



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcienc.edu.uy

**NO₂CLA como blanco de adición tipo Michael por tioles
Estudio *in silico* de la modulación según la naturaleza del
biotiol en solución y en LBD de PPAR γ**

Autor: Alexander Cantou

Tesina de graduación

Licenciatura en Bioquímica

Febrero 2018

Tutora: Dra. E. Laura Coitiño

Co-tutora: Lic. Stephanie Portillo

Laboratorio de Química Teórica y Computacional
Instituto de Química Biológica - Facultad de Ciencias
Universidad de la República

RESUMEN

Los nitroalquenos del ácido linoleico conjugado (NO₂CLA) han sido asociados a distintas acciones metabólicas tales como la reducción de grasa corporal, el mejoramiento de cuadros de resistencia a la insulina y acciones protectoras contra el daño tisular, entre otras. Estos efectos parecen estar relacionados con su capacidad de interacción con receptores nucleares, como PPAR γ . Se ha propuesto que los nitro-derivados de ácidos grasos insaturados ejercen función de regulación agonista de PPAR γ por unión covalente con el residuo Cys285 del bolsillo de unión al ligando (LBD) a través de reacciones químicas reversibles de tipo tiol-Michael. Existen antecedentes del estudio de NO₂CLA como aceptor de Michael frente a una serie de tioles de bajo peso molecular, incluyendo β -mercaptoetanol (β ME), cisteína (Cys), homocisteína (Hcy), cisteinglicinilo (CysGly) y glutatión (GSH). En dicho estudio se caracterizó esta reacción con una estrategia experimental-computacional integrada, proponiendo un mecanismo por etapas donde la adición directa del tiolato forma aductos nitronato que posteriormente se protonan e isomerizan, con diferencias cinéticas significativas entre la adición sobre los centros C β y C δ de NO₂CLA.

En esta tesina se estudiaron los efectos del cambio de biotiol sobre su carácter nucleofílico. Se caracterizaron los isómeros 9- y 12-NO₂CLA con indicadores de reactividad, comparando regioisómeros entre sí y respecto al modelo reducido representativo empleado en el estudio previo de base. Se estudiaron los efectos del cambio de tiol sobre la primera etapa de la adición tiol-Michael C β /C γ sobre NO₂CLA para tres casos de la serie anterior (β ME, Cys y Hcy), analizando especialmente posibles diferencias entre los canales de adición en β y δ . Por último, se caracterizó la interacción de 9/12-NO₂CLA en el bolsillo de unión al ligando (LBD) de PPAR γ , considerando sus posibilidades de actuar como aceptor de Michael en relación a la Cys285 del LBD. La estructura electrónica de las especies químicas se describió con métodos DFT al nivel ω B97X-D/6-31G(d,p), incorporando efectos del solvente con el método IEF-PCM (cavidad de forma molecular con radios de Bondi y contribuciones no electrostáticas). Se evaluaron cargas atómicas e índices de enlace de Wiberg por análisis poblacional de orbitales naturales (NPA). La interacción de NO₂CLA con PPAR γ se simuló por Dinámica Molecular (100 ns, NPT a 310 K y 1 atm, PME) considerando el LBD solo y en presencia 9- y 12-NO₂CLA como ligandos. Se usó el campo de fuerza AMBER ff14SB para la proteína y *gaff* con cargas RESP para los ligandos.

Se concluyó que la naturaleza del biotiol participante en la reacción de adición tipo Michael modula sus características. Se mostró que el modelo reducido de NO₂CLA captura las características principales de su reactividad como aceptor de Michael y las preferencias cinéticas entre los dos canales de adición de tioles. La termodinámica de la adición y la relación entre las barreras de activación de los canales β/δ se mantienen incambiables ante el cambio de biotiol, en concordancia con los antecedentes conocidos. Un análisis más detallado del grado de avance de la reacción de formación del aducto en el estado de transición del proceso mostró diferencias entre β ME, Cys y Hcy. La transferencia de carga es mayor para aquellos con mayor carga sobre el átomo de azufre, mientras que la reorganización nuclear es más marcada cuanto menor es dicha carga. Finalmente, no se encontró a ninguno de los regioisómeros de NO₂CLA en cercanía suficiente a Cys285 para reaccionar. Si bien cada regioisómero se ubica en forma distinta en el LBD, ambos lo hacen en la zona reportada para ligandos con acción agonista parcial de PPAR γ .

Palabras Clave: reacción tiol-Michael; biotioles; NO₂CLA; PPAR γ ; *in silico*.

TABLA DE CONTENIDOS

1 INTRODUCCIÓN

- 1.1 Nitroalquenos del ácido linoleico conjugado como electrófilos y aceptores de Michael
- 1.2 Reacción de adición tipo Michael con biotioles como nucleófilos
- 1.3 Antecedentes directos sobre la reacción tipo Michael entre biotioles y NO₂CLA
- 1.4 Receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales. Generalidades
- 1.5 PPAR γ : Estructura e interacción con ligandos moduladores de su función

2 OBJETIVOS

- 2.1 Objetivos generales
- 2.2 Objetivos específicos

3 METODOLOGÍA

- 3.1 Generalidades metodológicas
- 3.2 Nucleofilia de biotioles de bajo peso molecular y electrofilia de isómeros del NO₂CLA como indicadores de reactividad
 - 3.2.1 Descriptores globales de reactividad
 - 3.2.2 Descriptores locales de reactividad
- 3.3 Reacción tipo Michael de β ME, Cys y Hcy sobre C β y C δ de NO₂CLA. Efecto del cambio de biotiol
- 3.4 Interacción de 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA en LBD de PPAR γ . Dinámica Molecular.
 - 3.4.1 Preparación del LBD de PPAR γ partiendo de su estructura cristalográfica
 - 3.4.2 Preparación de 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA como ligandos en el LBD de PPAR γ
 - 3.4.3 Dinámica Molecular (MD) del LBD de PPAR γ sin y con 9 y 12-NO₂CLA como ligandos. Análisis de trayectoria

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 4.1 Variación de la reactividad general y como nucleófilos en la serie de tioles.
- 4.2 Electrofilia en regioisómeros de 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA y validación de modelo reducido (RM) de cara al estudio de la reacción tiol-Michael
- 4.3 Efecto del cambio de biotioles en la primera etapa de la reacción de adición tipo Michael para C β y C δ de NO₂CLA.
- 4.4 Interacción de 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA con LBD de PPAR γ .

5 CONCLUSIONES

6 REFERENCIAS

1)INTRODUCCION

1.1) Nitroalquenos del ácido linoleico conjugado como electrófilos y aceptores de Michael

Los Nitroalquenos del Ácido Linoleico Conjugado (NO₂CLA) son el producto de nitración de los Ácidos Linoleicos Conjugados (CLA) formados por estereoisómeros e isómeros posicionales de ácido octadecadienoico [ácido linoleico (LA), 18:2]. Estos se definen como conjugados al presentar al menos dos enlaces dobles C=C, distanciados entre ellos por un enlace simple C-C. Desde el punto de vista fisiológico, la electrofilia del grupo de los nitroalquenos de ácidos grasos insaturados (NO₂FA por su sigla en inglés) es fundamental porque determina una serie de propiedades antiinflamatorias y citoprotectoras que han sido reportadas para a este grupo. Esto se ha relacionado a su vez con efectos beneficiosos en varios modelos de enfermedades tales como la aterosclerosis, reestenosis, reperfusión isquémica, lesión renal, diabetes, el síndrome metabólico y la endotoxemia. También, la formación endógena de NO₂FA se ha asociado con efectos cardioprotectores [1-4]. Siendo que el grupo nitro es uno de los grupos funcionales atractor de electrones más fuertes conocidos, su presencia cercana a la conjugación de alquenos le confiere a este grupo de compuestos químicos propiedades excepcionalmente electrofílicas y lo hace objetivo esperable de reacciones de adición tipo Michael [5]. La participación en este tipo de reacciones es uno de los mecanismos propuestos para varias de las vías de regulación, tanto en solución en el plasma, como en contexto proteico [6,7]. El precursor de NO₂CLA más abundante es el *ácido cis,trans-9,11-octadecadienoico*, que representa más del 90% de la ingesta de CLA en la dieta. Este isómero, y el *ácido trans,cis-10,12 octadecadienoico* son los que se han usado principalmente en los estudios en animales, mostrándose que son éstos los que tienen mayores efectos de interés en diferentes sistemas biológicos [8]. Teniendo lo anterior en cuenta, se han investigado efectos de sus productos nitrados, los isómeros 9- y 12-NO₂CLA como fundamentales en las vías metabólicas ya mencionadas. La electrofilia de estos isómeros es estudiada en un trabajo del año 2016, mostrando dos zonas con tendencia electrón-aceptora en los átomos de C β y C δ de la doble conjugación. Mediante estudio computacional, se identificaron diferencias entre estas zonas, mostrando un mayor carácter eletrofílico sobre el C β según se muestra en la **figura 1**.

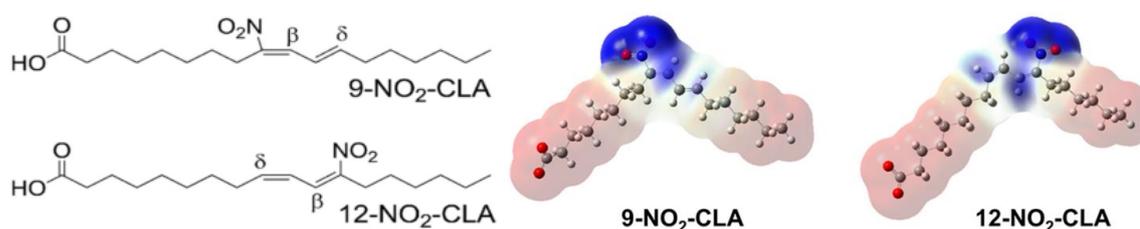


Figura 1: Izquierda. Fórmula química desarrollada del 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA señalando los C β y C δ . **Derecha:** Electrofilia de isómeros de NO₂CLA mostrada por función de Fukui f⁺(r) mapeado sobre la superficie de densidad de electrones total de 0,0004 au. Las áreas positivas representadas en azul representan las regiones electrofílicas. Tomado de Turell *et.al.* (2016). [9]

Previamente, en 2007, algunos autores estudiaron las características de la reacción entre NO₂FA con cisteína (Cys) y glutatión (GHS) en solución, proponiendo un mecanismo de adición tipo Michael en dos etapas como explicación para la reacción con nucleófilos fuertes

como tiolatos [10]. En dicho trabajo, se reporta la cinética de reacción de nitroalquenos con GSH y Cys y se determinan para esta reacción una constantes de velocidad de segundo orden y observan que los derivados de NO₂FA reaccionan con estos tioles a constantes de reacción que exceden a la mayoría de los electrófilos obtenidos de ácidos grasos.

En la misma línea pero en otro contexto bioquímico, la reacción de Michael en contexto proteico se ha propuesto para explicar la unión a ligando de varios ácidos grasos oxidados en el bolsillo de unión a ligando (LBD) del receptor nuclear PPAR γ (sigla en inglés para el receptor activado por proliferador peroxisomal *gamma*) un receptor nuclear que se une a ligandos lipofílicos. En 2005 se publica un artículo identificando el ácido nitrolinoleico (LNO₂) como ligando de PPAR γ . Se abordará más adelante las características de este receptor nuclear, pero resumidamente los efectos posteriores de la activación de PPAR incluyen la modulación de genes de diferenciación metabólica y celular y la regulación de respuestas inflamatorias, adipogénesis y homeostasis de glucosa. Se muestra que el ácido nitrolinoleico (LNO₂) es un ligando de alta afinidad para este receptor nuclear [11]. En 2006, se resuelve la estructura cristalina del complejo PPAR γ con LNO₂ a 2,4 Å de resolución y se muestra una red de interacciones en el Dominio de Unión a Ligando, que se presentará en mayor detalle en este trabajo cuando se aborden los antecedentes de PPAR γ [12]. También en 2008 se reporta un aducto entre la Cys285 de este receptor nuclear con el ácido 4-oxo-docosahexaenoico (4-oxoDHA) y el ácido 6-oxo-octadecatrienoico (6-oxoOTE) como se muestra en la **figura 2**, siendo el mecanismo de tior-Michael el propuesto para esta adición, [13]. En 2009 se prueba que el isómero del ácido linoleico 12-LNO₂ es el isómero nitrado de linoleico de mayor potencia activadora de PPAR γ , mostrando el nivel máximo más alto de activación de la transcripción dependiente de PPAR γ y el EC50 más bajo [14]. Todas estas investigaciones plantean como posible la reacción tipo Michael en entorno de proteína.

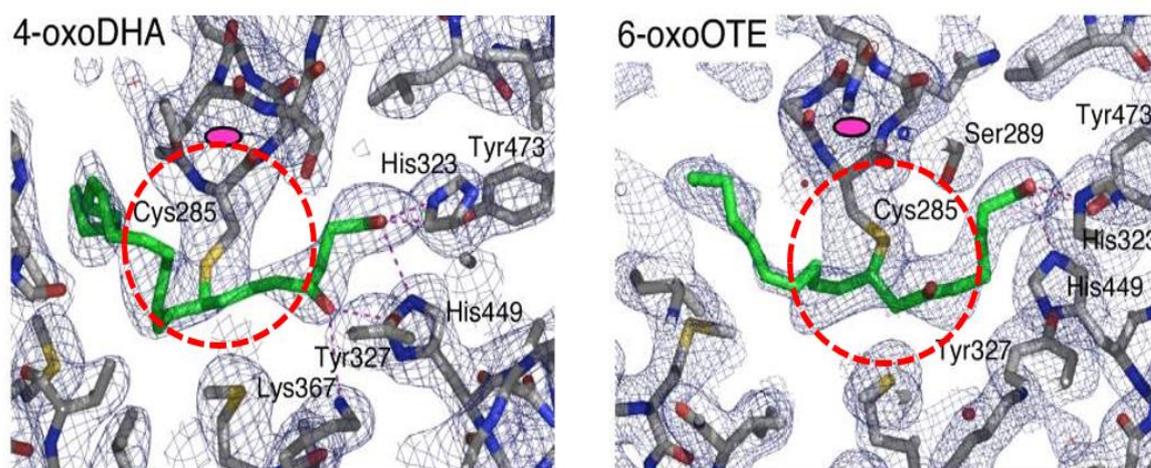


Figura 2: Ubicación de dos ácidos grasos oxidados en LBD de PPAR γ mostrando unión covalente con Cys285. Se destaca en círculo rojo la unión zona de unión covalente. Tomado de Itoh *et al.* (2008). [13]

1.2 Reacción de adición tipo Michael con btiotes como nucleófilos

La reacción de adición tipo Michael fue mencionada previamente en referencia al carácter electrofílico del NO_2CLA . Esta se caracteriza ampliamente como la reacción conjugada de un nucleófilo con un alqueno deficiente en electrones. Más específicamente las reacciones de Michael se describen como un tipo especial de adición conjugada en la que el ataque de un nucleófilo fuerte sobre el carbono β de un sistema α - β insaturado, que da como resultado un enolato cargado negativamente como intermediario, que posteriormente produce el aducto de Michael al protonarse [15]. Se puede realizar en condiciones de reacción muy suaves y tolera diferentes grupos funcionales. Desde que Arthur Michael la propuso a fines de la década de 1880, se han descubierto e implementado extensamente una variedad de reacciones químicas de adición de Michael, para construir una variedad de herramientas con una gama de reacciones obteniéndose productos altamente selectivos de manera eficiente en condiciones de reacción poco agresivas ambientalmente. [5,16]. Desde una perspectiva cinética y de reactividad, se han propuesto inicialmente para las reacciones de adición y eliminación tipo Michael dos mecanismos posibles. Dependiendo de los nucleófilos y electrófilos participantes así como de las condiciones de reacción, uno de ellos plantea un mecanismo concertado, y el otro por etapas, implicando este último la participación de carbaniones en especies intermediarias [17]. Más recientemente, en 2007, se propuso un mecanismo de adición tipo Michael para nucleófilos fuertes en ataque a nitroalquenos en dos etapas, sin participación de carbanión, sino deslocalización de la carga hacia el grupo nitro (figura 3) [10].

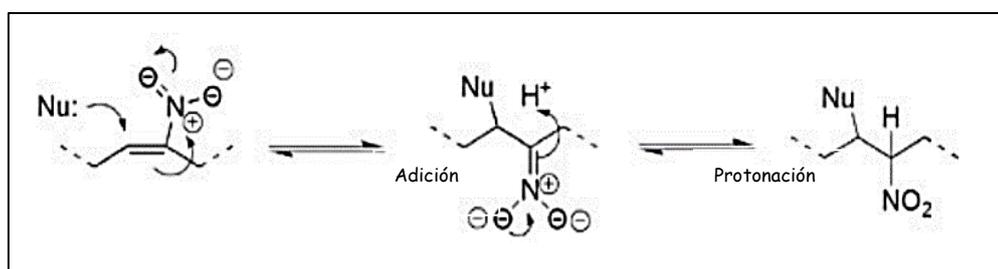


Figura 3: Esquema representativo de adición tipo Michael. Reacción de nucleófilo genérico (Nu:), con un nitroalqueno conjugado. Tomado de Baker *et al.* (2007). [10]

Dentro del amplio grupo de reacciones de Michael reportadas, para esta tesina interesa especialmente aquellas en las que la especie nucleófila es un tiol. A estas se les denomina generalmente adiciones tiol-Michael. El primer informe de la reacción de adición de tiol-Michael fue en la década de 1960 [18]. Desde su uso en síntesis y química de los materiales, la versatilidad aportada por el enlace débil de azufre-hidrógeno permite iniciar la reacción de adición de tiol-Michael usando una amplia variedad de precursores. A lo largo de los años, esta reacción se ha adaptado para progresar en condiciones de reacción suaves sin disolvente utilizando catalizadores también suaves para producir una reacción altamente eficiente [19].

Los tioles presentan características químicas y fisicoquímicas que los hacen particularmente tendientes al comportamiento nucleofílico en estas reacciones. Desde el punto de vista químico, los tioles son análogos sulfurados de los alcoholes, con un grupo $-\text{SH}$,

que reemplaza al grupo alcohol -OH. Sin embargo, el carácter ácido en los tioles es mayor que en los alcoholes por dos motivos principales. En primer lugar, los enlaces S-H se rompen con más facilidad que los enlaces O-H. En segundo lugar, el ion tiolato tiene la carga negativa más deslocalizada por ser el azufre un átomo de mayor tamaño, lo que genera mayor estabilidad en el tiolato respecto al alcóxido [15]. Debido a la combinación de orbitales-*d* y a la densidad de electrones asociada con el azufre, los tioles se clasifican como nucleófilos blandos en comparación con sus equivalentes de alcohol y amina, y típicamente exhiben alta reactividad con sustratos propensos a la reacción con nucleófilos fuertes. Los aniones nucleófilos de tiolato, y los radicales tiilo electrófilos son especies altamente reactivas que se utilizan en una amplia gama de procesos en condiciones relativamente benignas. [19].

Desde el campo de las aplicaciones bioquímicas y farmacéuticas, las reacciones de tiol-Michael entre compuestos que actúan como ligandos inhibidores covalentes en proteínas con residuos que contienen azufre son bastante conocidas y exploradas para la síntesis de drogas de acción inhibidora total [20-22]. Una estrategia que ha producido varios medicamentos aprobados por la FDA, es la inhibición covalente dirigida. En esta, un compuesto relativamente pequeño con capacidad de unión covalente a algún residuo de la proteína diana, se une a un ligando que reconoce el sitio de unión a través de interacciones no covalentes. La selectividad del objetivo se maximiza diseñando el inhibidor de modo que la formación del enlace covalente implique un residuo no catalítico poco conservado. La adición de un aceptor de Michael a un grupo tiol de cisteína es una modalidad común de diseño de inhibidor covalente dirigido. Cys es un aminoácido importante en la regulación metabólica y juega un papel crucial en la síntesis de proteínas, desintoxicación, integridad estructural y funcional de muchas enzimas esenciales. Un desarrollo más reciente tiene el concepto de inhibición covalente reversible. Este tipo de interacción implica que el enlace covalente se puede romper fácilmente para liberar el inhibidor. La formación de enlaces reversibles introduce la posibilidad de desarrollar inhibidores que formen interacciones de larga duración, pero no necesariamente permanentes, con la proteína diana. Las ventajas potenciales de los inhibidores covalentes reversibles incluyen mejores márgenes de seguridad y aplicabilidad a enfermedades crónicas [23-26].

La cisteína no es el único tiol de importancia fisiológica capaz de actuar como especie nucleofílica en una adición tiol-Michael. Al grupo de tioles de importancia y presencia biológica se les denomina en forma genérica *biotioles*. Entre ellos se encuentra el tripéptido GHS, el tiol no proteico más abundante a nivel citosólico. Otros tioles que contribuyen al total de concentración intracelular son los precursores para la síntesis de GSH, los aminoácidos homocisteína, cisteína y el dipéptido glutamilmcisteína. Como primer producto de la degradación de GSH, el dipéptido cisteinilglicina (Cys-Gly) también aporta a la concentración total de biotioles citosólicos [27]. El tiol más abundante en el plasma sanguíneo humano es la Cys34 en la albúmina sérica humana (HSA) [28], aunque también se encuentran GHS, Cys, Hcy y Cys-Gly libres en plasma. Se ha reportado al GSH se conjugado con xenobióticos y electrófilos celulares y reaccionando con ácidos grasos nitrados. Un nivel insuficiente de GSH en el cuerpo humano está asociado con la pérdida de leucocitos, cáncer, y enfermedades neurodegenerativas [29]. También, se ha mostrado que los residuos Cys de proteínas forman fácilmente aductos con electrófilos derivados de lípidos, y se han detectado conjugados de proteínas con nitroalquenos en glóbulos rojos de humanos sanos [10]. Además de esto, un nivel elevado de Hcy está involucrado en la enfermedad de Alzheimer, la preeclampsia y las enfermedades cardiovasculares [30].

