



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ACATLÁN**

**Biofísica de la Unión de Ligandos a Receptores:  
Cambios conformacionales distintos de la albúmi-  
na ante la unión de diferentes ligandos**

## **T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

## **ACTUARIA,**

**P R E S E N T A :**

**Marcela Charlotte Ramos Valezzi**

**ASESOR: Dr. Marco Antonio José Valenzuela**

**Mayo 2016**

**Santa Cruz Acatlán, Naucalpan, Edo. de México**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





## **AGRADECIMIENTOS:**

Un especial agradecimiento para Tzipe Govezensky quien me llevó de la mano durante todo este proceso, desde la introducción del tema, al igual que de la terminología y los conceptos básicos de química y termodinámica, hasta apoyo y supervisión de los programas utilizados durante este proyecto.

También, agradezco a Juan Román Bobadilla por todo su apoyo técnico durante la realización de mi tesis.

## **DEDICATORIAS:**

Al pensar a quién dedicarle este trabajo entendí que, en la vida, hay personas que solo pasan por unos momentos, otras que siempre están, y otras que, aunque se van, nos dejan una parte de ellos:

A esa gran amiga que el tiempo, la distancia, e incluso la rutina, nos enseña cada año la grandeza de la amistad.

A todas esas personas que, durante muchos años, me enseñaron el verdadero significado de equipo.

A un gran coach, no sólo de técnica y estrategia, sino también de vida.

A esas dos personas que me enseñaron que una familia no sólo se une por sangre.

A un gran investigador, con una gran paciencia, que me hizo descubrir el mundo que uno mismo quiere descubrir.

A los tíos y tías que nunca dejan de apoyar cualquier locura que surge de la cabeza.

A los primos y primas, los mejores amigos que la vida nos regala cuando nacemos.

A un abuelo que me enseñó una gran filosofía de vida.

A las dos almas que la vida puso a mi lado para cuidarnos, ayudarnos y acompañarnos para siempre.

A los dos seres que con nada podría agradecer todo lo que me dieron, enseñaron, hicieron por mi, pero sobre todo, que me enseñaron lo único que necesito: el amor.

A mi mejor amiga, que me ha enseñado la mejor parte de la vida; con quien quiero descubrir más y nunca me cansaré de reír.

# INDICE

CAPITULO I.	INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II.	TEORÍA DE UNIÓN DE LIGANDOS A RECEPTORES (Enfoques de Mecánica Estadística y Termodinámica).....	7
	II.1. DISTRIBUCIONES DE AFINI- DADES DE SITIO.- Mecánica Estadística.....	15
	II.2. DISTRIBUCIÓN DE LAS AFINI- DADES DE SITIO Y ESTEQUIO- MÉTRICAS.....	21
CAPITULO III.	MATERIAL Y METODOS.....	24
	III.1. Albúmina .....	25
	III.2. Metodología .....	27
CAPITULO IV.	RESULTADOS.....	36
	IV.1. Albúmina vs. Iones .....	38
	IV.2. Albúmina vs. Medicamentos .....	50
CAPITULO V.	DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	95
	BIBLIOGRAFIA.....	98
	APENDICE 1.....	101
	GLOSARIO.....	131



# **I**

## **INTRODUCCION**

La unión ligando-receptor es un proceso fundamental que ocurre en todo fenómeno biológico. Un receptor es una macromolécula (por ejemplo la albúmina, la hemoglobina, el aspartato transcarbamilasa, un anticuerpo, etc.) la cual tiene diferentes sitios, llamados sitios activos, que son ocupados por uno o más ligandos, es decir, aquí es donde el ligando se une al receptor. Un ligando, por el contrario, es una molécula usualmente mas pequeña la cual se une al receptor ocupando uno de su o sus sitios activos (por ejemplo el oxígeno, epítopes antigénicos, fármacos, etc.). Al suceder esta unión el receptor puede o no sufrir una serie de cambios conformacionales (cambios en su estructura física) para después desencadenar todo un proceso biológico (fotosíntesis, sensibilidad al dolor, inflamación, oxigenación, etc.).

Algunos métodos y modelos han sido propuestos a lo largo de los años para estudiar la unión ligando-receptor. Uno de ellos y el más conocido es el modelo de Scatchard [1] el cual establece la relación entre la concentración de moléculas de ligando libre y la concentración de ligandos unidos a una población heterogénea de afinidades,

$$B = \sum_{j=1}^n \frac{n_j k_j(L)}{1 + k_j(L)}$$

donde  $\sum n_j$  es el número de sitios ocupados del receptor o la cantidad de ligandos unidos,  $L$  es la concentración de ligando libre (no unido al receptor) y  $k_j$  es la constante de afinidad de la subpoblación  $j$ ; la afinidad mide qué tan fuerte o débil es la unión.

Algunas veces se presentan interacciones entre los sitios activos del receptor. Éstas pueden ser positivas o negativas, es decir, la unión de un ligando a un receptor que tenga más de un sitio activo modifica a la macromolécula de tal forma que el siguiente ligando se unirá mas rápido y de mejor manera al receptor; las interacciones negativas causan el efecto contrario.

Como ya lo mencionamos, la constante de afinidad mide que tan fuerte o débil es la unión entre ambas moléculas y ésta depende del tipo de enlace

químico que se forme: puentes de hidrogeno, enlaces covalentes, enlaces de Van der Waals, etc. Las constantes de afinidad se miden de dos distintas maneras, unas son las constantes de afinidad probabilísticas o de sitio y las otras son las constantes estequiométricas. Las constantes de sitio probabilísticas son las determinadas por la secuencia de aminoácidos del sitio activo y son de carácter microscópico de acuerdo a la mecánica estadística, es decir, la probabilidad de que el ligando se una a un sitio específico; y las constantes estequiométricas son constantes macroscópicas termodinámicas y se refieren a la fracción de sitios ocupados de una población de receptores heterogénea en su afinidad por el ligando, es decir son aquellas que solo toman en cuenta la unión del ligando al receptor, sin importar el sitio exacto que haya sido ocupado (la probabilidad).

La unión entre ligandos y receptores puede ser homogénea, es decir cuando la unión del ligando al receptor no presenta interacciones entre sitios u heterogénea, cuando el sistema presenta interacciones. El modelo de Scatchard es útil para sistemas con receptores monovalentes (un sitio activo), receptores multivalentes (n sitios activos) y sistemas homogéneos, pero no es aplicable a interacciones entre los sitios y se asume solo un ligando.

Conociendo los valores de las constantes de afinidad y sustituyéndolas en la ecuación de Scatchard podemos observar el comportamiento del sistema. Sin embargo obtener el valor de éstas resulta un proceso muy complicado, sobretodo para las constantes de sitio. Es por eso que en ocasiones se utiliza el modelo termodinámico de Klotz [1] que utiliza constantes de afinidad estequiométricas:

$$B = \frac{K_1(L) + 2K_1K_2(L)^2 + \dots + iK_1K_2 \dots K_i(L)^i + \dots + nK_1K_2 \dots K_n(L)^n}{1 + K_1(L) + K_1K_2(L)^2 + \dots + K_1K_2 \dots K_i(L)^i + \dots + K_1K_2 \dots K_n(L)^n}$$

donde  $n$  es el número de sitios (o valencia) del receptor,  $L$  es la concentración de ligando libre (no unido al receptor) y  $K_i$  son las constantes de afinidad estequiométricas. La gran ventaja de este método es que es útil para cualquier sistema que se presente: receptores monovalentes (un sitio

activo), receptores multivalentes (n sitios activos), sistemas homogéneos y sistemas heterogéneos, con o sin interacciones entre sus sitios de fijación.

Si graficamos cualquiera de estos dos modelos obtendríamos la llamada isoterma de fijación, también conocida en Química como isoterma de Langmuir [1920]. Existen tres graficas, que son las más utilizadas, en las cuales podemos analizar el comportamiento del sistema: la gráfica de pegado vs. libre, la grafica Semilogarítmica y la grafica de Scatchard y cada una presenta ventajas y desventajas.

La primer grafica que se utilizo fue la grafica de pegado vs. Libre, sin embargo esta gráfica presenta más desventajas que ventajas. Cuando el sistema comienza a saturarse, es decir, cuando la macromolécula tiene todos sus sitios ocupados, los valores en la grafica tienden a formar una línea paralela al eje de las abscisas sobre el valor equivalente al número de sitios activos que tiene el receptor. En un principio se pensó que esta grafica seria útil para determinar éste dato, sin embargo algunos experimentos mostraron que para algunos sistemas eso no era cierto ya que la curva se "acostaba" (paralela el eje de las abscisas) al tener cierta concentración de ligando, sin embargo al agregar mas concentración la curva se acostaba ahora sobre un nuevo valor (mayor al anterior). Así que, aunque en nuestra grafica parezca que hemos llegado a la saturación, esto nos puede llevar a suposiciones erróneas.

Después surgió la grafica de Scatchard, la cual es una transformación lineal de la ecuación de Scatchard. Esta grafica fue de gran utilidad en su momento ya que en ella se pueden observar otros factores como la existencia de interacciones entre sitios, la existencia de poblaciones de afinidad (un conjunto de sitios del receptor que tienen afinidades iguales o muy similares) y de manera más certera se distingue si hemos logrado saturar el sistema. Sin embargo una de las causas por las que esta grafica no es suficiente es debido a que cuando dejaba de ser una linea recta de pendiente negativa y mostraba un brazo descendente se interpretaba erróneamente como que la población de receptores comprendía solamente dos clases o grupos de afinidad.

Otra de las graficas utilizada es la grafica semilogarítmica. Esta grafica proviene de la ecuación de Klotz o Scatchard en función de  $\log(L)$ . La gran ventaja de este modelo es que es aún más fácil identificar si hemos logrado o no saturar al sistema ya que el problema que se presenta con la grafica de pegado vs. libre no ocurre. En esta grafica también podemos identificar la existencia de diferentes poblaciones (aunque no se puede determinar cuántas) y la existencia de interacciones entre sitios, ya sean positivas o negativas.

Sin embargo, a pesar de contar con estas tres graficas, la información obtenida de ellas es insuficiente si queremos conocer más sobre la molécula que se esté estudiando.

Uno de los objetivos importantes, que es precisamente sobre el cual gira esta tesis, son los cambios conformacionales que ocurren durante el proceso de unión; conocerlos podría ayudar a entender el comportamiento y las funciones de las moléculas; es por ello que en esta tesis se utiliza otro método que nos permite determinar la distribución de afinidades de una población heterogénea de receptores con o sin interacciones entre sus sitios de unión.

Si la ecuación discreta de Scatchard se reemplaza por una función continua  $N(k)$ , entonces nuestro modelo queda de la siguiente manera:

$$r = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{N(k)k[L]}{1 + k[L]} d(\log k) = \int_0^{\infty} \frac{(0.4343)N(k)[L]}{1 + k[L]} dk$$

donde  $n_0 = \int_{-\infty}^{\infty} N(k) d(\log k)$

donde  $N(k)$  es la distribución de afinidad de sitio en función de  $\log k$  y  $L$  es la concentración de ligando libre. Esta sustitución es válida ya que la función continua podría considerarse como el conjunto de muchos ensayos discretos.

$N(k)$  se puede resolver utilizando el método de diferencias finitas:

$$N(k) = \left| \frac{B(aL) - B(L/a)}{2 \log a} - \frac{a}{(a-1)^2} \frac{[B(a^2L) - B(L/a^2)] - 2[B(aL) - B(L/a)]}{2 \log a} \right|_{L=1/k}$$

donde  $a$  es una constante de suavizamiento arbitraria mayor a 1 (un valor razonable es  $a=1.585$ ),  $r$  y  $L$  están definidos como en la ecuación de Klotz.

