $\rightarrow$  sistema aromático, particularmente en las interacciones  $\pi$ -catión. El efecto es especialmente notorio cuando se comparan interacciones en anillos aromáticos de diferente tamaño.
2. La metodología GMIPp es una herramienta muy poderosa y muy rápida para la predicción de interacciones no enlazantes, incluida la unión de cationes a compuestos aromáticos.
3. Los sustituyentes y la presencia de heteroátomos o de anillos fusionados tienen una profunda influencia en las características topológicas de la densidad electrónica en sistemas  $\pi$ -catión con el mismo núcleo aromático, como anillos de 5 o 6 miembros. Con la excepción de los complejos que involucran anillos de 5 miembros, hay fuertes relaciones entre la densidad de carga en los puntos críticos de celda y los parámetros energéticos y geométricos de los complejos. Estas relaciones permiten generalizar el concepto de orden de enlace-longitud de enlace encontrados en otras interacciones intermoleculares.
4. El análisis topológico de los puentes de hidrógeno intermoleculares en sistemas C-H $\cdots\pi$  no muestra diferencia alguna entre los complejos con puentes de hidrógeno impropios y con puentes de hidrógeno convencionales. Ambos cumplen por completo los criterios de Koch y Popelier para este tipo de interacciones.
5. El análisis de *Atoms in Molecules* confirma la existencia de los puentes de hidrógeno N-H $\cdots$ O en el par A·U, pero no es concluyente en el caso de los contactos C-H $\cdots$ O. Los resultados muestran claramente que los contactos C-H $\cdots$ O en el par A·U no corresponden ni a un puente de hidrógeno convencional ni tampoco a un puente de hidrógeno impropio. En los pares U·U, dicho análisis

confirma la existencia de dos puentes de hidrógeno convencionales, N-H...O y C-H...O.

6. Los grupos amino unidos a la posición 2 y 8 de la hipoxantina no provocan ningún cambio en la estructura general de dúplexes y tríplexes, pero sí inducen alteraciones en la estabilidad de las hélices. Un grupo amino en posición 2 estabiliza tanto dúplexes como tríplexes, mientras que un grupo amino en posición 8 estabiliza tríplexes y desestabiliza dúplexes. Este comportamiento, que ha sido verificado experimentalmente, se debe a una sutil redistribución electrónica, y demuestra la peligrosidad de hacer predicciones de la estabilidad energética a partir de únicamente el recuento de puentes de hidrógeno.
7. La mutación T→F no conduce a modificaciones importantes en la estructura o en la reactividad de los dúplexes ni de los tríplexes de ADN, pero produce cambios importantes en la dinámica, concretamente en la aparición de fenómenos de respiración en el paso mutado. Estos movimientos de respiración aparecen en todas las estructuras de ADN (dúplex o tríplex) que contienen F, pero son más comunes cuando la mutación se encuentra en la posición Watson-Crick.
8. La sustitución T→F desestabiliza las estructuras de los dúplexes y tríplexes de ADN. Los resultados sugieren que la mutación T→F es más desestabilizadora en la posición Watson-Crick que en la Hoogsteen. Los resultados cuantitativos derivados de cálculos MD/TI concuerdan bien con los datos experimentales en dúplexes, siendo una predicción para los tríplexes.
9. Las dobles hélices de ADN basadas en motivos poli (A·T) son intrínsecamente estables en soluciones acuosas tanto si son paralelas como antiparalelas. Los cálculos MM-PB/SA acoplados a dinámicas moleculares detectan que la hélice antiparalela es la estructura helicoidal más estable y más flexible. La diferencia de estabilidad entre la hélice antiparalela y las hélices paralelas aumenta linealmente con la longitud de los oligonucleótidos. Los mismos cálculos



sugieren que la hélice WC reversa es más estable que la hélice Hoogsteen, la diferencia se relaciona con una mejor energía de nucleación de la hélice WC reversa.