Otro de los factores a considerar sobre los biotioles como nucleófilos en reacción tiol-Michael es la relación comprobada entre su reactividad durante la primera etapa de adición, y el pK_a del tiol reaccionante. En el antecedente directo de este trabajo se estudia la reactividad de una serie de biotioles de bajo peso molecular en la reacción tipo Michael con nitroalquenos del ácido linoleico conjugado. En este trabajo se reporta la k_{on} a pH independiente para cada biotiol estudiado, siendo esta indicador la reactividad intrínseca de cada tiolato. Para la reacción rápida, el registro de k_{on} , pH-independiente aumentó con el pK_a del tiol. Los autores concluyen que la nucleofilia del mismo se correlaciona con la basicidad del protón y es coherente con la participación del tiolato en la adición directa y posterior formación del estado de transición. Esta relación se presenta en una gráfica de Bronsted según la **figura 4**.

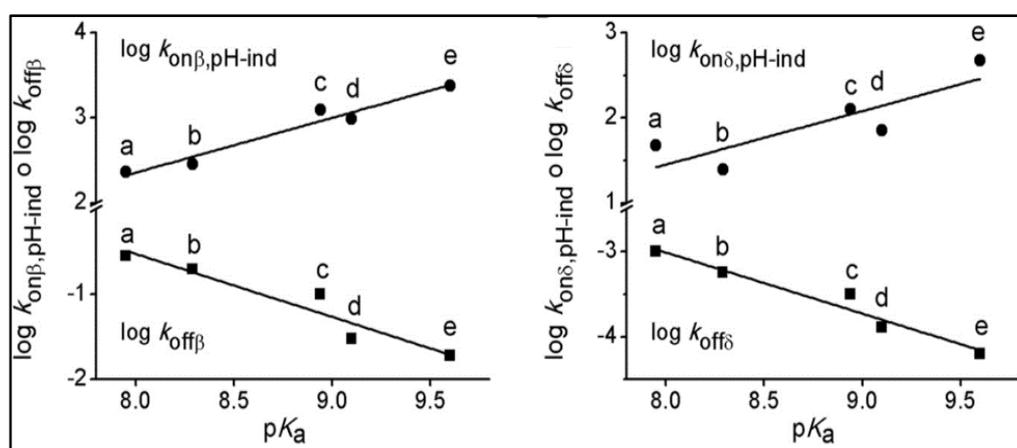


Figura 4: Gráficos de Bronsted para $\log k_{on\text{pH-indep}}$ y k_{off} en reacción de biotioles en reacción con $C\beta$ y $C\delta$ de NO_2CLA a- CysGLy; b- Cys; c- GHS; d- Hcy; e- β ME. Tomado de Turell *et al.* (2016). [9]

1.3) Antecedentes directos sobre la reacción tipo Michael entre biotioles y NO_2CLA

Como mencionamos previamente, el punto de unión entre los dos caminos de investigación que desembocan en los NO_2CLA ocurre en 2012, cuando se reconoce al CLA como el principal sustrato *in-vivo* de nitración. En este estudio se demuestra que los dienos conjugados, especialmente el CLA, son un objetivo preferencial de las reacciones de nitración durante las condiciones inflamatorias oxidativas y la digestión. Se reporta una producción de hasta 10^5 veces mayor que para otros ácidos grasos insaturados. Esta nitración preferencial en condiciones específicas se generan durante la digestión, el estrés metabólico y la inflamación relacionadas con estrés oxidativo. Los productos de nitración están presentes en plasma humano y es posible reconocer muchos de sus derivados en orina humana sana. Además de los derivados nitroalquenos originales, estas especies van acompañadas en orina de sus derivados productos de oxidación y aductos de tioles. En particular, los productos de adición tipo Michael de NO_2CLA con cisteína fueron reportados en 2013. Una detección exhaustiva de metabolitos de lípidos electrófilos en la orina abarca conjugados de cisteína y otros isotiocianatos. En una confirmación de la tendencia fisiológica de formar aductos tiol- NO_2CLA , se muestra en dicho trabajo niveles más altos de conjugados de NO_2CLA -cisteína, que de cualquier otro ácido graso libre o derivados de ácido mercaptúrico. Muestran que la

generación de nitroalquenos presenta un equilibrio estable entre los nitro-ácidos grasos libres y los aductos con Cys. Y que este es un equilibrio modificable mediante corregir concentraciones de tioles en plasma, tales como GHS [31].

En 2014, en un trabajo de Tesina de graduación realizado en LQTC, IQB en Facultad de Ciencias, se realiza mediante experimentación computacional, un estudio de las interacciones entre NO_2FA no conjugados y el LBD de PPAR γ . Se reportan similitudes de comportamiento en los regioisómeros de nitroácidos no conjugados tales como ácido nitroaraquidónico, linoleico y oleico. En todos los casos se encuentra una energía de formación mayor en la interacción con PPAR γ que para Rosiglitazona, que se ha reportado como un activador total de este receptor [32,33].

En 2016 se publica el artículo que ya hemos referenciado, donde se profundiza en las bases químicas de la adición de biotioles al NO_2CLA por reacción tipo Michael [9]. En este estudio se propone y respalda experimentalmente y por métodos computacionales, una cinética bifásica (**figura 5**) entre el NO_2CLA y una serie de biotioles de bajo peso molecular. Este modelo de reacción se relaciona con la existencia de dos centros de carácter electrofílico no equivalentes en la zona de doble conjugación del NO_2CLA . Esta no-equivalencia es también mostrada por el trabajo computacional, mediante el que se reconocen dos zonas de reactividad claramente diferentes sobre los carbonos β y δ , válido para los regioisómeros 9- NO_2CLA y 12- NO_2CLA . Se concluye además que la reacción rápida corresponde a la β -adición del tiol y la reacción lenta a la δ -adición. Estos resultados son explicados por una reacción rápida de NO_2CLA con el tiol para formar inicialmente el β -aducto. Debido a la reversibilidad de esta reacción, este aducto puede sufrir una eliminación y liberar nuevamente NO_2CLA que se involucra en reacciones posteriores. Finalmente se conduce a la lenta acumulación del δ -aducto, más estable. Se propone entonces que la formación del β -aducto es una reacción

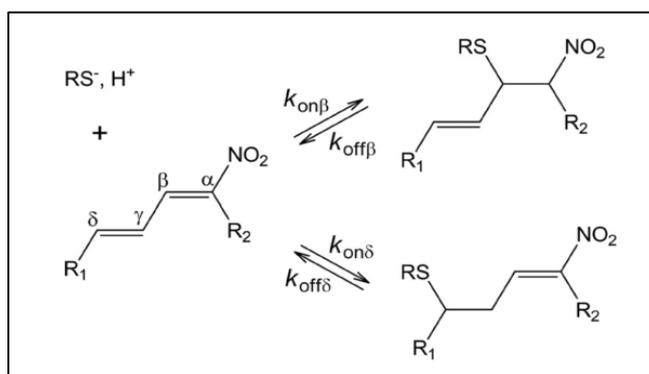


Figura 5: Propuesta de reacción bifásica entre biotioles de bajo peso molecular y NO_2CLA . Se identifica un ataque a C- β , dando como resultado un β -aducto, y un ataque al C- δ , dando como resultado un δ -aducto. Tomado de Turell, *et al.* (2014). [9]

regulada cinéticamente, mientras que la formación del δ -aducto es una reacción de regulación termodinámica. Desde el punto de vista computacional, se presenta una reacción con modelo reducido de la zona de conjugación de NO_2CLA , equivalente para ambos regioisómeros, y una molécula de metiltiolato como biotiol para el ataque nucleofílico de la reacción tipo Michael [9].

Para el contexto proteico lo más reciente se corresponde con el ya mencionado artículo en 2009 donde se identifican ácidos grasos oxidados de cadena corta como agonistas de PPAR γ mediante reacción covalente reversible con Cys285 de esta proteína, explicada mediante una reacción de tipo tiol- Michael [13,34].

1.4) Receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales. Generalidades

Los receptores activados por proliferador de peroxisoma (PPAR) son factores de transcripción activados por ligando que pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares de hormonas. PPAR α fue nombrado por el Comité de Nomenclatura de Receptores Nucleares en 1999 como (NR1C1) reconociendo que se activa por los proliferadores de peroxisomas, definiendo por esta característica su nombre. Dos isotipos adicionales relacionados con el primero, PPAR β/δ (NR1C2) y PPAR γ (NR1C3), fueron posteriormente encontrados y caracterizados. [35]. El isotipo PPAR α se transcribe a partir del gen PPAR α humano, que consta de ocho exones. Todos los miembros de la familia PPAR contienen cinco dominios principales mostrados en la **figura 6**.

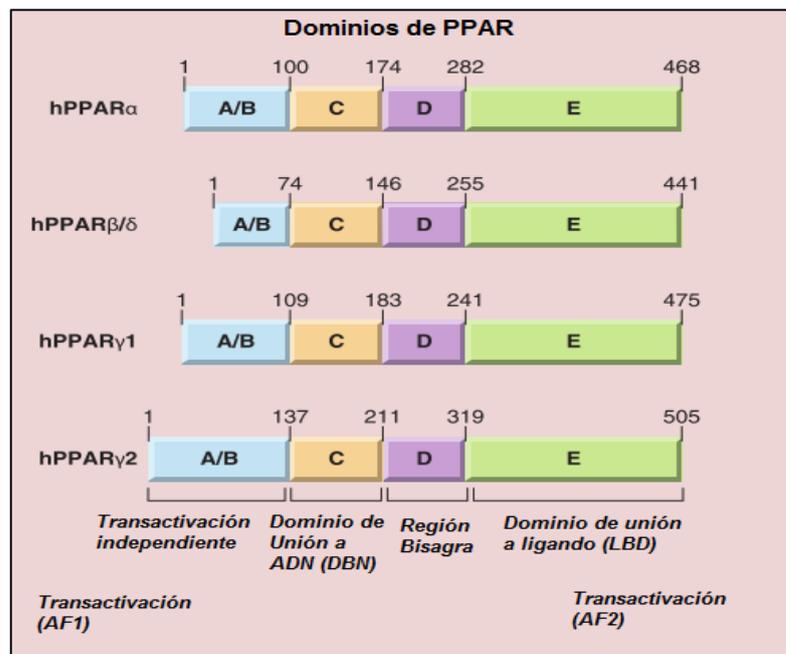


Figura 6: Comparación de los dominios de proteína PPAR para los distintos isotipos. Tomado y modificado de Han *et al.* (2017). [36]

Los cinco dominios son: el NH₂ terminal-final, dominio-ligando independiente de transactivación (A/B en fig. 4). El dominio de unión a ADN (DBD por su sigla en inglés) de 70 aminoácidos (C en fig. 4) que contiene dos motivos de dedo de zinc altamente conservados y promueve la unión del receptor a una secuencia de ADN en la región promotora conocida como elemento de respuesta del proliferador de peroxisoma (PPRE). La región de bisagra (D en fig. 4). El dominio de unión al ligando o LBD (E en fig. 4). Por último, el dominio LBD C-terminal, que es responsable de la especificidad del ligando, y la activación de la unión de PPAR al PPRE conduciendo al aumento de la expresión de genes diana, contribuyendo también

a la dimerización con el receptor X de retinoides (RXR por su sigla en inglés) [36]. Existen dos isoformas de PPAR γ , que se obtienen como resultado del corte y empalme alternativo del gen codificante, nombradas PPAR γ 1 y PPAR γ 2, presentando esta última 30 aminoácidos adicionales N-terminales respecto a la isoforma PPAR γ 1 [37].

Las funciones moleculares y biológicas de PPAR γ 1 y PPAR γ 2 están altamente expresadas en el tejido adiposo, donde desempeñan un papel esencial en la regulación de la diferenciación de adipocitos. Durante este proceso, los preadipocitos experimentan una detención del crecimiento, inician la acumulación de triglicéridos, y adquieren características morfológicas y bioquímicas de adipocitos maduros, tales como procesos metabólicos sensibles a hormonas incluyendo lipogénesis, lipólisis y metabolismo de la glucosa [38]. En condiciones fisiológicas normales, la isoforma PPAR γ 2 está restringida a tejidos adiposos marrones y blancos solamente, pero su expresión ectópica puede ser inducido en el hígado y en el músculo esquelético como respuesta a la ingesta excesiva de calorías u obesidad genética.

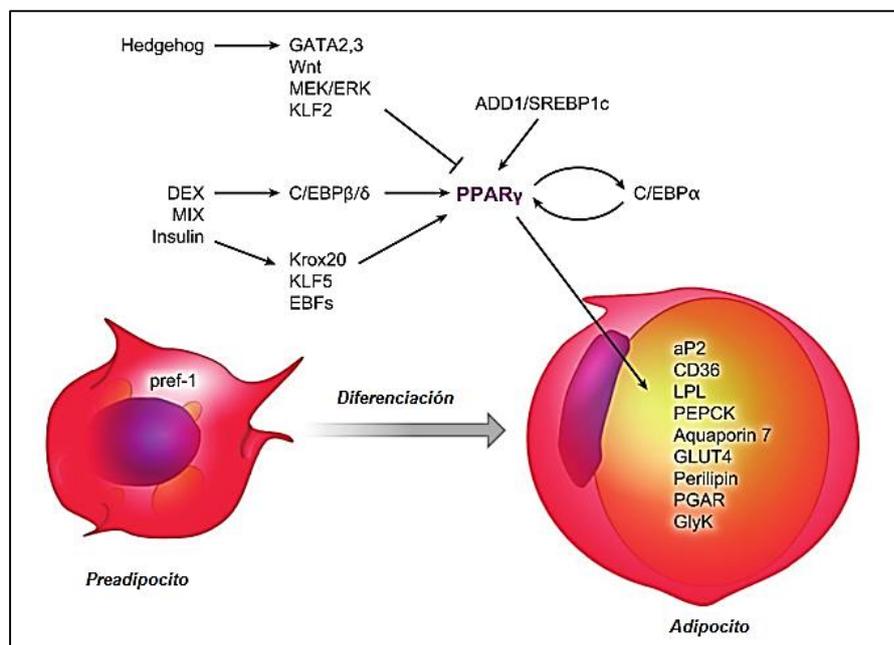


Figura 7: Resumen de la vía PPAR γ para la adipogénesis. PPAR γ se sitúa en el núcleo de la cascada adipogénica en un circuito de retroalimentación con C/EBP α . Se han identificado una variedad de vías de señalización que actúan aguas arriba de PPAR γ , incluyendo las vías hedgehog y proteína de unión a potenciador CAAT (C/EBP β/δ). La activación de PPAR γ promueve la diferenciación terminal a través de la inducción de una variedad de genes diana dependientes de la diferenciación, importantes para la captación y almacenamiento de triglicéridos. Tomado y modificado de Tontonoz *et al.* (2008) [38].

También se expresa en niveles altos en varias células vasculares, incluyendo células endoteliales, células de músculo liso y monocitos/macrófagos, desempeñando un papel integral en la regulación de la homeostasis vascular. Así mismo se han detectado niveles significativos de PPAR γ en las lesiones ateroscleróticas. Muchos estudios han proporcionado evidencia de que la activación de PPAR γ mediada por agonistas atenúa la activación y la inflamación, lográndose esto a través de varios mecanismos. Varios estudios también proporcionan evidencia de un papel inhibitorio de PPAR γ en la aterosclerosis, siendo posible que ejerza efectos ateroprotectores [38].

La vinculación de PPAR- γ con la resistencia a la Insulina fue descubierta en relación con los efectos de las tiazolidinedionas (TZDs). Estas se desarrollaron inicialmente debido a su capacidad para reducir los niveles de glucosa en roedores, para luego confirmarse que mejoran la sensibilidad a la insulina en humanos. Dos miembros de esta clase de fármacos, Rosiglitazona (Avandia[®]) y Pioglitazona (Actos[®]) funcionan como potentes y selectivos agonistas completos de PPAR- γ . Estos no sólo son fármacos antidiabéticos muy eficaces sino que también han ayudado en gran medida a comprender los mecanismos subyacentes mediante los cuales PPAR γ contribuye a la regulación de la adipogénesis, la homeostasis de los lípidos y la glucosa y otros procesos fisiopatológicos. En los seres humanos, la Pioglitazona y la Rosiglitazona funcionan como sensibilizadores a la acción de la insulina permitiendo así una acción directa sobre la hiperglucemia en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. Además de atenuar la hiperglucemia y aumentar la acción de la insulina, el tratamiento con estos fármacos en pacientes con Diabetes tipo 2 se asocia con mejoras significativas en los triglicéridos plasmáticos, HDL-C, concentración de partículas de LDL y tamaño de partícula LDL [39]. Sin embargo se han reportado algunos efectos secundarios asociados a la utilización de fármacos de tipo agonistas totales, siendo el más significativo el aumento del riesgo de infarto al miocardio [40].

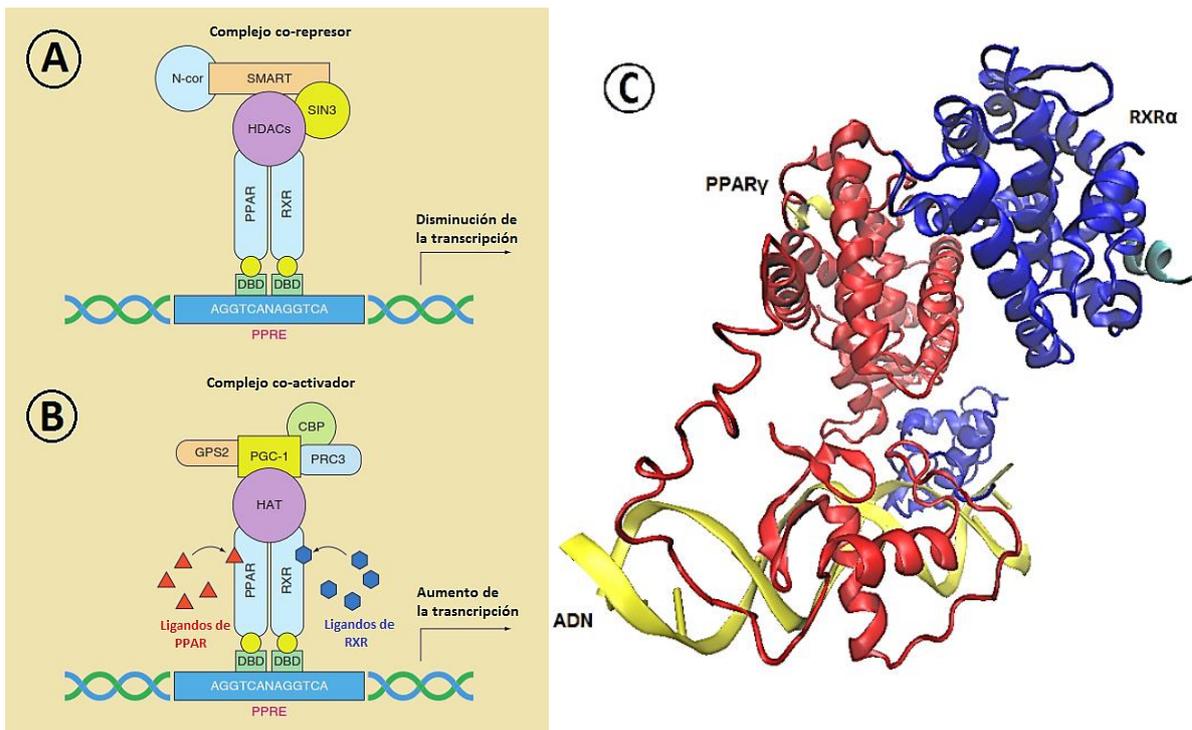


Figura 8: Regulación de genes mediada por el complejo PPAR-RXR. **A)** Bajo estado no ligado, los heterodímeros PPAR/RXR están unidos a represores multicomponentes tales como NcoR y SMART, inhibiendo de este modo la transcripción génica **B)** La unión del ligando a PPAR o RXR provoca el desplazamiento de los represores unidos, el reclutamiento de co-activadores tales como SRC-1 y la PBP y la modulación transcripcional (principalmente activación) de la transcripción génica **C)** Estructura cristalográfica. Salvo que se señale lo contrario, las representaciones se realizan con VMD, PDBID: 3DZU. PPAR γ en rojo, RXR α en azul, fragmento de ADN en amarillo. **Abreviaturas:** DBD: dominio de unión al ADN; NcoR: Corepresor de los receptores nucleares; PBP: proteína de unión a PPAR; PPRE: Elemento de respuesta del proliferador de peroxisoma; RXR: receptor Retinoide X; SMART: Mediador de silenciamiento para receptores de retinoides y de hormonas tiroideas; SRC: Co-activador del receptor de esteroides. (Esquema de regulación a y b tomado y modificado de Han *et al.* (2000) [36].