La ventaja que ofrece este método es que es válido para cualquier sistema, homogéneo o heterogéneo, con interacciones o sin interacciones, etc. Al graficar los valores obtenidos de esta ecuación se obtiene la sad (site affinity distribution) la cual nos permite identificar la existencia de interacciones, ya sean positivas o negativas, la existencia de varias poblaciones y, a diferencia de la grafica semilog, podemos concluir cuántas poblaciones se presentan; y lo mas importante es que se pueden asociar sus distintas modas o sesgos y/o kurtosis a cambios conformacionales que el receptor sufre durante su saturación.

La albúmina es una molécula que abunda en la sangre del cuerpo humano y es una proteína acarreadora de una gran cantidad de ligandos, como iones, medicamentos, compuestos aromáticos, etc. Muchos estudios se han desarrollado para conocer el comportamiento de esta molécula [8,9], algunos muestran que la albúmina tiene 15 sitios activos, otros 19 e incluso se cree que podría tener más; también se cree que la molécula esta compuesta por dos poblaciones, una de alta afinidad y otra de baja, cuántos sitios contiene cada población tampoco se sabe con certeza [8]; las interacciones entre sitios se presenta en ocasiones y en otras no, dependiendo del ligando [8].

Utilizando este último modelo obtendremos la sad y SADs para la unión de la albúmina con diferentes ligandos, algunos iones y otros medicamentos, y después analizaremos los resultados para dilucidar los cambios conformacionales e inferir algunas de sus funciones.

# **II**

## **TEORÍA DE UNIÓN DE LIGANDOS A RECEPTORES**

**Enfoques de Mecánica Estadística y Termodinámica**

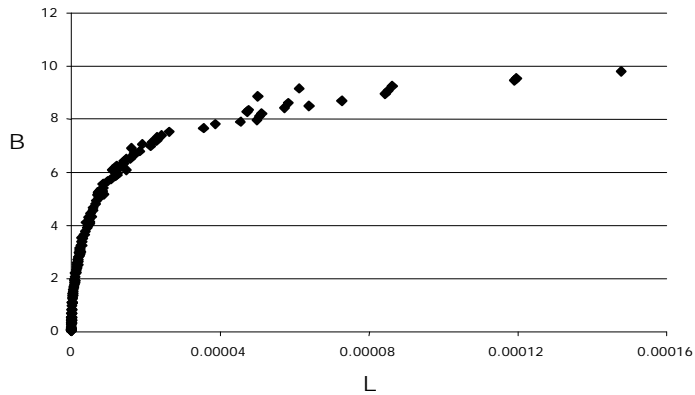
El modelo más utilizado para expresar matemáticamente la relación que existe entre las moléculas de ligando y receptor es el modelo termodinámico de Scatchard (1953), donde  $n$  es el número de sitios independientes,  $k$  la constante de afinidad de sitio,  $L$  la concentración de ligando y  $B$  el número de sitios activos ocupados (Apéndice I). Los valores de  $B$ ,  $n$  y  $k$  son muy útiles para poder analizar la unión entre ligandos y receptores y varias técnicas han sido propuestas. La relación dosis respuesta de la unión de un ligando a un receptor monovalente sigue un comportamiento hiperbólico de la siguiente manera

$$B = \frac{nk[L]}{1 + k[L]} \quad (2.1)$$

Existen algunos métodos experimentales para determinar la concentración molar del ligando libre ( $L$ ) y pegado ( $B$ ); una vez obtenidos estos valores, generalmente se grafica pegado vs. libre (Figura 2.1). Esta gráfica ha sido utilizada durante muchos años para estimar el número de sitios activos ( $B$ ) que tiene una macromolécula ya que, mientras más cerca de la saturación se encuentre el sistema, los valores asintóticos de pegado tienden a “acostarse” formando una línea horizontal con respecto al eje de las abscisas. La manera de linealizar la hipérbola es al través de la gráfica de Scatchard (Figura 2.2) la cuál se deriva a partir de la ecuación 2.1. de la siguiente manera:

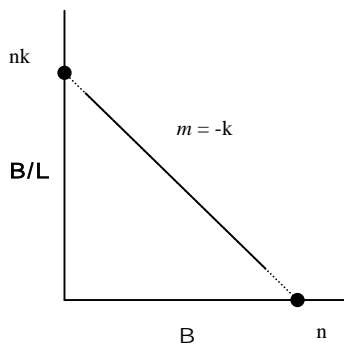
$$\begin{aligned} B[1 + k(L)] &= nk(L) \\ B &= nk(L) - Bk(L) \\ \frac{B}{L} &= nk - kB \end{aligned} \quad (2.2)$$





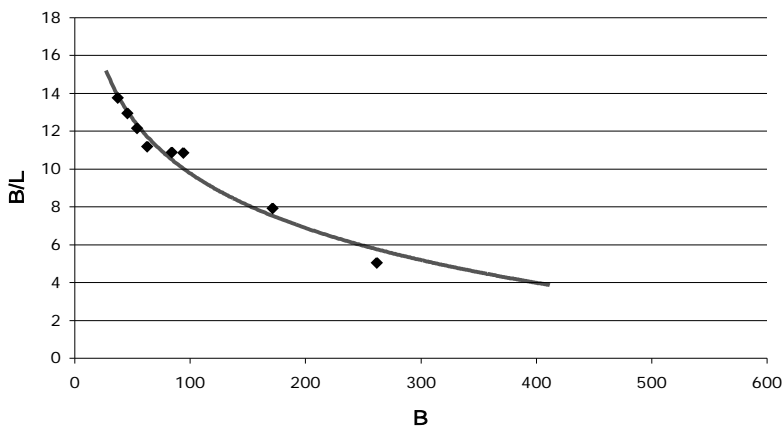
**Fig. 2.1** Gráfica de pegado vs. libre del ión laurato por la albúmina sérica humana

Para un modelo ideal que conste de un receptor con  $n$  sitios idénticos e independientes y los ligandos sean monovalentes, al graficar los valores - obtenidos con la ecuación 2.2 se obtiene una línea recta, y así los valores de  $n$  y  $k$  pueden ser estimados fácilmente (fig. 2.2).

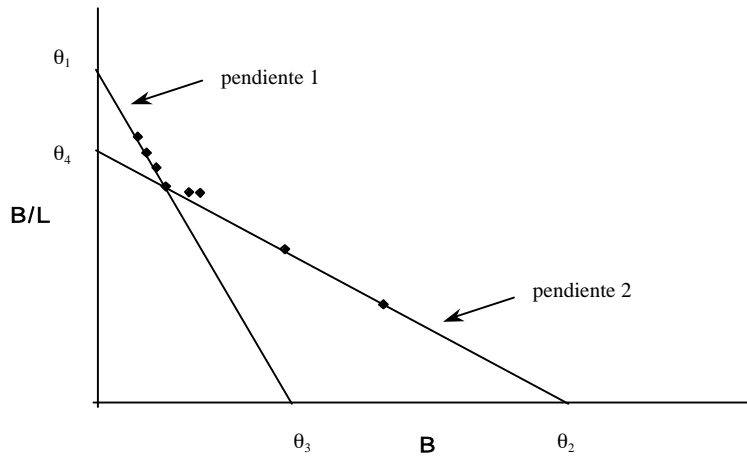


**Fig. 2.2** Grafica de Scatchard suponiendo un modelo ideal de  $n$  sitios activos idénticos

Existen casos en que la población de receptores manifiesta una distribución de afinidades y/o existen interacciones entre los sitios activos y/o el sistema consta de receptores o ligandos multivalentes. En estos casos los datos no pueden ser analizados por medio de la ecuación de Scatchard, ya que el resultado gráfico tiende a ser una línea curva (fig. 2.3). En un principio se acostumbraba dividir la información en dos, asumiendo dos rangos de afinidades, y por mucho tiempo se creyó que esa era la manera correcta para estimar los parámetros (fig. 2.4). El gran inconveniente al hacer esto, es que solamente nos sirve para estimar 2 constantes de afinidad (ya que solo tenemos dos ecuaciones) y para sistemas de  $k$  constantes de afinidad ( $k > 2$ ) resulta inútil.



**Fig. 2.3** Gráfica de Scatchard de la unión de iones de calcio a una proteína transportadora (la calbidina). La línea curva que ajusta los datos asume un modelo en donde no existen interacciones entre sitios y asume dos poblaciones del receptor, una de alta y otra de baja afinidad .



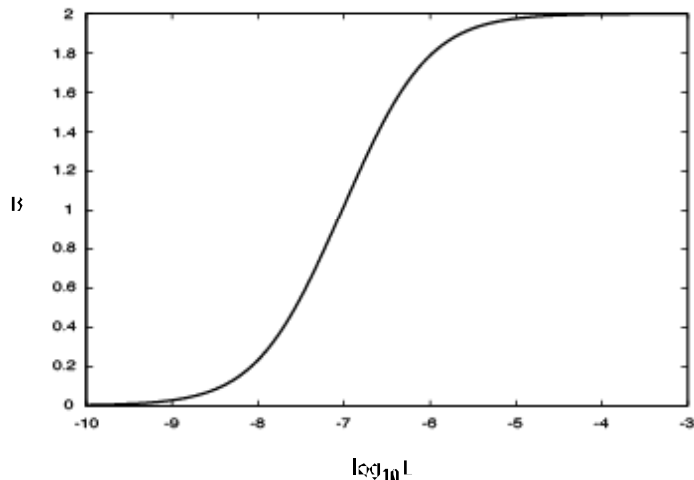
**Fig. 2.4.** Grafica de Scatchard para el caso de  $n$  sitios activos independientes. Suponiendo dos rangos de afinidades. 4 parámetros pueden ser estimados.

**Tabla 2.1** Valores de los parámetros de acuerdo a la grafica de la Figura 2.4

PARAMETRO	VALOR
pendiente 1	$-(K_1 - 2K_2)$
pendiente 2	$-nK_n$
$\theta_1$	$K_1$
$\theta_2$	$n$
$\theta_3$	$\frac{K_1}{(K_1 - 2K_2)}$
$\theta_4$	$n^2Kn$

Otro método utilizado para analizar la unión receptor-ligando es la gráfica semi-logarítmica. Del mismo modo que en el modelo de Scatchard, los

valores de la gráfica de  $B$  vs.  $L$  son expuestos en una gráfica ahora de  $B$  vs.  $\log L$  y de acuerdo al comportamiento de ésta es posible determinar cierta información. Alguna de esta información pudiera ser la existencia o no de cooperatividad entre sitios, lo cual se manifiesta cuando la sigmoideal de la gráfica semi-logarítmica no es simétrica con respecto al punto de inflexión o también cuando la curva “crece” de forma acelerada; cuando existen interacciones negativas la curva “crece” muy lento. El total de sitios activos también se pudiera inferir ya que al llegar a la saturación los valores se acuestan formando una recta casi paralela al eje de las abscisas. (Apendice1). Sin embargo, en algunos casos, la información obtenida tampoco es suficiente.



**Fig. 2.5.** Gráfica Semilog para la unión de Transferina Humana y Vandato.

El modelo de Klotz también puede ser expresado en términos de las constantes estequiométricas, en consecuencia, el análisis se torna más sencillo, ya que las constantes estequiométricas se refieren a la unión del  $i$ -ésimo ligando sin importar el sitio activo que el ligando haya ocupado. Estas constantes termodinámicas pueden ser medidas experimentalmente y el

modelo de Klotz asume que la unión de ligandos a los sitios activos ocurre de manera secuencial. Otra ventaja del modelo de Klotz (vea ecuación 2.3) es que éste es válido para un gran número de casos: existan o no interacciones entre sitios o que el receptor sea multivalente.