10. Las simulaciones de dinámica molecular no proporcionan estructuras helicoidales estables para secuencias que contienen un número similar de pares d(A·T) y d(G·C) dispuestos en la estructura WC reversa. Por el contrario, se encuentran trayectorias estables cuando se asume el apareamiento Hoogsteen. Las estructuras obtenidas en estas trayectorias permiten caracterizar la estructura de doble hélice paralela Hoogsteen, cuya conformación es próxima a la que muestran las cadenas Hoogsteen de un tríplex de ADN.
11. Los derivados 8-aminopurina son capaces de aumentar la estabilidad de las dobles hélices paralelas en conformación Hoogsteen, lo que permite diseñar nuevas moléculas potencialmente útiles en terapias *antigene* y *antisense*.

*(Esta página está intencionadamente en blanco)*

## **Otros trabajos publicados**

*(Esta página está intencionadamente en blanco)*

**E. Cubero**, M. Orozco & F.J. Luque. *Theoretical study of azido-tetrazole isomerism: effect of solvent and substituents, and mechanism of isomerization*. J. Am. Chem. Soc. **1998**, *120*, 4723-4731.

**E. Cubero**, M. Orozco & F.J. Luque. *Azidoazomethine-tetrazole isomerism in solution: a thermochemical study*. J. Org. Chem. **1998**, *63*, 2354-2356.

M. Orozco, **E. Cubero**, X. Barril, C. Colominas & F.J. Luque. *Nucleic acid bases in solution* en Computational Molecular Biology. Theoretical Computational Chemistry. Volume 8, Chapter 4, pp. 119-166. J. Leszczynski. (Ed.) Elsevier Science, Amsterdam, 1999.

M. Orozco, **E. Cubero**, B. Hernández, J.M. López & F.J. Luque. *Interactions of nucleic acid bases: the role of solvent* en Computational Chemistry: Reviews of Current Trends. Volume 4, Chapter 4, pp. 191-225. J. Leszczynski. (Ed.) World Scientific Publishing, Singapore, 1999.

**E. Cubero**, M. Orozco & F.J. Luque. *Electron density topological analysis of the C-H...O anti-hydrogen bond in the fluoroform-oxirane complex*. Chem. Phys. Lett. **1999**, *310*, 445-450.

**E. Cubero**, F.J. Luque, M. Orozco & J. Gao. *A perturbation approach to combined QM/MM simulation of solute-solvent interactions in solution*. Pendiente de publicación, **2001**.

*(Esta página está intencionadamente en blanco)*

## **Agradecimientos**

*(Esta página está intencionadamente en blanco)*



Me gustaría aprovechar este capítulo para expresar mi gratitud a todas aquellas personas que me han ayudado, de una manera u otra, durante la realización de la tesis.

En primer lugar, al Dr. Modesto Orozco y al Dr. F. Javier Luque por ofrecerme la oportunidad de trabajar con ellos. Gracias por vuestra confianza, comprensión, esfuerzo y dedicación. Me siento muy afortunada de formar parte de este gran equipo.

Al Dr. Josep Lluís Gelpí por sus buenos consejos y su ayuda incondicional.

A Bego, Carles, Robert, Xavi y Cristóbal por todo lo que he aprendido a vuestro lado y, sobre todo, por la amistad que nos ha unido dentro y fuera del laboratorio.

Al resto de compañeros del grupo de Reconeixement Molecular. Gracias por vuestra colaboración, trabajar con todos vosotros es un placer.

Al Dr. Charlie Laughton y al Dr. Jiali Gao por su hospitalidad durante mi estancia en sus respectivos grupos. Gracias por vuestros consejos e inestimable ayuda.

A todos aquellos investigadores que han colaborado con sus trabajos científicos en la realización de esta tesis.

A mi familia por el interés y el apoyo que siempre me estáis transmitiendo.

A Joaquín, con quien tengo la suerte de compartir muchas cosas. Gracias por hacer que todo parezca más fácil.

Finalmente, me gustaría recordar a todas aquellas personas que no han realizado ninguna aportación directa en este trabajo, pero que han contribuido diariamente a mi formación como persona.

El presente trabajo se ha llevado a cabo gracias a la ayuda proporcionada por una beca predoctoral de Recerca i Docència de la Universitat de Barcelona.

A todos vosotros, GRACIAS.

*(Esta página está intencionadamente en blanco)*