1.4) PPAR γ : Estructura e interacción con ligandos moduladores de su función

Como todos los miembros del grupo, PPAR γ parece requerir una dimerización con un RXR α para cumplir su función reguladora. La región C-terminal es responsable de la dimerización con RXR α y contiene el dominio de activación transcripcional principal, denominado dominio AF-2, nombrado como E en la **figura 6**. Al igual que la mayoría de los miembros del grupo receptor nuclear, los 120 aminoácidos N-terminales tienen actividad transcripcional cuando están unidos a un dominio heterólogo de unión al ADN (**figura 8**) [41].

Los efectos de los ligandos reguladores sobre PPAR γ , RXR α y otros receptores nucleares están mediados a través del dominio de unión al ligando (LBD), una región conservada de 250 aminoácidos en la mitad C-terminal del receptor. Además de su papel en la unión hormonal, el LBD también contiene funciones de dimerización y transactivación, incluyendo la función de activación transcripcional (AF-2). El LBD contiene 13 α -hélices y 4 pequeñas hojas- β que se pliegan en una conformación típica de “sándwich helicoidal” para los receptores nucleares (**figura 9**) [42]. Este sándwich helicoidal antiparalelo está formado por las hélices 11 a 13. Estas se pliegan para formar una cavidad hidrofóbica en la que el ligando puede unirse. El dominio AF-2 está contenido dentro de la hélice C-terminal. El posicionamiento preciso de AF-2 es un determinante importante en las interacciones con los coactivadores, pudiendo presentarse más saliente sobre la superficie de RXR α [43] u orientado contra el cuerpo del receptor PPAR γ [44]. Estos cambios conformacionales resultan en el desplazamiento de proteínas corepresoras que inhiben la transcripción, tales como NCoR y SMRT, y el reclutamiento de proteínas coactivadoras [41]. El LBD contiene un bolsillo de unión al ligando (LBP) con forma de letra Y. Liberato *et.al.* lo reportan con un volumen de aproximadamente 1300 Å³, destacándose un tamaño considerablemente mayor que los bolsillos de otros receptores nucleares [45].

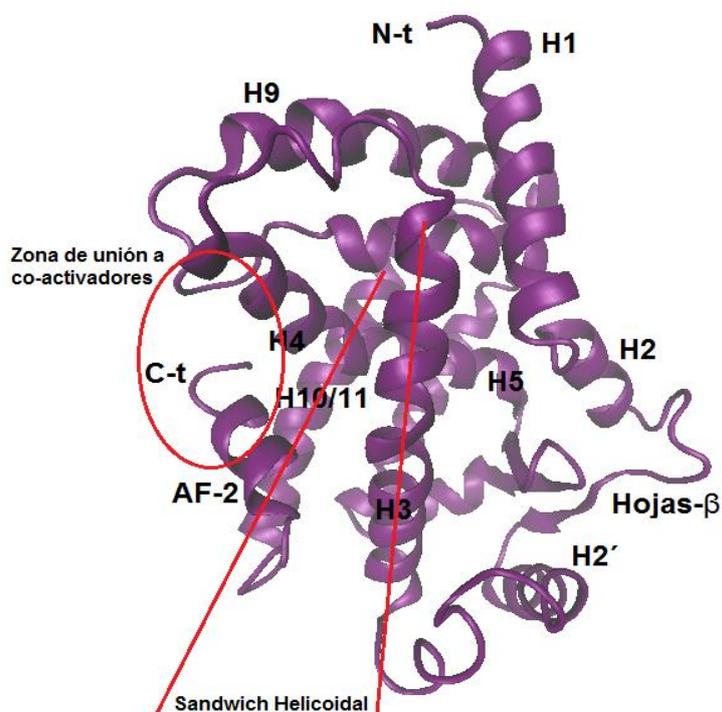


Figura 9: Dominio de unión a ligando (LBD) de PPAR γ . Estructura cristalográfica de LBD. PDBID:1FM6. Se señalan: Hélices principales. Porción AF-2, Carbono terminal y Amino terminal. Zona hidrofóbica de unión a ligando llamada “sándwich helicoidal”, zona de unión a co-activadores.

Dentro del bolsillo se pueden representar tres brazos denominados Arm1, Arm2 y Arm3. Arm1 y Arm2 son fundamentalmente hidrofóbicos mientras que Arm3 es fundamentalmente polar. El brazo Arm1 se extiende a través del espacio entre H12, H4 y H10/H11. El brazo Arm2 se extiende a través del espacio entre H3, H4 y H2. El brazo Arm3 está situado entre H3 y las hojas- β [46].

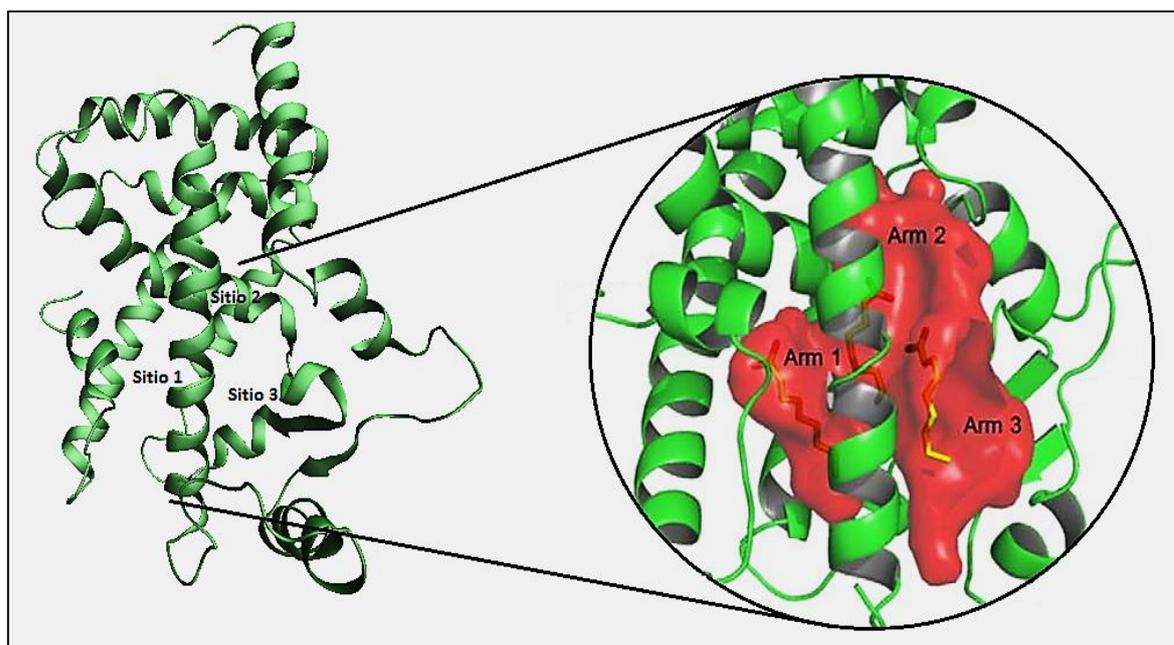


Figura 10: Zonas de unión a ligando y detalle de brazos en LBP de PPAR- γ : Izquierda: Estructura cristalográfica de LBD. PDBID:1FM6. Se señalan Sitios de unión preferenciales para ligandos. Derecha: Acercamiento y detalle de LBP con brazos destacados en rojo y nombrados Arm1, Arm2 y Arm3. Sitios ocupados con ácidos grasos de cadena media PDBID:4EM9 . Detalle a la derecha tomado de Liberato *et al.* (2012) [45].

A consecuencia del volumen del bolsillo de unión a ligando de PPAR γ , se ha reportado la capacidad de formar complejos con más de una molécula, preferentemente ácidos grasos de cadena media [45]. Cada uno de los ligandos presenta tendencia a asociarse a algunas de las zonas de unión definidas como brazos, y se puede vincular ésta unión con el tipo de acción del ligando. En el caso de los agonistas totales como las tiazolidinedionas (TZD), el grupo de cabeza ácida de la TZD forma enlaces de hidrógeno directos con Tyr473 en la hélice 12 y también con His323 adyacente, demostrando que los agonistas totales estabilizan directamente esta hélice [47]. Al mismo tiempo, interactúan con residuos de la hélice AF-2, estableciendo el mecanismo de regulación a unión de cofactores mencionado previamente.

En el caso de los agonistas parciales, algunos autores señalan a la Cys285 como participante fundamental en la acción agonista, idea ya desarrollada previamente en relación con la función biológica de las reacciones de tior-Michael en contexto proteico, especialmente para compuestos de tipo ácidos grasos oxidados conjugados [13]. Se ha demostrado además que los agonistas parciales disminuyen el reclutamiento de los co-activadores CBP y SRC1, quienes se unen al complejo receptor, modifican la estructura local de la cromatina y reclutan la maquinaria de transcripción para dirigir los promotores de genes, pero retienen la

asociación con PGC1a, generando una co-represión parcial [47]. EN 2007, autores muestran que los agonistas parciales no estabilizan la hélice-12 como se creía hasta el momento, sino otras regiones de la LBD, especialmente la zona de Hoja- β y la hélice-3. Plantean que los agonistas totales pueden funcionar estabilizando directamente el sitio de unión del coactivador AF-2, mientras que los agonistas parciales sólo estabilizan las regiones alejadas de AF-2, dejando AF-2 en un estado altamente dinámico (**figura 11**) [48]. También, se ha sugerido un nuevo mecanismo mediante el cual los agonistas PPAR γ parciales y totales actúan para mejorar la sensibilidad a la insulina independientemente del agonismo del receptor. Este mecanismo consiste en bloquear la fosforilación de PPAR γ en el residuo Ser273 y puede explicar cómo los agonistas parciales son capaces de presentar efectos antidiabéticos similares o más altos que los de agonistas totales. Es posible que agonistas parciales y totales logren una eficacia comparable en la sensibilización a la insulina a través de un efecto inhibitorio similar sobre la fosforilación PPAR γ , mientras que las diferencias en su potencia agonística podría estar vinculada a las diferencias en los efectos secundarios [49].

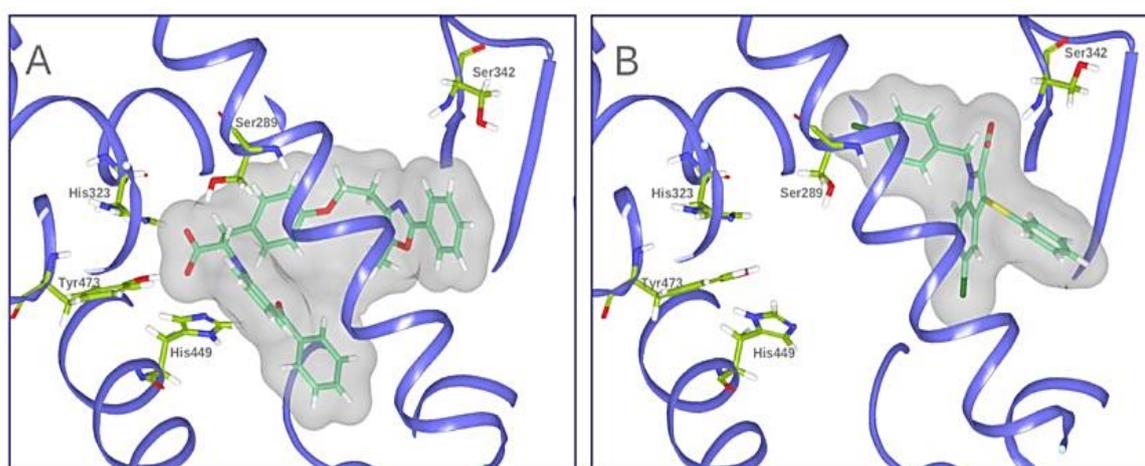


Figura 11: Modelos de unión de agonista total y parcial. A) Agonista total de PPAR γ Farglitazar (PDBID: 1FM9) B) el agonista parcial de PPAR γ nTZDpa (PDBID: 2Q5S). Los residuos de unión importantes se representan como estructuras de alambre con átomos de carbono verdes. Los átomos de oxígeno, nitrógeno e hidrógeno son de color rojo, azul y blanco, respectivamente. Tomado de Guasch *et al.* (2012). [53]

Otra de las muestras de la complejidad de posibilidades de regulación en el bolsillo de PPAR γ responde al hecho de que algunos agonistas, especialmente ácidos grasos de cadena media, pueden acomodarse y estabilizar zonas distintas del LBD. Por ejemplo, el ácido eicosapentaenoico (EPA) presenta una conformación "cola hacia arriba", de modo que la parte de cabeza ácida del mismo se encuentra en el brazo Arm2, mientras que la parte hidrofóbica de la cola de la molécula está enterrada en el brazo Arm1. La otra conformación es "cola hacia abajo", donde la parte de la cola hidrofoba se encuentra enterrada en el brazo Arm3 [46].

Basadas en estas ideas de relación ligando-receptor se ha sintetizado un gran número de farmacomoduladores de PPAR γ , que comparten una estructura básica similar: un grupo de cabeza de activación que forma enlaces de hidrógeno con residuos clave en el LBD proteico, y una zona de cola hidrofoba. A pesar de la alta variabilidad estructural de los ligandos de PPAR γ , se ha informado que la mayoría de estos agonistas establecen al menos una red enlaces de hidrógeno con los residuos aromáticos polares His323, Tyr327, His449 y Tyr473 [50]. La zona

en gran parte hidrofílica formada por estos residuos es importante para la unión de todos los agonistas fuertes y acomoda grupos de cabeza polar tales como carboxilato y tiazolidindiona, comunes en los moduladores de PPAR γ . Dentro de este grupo se encuentra la Rosiglitazona y Pioglitazona.

Con respecto a los ligandos naturales, el primero descrito fue 15-desoxi-A12,14-prostaglandina J2 (PGJ2), un ácido graso oxidado. Posteriormente, se demostró que el ácido 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODE) y el ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE), dos ácidos grasos oxidados presentes en la lipoproteína de baja densidad oxidada, activan PPAR γ en los macrófagos [47]. A pesar de la baja afinidad por el receptor de estos ácidos grasos oxidados, son más potentes que los homólogos sin oxidar. Los estudios más recientes, señalan al ácido linoleico nitrado y el ácido oleico nitrado como potentes activadores de PPAR γ , cuyas características ya fueron desarrolladas al inicio de esta introducción. La selectividad de PPAR γ para unir LNO $_2$ se explica por las interacciones específicas del grupo nitro con los residuos del LBD. Cuando el grupo NO $_2$ está ligado al C10 del LNO $_2$, forma enlace de hidrógeno con Arg288, mientras que ligado al C12, interacciona con Glu343 (ver **figura 12**). La mutación de cualquiera de los residuos disminuye la activación de PPAR γ por LNO $_2$ pero no tiene ningún efecto sobre la activación de PPAR γ por la rosiglitazona [12].

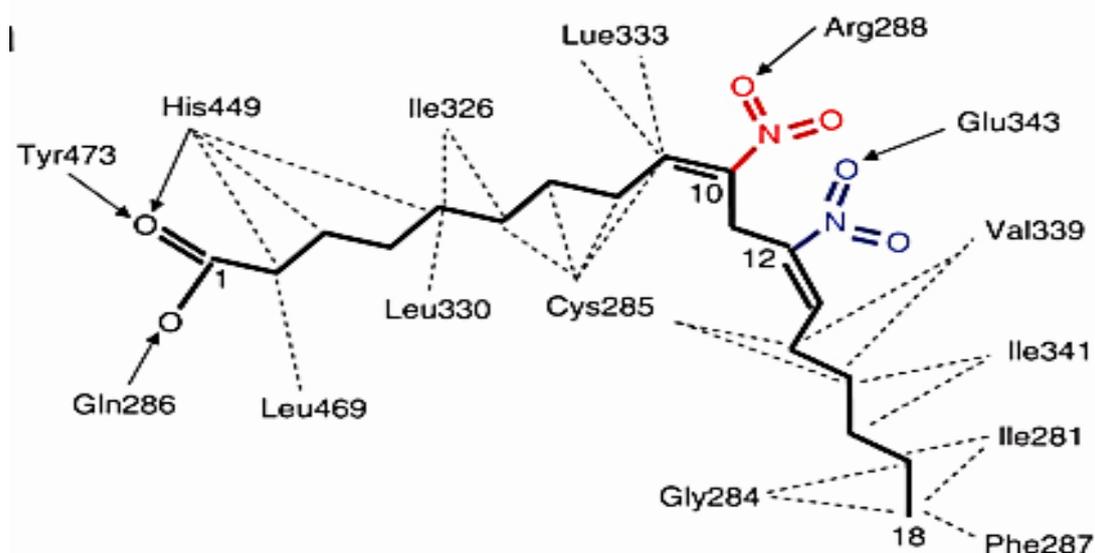


Figura 12: Correlación funcional de las interacciones LNO $_2$ -PPAR γ . Representación esquemática de algunas de las interacciones posibles en LBD de PPAR γ -LNO $_2$. Dos isómeros de LNO $_2$ se muestran en rojo y azul, respectivamente. El negro indica conformación y estructura compartida. Las interacciones hidrofóbicas se indican mediante líneas de trazos y los enlaces de hidrógeno se indican mediante flechas de donadores de protones a los aceptantes. Tomado de Li *et al.* (2016) [12].

Múltiples estrategias de modelado computacional de la estructura y energética se han utilizado para analizar la relación ligando-LBP de PPAR γ y para profundizar los cambios conformacionales del LBD y su vinculación con co-represores, co-activadores, relación con RXR α y dominio de unión a ADN. Entre ellas, docking ligando-receptor y simulaciones de dinámica molecular clásica. En la **tabla 1** se realiza una aproximación a algunos de los trabajos antecedentes que utilizan estrategias de modelado computacional.

Tabla 1: Detalle de algunos trabajos previos que estudian ligandos, sitio de unión y cambios conformacionales relacionados con la función reguladora de PPAR γ .

Título	Autores	Año	Metodología	Objetivo
Ligand-escape pathways from the ligand-binding domain of PPARγ receptor as probed by molecular dynamics simulations [51]	Genest, D., Garnier, N., Arrault, A., Marot, C., Morin-Allory, L., y Genest, M.	2008	Dinámica molecular clásica	Se usa Dinámica molecular para determinar los eventos principales asociados con el escape del agonista parcial GW0072.
Structural Insight into PPARγ Ligands Binding [50]	Guasch, L., Sala, E., Castell-Auví, A., Cedó, L., Liedl, K. R., Wolber, G., Muehlbacher, M., Mulero, M., Pinent, M., Ardévol, A., <i>et al.</i>	2009	Docking, <i>in silico</i> screening	Se determina interacción entre una serie de posibles ligandos y el LBP de PPAR γ
Design Novel Dual Agonists for Treating Type-2 Diabetes by Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptors with Core Hopping Approach [52]	Ma, Y., Wang, S. Q., Xu, W. R., Wang, R. L., and Chou, K. C.	2012	Docking, Dinámica molecular clásica, screening.	Se parte del estudio de dos ligandos agonistas sintéticos para proponer una serie de posibles nuevos agonistas para tratamiento de Diabetes tipo 2.
Rigid and flexible docking studies on PPARγ agonists: key interactions for a better antihyperglycemic activity and in silico pharmacodynamic activity versus experimental in vivo activity [35]	Kumar, B. R. P., Sopna, S., Verghese, J., Desai, B., y Nanjan, M. J.	2012	Doking rígido y Doking flexible con algoritmo LGA.	Se estudian los resultados de dockin rígido y flexible para 50 glitazonas en el LBP de PPAR γ
Identification of PPARγ Partial Agonists of Natural Origin (I): Development of a Virtual Screening Procedure and In Vitro Validation [53]	Guasch, L., Sala, E., Castell-Auví, A., Cedó, L., Liedl, K. R., Wolber, G., Muehlbacher, M., Mulero, M., Pinent, M., Ardévol, A., <i>et al</i>	2012	Docking ligando-receptor	Se determina el modo de unión y las interacciones ligando-blanco de cinco nuevos agonistas parciales de PPAR γ .
Medium Chain Fatty Acids Are Selective Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) Activators and Pan-PPAR Partial Agonists [45]	Liberato, M. V., Nascimento, A. S., Ayers, S. D., Lin, J. Z., Cvoro, A., Silveira, R. L., Martínez, L., Souza, P. C. T., Saidemberg, D., Deng, T., <i>et al.</i>	2012	Dinámica molecular clásica	Se utiliza MD para aportar al estudio de ácidos grasos de cadena media como ligandos de PPAR γ , sus diferentes orientaciones y efectos estructurales.
Combined Ligand- and Structure-based Virtual Screening Protocol Identifies Novel Submicromolar PPARγ Partial Agonists Title [54]	Vidović, D., Busby, S. A., Griffin, P. R., and Schürer, S. C.	2015	Virtual Screening, Docking molecular	Se propone un protocolo de Screening virtual basado en la similitud y acoplamiento 3D del ligando.
Computational study of the binding orientation and affinity of PPARγ agonists: inclusion of ligand- induced fit by cross-docking [55]	Munoz-Gutierrez, C., Adasme-Carreno, F., Fuentes, E., Palomo, I., y Caballero, J.	2016	Dockin cruzado	Se estudia una serie de ligandos, su interacción en el LBP de PPAR γ y la orientación y vinculación con residuos más cercanos.
Identification of Potential PPARγ Agonists as Hypoglycemic Agents: Molecular Docking Approach [56]	G. P. Mishra y R. Sharma	2016	Docking	Se identifica el descriptor molecular y los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad agonística de PPAR γ
The chemical basis of thiol addition to nitro-conjugated linoleic acid, a protective cell-signaling lipid [9]	Turell, L., Vitturi, D. A., Coitiño, E. L., Lebrato, L., Möller, M. N., Sagasti, C., Salvatore, S. R., Woodcock, S. R., Alvarez, B., y Schopfer, F. J.	2016	Modelos de estructura electrónica, y modelización de mecanismos	Se estudia la reacción tipo Michael vinculada a interacciones entre biotioles y ácidos grasos nitrados conjugados. Se estudia reactividad de NO ₂ CLA

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo General:

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el entendimiento del comportamiento bioquímico de los ácidos Nitrolinoleicos (LNO₂) conjugados en sus isómeros más estudiados (9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA), en relación a su mecanismo de reacción con biotioles de bajo peso molecular para la primera etapa de la adición tipo Michael, así como su posible comportamiento como ligando del receptor nuclear PPAR γ .