El modelo de Klotz para un receptor multivalente con  $n$  sitios de fijación con un ligando monovalente se expresa como

$$B = \frac{K_1(L) + 2K_1K_2(L)^2 + \dots + nK_1K_2\dots K_n(L)^n}{1 + K_1(L) + K_1K_2(L)^2 + \dots + K_1K_2\dots K_n(L)^n} \quad (2.3)$$

$$B = \frac{\sum_{i=1}^n i \left( \prod_{l=1}^i K_l \right) (L)^i}{1 + \sum_{i=1}^n \left( \prod_{l=1}^i K_l \right) (L)^i} \quad (2.4)$$

donde  $K_i$  representa la  $i$ -ésima constante estequiométrica de afinidad.

Utilizando la ecuación 2.3 y suponiendo los dos rangos de afinidades que propone Scatchard, nos es posible estimar los valores para cada  $K_i$ , de nuevo, siempre y cuando  $i=2$  (Tabla 2.1), es decir, solamente sirve para determinar las primeras 2 constantes estequiométricas y, el número de sitios activos que tiene el receptor ( $n$ ). Otro inconveniente de este método es que la suposición de los dos rangos de afinidad pudiera ser errónea recayendo en el valor de los parámetros. Es decir, si ajustáramos dos curvas a los valores, éstas pudieran ajustar a diferentes rangos de datos, la determinación de cuáles datos serán tomados en cuenta para cada curva y cuáles no se hace por medio de la percepción visual.

## DISTRIBUCIONES DE AFINIDADES DE SITIO.- Mecánica Estadística.

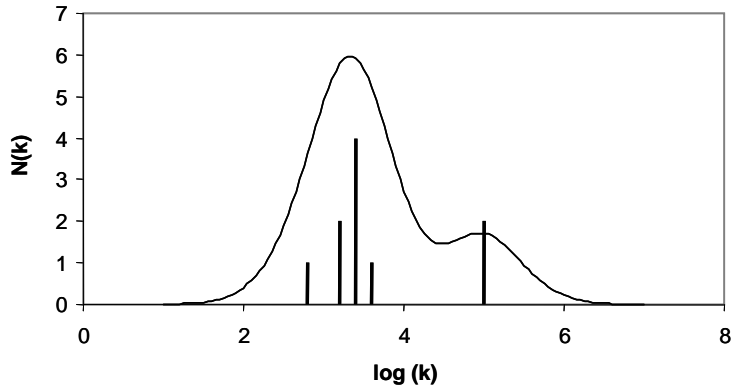
Debido a la complejidad en la interpretación de las gráficas y a la falta de información que éstas y los modelos anteriores aportan, se propuso un nuevo método para analizar la unión ligando-receptor. Suponiendo un modelo con  $m$  independientes clases de afinidad, la ecuación adecuada sería:

$$B = r = r([L]) = \sum_{i=1}^m \frac{n_i k_i [L]}{1 + k_i [L]} \quad (2.5)$$

$$\text{donde } n_0 = \sum_{i=1}^m n_i \quad (2.6)$$

donde  $n$  es el número de sitios de cada clase y  $k_i$  la constante de afinidad de sitio perteneciente a la clase  $i$ .

Si la ecuación 2.6 fuese evaluada y graficada en función de  $\log k$ , la gráfica obtenida sería como aquella en la fig. 2.6, la cual recibe el nombre de espectro o distribución de afinidades de las constantes de afinidad de sitio. En este modelo es necesario determinar tres incógnitas: el número de clases de sitios ( $m$ ), el número de sitios de cada clase ( $n_i$ ) y la constante de afinidad de cada clase ( $k_i$ ). Existen algunos métodos, sin embargo mientras más grande es  $m$  el análisis se torna cada vez más complicado, haciendo que éstos sean poco efectivos.



**Fig. 2.6.** La distribución o espectro de las constantes de afinidad mostradas para un sistema de 10 sitios con 5 diferentes clases de afinidad. Se muestra tanto la distribución discreta como la distribución continua.

Es por ello que se formuló un nuevo método el cual consiste en cambiar la distribución discreta de la ecuación 2.5 por una continua  $N(k)$  (ec. 2.7 y 2.8). Esto es posible ya que, sin pérdida de generalidad, la función continua la podemos representar como el conjunto de muchos ensayos de la distribución discreta. Por lo tanto, las ecuaciones 2.5 y 2.6 quedarían de la siguiente manera:

$$r = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{N(k)k[L]}{1+k[L]} d(\log k) = \int_0^{\infty} \frac{(0.4343)N(k)[L]}{1+k[L]} dk \quad (2.7)$$

$$\text{donde } n_0 = \int_{-\infty}^{\infty} N(k) d(\log k) \quad (2.8)$$

En este modelo,  $N(k)d(\log k)/n_0$  representa la probabilidad de encontrar un sitio activo con una constante de afinidad entre  $[\log k]$  y  $[\log k + d(\log k)]$  en una molécula.

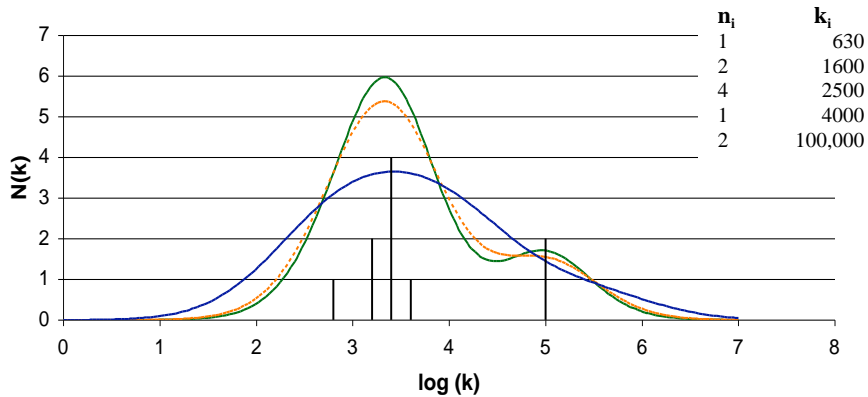
Existen distintos métodos para evaluar  $N(k)$ , sin embargo solo nos enfocaremos en aquel propuesto por Ninomiya y Ferry en 1959, el método de diferencias finitas, el cual establece, esencialmente, que los datos obtenidos sean desplegados en una gráfica semilogarítmica ( $B$  vs.  $\log L$ ) para luego, ajustar una curva la cual nos permita estimar los valores de  $B$  en series de baja concentración molecular. Posteriormente, de los valores obtenidos se puede calcular  $N(k)$  utilizando la siguiente ecuación:

$$N(k) = \left| \frac{B(aL) - B(L/a)}{2 \log a} - \frac{a}{(a-1)^2} \frac{[B(a^2L) - B(L/a^2)] - 2[B(aL) - B(L/a)]}{2 \log a} \right|_{L=1/k}$$

(2.9)

donde  $a$  es una constante arbitraria mayor que uno (el valor que mejor se ajusta es  $a=1.585$ ). Finalmente los valores de  $N(k)$  son expuestos en una gráfica de  $N(k)$  vs.  $\log(k)$  (Fig. 2.7) para obtener la distribución o espectro de las constantes de afinidad de sitio, mejor conocida como *sad* por sus siglas en inglés (site affinity distribution), la cual es utilizada para representar la reacción de unión.





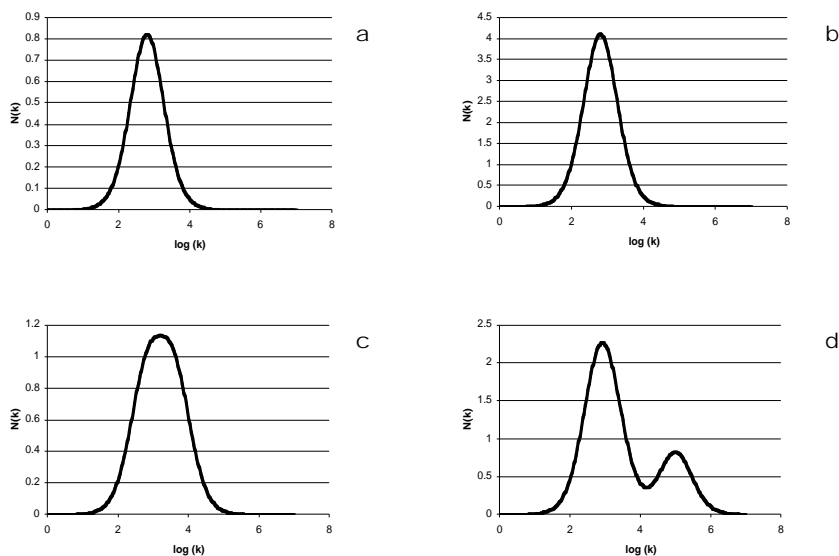
**Fig. 2.7.** La distribución o espectro de las constantes de afinidad de un sistema de 10 sitios con 5 diferentes clases de afinidad. Se muestra tanto la distribución discreta como 3 distribuciones continuas, cada una de ellas con distintos valores para  $a$ . (-)  $a=10$ ; (-)  $a=2.51$ ; (-)  $a=1.585$ ;

El área bajo la curva en cualquier porción del espectro bajo la gráfica del sistema coordinado  $N(k)$  vs.  $\log_{10} K$  corresponde a la concentración de sitios del receptor cuyas afinidades se encuentran en ese rango.

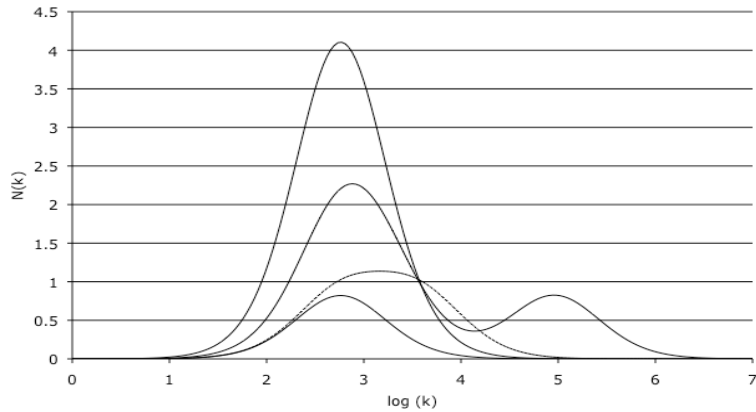
La ventaja de este modelo, es que la gráfica aporta mucha información y por lo tanto es más sencillo percibir si existen o no diferentes clases de afinidades. En caso de que existan, se forman dos, tres ó  $m$  modas, dependiendo del número de clases de afinidad que tenga el sistema. Sin embargo, cuando la diferencia entre las afinidades no es muy significativa estas modas no logran formarse, pero existe un cambio en la anchura de las mismas. Para un modelo con una sola clase de sitios activos el pico de la función no es muy amplio (es más picudo); mientras más clases ( $m$ ) distintas tiene el sistema pero la diferencia entre ellas no es muy significativa, más ancha será la moda, y mientras más sitios activos ( $n_i$ ) compartan

exactamente la misma afinidad, más alta y picuda será ésta. (Fig. 2.8). Esto nos ayuda para suponer cuántos sitios pertenecen a cierta clase de afinidad.

Cabe aclarar que éstas gráficas se leen de derecha a izquierda.