Se espera que este estudio aporte elementos a la explicación de la reactividad descrita experimentalmente en antecedentes [9] para este grupo de compuestos. Así también, identificar las características de la interacción entre el LBD de PPAR γ y los ácidos LNO₂ conjugados, especialmente en lo relacionado con su acomodación estructural y su entorno de interacción.

2.2) Objetivos específicos:

- 2.2.1) Identificar como afecta la naturaleza del tiol en su comportamiento como nucleófilos en reacción tipo Michael para la serie de biotioles estudiados en antecedentes (β ME, Cys, Hcy, CysGly, GHS).
- 2.2.2) Caracterizar los isómeros 9- y 12-NO₂CLA. Comparar los indicadores de reactividad sobre la zona de interés con el modelo reducido utilizado como referencia en antecedentes.
- 2.2.3) Caracterizar efectos del cambio de tiol sobre el mecanismo de adición tiol-Michael C β /C γ sobre NO₂CLA para tres biotioles de la serie (β ME, Cys y Hcy). Específicamente, reconocer si las diferencias entre ambos canales para la primera etapa de la reacción se ven afectadas por el tipo de tiol participante.
- 2.2.4) Estudiar desde un punto de vista estructural la posibilidad de que se establezca una reacción tipo Michael entre estos compuestos y la Cys235 de dicho LBD.

3) METODOLOGÍA

3.1) Generalidades metodológicas

Llegar al detalle de la reactividad de los compuestos estudiados (biotioles y regioisómeros principales de NO₂CLA) requiere conocer la estructura electrónica de las especies que se desean estudiar. También es necesario este nivel de detalle para el estudio del mecanismo de reacciones químicas (adición del tipo tior-Michael en este caso) caracterizando reactivos que experimentan procesos de ruptura y/o formación de enlaces junto a los estados de transición y los productos resultado de la transformación química. En este trabajo tal nivel de detalle de la estructura electrónica fue descrito utilizando la Teoría de los Funcionales de Densidad (DFT). Esta teoría se basa en un teorema que demuestra que la energía exacta del estado fundamental de un sistema puede determinarse a partir del conocimiento de la densidad electrónica $\rho(r)$. Hohenberg-Kohn [57] y Kohn-Sham [58] publicaron entre 1964 y 1965 los teoremas que dan base a la DFT moderna y permiten su aplicación actual al estudio de sistemas moleculares. Durante los siguientes 50 años, se continuó trabajando sobre esta idea, mejorando su exactitud y capacidad predictiva, robusteciendo los funcionales de la densidad utilizados hasta lograr, en palabras del propio Kohn, un método en principio exacto para el cálculo de la densidad electrónica del estado fundamental y energía de moléculas, clústeres y sistemas sólidos [59]. En este trabajo de tesis se utilizó el funcional ω B97X-D [60] con el conjunto de base 6-31G(d,p) [61]. Se eligió ω B97X-D por dos motivos fundamentales. En primer lugar, el hecho de que contenga correcciones para la dispersión electrónica lo hace más adecuado para describir sistemas con electrones deslocalizados, como aparecen en los regioisómeros de NO₂CLA y el modelo reducido (RM) que captura su capacidad como aceptor de Michael estudiados. Por otro lado, se ha reportado que presenta mayor exactitud que el funcional B3LYP para describir reacciones de adición tipo tior-Michael [62]. Los efectos del solvente (agua) se representaron aquí a través de un método de solvente implícito, IEF-PCM [63].

Para el estudio de la interacción de NO₂CLA con PPAR γ se recurrió a métodos clásicos, que permiten el estudio tridimensional de la estructura del LBD de la proteína bajo condiciones representativas y la descripción de su interacción con ambos regioisómeros de NO₂CLA como ligandos. Se realizó Dinámica Molecular (MD) tanto para el LBD aislado, como para los complejos que éste forma con los ligandos 9- y 12-NO₂CLA. Se partió de la estructura cristalográfica del complejo que el LBD de PPAR γ forma con RXR α , un péptido coactivador y los ligandos 9-cis-retinoico y rosiglitazona, depositada como PDBID:1FM6 [64] utilizando para la proteína el campo de fuerza ff14SB [65] con el programa AMBER16 [66]. Los ligandos fueron parametrizados utilizando el campo de fuerza *gaff* [67] y cargas atómicas derivadas por el procedimiento RESP [68]. Cada sistema se solató con una caja octaédrica truncada de agua TIP3P [68] extendida hasta 12 Å y se simuló 100 ns en condiciones periódicas NPT (310 K, 1 atm). El análisis de las trayectorias se realizó utilizando el programa *cpptraj* [69], obteniéndose RMSD y RMSF, detalle de las interacciones de enlace de hidrógeno (EdH) y agrupando las múltiples topologías en función de la similitud en su conformación mediante un análisis de clúster de la trayectoria que permitió obtener estructuras representativas. El entorno más cercano del ligando en el LBD de la proteína se

analizó con LigPlot⁺ [70]. Las imágenes de estructura tridimensional se realizaron con el programa VMD [71].

3.2) Nucleofilia de biotioles de bajo peso molecular y electrofilia de isómeros del NO₂CLA

La estructura electrónica de los regioisómeros 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA, del modelo reducido que los representa en su reacción como aceptores de Michael y los biotioles de la serie de interés fue modelada en solución acuosa, optimizando su geometría al nivel ωB97X-D/6-31G(d,p) con el programa Gaussian09 rev D.01 [72]. Los efectos del entorno acuoso se introdujeron mediante el modelo continuo IEF-PCM [63], utilizando la constante dieléctrica del agua ($\epsilon = 78.35$) y cavidades de forma molecular, construidas intersecando esferas centradas en los átomos y radios de Bondi [73]. Se consideraron las contribuciones no electrostáticas a la energía de solvatación (dispersión, repulsión y cavitación) de la forma en que están implementadas en Gaussian09. Así mismo se realizó un análisis de Weinhold de orbitales naturales NBO y se derivaron cargas atómicas NPA e índices de enlace de Wiberg a partir del análisis poblacional correspondiente [74].

3.2.1) Descriptores globales de reactividad:

Se determinó en primer lugar el potencial de ionización y la afinidad electrónica (IP y EA, por sus siglas en inglés) para cada sistema molecular empleando dos aproximaciones diferentes. Una de ellas mediante una extensión del Teorema de Koopmans [75] que identifica la energía de la primera ionización con la energía del orbital de Kohn-Sham ocupado de frontera (HOMO-KS) y la electroafinidad con la energía del orbital virtual de menor energía (LUMO-KS). La otra corresponde al método Δ SCF vertical [76], donde potencial de ionización y afinidad electrónica se calculan a partir de diferencias de energía total correspondientes a la especie estudiada en su estado de referencia y el resultado de extraer/adicionar un electrón con la geometría congelada.

A partir de los valores de IP y EA se deriva una serie de otros indicadores de reactividad global que se definen en el marco de la DFT conceptual a partir de una aproximación de diferencias finitas tal como se presenta a continuación [9]:

El *potencial químico* (μ): es una medida de la tendencia de escape de los electrones desde un sistema en equilibrio, se calcula en el marco anterior como:

$$\mu = [-\frac{1}{2} (IP+EA)] \quad (1)$$

La *dureza global* (η) es un índice global de reactividad que puede ser entendido como la resistencia de los electrones a ser transferidos desde un sistema en equilibrio. Los valores de dureza pueden ser calculados como:

$$\eta = [\frac{1}{2} (IP-EA)] \quad (2)$$

El *índice de electrofilicidad* (ω), se define como la energía de estabilización de un sistema electrónico cuando es saturado con electrones provenientes del entorno y se calcula como:

$$\omega = [\mu^2/2\eta] \quad (3)$$

La *Blandura global* (S) es, a la inversa de la dureza, un índice global que puede ser entendido como la facilidad de ese sistema a transferir electrones desde el equilibrio. Puede ser calculada como:

$$S = [1/2\eta] \quad (4)$$

3.2.2) Descriptores locales de reactividad:

Se calcularon las funciones de Fukui para la ganancia y pérdida de electrones, $f^+(\mathbf{r})$ y $f^-(\mathbf{r})$, conocidas como *funciones de Fukui electrofílica* y *nucleofílica*, respectivamente [77]. Las mismas pueden ser representadas y analizadas en forma gráfica, mapeadas sobre una *superficie de iso-densidad electrónica* ρ representativa de la superficie molecular (aquí fijada en un valor de 0.004 u.a.) o bien en forma *condensada sobre los átomos*, determinando su valor numérico a partir de la variación de cargas atómicas entre el estado de referencia del sistema molecular en estudio y el resultante de adicionarle/quitarle un electrón a configuración nuclear congelada en la que corresponde a dicho estado de referencia.

Para los regioisómeros 9- y 12- de NO₂CLA y el modelo reducido (RM) usado para representarlos en los estudios de reacciones de adición de tioles, se calculó la *función de Fukui electrofílica*, $f^+(\mathbf{r})$, como medida local de la tendencia de estas especies a ganar densidad electrónica. Los cálculos de la densidad electrónica del sistema de referencia $\rho_N(\mathbf{r})$ y del sistema tras ganar un electrón $\rho_{N+1}(\mathbf{r})$ fueron obtenidos a nivel ω B97X-D/6-31G(d,p) en agua representada por el modelo IEF-PCM [63]. A partir de una aproximación de diferencias finitas, $f^+(\mathbf{r})$ se puede obtener según la expresión:

$$f^+(\mathbf{r}) = \rho_{N+1}(\mathbf{r}) - \rho_N(\mathbf{r}) \quad (5)$$

Para cada una de las especies de la serie de biotioles estudiada, se generó por otra parte una $f^-(\mathbf{r})$ como medida de la tendencia de cada especie a ceder densidad electrónica frente a un proceso de formación de enlaces covalentes, comportándose como nucleófilo. La expresión que describe la obtención de la *función de Fukui nucleofílica* por diferencia de densidades electrónicas obtenidas para el sistema de referencia $\rho_N(\mathbf{r})$ y tras perder un electrón $\rho_{N-1}(\mathbf{r})$, es la siguiente

$$f^-(\mathbf{r}) = \rho_{N-1}(\mathbf{r}) - \rho_N(\mathbf{r}) \quad (6)$$

Por su parte las *funciones de Fukui condensadas sobre un átomo A, electrofílica (f_A^+) o nucleofílica (f_A^-)* se obtienen aquí como diferencia entre el valor de la carga atómica NPA del átomo A en el sistema de referencia (q_{NA}) y en el mismo sistema tras ganar o perder un electrón (q_{N+1A} o q_{N-1A}), como se muestra en las expresiones (7) y (8), respectivamente:

$$f_A^+ = q_{N+1A} - q_{NA} \quad (7)$$

$$f_A^- = q_{N-1A} - q_{NA} \quad (8)$$

Multiplicando la *función de Fukui condensada* sobre cada átomo A por el valor de la *blandura global S* del sistema molecular previamente determinado mediante la expresión (4) se obtienen, según las expresiones (9) y (10), valores de *blandura atómica S_A* para las especies electrófilas (S_A^+) y nucleófilas (S_A^-). Este es un indicador de reactividad local cuyo valor puede ser comparado para un mismo átomo a lo largo de la serie de especies estudiadas, a diferencia de lo que ocurre con las *funciones de Fukui*, cuya magnitud debe ser ponderada por el número de electrones del sistema para propósitos de comparación.

$$s_A^+ = S \cdot f_A^+ \quad (9)$$

$$s_A^- = S \cdot f_A^- \quad (10)$$

3.3) Reacción tipo Michael de β ME, Cys y Hcy sobre $C\beta$ y $C\delta$ de NO_2CLA . Efecto del cambio de biotiol

Para caracterizar los efectos del cambio de tiol sobre la primera etapa de adición tiol-Michael de los tres biotioles de bajo peso molecular considerados en esta parte del trabajo de tesis (β ME, Cys y Hcy) en $C\beta/C\delta$ de NO_2CLA , se trabajó con el mismo modelo reducido del aceptor de Michael previamente empleado en los antecedentes de partida de esta tesis para determinar el mecanismo de esta reacción por modelado computacional, empleando al metiltiolato como tiol representativo [9].

Se optimizaron las estructuras del complejo inicial (IC), estado de transición (TS) y aductos nitronato producto de la reacción (P) para cada par de canales de adición en $C\beta$ y $C\delta$, con el mismo nivel de cálculo y condiciones que se utilizaron en la descripción de reactividad de las especies involucradas. Para la optimización de las estructuras de IC, TS y P se usó el algoritmo de Schlegel [78] y se verificó su naturaleza como puntos estacionarios al mismo nivel de teoría en base a los valores propios del Hessiano analítico. A partir de cada TS verificado como punto de ensilladura de primer orden, se calculó el camino de reacción correspondiente en coordenadas intrínsecas (IRC) usando el algoritmo integrador predictor-corrector HPC con 20 pasos de una magnitud de $10 \mu^{-1/2}$ -Bohr [79,80]. Se calcularon cargas atómicas NPA e índices de enlace de Wiberg (WBI) para una selección de puntos del IRC a efectos de seguir el grado de avance en la transferencia de carga entre reactivos y en la formación de enlaces

covalentes a lo largo de la reacción con β ME, con interés específico en la formación del enlace S-C entre el tiolato y los átomos C β y C δ del modelo reducido de NO₂CLA. Se examinó también el *Potencial Electrostático Molecular* (MEP) mapeado sobre la superficie de isodensidad electrónica de 0,004 u.a. para Cl, TS y P de las reacciones con los tres biotioles de la serie para ataque en C β y en C δ , respectivamente, utilizando el programa Gaussview5 [81].

3.4) Interacción de 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA en el LBD de PPAR γ . Dinámica Molecular

3.4.1) Preparación del LBD de PPAR γ partiendo de su estructura cristalográfica

Para el estudio del comportamiento de los isómeros de NO₂CLA como ligandos de PPAR γ se partió del LBD de PPAR γ obtenido a partir de la estructura cristalográfica PDBID 1FM6 correspondiente a esta proteína determinada con resolución de 2.1 Å en complejo con el receptor RXR α y en presencia de sus respectivos ligandos (rosiglitazona y ácido 9-cis-retinoico) y un péptido co-activador [64]. De esta estructura cristalográfica se extrajo solamente el LBD de PPAR γ y se minimizó su energía bajo condiciones periódicas quasi-fisiológicas representativas del medio intracelular, utilizando el campo de fuerza *amber ff14SB* y el programa AMBER16. Este campo de fuerza tiene como predecesores al *ff99* y, posteriormente, al *ff99SB* y presenta mejoras respecto a ambos en la parametrización de ángulos diedros de la cadena lateral aminoacídica, introduciendo ajustes empíricos (e incorpora parámetros para estados de protonación alternativos de las cadenas laterales ionizables) junto a múltiples ajustes a los parámetros de torsión ϕ y ψ contra datos de acoplamiento escalar de NMR y el contenido de la estructura secundaria para péptidos cortos. En resumen, estos cambios lo hacen un mejor campo de fuerza para la simulación de proteínas y péptidos [65].

El protocolo seguido para la preparación del LBD fue el siguiente:

- a) se agregaron los átomos de H faltantes en la cristalografía, manejando la protonación estándar para los residuos ionizables;
- b) se solató el sistema con una caja octaédrica truncada de agua TIP3P y se agregaron contraiones K⁺ hasta la electro-neutralidad con el módulo *tleap* del paquete AMBER16. Para las interacciones no enlazantes se usó un *cutoff* de 10 Å y las interacciones electrostáticas de largo alcance se trataron con el procedimiento Particle Mesh Ewald (PME) [85] bajo condiciones de contorno periódicas;
- c) se minimizó la energía del sistema con la proteína restringida y agua y contraiones móviles en 1.000 pasos con Steepest Descent (SD) y 4.000 pasos con un algoritmo de Conjugated Gradient (CG);
- d) se minimizó la energía del sistema completo sin restricciones en 1.500 pasos SD y 8.500 pasos CG;
- e) se calentó el sistema de 0 a 310 K durante 1 ns a volumen constante (NVT), usando el termostato de Langevin con una frecuencia de colisión de 2 ps⁻¹, restringiendo los enlaces que involucran átomos de hidrógeno con el algoritmo Shake [82] y pasos de integración de 2 fs;
- f) finalmente, se equilibró el sistema en condiciones NPT durante 5 ns, a presión y temperatura constante mantenidas con el baróstato de Monte Carlo y el

termostato de Langevin con una frecuencia de colisión de 2 ps^{-1} e igual restricción para enlaces que el punto anterior.

3.4.2) Preparación de 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA como ligandos en el LBD de PPAR γ

La estructura de los ligandos fue optimizada tal como se mencionó en 3.2. Posteriormente, fueron parametrizados utilizando el campo de fuerza *gaff* [67] y se determinaron cargas atómicas RESP [83]. Luego de esto, para considerar una ubicación inicial de cada ligando en el LBD de PPAR γ para la MD, se realizó *docking ligando-proteína* anclando los ligandos con el programa Autodock 4.2 [84]. Se utilizó una grilla que abarcara todo el LBD de interés y se centró la misma en el residuo Cys285. Se realizaron 50 corridas con la función de score del algoritmo genético Lamarckiano. Se definió un espaciado de 0,375 Å y un tamaño de paso de 0,2 para la traslación y de 12,0 Å para la rotación. Todos los clústers de estructuras obtenidos tienen entre sí una diferencia de energía menor de 2 Kcal/mol, por lo que se asume que no hay diferencias estructurales significativas entre los distintos complejos obtenidos. Se tomó el clúster mayoritario y se seleccionó una posición de partida del ligando utilizando criterio químico, buscando que la zona de doble conjugación del NO₂CLA quedara orientada hacia la Cys285. Dicha estructura es la que se tomó como punto de partida para realizar la simulación de Dinámica Molecular de los complejos.

3.4.3) Dinámica Molecular (MD) del LBD de PPAR γ sin y con 9- y 12-NO₂CLA como ligandos. Análisis de trayectoria

Se repite para los complejos PPAR γ :NO₂CLA el mismo protocolo de preparación ya descrito para el LBD en la sección 3.4.1, solvatando los sistemas en cajas octaédricas truncadas de aguas TIP3P, con su carga neta neutralizada con contraiones K⁺, minimizando y calentado en condiciones NVT y equilibrado bajo condiciones periódicas NPT a 1 atm y 310 K. Luego, para los tres sistemas moleculares (LBD y complejos 1:1 LBD:9-NO₂CLA y LBD:12NO₂CLA) se realizó exactamente el mismo protocolo de Dinámica Molecular productiva con las siguientes características: se definió una extensión temporal para la MD de 100 ns, controlando la temperatura con el termostato de Langevin (frecuencia de colisión de 2 ps^{-1}) a una temperatura de 310 K y presión de 1 atm controlada con el baróstato de Monte Carlo.

Luego de obtenida, cada trayectoria de MD productiva, se analizó con el paquete *cpptraj* de AMBER16 [69]. Se agruparon las estructuras a lo largo de toda la MD por análisis de clúster y se utilizó el clúster de mayor población para los análisis posteriores. Se analizó globalmente la estabilidad estructural a través del RMSD del *backbone* proteico respecto a la estructura inicial y a través del RMSF correspondiente las fluctuaciones de los residuos y del ligando experimentadas a lo largo de la trayectoria de simulación. También se analizó la ocupación de los enlaces de hidrógeno (EdHs) formados en las inmediaciones de cada ligando, definidos a través de parámetros estructurales, utilizando como criterio de corte geométrico distancias de 3,0 Å y ángulos de 120°. Finalmente se analizó el entorno de los ligandos, estudiando los EdHs e interacciones hidrofóbicas establecidas con la proteína utilizando el programa LigPlot+ [70] con umbral de corte en distancias de 3,0 Å y en ángulos de enlace de 135°.