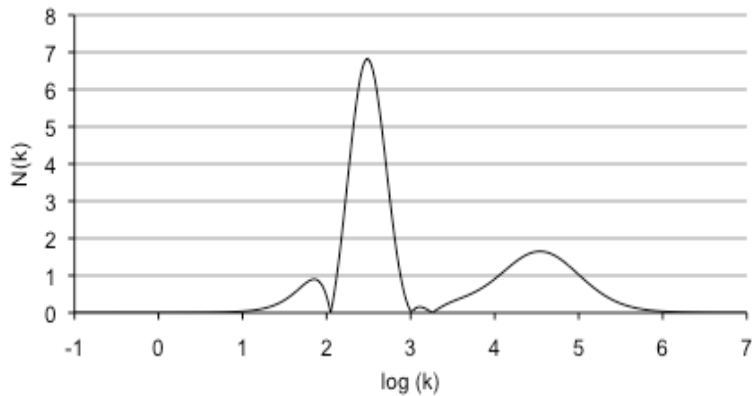


**Fig. 2.8.** Distribución de frecuencias. a) Molécula con un solo sitio activo; puede verse que el pico de la distribución es estrecho y menor que uno. b) Molécula con una sola clase de afinidad con cinco sitios activos; el pico de la distribución es agudo igual que el anterior, sin embargo es más alto debido al número de sitios ( $n=5_i$ ). c) Sistema con dos clases de afinidades que no difieren significativamente ( $k_1=630$ ,  $k_2=4000$ ), un sitio activo cada clase; la moda es más ancha y no tan alta. d) Complejo con tres clases de afinidad ( $k_1=630$ ,  $k_2=1600$ ,  $k_3=100,000$ ), la primera con dos sitios activos y las restantes con uno; como la diferencia de afinidades es significativa se forman dos modas y la altura de la segunda es mayor a uno y a la primer moda ya que consta de 3 sitios activos.



**Fig. 2.9** Mismas funciones de la fig. 2.20. Claramente se ven las diferencias que existen entre cada una de las funciones.

Otra información que podemos ver utilizando esta gráfica es si las modas son o no independientes; esto lo notamos cuando la distribución se interseca con el eje de las abscisas. (Fig. 2.10).



**Fig. 2.10** Unión del Hexanoato a la Albumina. Cada moda interseca el eje de las abscisas, lo que significa que los estados conformacionales de la macromolécula o receptor son independientes.

## II.2 DISTRIBUCIÓN DE LAS AFINIDADES DE SITIO Y ESTEQUIOMÉTRICAS

Las distribuciones de las constantes estequiométricas, mejor conocidas como SAD por sus siglas en inglés (stoichiometric affinity distributions) son aquellas que muestran el comportamiento de las constantes estequiométricas, o sea, de cada paso de unión entre el ligando y el receptor.

Varios autores han encontrado que la distribución de afinidad de sitio (sad) y la distribución de las afinidades estequiométricas (SAD) están matemáticamente relacionadas. Consideremos el caso más simple de un sistema heterogéneo constituido por receptores monovalentes, dónde la constante macroscópica o estequiométrica  $K_1$  es idéntica a la constante microscópica o de sitio  $k$ .

$$K_1 = k \quad (2.10)$$

Sabiendo que  $k$  tiene la función de probabilidad de densidad  $N(k)$  podemos obtener la ley de probabilidad para  $K_1$ ,  $T(K_1)$

$$T_1(K_1) = \int N(k) \delta(K_1 - k) dk \quad (2.11)$$

donde  $\delta$  es la función delta de Dirac (ver Apéndice I). Esta ecuación indica que si  $N(k)$  es normalizada, entonces también lo es  $T_1(K_1)$ . Debido a las propiedades de la función de Dirac, la solución a la ecuación es directa:

$$T_1(K_1) = N(K_1) \quad (2.12)$$

Este resultado establece que la forma funcional de la ley de probabilidades para las afinidades de sitio y las estequiométricas es la misma.

Analícemos ahora el caso más complejo, aquellos sistemas heterogéneos con receptores multivalentes. Éste podría considerarse como un sistema con subpoblaciones cada una con afinidades distintas y sitios independientes. En este caso, cada constante estequiométrica  $K_i$  se relaciona con la afinidad de sitio  $k$  de la siguiente manera

$$K_i = \left( \frac{v-i+1}{i} \right) k = d_i k \quad (2.13)$$

Si  $k$  es una variable independiente con función de probabilidad de densidad  $N(k)$  entonces la constante de equilibrio  $K_i$ , que gobierna la unión del  $i$ -ésimo ligando monovalente a un receptor ( $i=1,2,\dots,v$ ) tiene la función de probabilidad de densidad  $T_i$ :

$$T_i(K_i) = \int N(k) \delta(K_i - d_i k) dk \quad (2.14)$$

$$T_i(K_i) = \frac{N(K_i/d_i)}{d_i} \quad (2.15)$$

Puede verse que los valores de  $K_i$  son reescalados por el factor  $d_i$ .

Para obtener  $N(k)$  en términos de  $T(K_i)$ , note que, por ejemplo, si  $v=2$  entonces  $d_1 T_1(d_1 k) = N(k)$ ,  $d_2 T_2(d_2 k) = N(k)$  y  $N(k) = 1/2 [(d_1 T_1(d_1 k) + d_2 T_2(d_2 k))]$

$$T_i(K_i) = \frac{N(K_i/d_i)}{d_i}$$

haciendo

$$K_i = d_i k$$

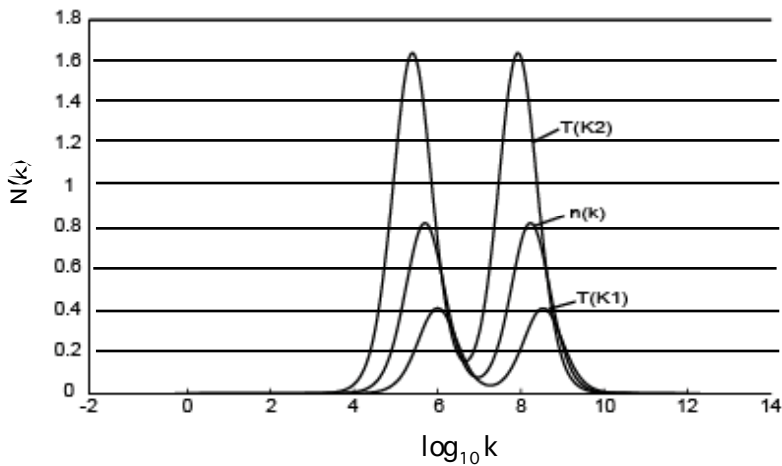
entonces

$$\begin{aligned}
T_i(d_i k) &= \frac{N(d_i k / d_i)}{d_i} \\
T_i(d_i k) &= \frac{N(k)}{d_i} \\
d_i T_i(d_i k) &= N(k)
\end{aligned}
\tag{2.16}$$

De esta manera tenemos que:

$$N(k) = \frac{1}{v} \sum_{i=1}^v d_i T_i(K_i)
\tag{2.17}$$

Esto nos dice que  $N(k)$  puede ser expresada como un promedio de todas las  $T_i(K_i)$ , esto es, la distribución de afinidades de las constantes microscópicas resulta ser el promedio de las distribuciones macroscópicas por pasos de fijación.



**Fig. 2.10** sad y SADs de la unión de Calbidine Mutante y Calcio.

# **III**

## **MATERIAL Y METODOS**

Utilizando los métodos y modelos anteriores analizaremos el caso de la albúmina uniéndose a un extenso grupo de ligandos para así ilustrar su aplicabilidad y su utilidad y así poder dilucidar los cambios conformacionales de la molécula unida a cualquier ligando.

La mayoría de los ligandos que utilizamos para realizar este análisis son aquellos medicamentos conocidos como anti-inflamatorios sin esteroides (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) cuya principal función es la inhibición de la producción de prostaglandinas. Algunos ejemplos de estas drogas son el ácido acetil salicílico (Aspirina), ibuprofeno (Advil), naproxeno, diclofenaco (Voltaren), etc.

La ciclooxigenasa, una enzima que participa en la producción de prostaglandinas y tromboxanos, se vuelve irreversiblemente inactiva cuando una molécula de algún NSAID se le une. Esto fue descubierto por John Vane en el año de 1971 quién trabajaba en el Royal Collage of Surgeon en Londres. Las prostaglandinas son hormonas locales producidas dentro del cuerpo humano que tienen diversos efectos, algunos de ellos son transmitir al cerebro toda la información correspondiente al dolor o regular la temperatura e inflamación del hipotálamo. Por otra parte, los tromboxones son responsables de producir plaquetas en la sangre para la formación de coágulos; a falta de éstos, la sangre se hace más delgada.

Dentro del campo médico las NSAID son utilizadas para tratar muchas enfermedades o síntomas como el adelgazamiento de arterias en niños, el síndrome de Bartters o, es bien sabido que, dosis pequeñas de aspirina son útiles para prevenir los infartos, etc. Sin embargo, el abuso de estas drogas produce daños gastrointestinales y también, por los efectos anticoagulantes que presentan, es posible que una persona sangre más tiempo de lo debido.

## **III.1 ALBUMINA**

La albúmina es una proteína sintetizada y secretada por el hígado, es la más abundante del cuerpo humano y la principal transportadora de un extenso



grupo de ligandos, ya sea endógenos o exógenos (como drogas, iones, aminoácidos, etc). Éstos se pegan de manera reversible, lo que quiere decir que el ligando se une y se despega continuamente del receptor, a diferencia de los enlaces covalentes los cuales ocurren cuando un ligando se pega al receptor de manera casi fija formando compuestos y necesitando de mucha energía para romper estos enlaces.

Existen varias suposiciones en cuanto a cómo se comporta la albúmina al unirse con algún ligando. Por ejemplo, para el calcio, Pedersen (1971) propuso que se une aproximadamente en 12 sitios activos idénticos e independientes de baja afinidad, a diferencia de Fogh-Andersen, quién dice que el calcio se une a 1 sitio de alta afinidad, 3 de baja y 19 de mínima afinidad. También se cree que los principales sitios activos donde los iones se unen son distintos a aquellos donde se une a otro tipo de moléculas (drogas, aminoácidos, etc); el diazepam, triptofano y otros compuestos aromáticos parecen compartir los mismos sitios activos, etc. Pero ninguno de estos supuestos está comprobado.

Algo que hace muy difícil el estudio de ésta molécula es que las “propiedades de unión” (binding properties) para un ligando específico pueden ser influenciadas por un gran número de factores: uniones simultáneas, unión de otros ligandos, modificaciones químicas de la proteína, etc. haciendo que el comportamiento de la albúmina sea diferente con cada ligando.

Sudlow (1975) propuso un modelo en el que la albúmina consta de dos sitios, Sitio I y Sitio II de alta o muy alta afinidad en los cuales se unen la mayoría de las drogas; presenta también unión en muchos sitios más pero con baja o muy baja afinidad. El Sitio I es un sitio muy flexible debido a ciertas propiedades que presenta como son: el hecho de que muchos ligandos de distintas estructuras químicas se unen con alta afinidad hacen que este sitio sea adaptable; existen interacciones entre ligandos unidos; presenta traslapes de sitios (cooperatividad) debido a los cambios conformacionales de la albúmina y/o mutaciones en la región. En resumen, la unión de un extenso grupo de ligandos a este sitio, especialmente las

drogas, son capaces de unirse influyendo o no la interacción entre sus sitios de unión.

El Sitio II parece ser más pequeño o angosto que el Sitio I y menos flexible debido a que la unión frecuentemente se ve afectada por la estereoselectividad. La estereoselectividad se refiere a que, habiendo dos posibilidades (o dos sitios activos) a donde se pueda pegar un ligando, éste prefiere pegarse a uno más que al otro. Este sitio también es más restringido que el Sitio I (se le unen menos ligandos).

Existe también un tercer sitio, denominado Sitio III, sin embargo no se tiene mucha información de éste.

Es importante resaltar que existen medicamentos que al unirse a la albúmina inducen la unión de más ligandos, ya sea del mismo compuesto o distinto.

Sin embargo, a pesar de que esta molécula ha sido estudiada a lo largo de varios años, aún no se sabe de manera segura cuál es su comportamiento al momento de unirse con otras moléculas.