4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1) Variación de la reactividad general y como nucleófilos en la serie de tioles

En la **tabla 2** se muestra el resultado de Blandura e IP obtenidos por aproximación Δ SCF para la serie de biotioles estudiados, así como la carga NPA sobre el átomo de azufre. La aproximación Δ SCF se elige para el cálculo de estos indicadores por sobre la aproximación de Koopmans por considerarla más exacta para el estudio de la situación considerada. Hay dos aspectos principalmente cuestionados de la aproximación de Koopmans a saber: la relajación orbital y la correlación de electrones [86,87]. Con respecto a la correlación electrónica, para este trabajo se utiliza el funcional ω B97X-D, que incluye la consideración de la misma. Fue necesario sin embargo, reconocer si las especies de biotioles estudiados presentan efectos de relajación orbital del dador de electrones (es decir, la respuesta de la estructura electrónica a la ausencia creada en los orbitales ocupados) que implique una metodología específica en el cálculo de la reactividad estudiada. Para esto se realizaron los cálculos de las dos formas propuestas, obteniéndose una diferencia significativa para IP y EA en cada metodología. Cuando se utiliza la aproximación de Koopmans se sobreestima en más de un 50% los valores de IP, y entre un 10% y 20% los de EA. Considerando que el efecto de relajación orbital es significativo para estas especies e incide en el resultado a analizar, se decide utilizar los resultados obtenidos mediante la aproximación Δ SCF. Estos son los valores presentados en la **tabla 2**.

Tabla 2 Blandura (s), IP y carga sobre el átomo del azufre para la serie de biotioles . K_{on} pH-independiente para los canales Beta y Delta.

	Blandura [s] en au	IP	Carga sobre Azufre (au)	K_{on} pH-Indep Canal Beta ($M^{-1} s^{-1}$)	K_{on} pH-Indep Canal Delta ($M^{-1} s^{-1}$)
Bme	5,4	0,18	-0,85	150,4	3,0
Hcy	5,4	0,18	-0,84	122,4	0,2
GHS	5,2	0,18	-0,81	192,6	0,6
Cys	5,2	0,18	-0,81	112,0	0,8
Cysgly	5,1	0,19	-0,76	139,4	3,7

El análisis está planteado desde el nivel más global al más específico. Se visualizan cambios muy poco significativos a nivel de la blandura para todos los biotioles. Algo similar ocurre con el Potencial de Ionización, que es casi idéntico en todos los casos. Desde el punto de vista global por tanto, el carácter nucleofílico no parece modificarse en función del sustituyente que se tome como tiol. Para el caso del tiol Cys, también se calcularon IP y blandura en su estado de segunda desprotonación, considerando que el efecto de reactividad total es resultado de los equilibrios entre los diferentes estados de protonación, y que esto podría incidir en los resultados, especialmente para este biotiol por su pequeño tamaño y cercanía de sus grupos funcionales. Los resultados para ese caso tampoco mostraron grandes

diferencias de reactividad para dicha especie en este estado, presentando una IP de 0,18 au y una blandura (s) de 5,8 au.

Cuando se observa en la **tabla 2** el detalle las cargas atómicas sobre el átomo que se comporta como dador de electrones, hay una variación progresiva entre las especies estudiadas. Esta diferencia en las cargas sobre el átomo de azufre puede modular en parte la primera etapa de las reacciones de tiol-Michael reportadas en artículos de antecedentes [9]. Es importante destacar que los valores de cargas sobre los tres biotioles que se estudiaron en interacción con NO_2CLA (resultados se presentan más adelante) se presentan en orden $\beta\text{ME} > \text{Hcy} > \text{Cys}$. Este orden se retomará posteriormente en la discusión de resultados.

Para reconocer la distribución espacial de la nucleofilia se muestra en la **figura 13** se muestra el mapeado de la función de Fukui $f(r)$ sobre la superficie de isodensidad electrónica a 0,004 au, donde se destacan los centro nucleofílicos con color azul. Toda la serie presenta gran similitud en la zona destacada en azul, mostrando que la reorganización de carga a nivel molecular una vez cedida en la reacción es similar para todos los sustituyentes, no siendo éste el elemento determinante de la modulación de su reactividad.

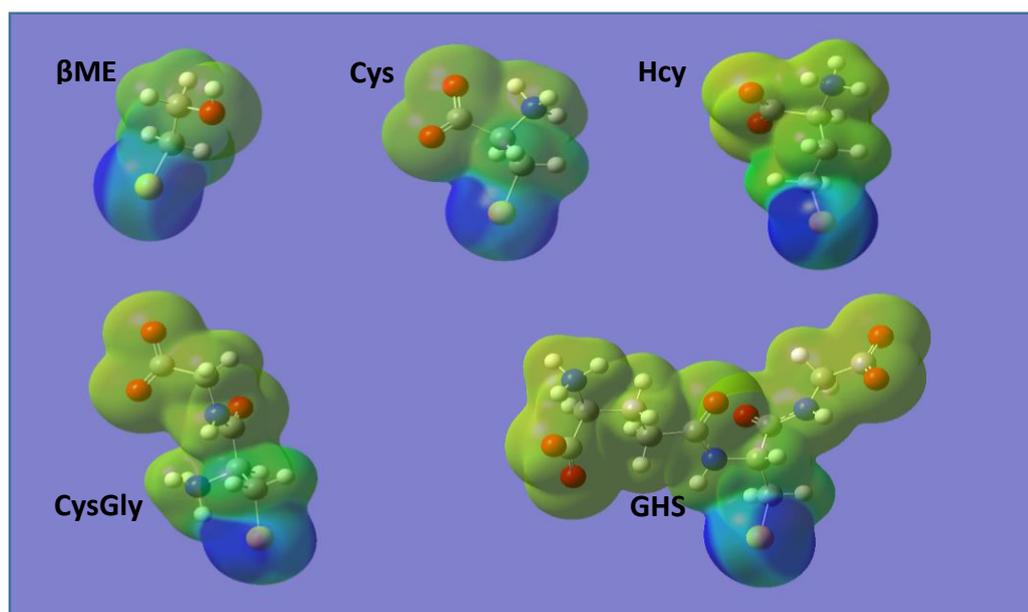


Figura 13: Fukui $f(r)$ mapeada sobre superficie de isodensidad electrónica a 0,004 au. Las áreas positivas destacadas en azul representan los centros nucleofílicos.

4.2) Electrofilia en regioisómeros de 9- NO_2CLA y 12- NO_2CLA y validación de modelo reducido (RM) de cara al estudio de la reacción tiol-Michael

De acuerdo con los resultados experimentales reportados en el trabajo de antecedente usado como referencia [9], la reactividad, vinculada a su capacidad electrofílica entre los isómeros 9- NO_2CLA y 12- NO_2CLA no presentan mayores diferencias. También se presenta en

dicho trabajo un modelo reducido que incluye la zona de conjugación y el grupo nitro (2-nitrohexa-2,4-dieno) para la experimentación *in-silico*, logrando una excelente correlación con los valores experimentales. Era de interés para esta tesina, modelar en forma completa los regioisómeros de NO₂CLA, y estudiar su características como especies electrofílicas, tanto comparándola entre ellos, como con el modelo reducido. Al igual que para la serie de biotioles, se determina IP y EA por aproximación de Koopmans y por enfoque Δ SCF para reconocer el posible efecto de relajación orbital en estas especies y determinar la mejor metodología para calcular descriptores de reactividad. Al igual que para los biotioles, estas especies presentan un efecto importante relacionado a la relajación orbital, por lo que se decide el uso del enfoque Δ SCF para calcular los indicadores que dependen de IP y EA.

Dado el comportamiento electrofílico de estas especies durante el transcurso de la reacción de adición tiol-Michael, el indicador de reactividad global más pertinente es la dureza. Para 9-NO₂CLA, la dureza es de **5,66 eV**, para 12-NO₂CLA es de **5,69 eV** y para el RM-NO₂CLA es de **5,72 eV**. De acuerdo a lo esperado, la dureza es muy similar en los 3 casos, con una diferencia máxima de 0,08 eV entre el valor más chico y el más alto. Otro indicador a considerar desde el punto de vista de la reactividad en la zona de conjugación de estas especies, es el valor de las cargas atómicas sobre los cuatro carbonos que forman parte de la conjugación, y que podrán ser objetivo de ataque nucleofílico. En la **tabla 3** se muestran las cargas sobre los C α , C β , C δ y C γ . Una vez más, se muestran muy similares ambos isómeros con respecto a la distribución de cargas, especialmente sobre el C β y C δ donde ocurre dicho ataque. El modelo reducido también reproduce muy bien los valores de carga de los compuestos estudiados.

Tabla 3: Cargas NPA en los C de la zona de conjugación (au)

	9-NO ₂ CLA	12-NO ₂ CLA	RM-NO ₂ CLA
Cα	0,08	0,15	0,07
Cβ	-0,15	-0,16	-0,15
Cδ	-0,31	-0,33	-0,32
Cγ	-0,10	-0,08	-0,11

En la **figura 15** se muestra la Fukui $f^+(r)$ mapeada sobre superficie de isodensidad electrónica a 0,004 ua para los dos regioisómeros estudiados. En este trabajo se replica el cálculo ya realizado en el estudio previo, obteniéndose una distribución de exactamente las mismas características. Se reconoce la organización de las zonas electrofílicas, marcadas positivas en azul, para ambos isómeros. Se señalan los Carbonos directamente participantes

en la reacción tipo Michael. De acuerdo a lo esperado, all igual en lo reportado en [9], se reconocen zonas electrofílicas sobre el C β y sobre el C δ , siendo sobre el primero de mayor extensión que sobre el segundo. Esto señala al C β como el más propenso al ataque electrofílico de los dos. Ambos isómeros presentan diferencias de electrofilia muy similares para los átomos de carbono de interés.

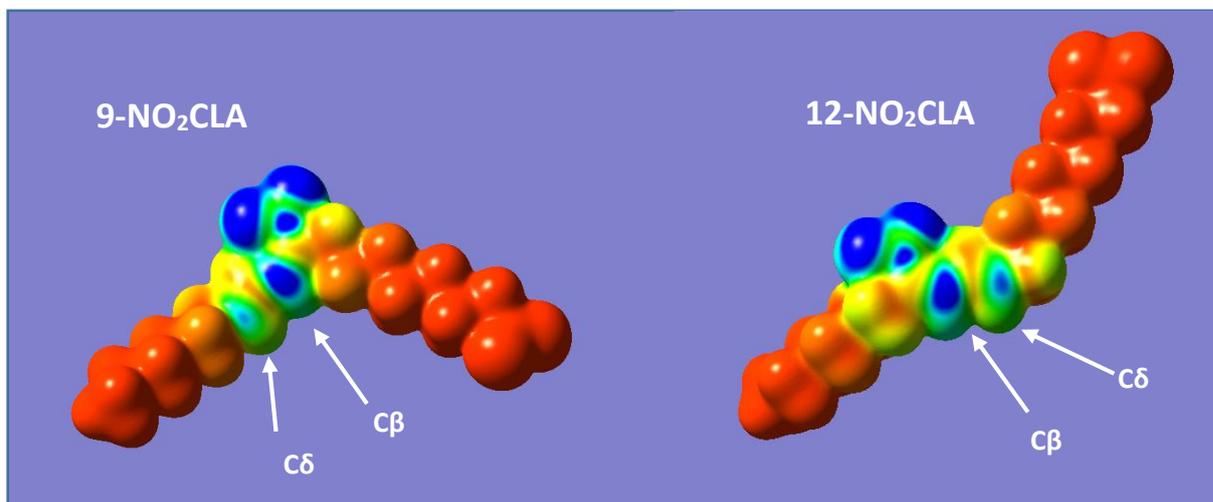


Figura 14: Fukui f^+ mapeada sobre la superficie de isodensidad a 0,004 ua para 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA. Escala de colores entre -5×10^{-5} au en rojo y 1×10^{-3} au en azul. Las zonas positivas representan las zonas de mayor electrofilia. Se señalan los carbonos participantes en la reacción de adición tiol-Michael.

La Función de Fukui presenta dependencia con el número de electrones de la molécula [88], por lo que no permite comparar el compuesto completo con el modelo reducido. A los efectos de esta comparación se calcula la **blandura local**, de acuerdo a lo desarrollado en metodología. La **tabla 4** presenta los valores de esta propiedad calculados para los cuatro carbonos de interés para los dos regioisómeros y el modelo reducido. La marcada reactividad local para los átomos β y δ se muestra claramente en estos valores. Una vez más, ambos isómeros se presentan similares en el comportamiento para estos cuatro átomos y el modelo reducido reproduce este comportamiento.

Tabla 4: Blandura local calculada para los C de la zona de conjugación (au).

	9- NO ₂ CLA	12- NO ₂ CLA	RM-NO ₂ CLA
Cα	0,03	0,04	0,02
Cβ	-0,44	-0,43	-0,45
Cδ	0,08	0,06	0,07
Cγ	-0,32	-0,31	-0,30

De acuerdo a todos los resultados obtenidos, la reactividad de los isómeros 9 /12-NO₂CLA está bien capturada en el modelo reducido.

4.3) Efecto del cambio de biotioles en la primera etapa de la reacción de adición de Michael para C β y C δ de NO $_2$ CLA.

Se estudia la primera etapa de la reacción de adición de tres biotioles de la serie total, β ME, Cys y Hcy para profundizar en el efecto del cambio de tiol en su acción nucleófila sobre los dos carbonos que pueden ser objeto de adición tipo Michael en la zona de conjugación del NO $_2$ CLA. De acuerdo a lo reportado experimentalmente, el comportamiento sobre el C β y el C δ tiene diferencias a nivel cinético y termodinámico. La **figura 15** muestra el IRC en cada canal, para el β ME como reactivo nucleofílico. Los IRC fueron obtenidos a nivel ω B97X-D/6-31+G(d,p) en solución acuosa tal como se describe en metodología. En la **Tabla 5** se reportan las frecuencias vibracionales imaginarias asociadas para cada TS. Se obtuvieron perfiles similares de IRC para Cys y Hcy. La naturaleza de todas las estructuras para cada etapa de la reacción fueron verificadas con el cálculo del Hessiano analítico al mismo nivel de teoría, siendo los resultados obtenidos confiables en términos de cambios estructurales a lo largo de la reacción.

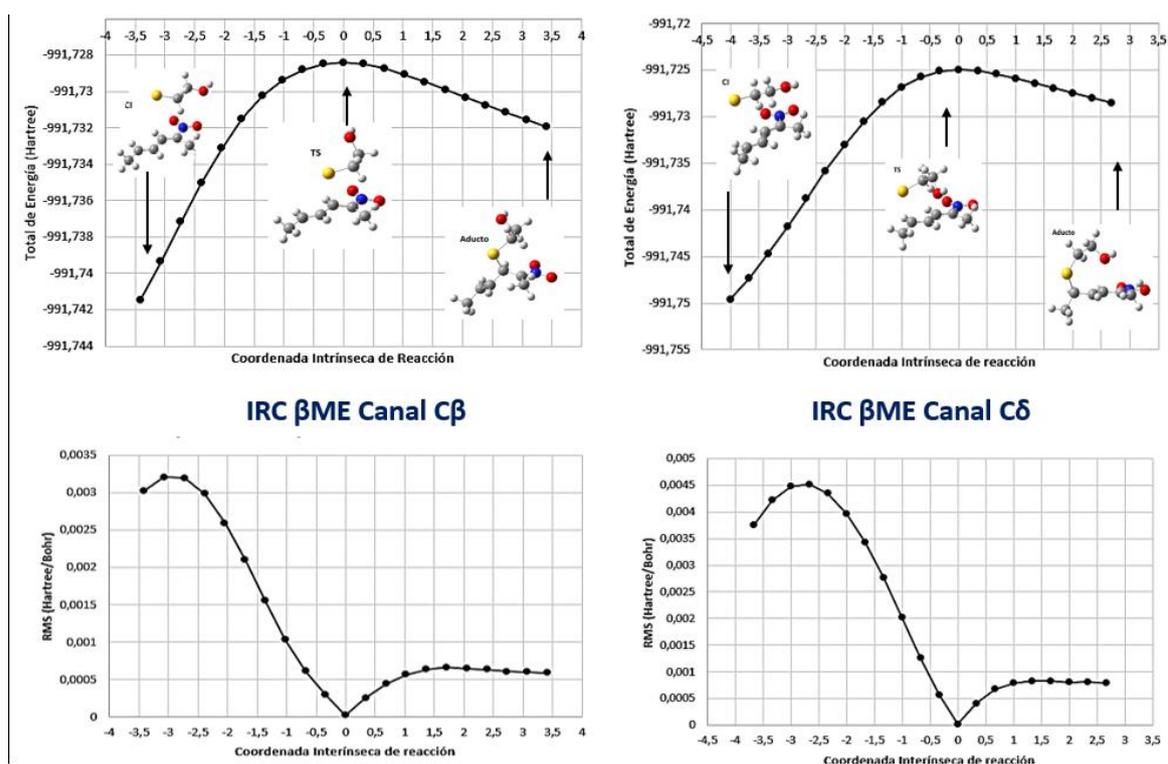


Figura 15: IRC para ataque nucleofílico de β ME sobre C β y C δ de RM-NO $_2$ CLA. Se muestra Energía total y Gradiente a lo largo de Coordenada Intrínseca de Reacción. Se superponen las estructuras optimizadas para cada etapa de la reacción (IC, TS y Aducto nitronato).

Tabla 5: Frecuencias vibracionales imaginarias asociadas a cada TS de las reacciones de Michael sobre canal β y δ de RM/NO₂CLA (cm⁻¹).

	Bme	Cys	Hcy
Cβ	-207,3	-245,4	-200,6
Cδ	-277,9	-299,4	-258,8

De acuerdo a lo que se ha reportado para esta reacción, la mayor parte de la carga que aporta la especie nucleofílica, no permanece en ninguno de los carbonos de la zona de conjugación. En simulaciones previamente realizadas, no se encuentra en ningún caso acumulación de carga sobre este grupo de carbonos. En todos los casos, la elevada electronegatividad el grupo Nitro hace que este funcione como un fuerte atractor de carga. Como resultado de esto, la misma se deslocaliza de la coordenada de reacción y se traslada hacia dicho grupo [9]. Es posible por tanto seguir el desarrollo de la reacción reportando la carga NPA sobre el átomo de azufre, y la suma de las cargas NPA sobre los átomos del grupo NO₂. Es de esperar que la carga cedida por el primero pase en su totalidad o casi completamente al segundo a lo largo de la reacción. En la **tabla 6** se reportan dichos valores para los 3 biotioles estudiados en esta etapa para ambos canales de ataque sobre RM-NO₂CLA y para CI, TS y aducto nitronato. En coincidencia con lo propuesto en antecedentes, a lo largo de la reacción, el átomo de azufre cede carga electrónica mientras que el grupo NO₂ aumenta la suya en igual proporción.

Tabla 6: Cargas NPA para átomo de azufre y grupo nitro en CI, TS y aducto nitronato en canal β y δ

		CI Biotiol/NO ₂ CLA		TS Biotiol/NO ₂ CLA		Aducto Nitronato	
		canal- β	canal- δ	canal- β	canal- δ	canal- β	canal- δ
βME	q (S ⁻)	-0,99	-0,81	-0,54	-0,57	-0,14	-0,05
	q (NO ₂)	-0,39	-0,38	-0,43	-0,48	-1,10	-1,00
Cys	q (S ⁻)	-0,77	-0,77	-0,40	-0,48	-0,16	-0,16
	q (NO ₂)	-0,39	-0,39	-0,67	-0,63	-1,10	-1,02
Hcy	q (S ⁻)	-0,83	-0,80	-0,52	-0,57	-0,15	-0,14
	q (NO ₂)	-0,40	-0,37	-0,82	-0,59	-1,10	-1,00

Según lo descripto experimentalmente para estas reacciones, hay una diferencia en la cinética de la adición dependiendo del carbono sobre el cuál se da el ataque nucleofílico. La reacción sobre el C β fue reportada como más rápida, asociada a control cinético, mientras que la reacción sobre el C δ se reportó como más lenta, pero con un producto progresivamente de mayor abundancia relativa, asociado a una mayor estabilidad termodinámica [9]. Recurriendo a la teoría del estado de transición (TST), es posible relacionar las constantes cinéticas obtenidas experimentalmente, con valores de Energía libre de activación (ΔG^\ddagger) utilizando la

Ecuación de Eyring. Siendo que a nivel teórico las reacciones fueron modeladas usando un modelo reducido de NO₂CLA, los valores relativos de ΔG^\ddagger obtenidos en forma teórica no son comparables con los obtenidos experimentalmente. Sin embargo, si se considera la diferencia entre las constantes cinéticas de los canales β y δ , expresado en diferencia de Energía libre de activación, el modelo teórico debería ser capaz de reproducir en buena medida estas diferencias. Así mismo, debería ser capaz de mantener tendencias generales como por ejemplo, valores de ΔG^\ddagger mayores para todas las reacciones sobre el C δ . La **tabla 7** reporta los valores de Energía relativa de Activación (ΔG^\ddagger), la diferencia para esta Energía entre los canales β y δ , experimental obtenida de la k_{on} pH-independiente calculadas de los datos reportados en [9] y teórica ($\Delta \Delta G^\ddagger$), y finalmente el ΔG de reacción.

Como primera observación, para los tres biotioles estudiados, existe una diferencia en la energía relativa libre entre los dos canales de ataque nucleofílico de acuerdo a lo esperado. Y en todos los casos esta se presenta mayor para la reacción sobre el C δ , coincidente con una cinética de reacción más lenta. La diferencia entre los canales analizada en forma teórica y contrastada con los valores prácticos ajusta en forma exacta para β ME y Hcy. En el caso de Cys, no ajusta en valor exacto, pero presenta una diferencia menor a 1Kcal/mol y mantiene la tendencia de ser mayor sobre el canal δ .