## **III.2 METODOLOGÍA**

El método utilizado para obtener las gráficas de la distribución de afinidad de sitio (sad) es evaluando la ecuación 2.5, sustituyendo los valores de las constantes de afinidad estequiométricas de la molécula estudiada. Y para las distribuciones de afinidad estequiométricas (SAD) sustituimos los valores obtenidos de la ecuación 2.5 en la ecuación 2.12, para cada  $T(K_i)$ . Para realizar esto, creamos un par de programas con el paquete MATLAB.

**Programa para graficar las 3 curvas: free vs. bound, scatchard y semilog:**

```
function p = plotsbound
```

```
%Ingresar las constantes de afinidad
```

```
K1=1100000;
```

```
K2=100000;
```

```
K3=11000;
```

```
K4=2900;
```

```
K5=0;
```

```
K6=0;
```

```
K7=0;
```

```
K8=0;
```

```
K9=0;
```

```
K10=0;
```

```
K11=0;
```

```
K12=0;
```

```
K13=0;
```

```
K14=0;
```

```
K15=0;
```

```
K16=0;
```

```
minL=10^-5;
```

```
maxL=10^1;
```

```
i=1;
```

```
for i=1:1:501
```

```
    L=(minL*exp(((log(maxL)-log(minL))/(500))*(i-1)));
```

```
%Calculando el numerador de la ecuación
```

```
num=K1*L
```

```
+2*K1*K2*(L^2)
```

```
+3*K1*K2*K3*(L^3)
```

```
+4*K1*K2*K3*K4*(L^4)
```

$$\begin{aligned}
&+5*K1*K2*K3*K4*K5*(L^5) \\
&+6*K1*K2*K3*K4*K5*K6*(L^6) \\
&+7*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*(L^7) \\
&+8*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*(L^8) \\
&+9*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*(L^9) \\
&+10*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*(L^{10}) \\
&+11*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*(L^{11}) \\
&+12*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*(L^{12}) \\
&+13*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*K13*(L^{13}) \\
&+14*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*K13*K14*(L^{14}) \\
&+15*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*K13*K14*K15*(L^{15}) \\
&+16*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*K13*K14*K15*K16*(L^{16});
\end{aligned}$$

*%Calculando el numerador de la ecuación*

$$\begin{aligned}
&den=1+K1*L \\
&+K1*K2*(L^2) \\
&+K1*K2*K3*(L^3) \\
&+K1*K2*K3*K4*(L^4) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*(L^5) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*(L^6) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*(L^7) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*(L^8) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*(L^9) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*(L^{10}) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*(L^{11}) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*(L^{12}) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*K13*(L^{13}) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*K13*K14*(L^{14}) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*K13*K14*K15*(L^{15}) \\
&+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*K11*K12*K13*K14*K15*K16*(L^{16});
\end{aligned}$$

*%Capturando los datos (en columnas) para la gráfica*

B(i,3)=num/den;

B(i,1)=L;

B(i,2)=log10(L);

B(i,4)=(num/den)/L;

end

*%Graficando*

plot(B(:,1),B(:,3));

figure;

plot(B(:,2),B(:,3));

figure;

plot(B(:,3),B(:,4));

save plotsAzapropazone.txt B -ASCII -TABS;

**Programa para evaluar el binding usando la fórmula de Klotz.  
Programa para 10 sitios:**

*%Ingresar las constantes de afinidad*

function k = nkKlotztesis

a=1.585;

b=a<sup>(-1)</sup>;

c=a<sup>2</sup>;

d=a<sup>(-2)</sup>;

K1=7.08\*10<sup>4</sup>;

K2=1.81\*10<sup>4</sup>;

K3=8.03\*10<sup>2</sup>;

K4=4.20\*10<sup>1</sup>;

K5=2.32\*10<sup>3</sup>;

K6=0;

K7=0;

K8=0;

K9=0;

K10=0;

minL=10<sup>-7</sup>;

maxL=10<sup>1</sup>;

i=1;

n=5;

*%Cambiar dependiendo del numero de constantes que*

*se tengan*

for i=1:1:501

L=(minL\*exp(((log(maxL)-log(minL))/(500))\*(i-1))));

*%Para evaluar la ecuación 2.9:*

*%nk(i,(2\*n+2))=abs(((B1-B2)/(2\*log10(a)))-((a/((a-1)^2)))\*(((B3-B4)-  
(2\*(B1-B2)))/(2\*log10(a))))*

*%Valuamos por partes:*

*%Calculando el numerador de B1*

```
num1=K1*(L*a)
+2*K1*K2*((L*a)^2)
+3*K1*K2*K3*((L*a)^3)
+4*K1*K2*K3*K4*((L*a)^4)
+5*K1*K2*K3*K4*K5*((L*a)^5)
+6*K1*K2*K3*K4*K5*K6*((L*a)^6)
+7*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*((L*a)^7)
+8*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*((L*a)^8)
+9*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*((L*a)^9)
+10*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*((L*a)^10);
```

*%Calculando el denominador de B1*

```
den1=1+K1*(L*a)
+K1*K2*((L*a)^2)
+K1*K2*K3*((L*a)^3)
+K1*K2*K3*K4*((L*a)^4)
+K1*K2*K3*K4*K5*((L*a)^5)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*((L*a)^6)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*((L*a)^7)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*((L*a)^8)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*((L*a)^9)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*((L*a)^10);
```

*%Haciendo*

```
B1=num1/den1;
```

*%Calculando el numerador de B2*

```
num2=K1*(L*b)
+2*K1*K2*((L*b)^2)
+3*K1*K2*K3*((L*b)^3)
+4*K1*K2*K3*K4*((L*b)^4)
+5*K1*K2*K3*K4*K5*((L*b)^5)
+6*K1*K2*K3*K4*K5*K6*((L*b)^6)
```

```

+7*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*((L*b)^7)
+8*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*((L*b)^8)
+9*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*((L*b)^9)
+10*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*((L*b)^10);

```

```

%Calculando el denominador de B2  den2=1+K1*(L*b)
+K1*K2*((L*b)^2)
+K1*K2*K3*((L*b)^3)
+K1*K2*K3*K4*((L*b)^4)
+K1*K2*K3*K4*K5*((L*b)^5)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*((L*b)^6)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*((L*b)^7)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*((L*b)^8)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*((L*b)^9)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*((L*b)^10);

```

```

%Haciendo
B2=num2/den2;

```

```

%Calculando el numerador de B3
num3=K1*(L*c)
+2*K1*K2*((L*c)^2)
+3*K1*K2*K3*((L*c)^3)
+4*K1*K2*K3*K4*((L*c)^4)
+5*K1*K2*K3*K4*K5*((L*c)^5)
+6*K1*K2*K3*K4*K5*K6*((L*c)^6)
+7*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*((L*c)^7)
+8*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*((L*c)^8)
+9*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*((L*c)^9)
+10*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*((L*c)^10);

```

```

%Calculando el denominador de B3
den3=1+K1*(L*c)
+K1*K2*((L*c)^2)
+K1*K2*K3*((L*c)^3)

```



```

+K1*K2*K3*K4*((L*c)^4)
+K1*K2*K3*K4*K5*((L*c)^5)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*((L*c)^6)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*((L*c)^7)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*((L*c)^8)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*((L*c)^9)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*((L*c)^10);

```

*%Haciendo*

```
B3=num3/den3;
```

*%Calculando el numerador de B4*

```

num4=K1*(L*d)
+2*K1*K2*((L*d)^2)
+3*K1*K2*K3*((L*d)^3)
+4*K1*K2*K3*K4*((L*d)^4)
+5*K1*K2*K3*K4*K5*((L*d)^5)
+6*K1*K2*K3*K4*K5*K6*((L*d)^6)
+7*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*((L*d)^7)
+8*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*((L*d)^8)
+9*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*((L*d)^9)
+10*K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*((L*d)^10);

```

*%Calculando el denominador de B4*

```

den4=1+K1*(L*d)
+K1*K2*((L*d)^2)
+K1*K2*K3*((L*d)^3)
+K1*K2*K3*K4*((L*d)^4)
+K1*K2*K3*K4*K5*((L*d)^5)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*((L*d)^6)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*((L*d)^7)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*((L*d)^8)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*((L*d)^9)
+K1*K2*K3*K4*K5*K6*K7*K8*K9*K10*((L*d)^10);

```

```

%Haciendo:
B4=num4/den4;

%Finalmente:

nk(i,(2*n+2))=abs(((B1-B2)/(2*log10(a))-((a/((a-1)^2))*((B3-B4)-
(2*(B1-B2)))/(2*log10(a)))));
nk(i,(2*n+1))=log10(1/L);
nk(i,(2*n+3))=L;

%Anepenúltima columna es n(k)
%Penúltima columna es Log10 (1/L) [Valores utilizados para la gráfica
de n(k)]
%Ultima columna es L
%Las demás filas son los valores de las T(Ki) y los valores del eje x para
graficar éstas.

%Para las gráficas:
for j=1:1:n
    nk(i,j)=(j/(n-j+1))*nk(i,(2*n+2));
    nk(i,(j+n))=log10(((n-j)+1)/(j*L));
end

i=i+1;
end

plot(nk(:,(2*n+1)),nk(:,(2*n+2)));
for j=1:1:n
    figure;
    plot(nk(:,(j+n)),nk(:,j))
end

save nktesisHumanSerumAlbuminHexanoateiona.txt nk -ASCII -TABS;

```

# **IV**

## **RESULTADOS**

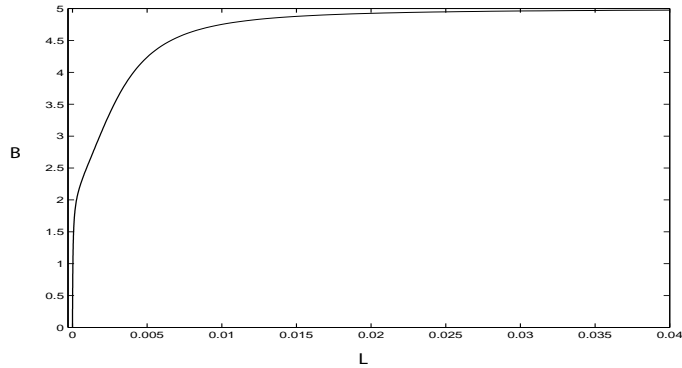
A continuación se presentan los resultados de las gráficas de la albúmina unida a diferentes compuestos, algunos son medicamentos y otros iones. El orden en el que las gráficas aparecen para cada uno de los ligandos es: la gráfica de pegado vs. libre, gráfica de Scatchard, gráfica Semilogarítmica, la distribución de afinidad de sitio (sad) y las distribuciones de afinidades estequiométricas (SAD).

Primero aparecen los resultados de la albúmina unida a los iones y posteriormente aquellos en los que se une a los medicamentos. Después de las gráficas se presenta un análisis de las mismas.