Tabla 7: Energías relativas de activación a 298 K y 1 atm.

RM-NO ₂ CLA	ΔG^\ddagger		$\Delta(\Delta G^\ddagger)$ C δ -C β		ΔG_{rn}	
	C β	C δ	Teórico	Exp.	C β	C δ
Hcy	27,8	30,7	1,8	1,8	-13,8	-8,8
Cys	24,6	25,8	1,2	2,0	-11,7	-7,9
βME	18,3	20,8	2,5	2,5	-5,3	-11,5

Energías relativas de activación (ΔG^\ddagger), diferencia de Energía de activación entre reacción sobre C β y C δ , y Energía relativa de reacción (ΔG_{rn}). Todos los valores en Kcal/mol.

Esta diferencia en el desarrollo de la reacción cuando la misma se da sobre uno de los átomos u sobre el otro, puede en parte ser explicada por la diferencia en el comportamiento nucleofílico del C β que ya se desarrolló anteriormente. Desde un análisis *in silico*, usando como indicadores las cargas NPA sobre el átomo de azufre y el índice de Wiberg para la formación del enlace covalente S-C β y S-C δ , es posible además agregar elementos para la explicación de este comportamiento químico. Mediante el Principio de la No-perfecta Sincronización (PNS por sus siglas en inglés para *Principle of Nonperfect Sincronization*), Bernasconi desarrolla una idea simple pero con extensa capacidad de predicción a nivel de mecanismos químicos. El Principio de la No-perfecta Sincronización establece una conexión entre los desequilibrios del estado de transición y las barreras intrínsecas de las reacciones.

Su formulación original define que cualquier factor estabilizador de producto cuyo desarrollo se retrasa en los cambios principales en el TS, o cualquier factor estabilizador de reactivos cuya pérdida en el TS se adelanta a estos cambios de enlace, aumenta la barrera intrínseca, disminuyendo la constante de velocidad intrínseca. A la inversa, para aquellos factores estabilizadores del producto que se desarrollan antes de los principales cambios en los enlaces, o para los factores estabilizadores de los reactivos cuya pérdida va a adelantada a los cambios en los enlaces, los efectos se revierten, es decir, hay una disminución en la barrera intrínseca y una disminución en la constante de velocidad [89]. EL PNS adquiere especial utilidad cuando se desea reconocer factores que generen diferencias en la cinética de reacciones al cambiar sustituyentes en reactivos o productos. Hay varios factores que pueden afectar el desbalance de la reacción y “retrasar” o “adelantar” la misma. Algunos de estos son, efectos electrostáticos, solvatación, polaridad del solvente, polaridad de sustituyentes no adyacentes, entre otros [90]. Uno de ellos es la transferencia de carga, y los posibles desbalances que puedan existir en esta transferencia durante la reacción, especialmente teniendo como punto de referencia el TS para cada reacción comparada. Se ha usado previamente estudios *in-silico* siguiendo la transferencia de cargas NPA en contexto del PNS para explicar diferencias de reactividad de estas especies en distintas reacciones [91].

Para los casos de interés de este trabajo, ya se mostró previamente que no existen mayores diferencias en el aporte de carga de parte del tiolato, aún cambiando este a lo largo de la serie estudiada. Sin embargo, es posible utilizar el PNS como modelo explicativo para la diferencia cinética encontrada en las reacciones de adición tiol-Michael sobre los C β y C δ de NO₂CLA. Si esta idea es correcta, sería esperable encontrar un desbalance evidente en la transferencia de carga en los TS de las reacciones de los tres tiolatos con NO₂CLA, mostrando un adelantamiento de la transferencia de carga para el canal más rápido, o a la inversa, un retardo en la transferencia para el canal más lento.

En la **figura 16** se muestra la relación entre el avance de la transferencia de carga, seguido por la pérdida de carga NPA sobre el átomo de azufre del tiolato, en función del avance de la formación del enlace S-C, seguido por índice de Wiberg. Es claramente visible que los resultados coinciden con lo previsto por el Principio de No-perfecta Sincronización. Para los tres casos estudiados, los TS sobre el C β de NO₂CLA se ubican desplazados a la derecha en el eje horizontal, estando por tanto más avanzados en la consolidación del enlace covalente S-C β . Al mismo tiempo se encuentran desplazados hacia abajo en el eje vertical, por tanto con una transferencia de carga adelantada de parte del tiolato, evidenciada por la pérdida de carga sobre el átomo de azufre. Esta diferencia en el desarrollo de la reacción, junto con la diferencia en el comportamiento nucleofílico de los C β y C δ de NO₂CLA son elementos que permiten explicar al menos en parte las diferencias cinéticas entre ambos canales.

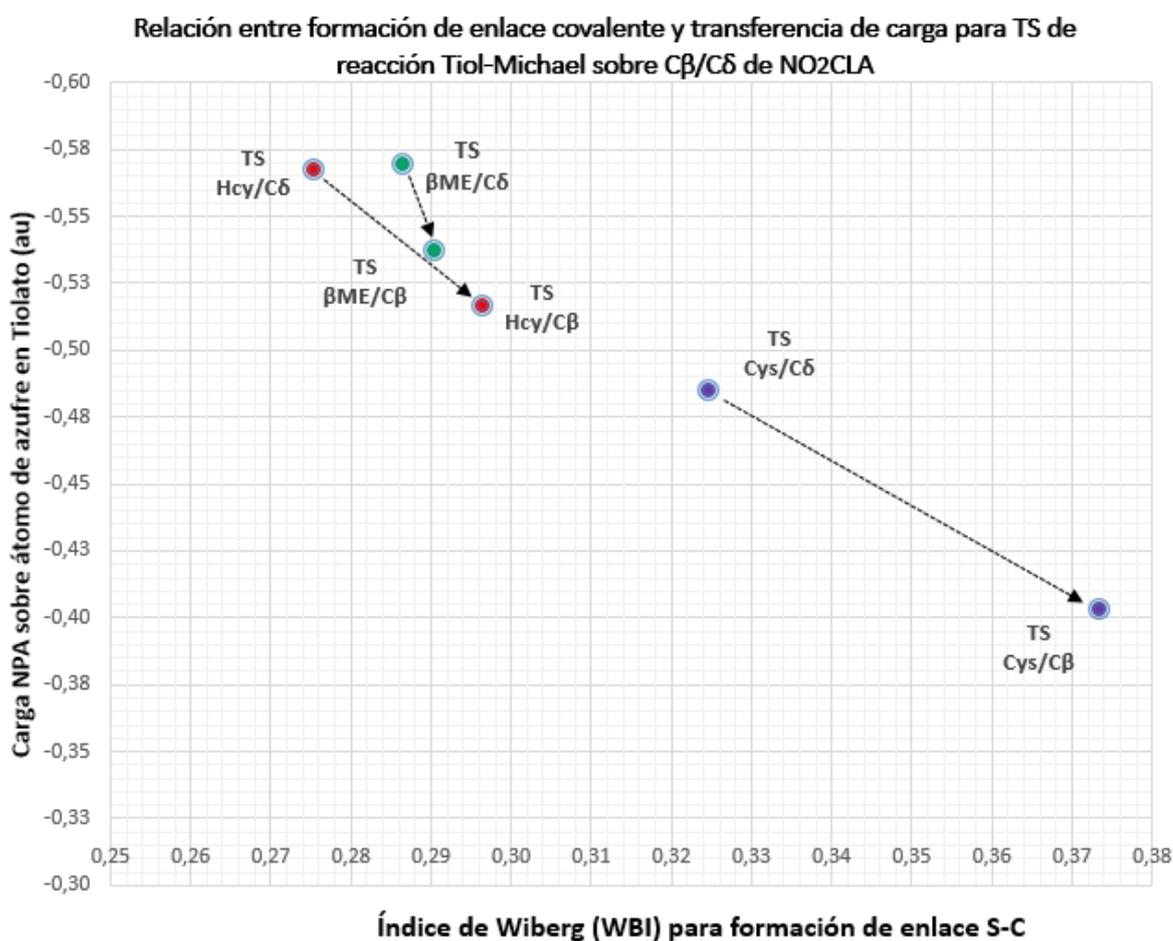


Figura 16: Transferencia de carga NPA desde átomo de azufre en función de la formación de enlace S-C según índice de Wiberg para cada TS sobre ambos canales de reacción de NO₂CLA. Se etiqueta para cada punto mostrado el tiolato de ataque nucleofílico y el carbono sobre el cual se da la reacción de Michael. Se unen con flecha punteada los puntos correspondientes a un mismo tiolato para canales diferentes.

Otro elemento que surge de este análisis está relacionado con el carácter predominante en el avance de la reacción para cada TS. Si bien las diferencias entre los C β y C δ se muestran similares y siempre con la misma tendencia, no son de idéntica característica. El estado de avance de la reacción en los TS para el β ME presenta una diferencia

fundamentalmente en el eje vertical, es decir en el avance de transferencia de carga. Mientras que para los TS de Cys, la mayor diferencia de avance se presenta en el eje horizontal, es decir en la reorganización nuclear expresado en el índice de Wiberg. La Hcy presenta un comportamiento intermedio. Esta características coincide con la concentración de carga encontrada para cada tiolato, que como se mostró anteriormente, sigue el orden $\beta\text{ME} > \text{Hcy} > \text{Cys}$. Esto permite identificar que, si bien el cambio en el tiol no modifica en gran medida las diferencias cinéticas globales entre ambos canales, sí modifica la característica predominante en esta diferencia, siendo en algún caso más pronunciada en carácter electrónico, y en otras con efecto más importante en el establecimiento del enlace seguido por Wiberg.

Para dar una mirada más en detalle en el proceso de formación del enlace covalente durante esta primera etapa de la adición de tiol-Michael, se realizó un análisis de la transferencia de carga y enlace de Wiberg a lo largo de la coordenada de reacción para el βME , tanto en canal- β como en canal- δ . El resultado se muestra en la **figura 17**. En esta se evidencia que la transferencia de carga está siempre adelantada para el avance de la reacción sobre el canal- β , mientras que sobre el canal- δ es notoriamente más retrasada.

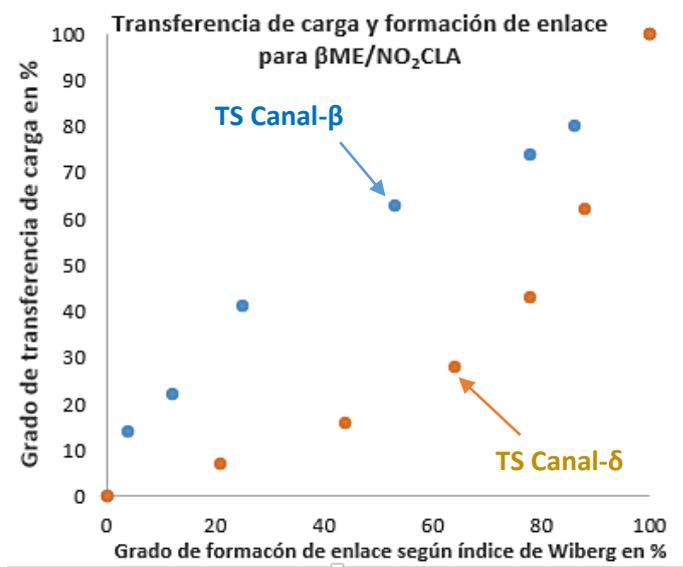


Figura 17: Porcentaje de transferencia de carga NPA y grado de formación de enlace según índice de Wiberg para de la formación de enlace S- sobre ambos canales de reacción de NO_2CLA con βME . Se etiqueta El punto correspondiente a los TS.

En los análisis realizados hasta ahora en este trabajo, se ha considerado la pérdida de carga NPA sobre el átomo de azufre como indicador del avance de transferencia de carga a lo largo de la reacción. Esto implica asumir metodológicamente que la carga que cede dicho átomo es la que principalmente avanza sobre la especie electrofílica, y termina ubicándose sobre el grupo nitro del NO_2CLA , que es el grupo de mayor electronegatividad, tal como se ha propuesto en antecedentes. Se podría discutir sobre el uso de este indicador de avance de reacción planteando una posible reorganización de carga durante el desarrollo de la reacción

por parte del tiolato, transfiriendo parte de esa carga, no hacia el NO₂CLA, sino sobre sí mismo, en dirección inversa a la propuesta para la reacción. Para verificar este punto se calculó las cargas NPA sobre el tiolato completo. En la **tabla 8** se presentan los valores de carga NPA para βME, Cys y Hcy en cada etapa de la reacción para ambos canales. Es claro que el avance de carga desde el átomo de azufre en ataque nucleofílico sobre NO₂CLA no redistribuye parte hacia el propio tiolato, sino que transfiere en su totalidad hacia la especie electrofílica. La especie nucleofílica durante la reacción tipo Michael no gana carga en ninguna de sus etapas, y la pierde en una proporción coincidente con la pérdida mostrada por su átomo de azufre. Por lo tanto, seleccionar la variación en la carga de éste átomo como uno de los indicadores de avance de reacción es un criterio válido para el análisis de este grupo de estudiado.

Tabla 8: Cargas NPA para cada tiolato completo en CI, TS y aducto nitronato para las reacciones sobre canal β y δ

		CI tiolato/NO ₂ CLA		TS tiolato/NO ₂ CLA		Aducto Nitronato	
		canal-β	canal-δ	canal-β	canal-δ	canal-β	canal-δ
βME	q (RS-)	-0,99	-0,98	-0,68	-0,68	-0,06	-0,08
Cys	q (RS-)	-1,00	-0,99	-0,63	-0,68	0,03	0,04
Hcy	q (RS-)	-1,02	-0,98	-0,67	-0,72	0,04	0,06

Finalmente, de acuerdo a lo propuesto previamente como mecanismo de estas reacciones, posteriormente a la formación del aducto nitronato, la neutralidad de la molécula se obtendría en solución acuosa, factiblemente por la captura de un protón por parte del grupo nitro en una reacción de O-protonación, reportada como preferencial en compuestos de estructura química similar. Posteriormente, por tautomerización, probablemente asistida por moléculas de agua, terminar en la especie termodinámicamente más estable, un aducto nitroalqueno C-protonado [9]. Si bien en este trabajo no se aborda esa etapa final de la reacción estudiada, es de interés analizar si las condiciones para la O-protonación, correspondiente al paso siguiente de reacción, se mantienen similares aún cuando se cambie el biotiol reactivo. Para eso, se muestra en la **figura 18** el potencial electrostático molecular (MEP) mapeado sobre la superficie de isodensidad de 0,004 ua para todos los aductos nitronatos de la serie estudiada. El MEP permite visualizar el efecto electrostático total de núcleos y electrones en conjunto, reflejados como efectos de superficie a determinada isodensidad. Puede ser usado como indicador de la tendencia de ciertas zonas de la molécula a captar electrones, o para el caso de interés, protones. Las zonas con valores de MEP positivas tenderán en general a interactuar favorablemente con nucleófilos (por ejemplo, sitios negativos) y las regiones negativas con electrófilos (por ejemplo, sitios positivos) [92]. Se reportan también los valores de carga NPA sobre el grupo Nitro para el aducto nitronato. Los resultados son muy similares para todos los aductos mostrados, donde se evidencia que el sitio con mayor preferencia para la captura de protones es siempre el grupo Nitro, independientemente del cambio de biotiol reactivo. No se visualizan otras zonas con tendencia similar sobre los carbonos de conjugación que permitan una reacción de protonación directa sobre el Cα o el Cδ para una C-protonación como etapa siguiente. Importa destacar que es una aproximación al comportamiento de esta especie y su tendencia a captar

protones para una posible O-protonación. El detalle de esta etapa final no forma parte de los objetivos de estudio de este trabajo.

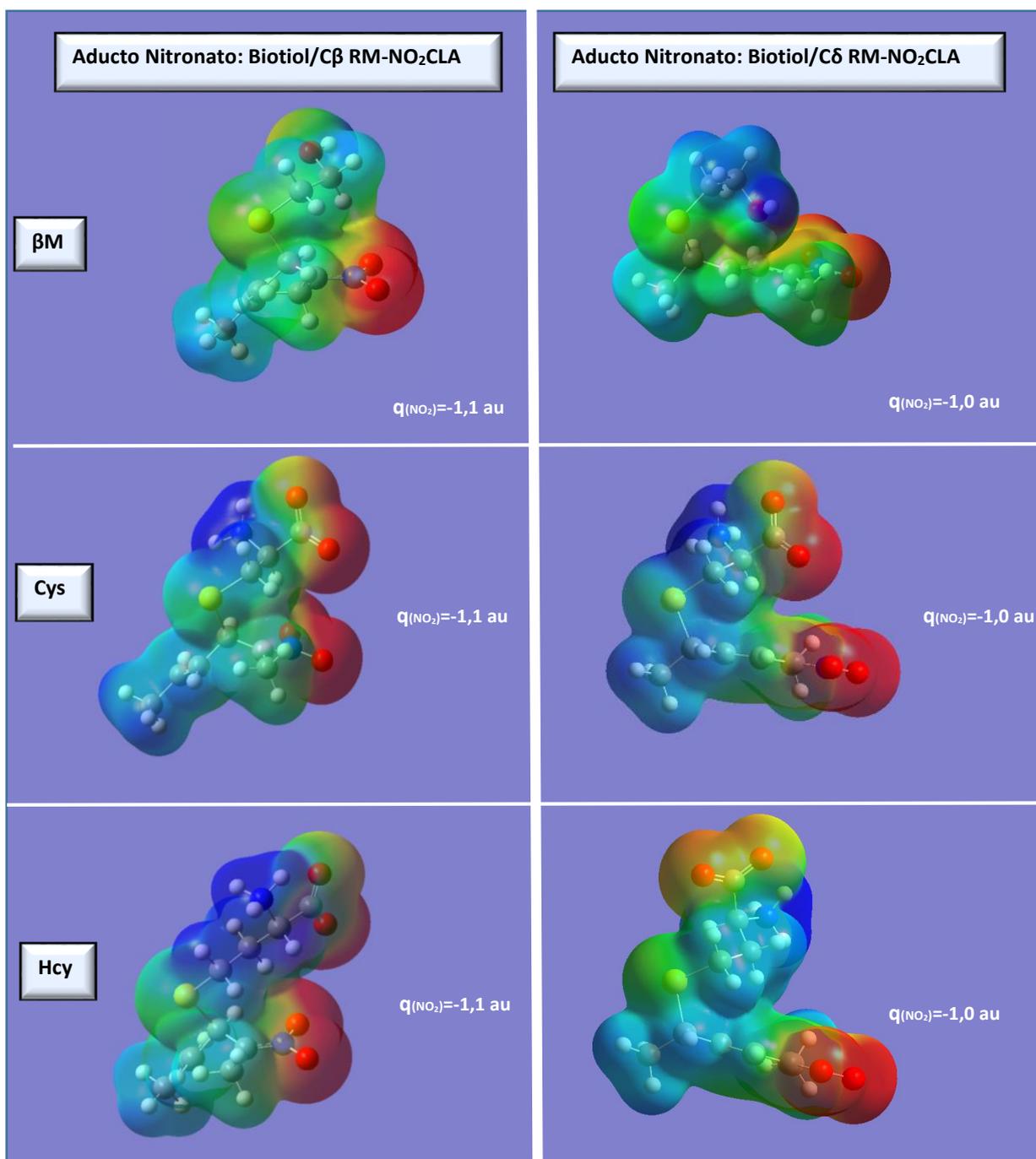


Figura 18: Potencial electrostático molecular (MEP) mapeado sobre superficie de isodensidad electrónica a 0,004 au para aducto nitronato de los tres biotioles estudiados con carbonos β y δ de NO₂CLA. La escala de colores varía de -0,250 au en rojo a 0,001 au en azul. Se superponen las cargas NPA para el grupo NO₂.

4.4) Interacción de 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA con LBD de PPAR γ .

Como se mencionó en introducción, el comportamiento de los ácidos Nitrolinoleicos sin conjugación ha sido estudiado en relación con su afinidad y capacidad de activar PPAR γ . Se ha reportado que el 12-LNO₂ es el más potente activador de PPAR γ mientras que los isómeros 9/10-LNO₂ lo son en mucha menor medida [34]. Así mismo, se explicitó lo reportado con respecto al comportamiento de los ligandos con acción agonista parcial y agonista total. Sobre esto en particular importa recordar que la zona de acomodación en el bolsillo de unión a ligando es diferente para cada uno de estos grupos, como también son distintas las α -hélices con las que interactúan y los efectos sobre las mismas [47,48,93]. Al mismo tiempo, dos residuos se han propuesto como de importancia en la interacción de agonistas parciales de PPAR γ . Uno es la Cys285, cuya interacción con el ligando reduciría la movilidad de la H3. Y el otro es Ser273, mediante bloquear la fosforilación de PPAR γ en dicho residuo [49].

Es de interés por lo tanto para este trabajo, estudiar las interacciones de los regioisómeros de NO₂CLA en LBD de PPAR γ , prestando especial atención a la zona donde se acomodan para definir la posibilidad de interactuar con Cys283, siendo esta capaz de funcionar como especie nucleofílica en una reacción tiol-Michael como las que se han estudiado previamente.