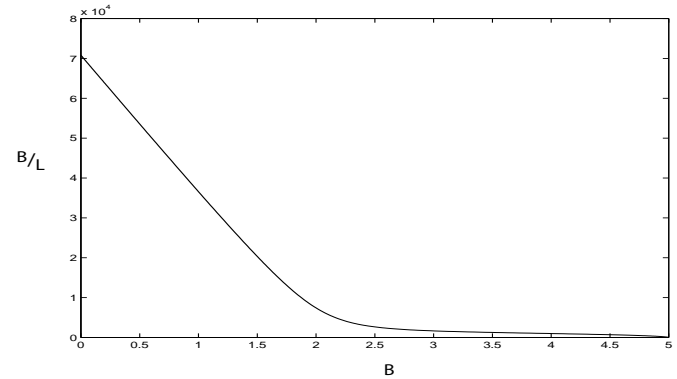
## **IV.1 Albúmina vs. Iones**

# Albumin vs. Ion Hexanoato

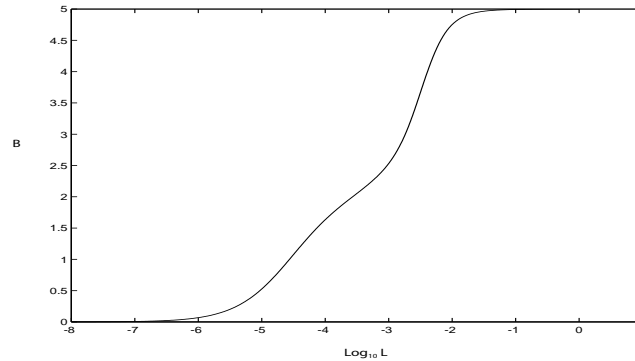
## Bound vs. Free Plot



## Scatchard Plot

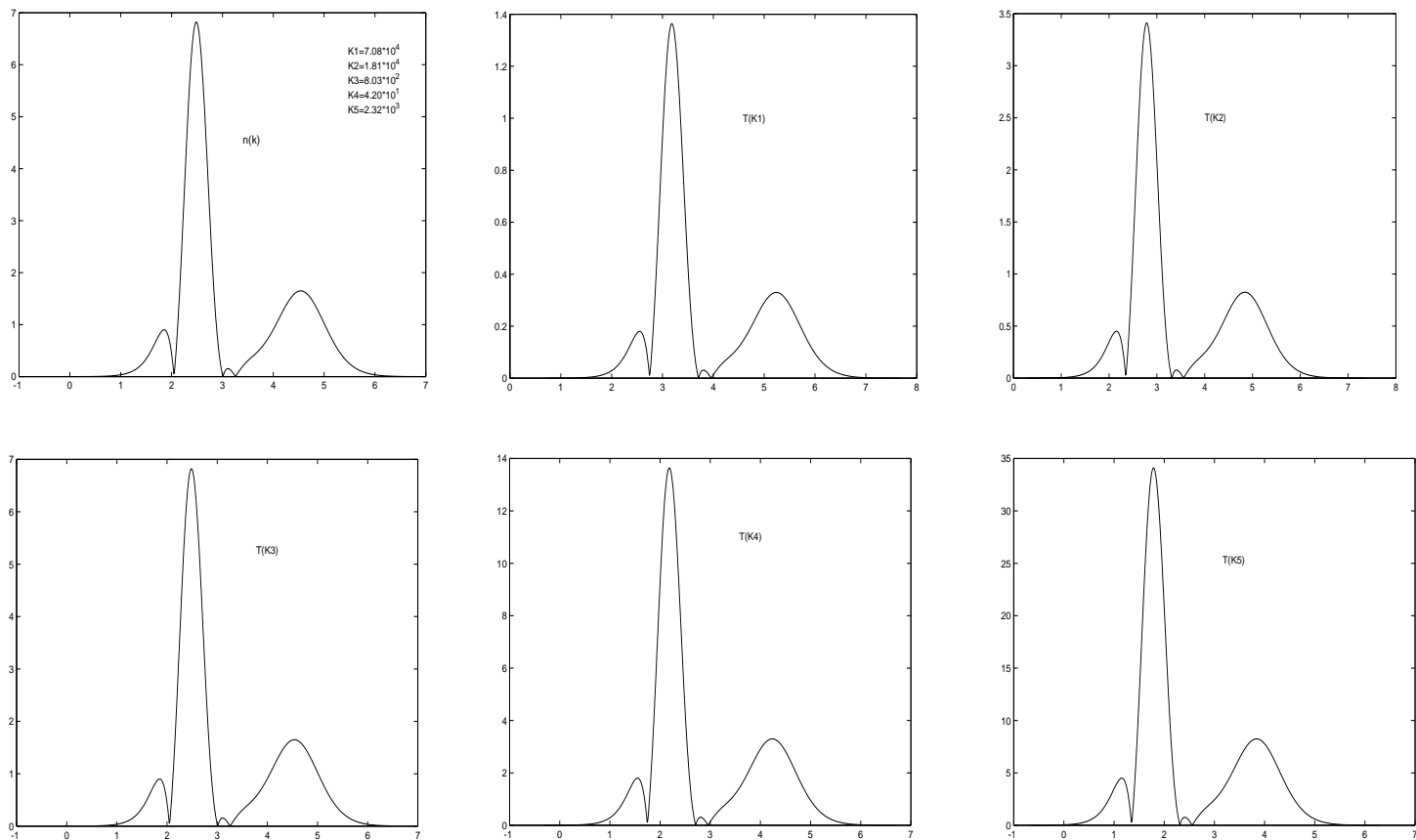


## Semilog Plot



**Fig. 1.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Hexanoato. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica.

## Albumin vs. Ion Hexanoato



**Fig. 2.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Hexanoato. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-f) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_5)$  respectivamente.

## Albumin vs. Ion Hexanoato

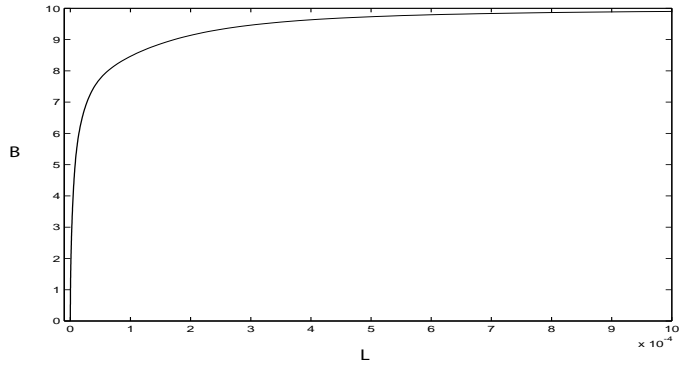
Analizando las gráficas de pegado vs. libre, Scatchard y la gráfica Selimogarítmica (Fig. 1a-c) el número de sitios activos al que concluimos que puede pegarse el ion hexanoato es a 5. Observando la gráfica de Scatchard podemos suponer dos rangos de afinidades, idea que es apoyada al ver las dos “s” que se forman en la gráfica semilogarítmica.

Sin embargo, examinando la gráfica del espectro de afinidad (Fig. 2a) vemos 4 modas que son totalmente disjuntas una de la otra (debido a que cada moda inicia y finaliza en el valor de cero en el eje de las ‘y’).

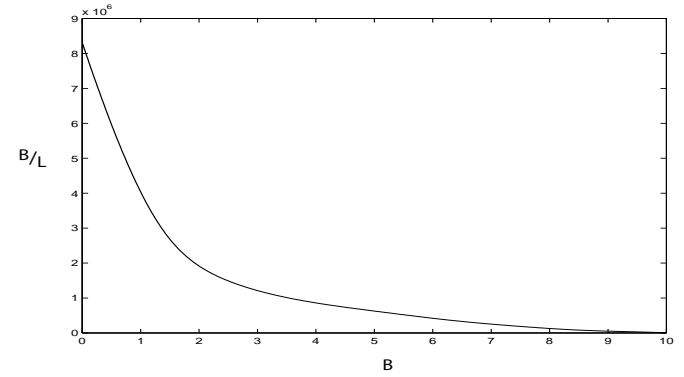


# Albumin vs. Ion Laurato

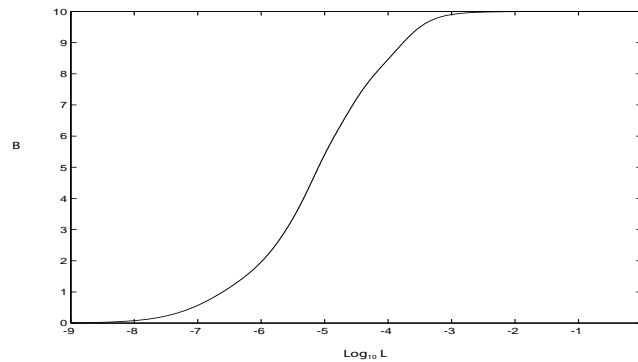
## Bound vs. Free Plot



## Scatchard Plot

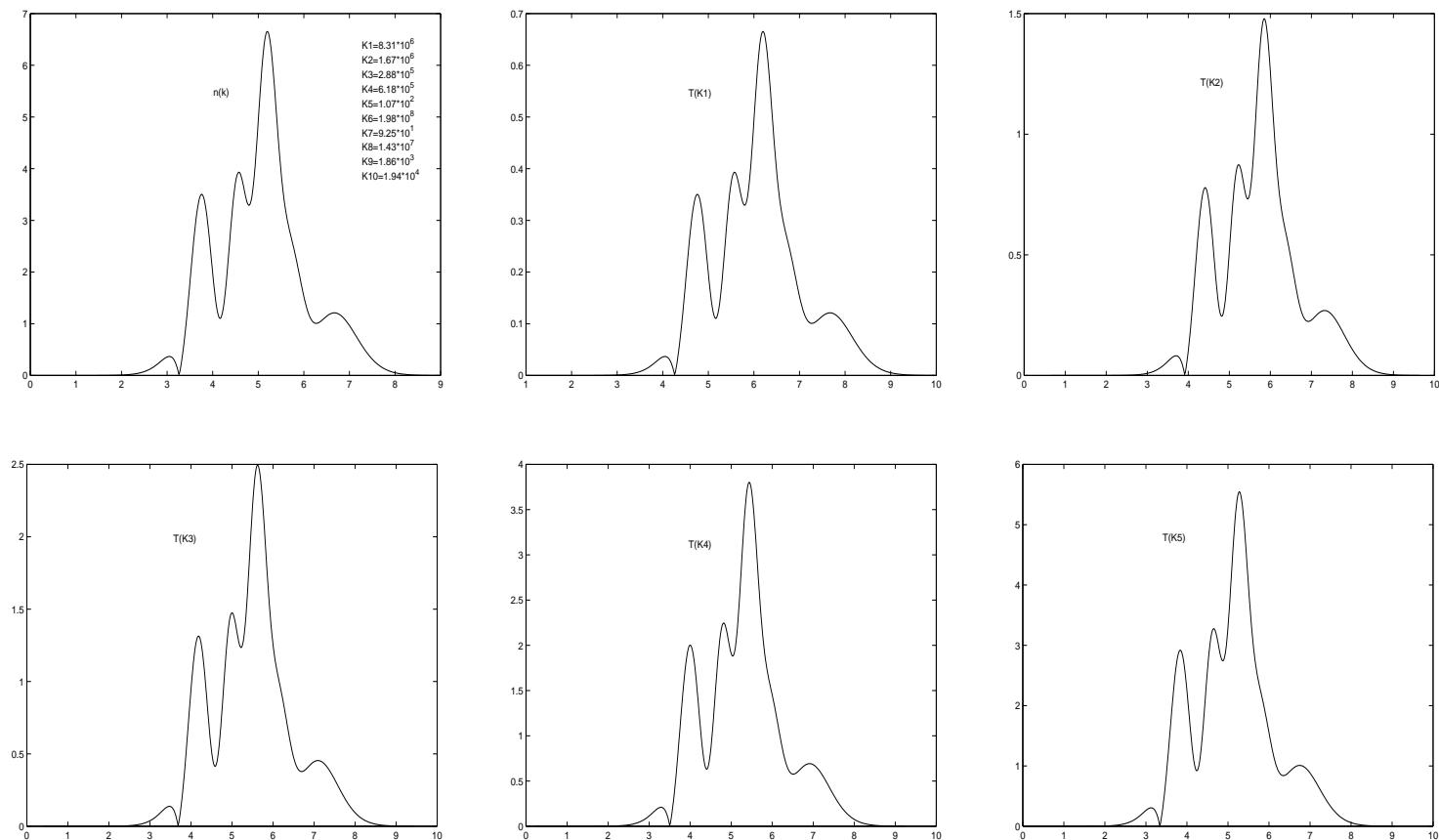


## Semilog Plot



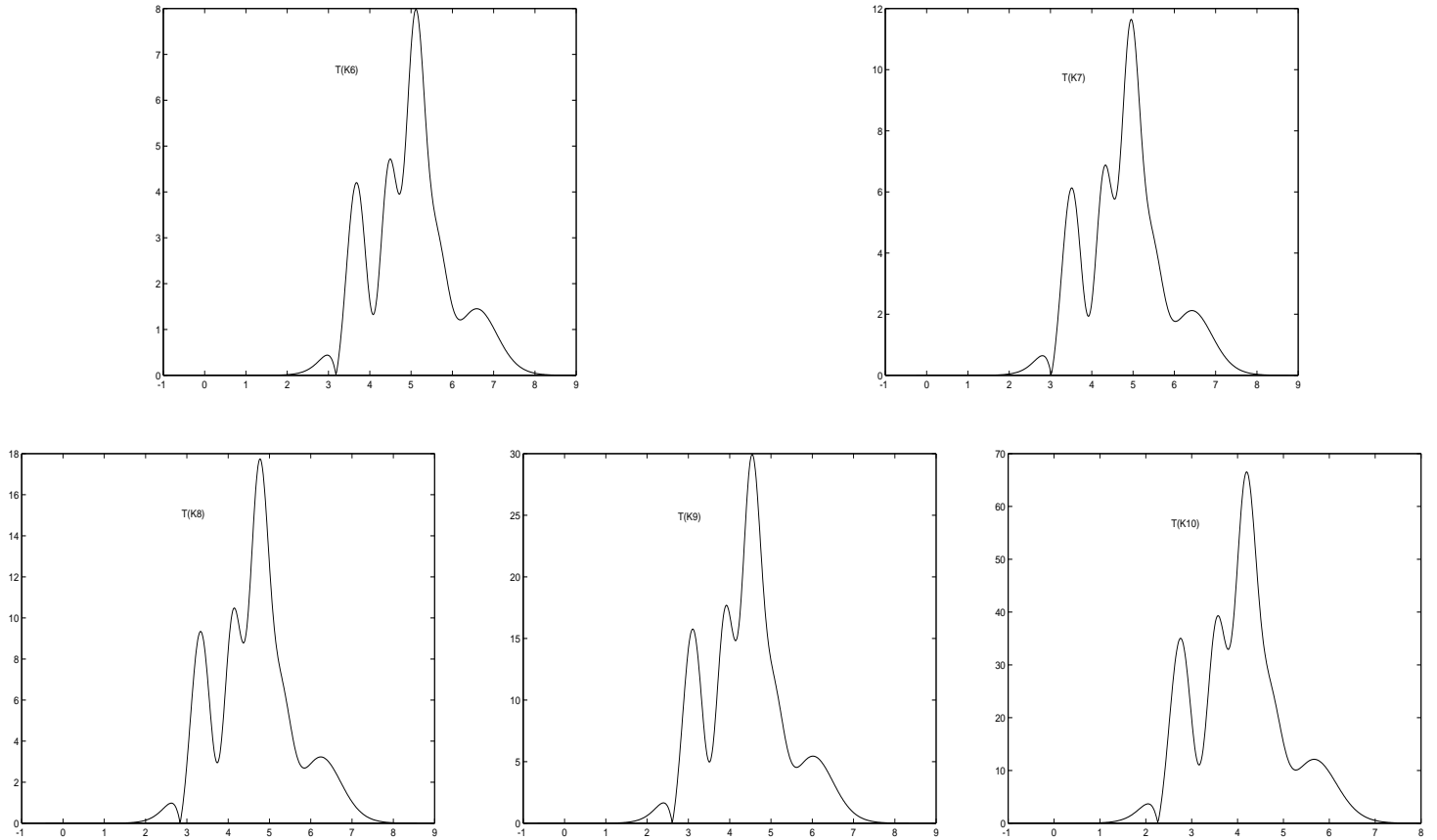
**Fig. 3.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Laurato. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica.

## Albumin vs. Ion Laurato



**Fig. 4.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Laurato. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-f) Distribucion de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_5)$  respectivamente.

## Albumin vs. Ion Laurato



**Fig. 4. (g-k).** Distribucion de afinidad estequiométrica, de  $T(K_6)$  a  $T(K_{10})$  respectivamente.

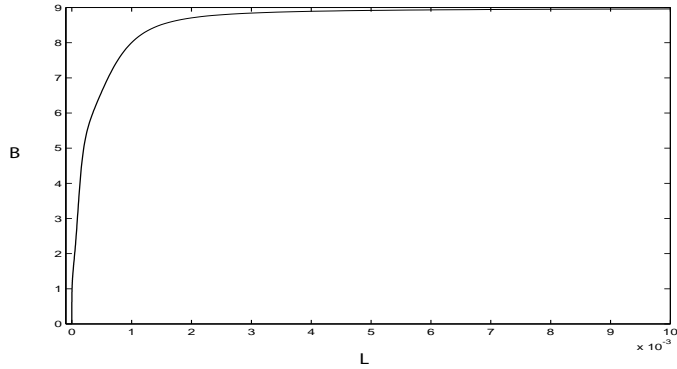
## Albumin vs. Ion Laurato

Al analizar las primeras tres gráficas, Fig 3(a-c), podemos concluir que el laurato se une a 10 sitios, observando la gráfica de Sacthard (fig. 3b), podríamos suponer dos rangos de afinidades y, analizando la gráfica semilogarítmica (fig. 3c), simplemente observamos que la curva no es simétrica, y por el compartimiento que presenta, pudiera concluirse la existencia de interacciones negativas entre sus sitios de unión.

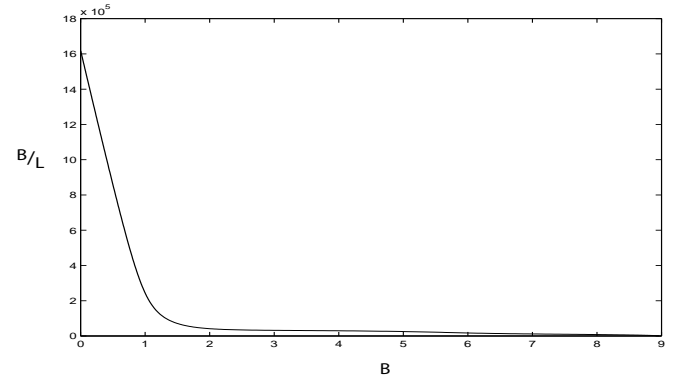
Al ver la gráfica de la sad (4a) notamos 5 modas, posiblemente 6, que no son independientes una de la otra excepto la última, es decir, los valores de  $n(k)$  no “tocan” el cero (excepto para la última moda).