La **figura 19** presenta los RMSD del backbone respecto a la estructura inicial obtenidos según se describe en metodología, para el LBD de PPAR γ sin ligando, y para el mismo LBD con los ligandos 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA. Se evidencia que el sistema modelado alcanza la estabilidad global sin mayores irregularidades a destacar en este proceso, con fluctuaciones promedio al finalizar la dinámica de 1,5Å y 2,0Å para LBD con y sin ligando respectivamente.

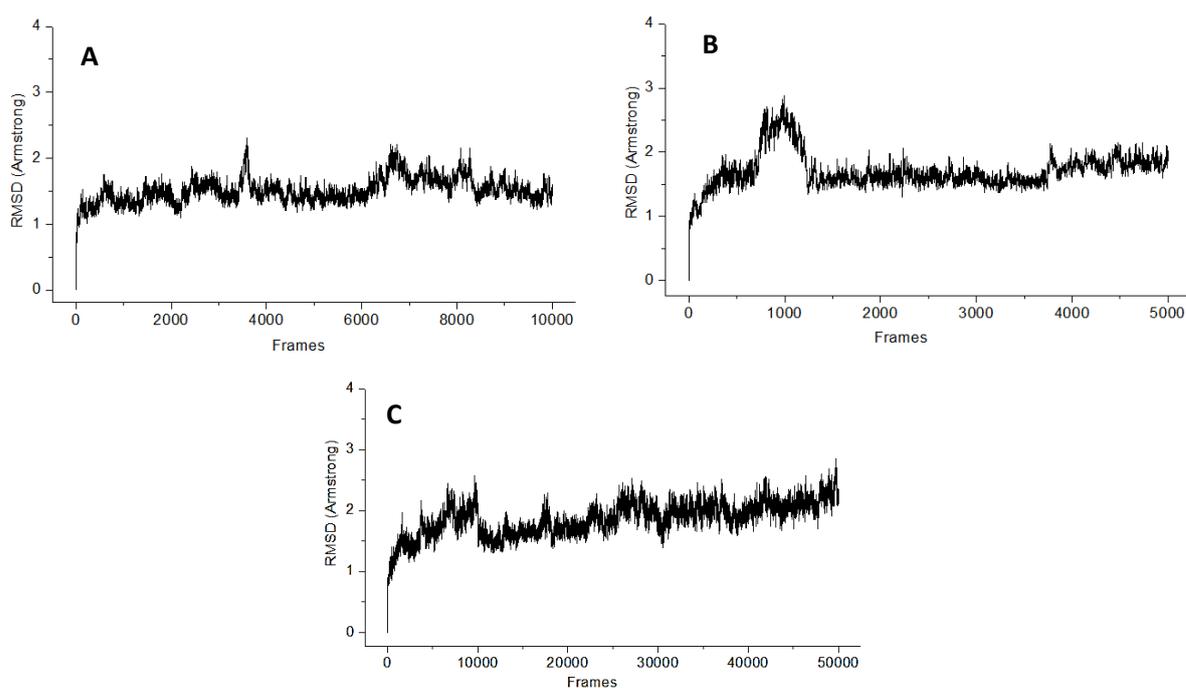


Figura 19: RMSD del Backbone respecto a estructura inicial. **A:** LBD PPAR γ + 9-NO₂CLA **B:** LBD PPAR γ + 12-NO₂CLA **C:** LBD de PPAR γ

Para comparar las fluctuaciones de los residuos del LBD y del ligando experimentadas a lo largo de la trayectoria de simulación se realiza el RMSF para las tres situaciones estudiadas. En la **figura 20** se los presenta superpuesto para reconocer similitudes o diferencias en la fluctuación de la estructura del LBD en presencia o ausencia de ligando, o comparando los dos regioisómeros entre sí. Se evidencia que las zonas de mayor movilidad en el LBD coinciden en general en presencia de los compuestos 9 y 12-NO₂CLA. Hay alguna variación en la intensidad del efecto sobre estas zonas. La presencia del ligando 9-NO₂CLA, señalado con línea azul, flexibiliza un poco más la zona de la H3 y el 12-NO₂CLA señalado con línea roja, la zona de H2 y hoja-β cercana. Pero en forma general ambos afectan estructuralmente las mismas zonas del LBD.

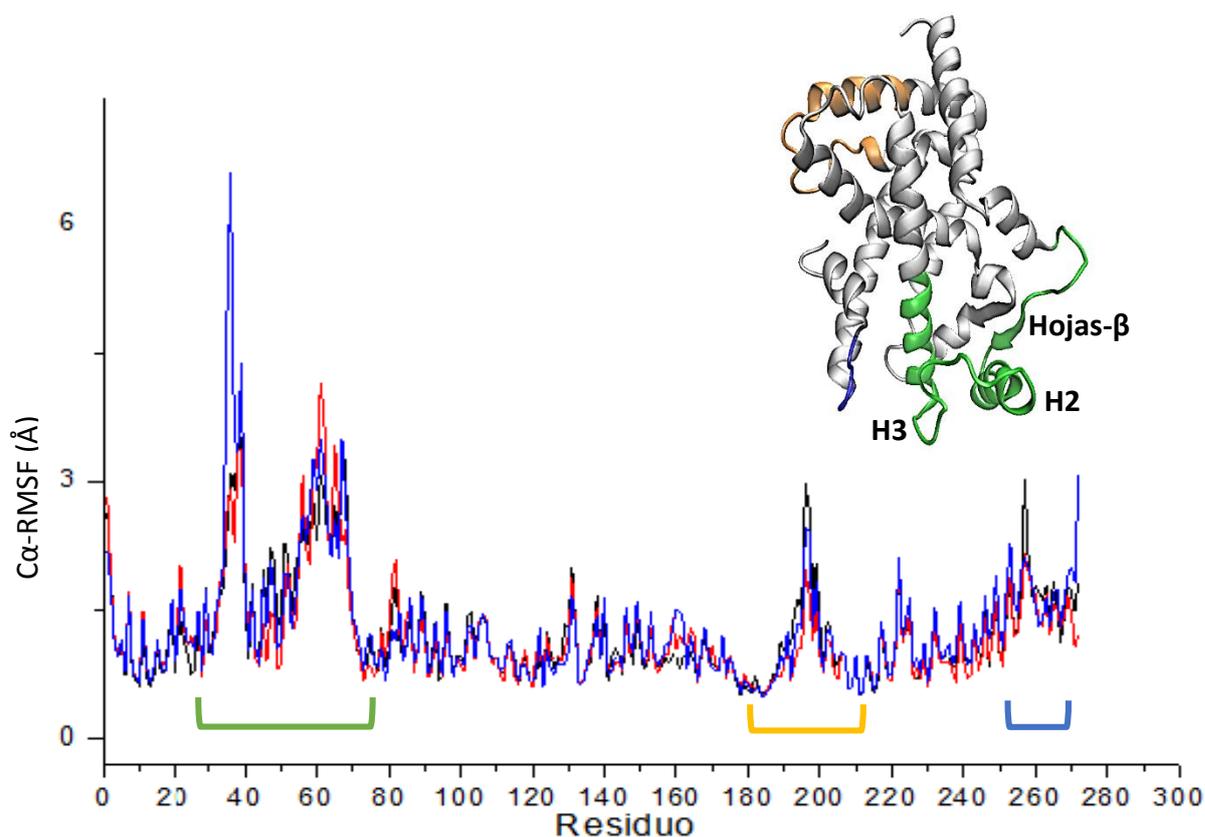


Figura 20: RMSF del Backbone superpuesto. **En línea azul:** LBD PPAR γ +9-NO₂CLA. **En línea roja:** LBD PPAR γ +12-NO₂CLA **En línea negra:** LBD de PPAR γ sin ligando. **Esquina superior derecha:** Estructura del LBD de PPAR γ con destaque de zonas con cambio en la movilidad de los residuos. Colores verde, naranja y azul se referencian en el eje horizontal del RMSF.

En la **figura 21** se superponen las estructuras destacando las variaciones estructurales basadas en RMSF para las 3 combinaciones posibles. No se destaca ninguna zona con modificaciones severa, pero se reconocen zonas de modificación intermedia (color blanco) en la movilidad de la estructura proteica, las ya señaladas H3, H2, Hojas-β, y en forma indirecta, la porción AF-2. Así mismo es posible visualizar la zona donde se acomodan los regioisómeros de NO₂CLA, ambos en la porción identificada como ARM3 [45]. Tanto las hélices que afectan

como la zona de ubicación se corresponden con lo reportado para agonistas parciales de PPAR γ . Este comportamiento además es indistinto para ambos regioisómeros.

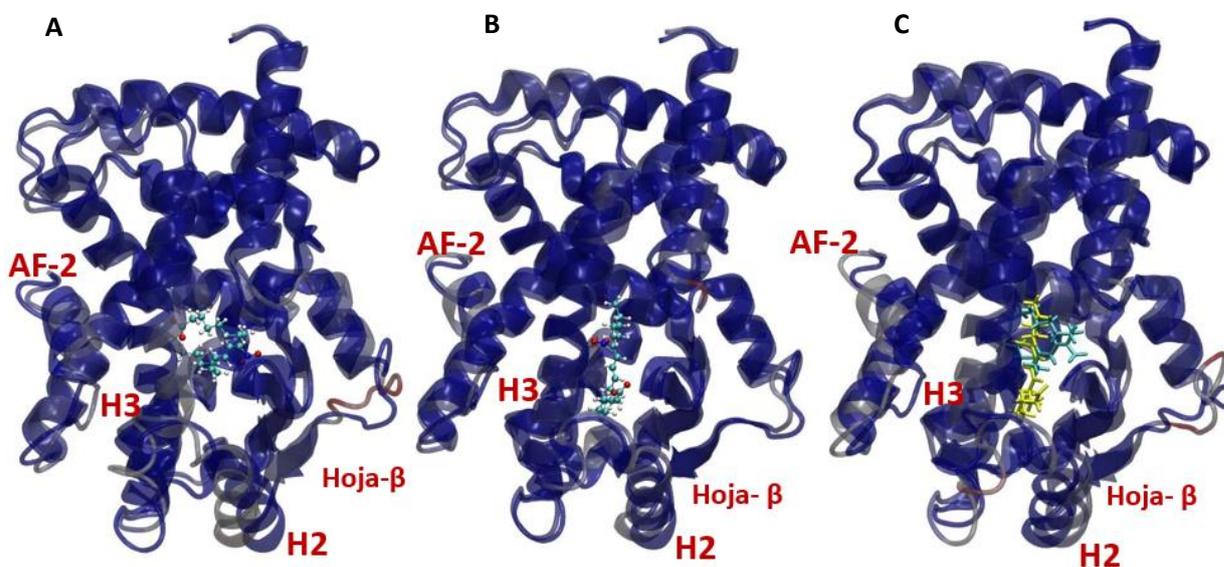


Figura 21: Superposición de estructuras de LBD de PPAR γ y ligando basado en RMSF del Backbone. **A:** PPAR γ vs PPAR γ +9-NO₂CLA. **B:** PPAR γ vs PPAR γ +12-NO₂CLA. **C:** PPAR γ +9-NO₂CLA vs PPAR γ +12-NO₂CLA. Se representan en azul las porciones sin variaciones, en blanco las que presentan variaciones medias, y en rojo las que presentan grandes variaciones.

La **figura 22** muestra las interacciones más cercanas del ligando en el LBD de la proteína, representadas en 2D, obtenidas con el programa LigPlot⁺ para el clúster mayoritario de cada MD. Como criterio de corte y tal como se detalla en metodología, se tomó una distancia de 3,0 Å y ángulos de 135 °. Del análisis de estas interacciones surgen algunos elementos importantes a considerar. En primer término, si bien los regioisómeros 9 y 12-NO₂CLA se ubican en la misma zona, descrita como ARM3, presentan algunas diferencias con respecto a los residuos con los que establecen mayor interacción. El isómero 9-NO₂CLA establece EdH con Ser289 y Glu343. Mientras que el 12-NO₂CLA establece EdH con Arg288, y Ser342. Así mismo, éste último establece EdH con al menos 3 moléculas de H₂O de hidratación del LBD. Por último, cabe destacar que la Cys285 aparece como parte del entorno más cercano de 12-NO₂CLA, pero no cerca de la zona de conjugación, ni orientada de forma tal que permita un ataque nucleofílico sobre dicha zona del ligando.

Finalmente, el análisis de las interacciones que implican EdH, realizado con CPPTRAJ para la totalidad de los clústeres obtenidos a partir de la MD para cada regioisómero como ligando, brinda como resultado los siguientes residuos participantes. Para el 9-NO₂CLA reconoce Ser289 y Glu343 al igual que LigPlot⁺. Pero también reporta la interacción mediante EdH con Arg288 en un 13% de los frames obtenidos durante la dinámica, y con Phe287 en un 11%. Para el 12-NO₂CLA, se obtienen en el análisis de la totalidad de los clústeres, los mismos residuos obtenidos por LigPlot⁺ y mostrados en la **figura 23**, siendo las interacciones por EdH con Arg288 y Ser342 las reportadas.

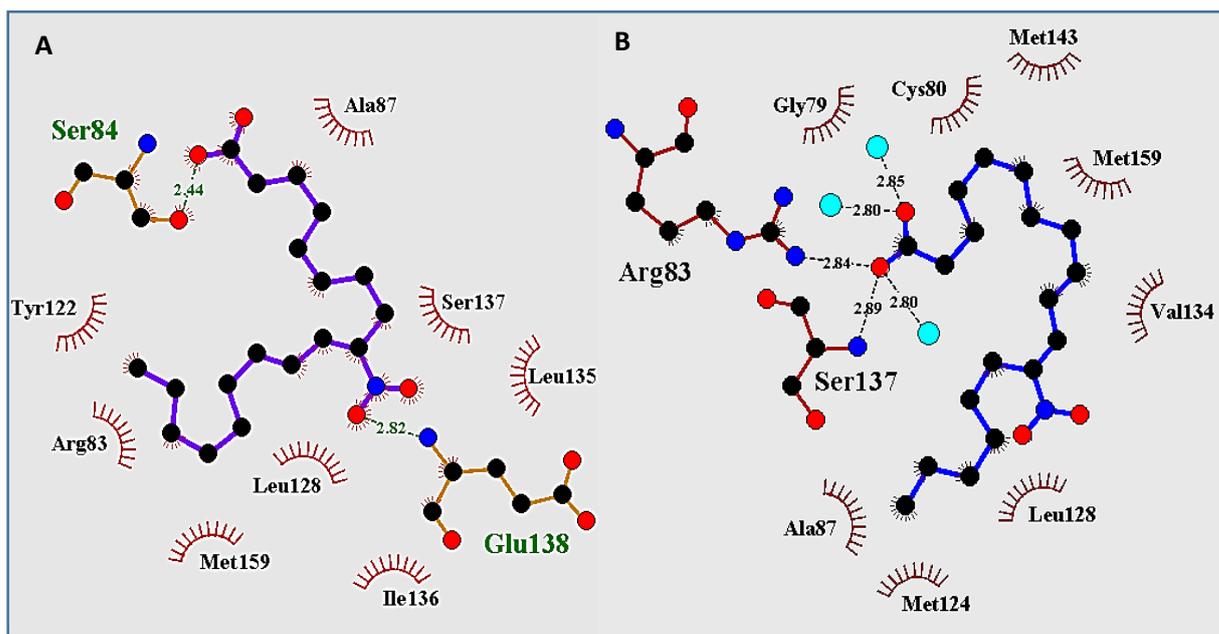


Figura 22: Zona de interacción para regioisómeros de NO_2CLA en LBD de $\text{PPAR}\gamma$. Imagen en 2D obtenida con LigPlot⁺. Las interacciones por EdH se señalan con línea punteada y se reportan las distancias correspondientes. Las interacciones hidrofóbicas se representan con semicírculo radiado. En celeste, moléculas de agua. **A:** 9- NO_2CLA y residuos más cercanos. **B:** 12- NO_2CLA y residuos más cercanos. La numeración de los residuos se corresponde a la correlativa exclusivamente para el LBD. La diferencia correlativa con la numeración en la proteína completa es de (+205).

5) CONCLUSIONES

El presente estudio computacional permitió profundizar sobre el comportamiento de los ácidos linoleicos conjugados (en sus isómeros más estudiados 9-NO₂CLA y 12-NO₂CLA) como especies electrófilas en reacciones de tipo Michael, así como el comportamiento de biotioles de bajo peso molecular como nucleófilos para este tipo de reacciones y explorar las posibilidades de los últimos como ligando del receptor nuclear PPAR γ .

Con respecto al efecto de la naturaleza del biotiol en su comportamiento como nucleófilo, para la serie β ME, Cys, Hcy, CysGly y GHS se pudo concluir que la naturaleza del tiol participante modula la reactividad del mismo en forma leve. Esta modulación parece estar dada fundamentalmente por las diferencias en la concentración de carga nuclear sobre el átomo de azufre participante.

En lo relacionado con la reactividad de los regioisómeros de NO₂CLA y el modelo reducido planteado como representativo, se pudieron con este, reproducir las características de la molécula completa, y se identificaron también las características ya reportadas en antecedentes para este modelo. Como nuevo aspecto de validación de este modelo reducido, se mostró que las características relacionadas con la reactividad de estos compuestos, así como la cinética diferencial para la reacción en los canales de ataque β/δ de NO₂CLA fueron capturadas por el mismo, haciéndolo válido para modelar las reacciones en la siguiente etapa del estudio.

El efecto del cambio de tiol en la primera etapa de la reacción de tiol-Michael sobre NO₂CLA se estudió para tres biotioles como reactivos nucleofílicos, β ME, Cys y Hcy. Se optimizaron las estructuras del complejo inicial (IC), estado de transición (TS) y aductos nitronato producto de la reacción (P) para cada par de canales de adición en C β y C δ . La termodinámica y la relación entre barreras de la activación entre el canal β y el canal δ del NO₂CLA se mantuvieron incambiadas independientemente del cambio de tiol. Esto se muestra concordante con los antecedentes conocidos de esta reacción. La barrera de activación se presentó siempre mayor para la reacción sobre el C δ , reportado como de cinética más lenta en los estudios experimentales previos. Se encontró en los tres casos que, tanto la formación del enlace covalente entre S del tiolato y C β o C δ del NO₂CLA (seguido por WBI), como la transferencia de carga desde la especie nucleofílica hacia el NO₂CLA (seguida por carga NPA sobre el átomo de azufre del tiolato) se encontraban adelantados en la reacción sobre el canal β con respecto a la reacción sobre el canal δ . Se muestra también que estas características permanecen incambiadas a lo largo de la serie estudiada y coinciden con lo presentado en antecedentes [9] para estas reacciones.

Un análisis más detallado del grado de avance de la reacción de formación del aducto en el estado de transición permitió identificar diferencias según el tiol participante. Mientras que para los biotioles de mayor carga sobre el átomo de azufre, la mayor diferencia entre los canales β y δ en el TS se presenta en el avance de la transferencia electrónica, para los biotioles de menor carga inicial sobre éste átomo, es el avance de la reorganización nuclear la que presenta la mayor diferencia.

Se estudió también en detalle la transferencia de carga a lo largo para la primera etapa de la reacción entre β ME/NO₂CLA y se encontró una diferencia en el avance de esta transferencia a lo largo del proceso de formación del enlace entre el carbono β/δ del NO₂CLA

y el azufre del tiolato, adelantándose durante el desarrollo de la reacción sobre el C β , y retrasándose durante la reacción sobre el C δ , favoreciendo cinéticamente al primero sobre el segundo, en concordancia con los datos experimentales.

Finalmente, se realizaron estudios de MD clásica para conocer el comportamiento de los regioisómeros de NO₂CLA en el LBD del receptor nuclear PPAR γ , específicamente en lo relacionado con su ubicación y el entorno proteico más cercano. Sobre esto, no se encontró evidencia de que la Cys285 estuviera a una distancia u orientación adecuada para un posible ataque de tipo tiol-Michael dentro del LBD estudiado. Por otro lado, se encontró que cada regioisómero se ubica en forma distinta en dicho LBD, pero ambos sobre la zona reportada para ligandos con acción de agonista parcial, afectando la movilidad de las mismas estructuras secundarias (hélice-2, hélice-3 y hoja- β) que lo reportado para estos compuestos.

6) REFERENCIAS

- [1] Charles, R. L., Rudyk, O., Pryszyzhna, O., Kamynina, A., Yang, J., Morisseau, C., Hammock, B. D., Freeman, B. A., y Eaton, P., "Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 22, pp. 8167–8172, 2014.
- [2] Fazzari, M., Trostchansky, A., Schopfer, F. J., Salvatore, S. R., Sánchez-Calvo, B., Vitturi, D., Valderrama, R., Barroso, J. B., Radi, R., Freeman, B. A., *et al.*, "Olives and Olive Oil Are Sources of Electrophilic Fatty Acid Nitroalkenes," *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e84884, 2014.
- [3] Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Cole, M. P., Baker, P. R. S., Ramani, R., y Freeman, B. A., "Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion," *Cardiovasc. Res.*, vol. 85, no. 1, pp. 155–166, 2010.
- [4] Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J., y Fernandes, G., "Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 12, pp. 789–810, 2006.
- [5] Ono, N., "Michael Addition," in *The Nitro Group in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 70–125, 2001.
- [6] Schopfer, F. J., Lin, Y., Baker, P. R. S., Cui, T., Garcia-Barrio, M., Zhang, J., Chen, K., Chen, Y. E., y Freeman, B., "Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 7, pp. 2340–2345, 2005.
- [7] Baker, P. R. S., Lin, Y., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Groeger, A. L., Batthyany, C., Sweeney, S., Long, M. H., Iles, K. E., Baker, L. M. S., *et al.*, "Fatty Acid Transduction of Nitric Oxide Signaling, multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 51, pp. 42464–42475, 2005.
- [8] Campbell, B., Kreider, R. B., y Kreider, R., "Conjugated Linoleic Acids," *Curr. Sport. Med. Rep*, vol. 7, no. 4, p. 237241, 2008.
- [9] Turell, L., Vitturi, D. A., Coitiño, E. L., Lebrato, L., Möller, M. N., Sagasti, C., Salvatore, S. R., Woodcock, S. R., Alvarez, B., y Schopfer, F. J., "The chemical basis of thiol addition to nitro-conjugated linoleic acid, a protective cell-signaling lipid," *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 4, pp. 1145–1159, 2016.
- [10] Baker, L. M. S., Baker, P. R. S., Golin-Bisello, F., Schopfer, F. J., Fink, M., Woodcock, S. R., Branchaud, B. P., Radi, R., y Freeman, B. A., "Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine: Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 42, pp. 31085–31093, 2007.
- [11] Schopfer, F. J., Lin, Y., Baker, P. R. S., Cui, T., Garcia-Barrio, M., Zhang, J., Chen, K., Chen, Y. E., y Freeman, B. A., "Nitrolinoleic acid: An endogenous peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 7, pp. 2340–2345, Feb. 2005.
- [12] Li, Y., Zhang, J., Schopfer, F. J., Martynowski, D., Garcia-Barrio, M. T., Kovach, A., Suino-Powell, K., Baker, P. R. S., Freeman, B. a, Chen, Y. E., *et al.*, "Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPAR gamma," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 8, pp. 865–7, 2008.
- [13] Itoh, T., Fairall, L., Amin, K., Inaba, Y., Szanto, A., Balint, B. L., Nagy, L., Yamamoto, K., y Schwabe, J. W. R., "Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 9, pp. 924–931, 2008.

- [14] Alexander, R. L., Wright, M. W., Gorczynski, M. J., Smitherman, P. K., Akiyama, T. E., Wood, H. B., Berger, J. P., King, S. B., and Morrow, C. S., "Differential Potencies of Naturally Occurring Regioisomers of Nitrolinoleic Acid in PPAR γ Activation," *Biochemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 492–498, 2009.
- [15] Wade, L. G., Pedrero, A. M., y García, C. B., "Química orgánica", 5ta ed. *Pearson Educación*, 2004.
- [16] Nair, D. P., Podgórski, M., Chatani, S., Gong, T., Xi, W., Fenoli, C. R., y Bowman, C. N., "The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry," *Chem. Mater.*, vol. 26, no. 1, pp. 724–744, 2014.
- [17] Cann, P. F., y Stirling, C. J. M., "Elimination and addition reactions. Part XXIII. Mechanisms of elimination in nitro-compounds bearing phenoxy and phenylthio leaving groups," *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, no. 7, pp. 820–823, 1974.
- [18] Allen, C. F. H., Fournier, J. O., y Humphlett, W. J., "THE THERMAL REVERSIBILITY OF THE MICHAEL REACTION: IV. THIOL ADDUCTS," *Can. J. Chem.*, vol. 42, no. 11, pp. 2616–2620, 1964.
- [19] Hoyle, C. E., Lowe, A. B., y Bowman, C. N., "Thiol-click chemistry: a multifaceted toolbox for small molecule and polymer synthesis," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 4, pp. 1355–1387, 2010.
- [20] Liu, Q., Sabnis, Y., Zhao, Z., Zhang, T., Buhrlage, S. J., Jones, L. H., y Gray, N. S., "Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome," *Chem. Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 146–159, 2013.
- [21] Anscombe, E., Meschini, E., Mora-Vidal, R., Martin, M. P., Staunton, D., Geitmann, M., Danielson, U. H., Stanley, W. A., Wang, L. Z., Reuillon, T., *et al.*, "Identification and Characterization of an Irreversible Inhibitor of CDK2," *Chem. Biol.*, vol. 22, no. 9, pp. 1159–1164, 2015.
- [22] Bauer, R. A., "Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies," *Drug Discov. Today*, vol. 20, no. 9, pp. 1061–1073, 2015.
- [23] Advani, R. H., Buggy, J. J., Sharman, J. P., Smith, S. M., Boyd, T. E., Grant, B., Kolibaba, K. S., Furman, R. R., Rodriguez, S., Chang, B. Y., *et al.*, "Bcr Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib (PCI-32765) Has Significant Activity in Patients With Relapsed/Refractory B-Cell Malignancies," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 1, pp. 88–94, 2013.
- [24] Bradshaw, J. M., McFarland, J. M., Paavilainen, V. O., Bisconte, A., Tam, D., Phan, V. T., Romanov, S., Finkle, D., Shu, J., Patel, V., *et al.*, "Prolonged and tunable residence time using reversible covalent kinase inhibitors," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 7, pp. 525–531, 2015.
- [25] Serafimova, I. M., Pufall, M. A., Krishnan, S., Duda, K., Cohen, M. S., Maglathlin, R. L., McFarland, J. M., Miller, R. M., Frödin, M., y Taunton, J., "Reversible targeting of noncatalytic cysteines with chemically tuned electrophiles," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 471–476, 2012.
- [26] Krenske, E. H., Petter, R. C., y Houk, K. N., "Kinetics and Thermodynamics of Reversible Thiol Additions to Mono- and Diactivated Michael Acceptors: Implications for the Design of Drugs That Bind Covalently to Cysteines," *J. Org. Chem.*, vol. 81, no. 23, pp. 11726–11733, 2016.
- [27] García-Beltrán, O., Santos, J. G., Fuentealba, S., De la Torre, P., Pavez, P., Mena, N., Nuñez, M. T., y Aliaga, M. E., "Mechanism study of the thiol-addition reaction to benzothiazole derivative for sensing endogenous thiols," *Tetrahedron Lett.*, vol. 56, no. 19, pp. 2437–2440, 2015.

- [28] Turell, L., Radi, R., y Alvarez, B., "The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 65, pp. 244–253, 2013.
- [29] Ortega, A., Carretero, J., Obrador, E., y Estrela, J. M., "Tumoricidal activity of endothelium-derived NO and the survival of metastatic cells with high GSH and Bcl-2 levels," *Nitric Oxide*, vol. 19, no. 2, pp. 107–114, 2008.
- [30] Seshadri, S., Beiser, A., Selhub, J., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., D'Agostino, R. B., Wilson, P. W. F., y Wolf, P. A., "Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, no. 7, pp. 476–483, 2002.
- [31] Salvatore, S. R., Vitturi, D. a, Baker, P. R. S., Bonacci, G., Koenitzer, J. R., Woodcock, S. R., Freeman, B. a, y Schopfer, F. J., "Characterization and quantification of endogenous fatty acid nitroalkene metabolites in human urine," *J Lipid Res*, vol. 54, no. 7, pp. 1998–2009, 2013.
- [32] Veroli, V., "Interacciones entre el ácido nitroaraquidónico y el receptor nuclear PPAR γ : calibración de un modelo computacional para predecir su actividad como agonistas," Tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (Tutoras: Coitiño, E.L. y Ferreira, A.), pp. 1–59, 2014.
- [33] Alexander, R. L., Wright, M. W., Gorczynski, M. J., Smitherman, P. K., Akiyama, T. E., Wood, H. B., Berger, J. P., King, S. B., and Morrow, C. S., "Differential Potencies of Naturally Occurring Regioisomers of Nitrolinoleic Acid in PPAR γ Activation," *Biochemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 492–498, 2009.
- [34] Alexander, R. L., Wright, M. W., Gorczynski, M. J., Smitherman, P. K., Akiyama, T. E., Wood, H. B., Berger, J. P., King, S. B., y Morrow, C. S., "Differential potencies of naturally occurring regioisomers of nitrolinoleic acid in PPAR γ activation," *Biochemistry*, vol. 48, no. 2, pp. 492–498, 2009.
- [35] Kumar, B. R. P., Sopna, S., Verghese, J., Desai, B., y Nanjan, M. J., "Rigid and flexible docking studies on PPAR- γ agonists: Key interactions for a better antihyperglycemic activity and in silico pharmacodynamic activity versus experimental in vivo activity," *Med. Chem. Res.*, vol. 21, no. 5, pp. 624–633, 2012.
- [36] Han, L., Shen, W.-J., Bittner, S., Kraemer, F. B., y Azhar, S., "PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α ," *Future Cardiol.*, vol. 13, no. 3, pp. 259–278, 2017.
- [37] Zhu, Y., Qi, C., Korenberg, J. R., Chen, X. N., Noya, D., Rao, M. S., y Reddy, J. K., "Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 17, pp. 7921–7925, 1995.
- [38] Tontonoz, P., y Spiegelman, B. M., "Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ ," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 289–312, 2008.
- [39] Deeg, M. A., Buse, J. B., Goldberg, R. B., Kendall, D. M., Zagar, A. J., Jacober, S. J., Khan, M. A., Perez, A. T., y Tan, M. H., "Pioglitazone and Rosiglitazone Have Different Effects on Serum Lipoprotein Particle Concentrations and Sizes in Patients With Type 2 Diabetes and Dyslipidemia," *Diabetes Care*, vol. 30, no. 10, p. 2458-2464, 2007.
- [40] Nissen, S., y Wolsky, K., "Effect of Rosiglitazone on the Risk of Myocardial Infarction and Death from Cardiovascular Causes," *N. Engl. J. Med.*, vol. 356, no. 24, pp. 339–354, 2010.
- [41] Gampe Jr., R. T., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V,

- Kliewer, S. A., Willson, T. M., y Xu, H. E., "Asymmetry in the PPAR γ /RXR α Crystal Structure Reveals the Molecular Basis of Heterodimerization Among Nuclear Receptors.," *Mol. Cell*, vol. 5, pp. 545–555, 2000.
- [42] Xu, H. E., Stanley, T. B., Montana, V. G., Lambert, M. H., Shearer, B. G., Cobb, J. E., McKee, D. D., Galardi, C. M., Plunket, K. D., Nolte, R. T., *et al.*, "Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α ," *Nature*, vol. 415, no. 6873, pp. 813–817, 2002.
- [43] Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J.-M., Chambon, P., Gronemeyer, H., y Moras, D., "Crystal Structure of a Heterodimeric Complex of RAR and RXR Ligand-Binding Domains," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 2, pp. 289–298, 2000.
- [44] Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K., y Milburn, M. V., "Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ," *Nature*, vol. 395, no. 6698, pp. 137–143, 1998.
- [45] Liberato, M. V., Nascimento, A. S., Ayers, S. D., Lin, J. Z., Cvorovic, A., Silveira, R. L., Martínez, L., Souza, P. C. T., Saidenberg, D., Deng, T., *et al.*, "Medium chain fatty acids are selective peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) γ activators and Pan-PPAR partial agonists," *PLoS One*, vol. 7, no. 5, pp. 1–10, 2012.
- [46] Kuwabara, N., Oyama, T., Tomioka, D., Ohashi, M., Yanagisawa, J., Shimizu, T., y Miyachi, H., "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) have multiple binding points that accommodate ligands in various conformations: Phenylpropanoic acid-type PPAR ligands bind to PPAR in different conformations, depending on the subtype," *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 2, pp. 893–902, 2012.
- [47] Nettles, K. W., "Insights into PPAR γ from structures with endogenous and covalently bound ligands.," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 9, pp. 893–895, 2008.
- [48] Bruning, J. B., Chalmers, M. J., Prasad, S., Busby, S. A., Kamenecka, T. M., He, Y., Nettles, K. W., y Griffin, P. R., "Partial Agonists Activate PPAR γ Using a Helix 12 Independent Mechanism," *Structure*, vol. 15, no. 10, pp. 1258–1271, 2007.
- [49] Choi, J. H., Banks, A. S., Estall, J. L., Kajimura, S., Laznik, D., Ruas, J. L., Chalmers, M. J., Kamenecka, T. M., Blüher, M., Griffin, P. R., *et al.*, "Obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by cdk5 is a direct target of the anti-diabetic PPAR γ ligands," *Nature*, vol. 466, no. 7305, pp. 451–456, 2010.
- [50] Farce, A., Renault, N., y Chavatte, P., "Structural insight into PPAR γ ligands binding," *Curr Med Chem*, vol. 16, no. 14, pp. 1768–1789, 2009.
- [51] Genest, D., Garnier, N., Arrault, A., Marot, C., Morin-Allory, L., y Genest, M., "Ligand-escape pathways from the ligand-binding domain of PPAR γ receptor as probed by molecular dynamics simulations," *Eur. Biophys. J.*, vol. 37, no. 4, pp. 369–379, 2008.
- [52] Ma, Y., Wang, S. Q., Xu, W. R., Wang, R. L., y Chou, K. C., "Design novel dual agonists for treating type-2 diabetes by targeting peroxisome proliferator-activated receptors with core hopping approach," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, pp. 1–9, 2012.
- [53] Guasch, L., Sala, E., Castell-Auví, A., Cedó, L., Liedl, K. R., Wolber, G., Muehlbacher, M., Mulero, M., Pinent, M., Ardévol, A., *et al.*, "Identification of PPAR γ Partial Agonists of Natural Origin (I): Development of a Virtual Screening Procedure and In Vitro Validation," *PLoS One*, vol. 7, no. 11, pp. 1–13, 2012.

- [54] Vidović, D., Busby, S. A., Griffin, P. R., y Schürer, S. C., "Combined Ligand- and Structure-based Virtual Screening Protocol Identifies Novel Submicromolar PPAR γ Partial Agonists Title," *ChemMedChem*, vol. 6, no. 1, pp. 94–103, 2011.
- [55] Muñoz-Gutierrez, C., Adasme-Carreño, F., Fuentes, E., Palomo, I., y Caballero, J., "Computational study of the binding orientation and affinity of PPAR γ agonists: inclusion of ligand-induced fit by cross-docking," *RSC Adv.*, vol. 6, no. 69, pp. 64756–64768, 2016.
- [56] Mishra, G. P., y Sharma, R., "Identification of Potential PPAR γ Agonists as Hypoglycemic Agents: Molecular Docking Approach," *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.*, vol. 8, no. 3, pp. 220–228, 2016.
- [57] Hohenberg, P., y Kohn, W., "Inhomogeneous Electron Gas," *Phys. Rev.*, vol. 136, no. 3B, pp. B864–B871, 1964.
- [58] Kohn, W., y Sham, L. J., "Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects," *Phys. Rev.*, vol. 140, no. 4A, pp. A1133–A1138, 1965.
- [59] Kohn, W., Becke, A. D., y Parr, R. G., "Density Functional Theory of Electronic Structure," *J. Phys. Chem.*, vol. 100, no. 31, pp. 12974–12980, 1996.
- [60] Chai, J.-D., y Head-Gordon, M., "Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 10, no. 44, pp. 6615–6620, 2008.
- [61] Ditchfield, R., Hehre, W. J., y Pople, J. A., "Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules," *J. Chem. Phys.*, vol. 54, no. 2, pp. 724–728, 1971.
- [62] Smith, J. M., Jami Alahmadi, Y., y Rowley, C. N., "Range-Separated DFT Functionals are Necessary to Model Thio-Michael Additions," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 9, no. 11, pp. 4860–4865, 2013.
- [63] Tomasi, J., Mennucci, B., y Cancès, E., "The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level," *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, vol. 464, no. 1, pp. 211–226, 1999.
- [64] Gampe Jr., R. T., Montana, V. G., Lambert, M. H., Miller, A. B., Bledsoe, R. K., Milburn, M. V., Kliewer, S. A., Willson, T. M., y Xu, H. E., "Asymmetry in the PPAR γ /RXR α Crystal Structure Reveals the Molecular Basis of Heterodimerization among Nuclear Receptors," *Mol. Cell*, vol. 5, no. 3, pp. 545–555, 2017.
- [65] Maier, J. A., Martinez, C., Kasavajhala, K., Wickstrom, L., Hauser, K. E., y Simmerling, C., "ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 11, no. 8, pp. 3696–3713, 2015.
- [66] Case, D. A., Cerutti, D. S., T.E. Cheatham, I., Darden, T. A., Duke, R. E., Giese, T. J., Gohlke, H., Goetz, A. W., Greene, D., Homeyer, N., *et al.*, "AMBER 2017." University of California, San Francisco, 2017.
- [67] Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A., y Case, D. A., "Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations," *J. Mol. Graph. Model.*, vol. 25, no. 2, pp. 247–260, 2006.
- [68] Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W., y Kollman, P. A., "A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model", *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 40, pp. 10269-10280.

- [69] Roe, D. R., y Cheatham, T. E., "PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 9, no. 7, pp. 3084–3095, 2013.
- [70] Laskowski, R. A., y Swindells, M. B., "LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 51, no. 10, pp. 2778–2786, 2011.
- [71] Humphrey, W., Dalke, A., y Schulten, K., "VMD: Visual molecular dynamics," *J. Mol. Graph.*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, 1996.
- [72] Frisch, M. J. et al, "Gaussian 09, Revision D.01," *Gaussian09 Rev. D.01*. 2009.
- [73] Bondi, A., "van der Waals Volumes and Radii," *J. Phys. Chem.*, vol. 68, no. 3, pp. 441–451, 1964.
- [74] Glendening, E. D., Landis, C. R., y Weinhold, F., "Natural bond orbital methods," *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–42, 2012.
- [75] Koopmans, T., "Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms," *Physica*, vol. 1, no. 1–6, pp. 104–113, 1934.
- [76] Gavnholt, J., Olsen, T., Engelund, M., y Schiøtz, J., "Delta Self-Consistent Field as a method to obtain potential energy surfaces of excited molecules on surfaces," *Phys. Rev.*, 2008.
- [77] Parr, R. G., y Yang, W., "Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 106, no. 14, pp. 4049–4050, 1984.
- [78] Bernhard Schlegel, H., "Estimating the hessian for gradient-type geometry optimizations," *Theor. Chim. Acta*, vol. 66, no. 5, pp. 333–340, 1984.
- [79] Hratchian, H. P., y Schlegel, H. B., "Accurate reaction paths using a Hessian based predictor–corrector integrator," *J. Chem. Phys.*, vol. 120, no. 21, pp. 9918–9924, 2004.
- [80] Fukui, K., "The path of chemical reactions - the IRC approach," *Acc. Chem. Res.*, vol. 14, no. 12, pp. 363–368, 1981.
- [81] Dennington, R., Keith, T., y Millam, J., "Gaussview5." Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.
- [82] Ryckaert, P., Ciccotti, G., y Berendsen, H. J., "Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes," *J. Comput. Phys.*, vol. 23, no. 3, pp. 327–341, 1997.
- [83] Breneman, C. M., y Wiberg, K. B., "Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis," *J. Comput. Chem.*, vol. 11, no. 3, pp. 361–373, 1990.
- [84] Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., y Olson, A. J., "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility," *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, 2009.
- [85] Toukmaji, A., Sagui, C., Board, J., y Darden, T., "Efficient particle-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions," *J. Chem. Phys.*, vol. 113, no. 24, pp. 10913–10927, 2000.
- [86] Cederbaum, L. S., Domcke, W., Schirmer, J., Von Niessen, W., Dierksen, G. H. F., y Kraemer, W. P., "Correlation effects in the ionization of hydrocarbons," *J. Chem. Phys.*, vol. 69, no. 4, pp. 1591–1603, 1978.

- [87] Trofimov, A. B., Holland, D. M. P., Powis, I., Menzies, R. C., Potts, A. W., Karlsson, L., Gromov, E. V., Badsyuk, I. L., y Schirmer, J., "Ionization of pyridine: Interplay of orbital relaxation and electron correlation," *J. Chem. Phys.*, vol. 146, no. 24, 2017.
- [88] Yang, W., y Parr, R. G., "Hardness, softness, and the fukui function in the electronic theory of metals and catalysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, no. 20, pp. 6723–6726, 1985.
- [89] Bernasconi, C. F., "The principle of nonperfect synchronization: recent developments," vol. 44, no. Supplement C, Richard, J. P. B. T.-A. in P. O. C., Ed. Academic Press, 2010, pp. 223–324.
- [90] Bernasconi, C. F., "Intrinsic barriers of reactions and the principle of nonperfect synchronization," *Acc. Chem. Res.*, vol. 20, no. 8, pp. 301–308, 1987.
- [91] Bernasconi, C. F., y Wenzel, P. J., "Effect of Transition State Aromaticity and Antiaromaticity on Intrinsic Barriers of Proton Transfers in Aromatic and Antiaromatic Heterocyclic Systems; An ab Initio Study," *J. Org. Chem.*, vol. 75, no. 24, pp. 8422–8434, 2010.
- [92] Murray, J. S., y Politzer, P., "Molecular electrostatic potentials and noncovalent interactions," *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, vol. 7, no. 6, 2017.
- [93] Cronet, P., Petersen, J. F. W., Folmer, R., Blomberg, N., Sajblom, K., Karlsson, U., Lindstedt, E. L., y Bamberg, K., "Structure of the PPAR α and - γ ligand binding domain in complex with AZ 242; ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family," *Structure*, vol. 9, no. 8, pp. 699–706, 2001.