# Albumin vs. Ion Octanoato

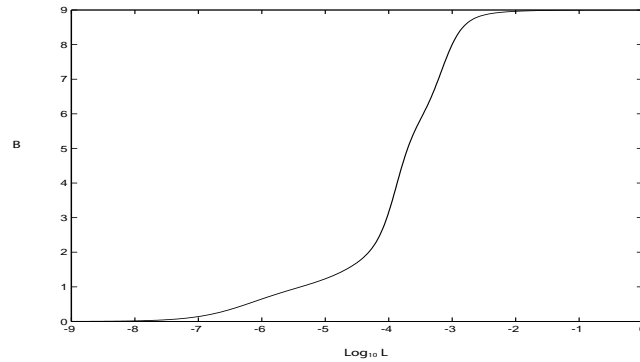
## Bound vs. Free Plot



## Scatchard Plot

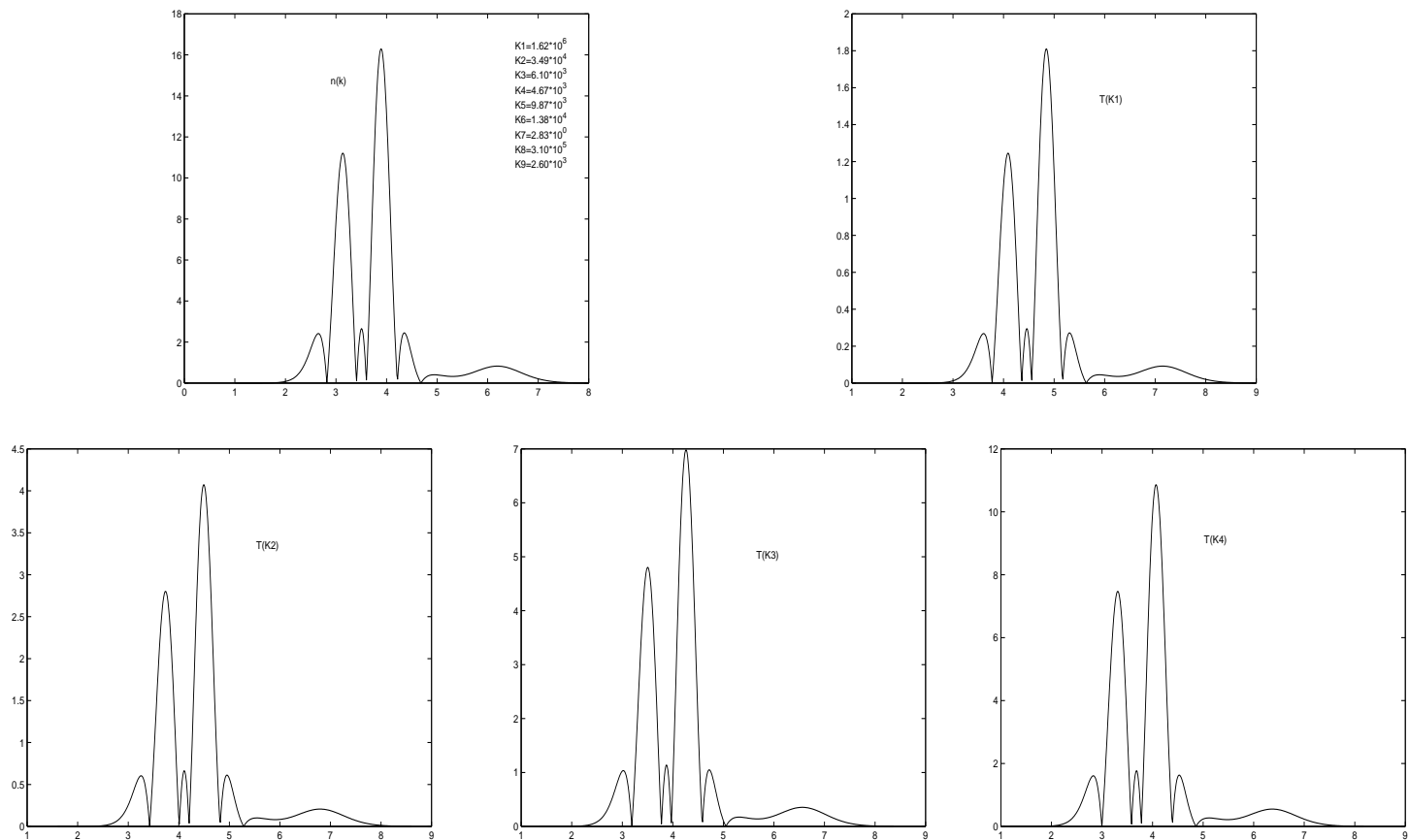


## Semilog Plot



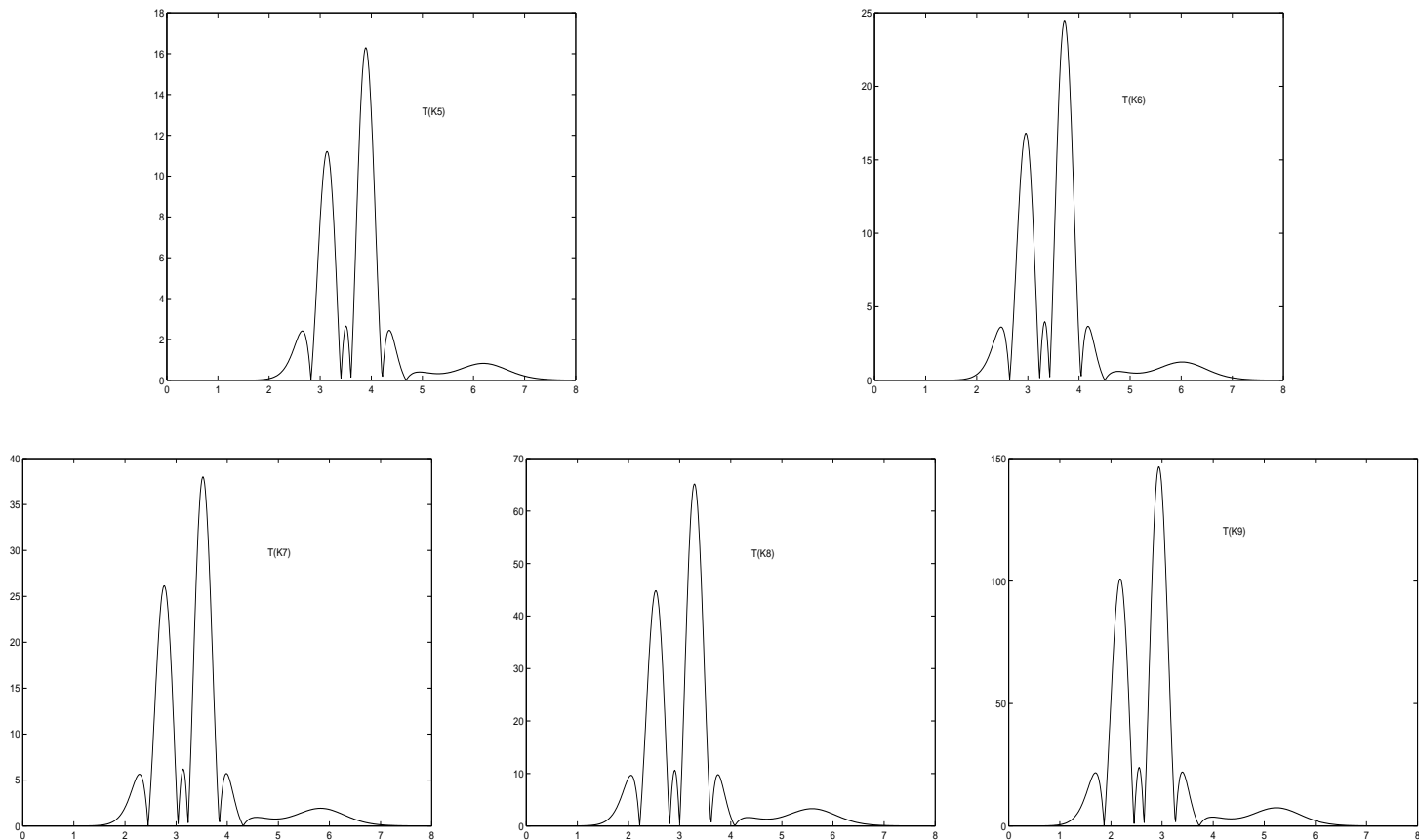
**Fig. 5.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Octanoato. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica.

## Albumin vs. Ion Octanoato



**Fig. 6.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Octanoato. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-e) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_4)$  respectivamente.

## Albumin vs. Ion Octanoato



**Fig. 6. (f-j).** Distribucion de afinidad estequiométrica, de  $T(K_5)$  a  $T(K_9)$  respectivamente.

## Albumin vs. Ion Octanoato

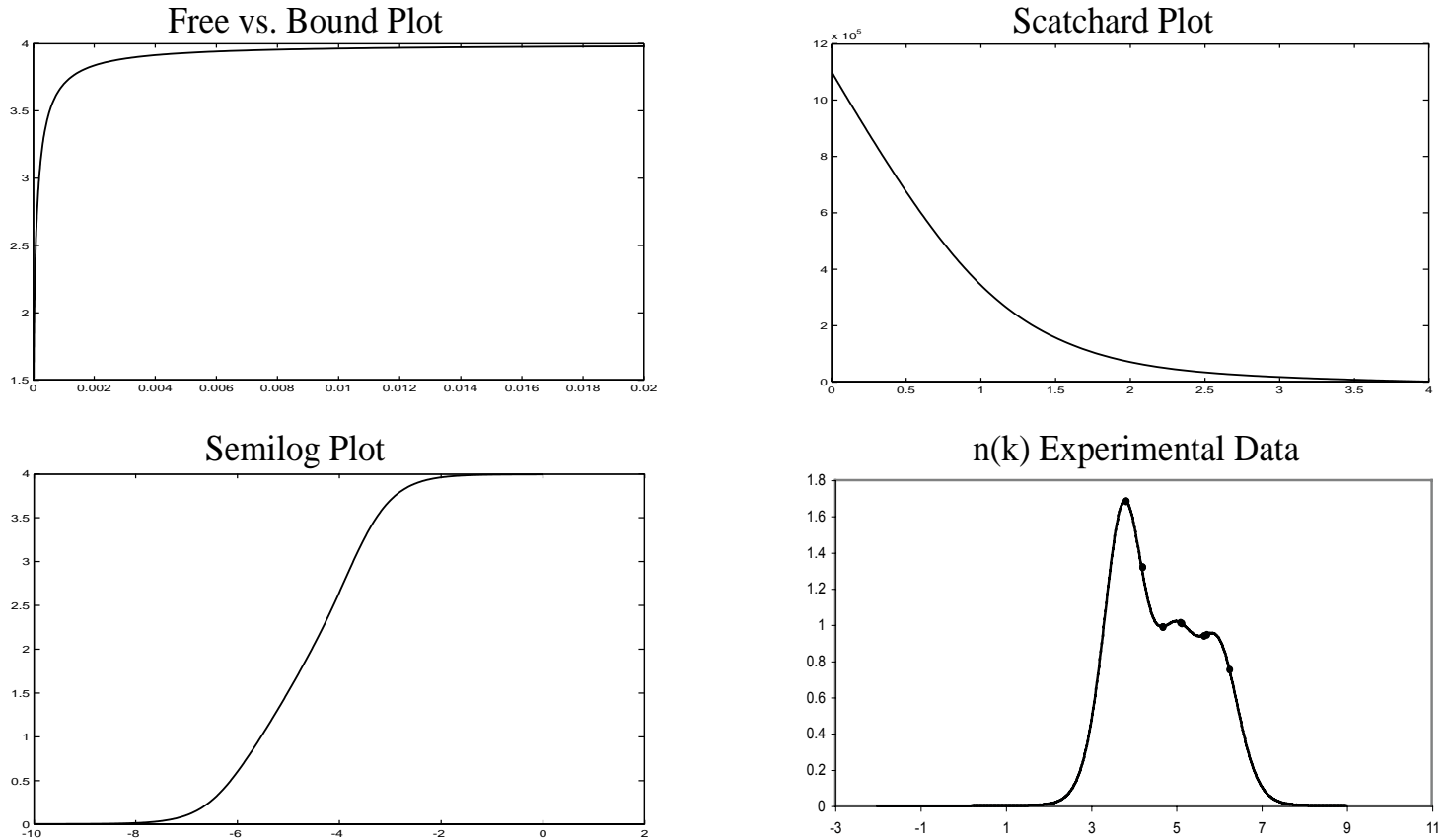
Las fig. 5(a-c), que exhiben los datos de la albúmina unida al ion octanoato muestran que éste se une a 9 sitios. La gráfica de Scatchard podríamos interpretarla como un sistema con dos rangos de afinidades bastante distintos. Y al analizar la gráfica semilogarítmica vemos un sistema que pudiera tener interacciones tanto positivas como negativas ya que la sigmoide en un principio es más horizontal y después cambia bruscamente y tiende a ser más vertical, además de presentar dos modas en esta última parte.

Analizando la gráfica del espectro de afinidad (6a) vemos un sistema más complejo con 6, posiblemente 7 modas, que son practicante disjuntas una de la otra, algunas con mayor recurrencia que otras.



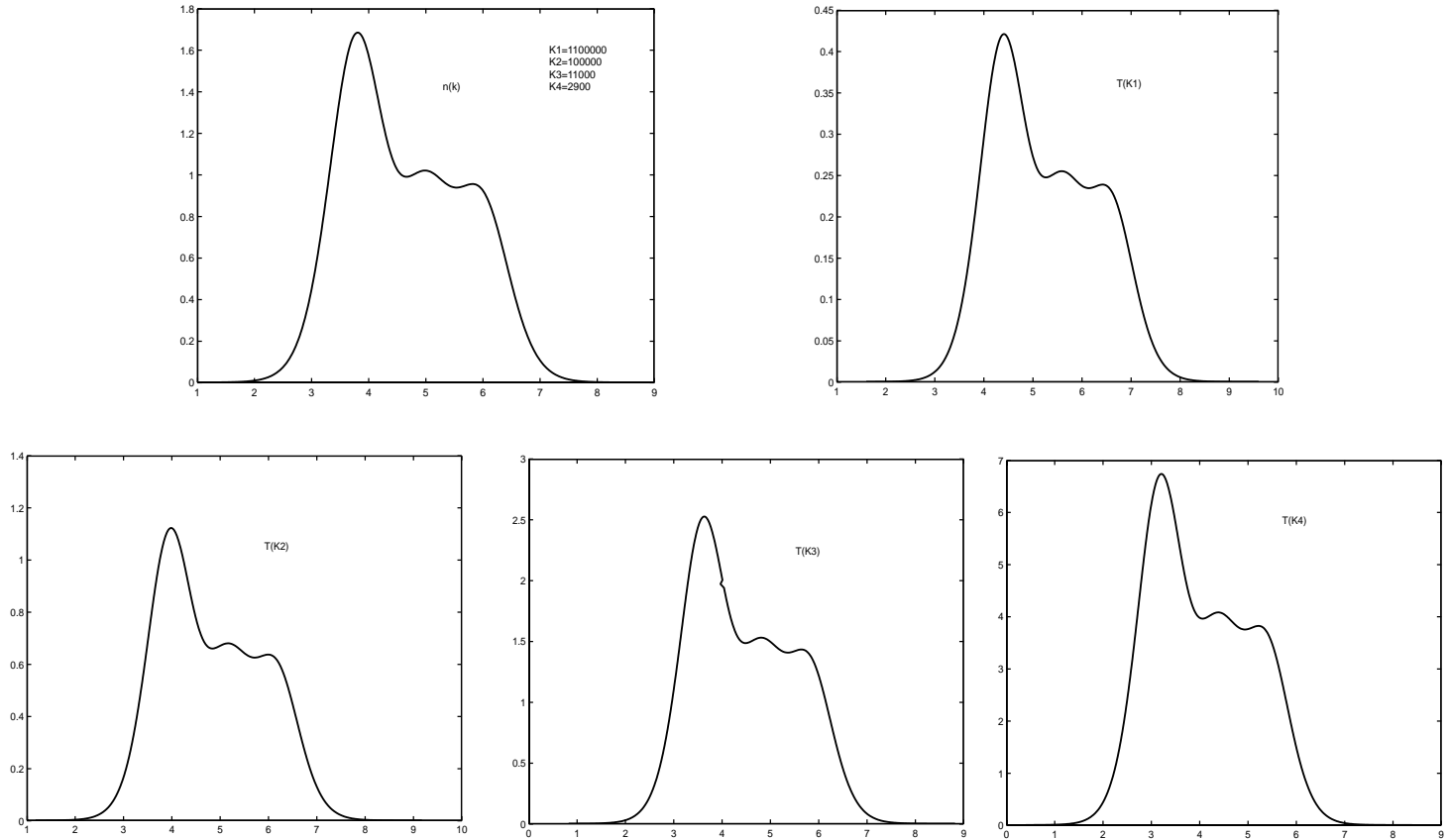
## **IV.2 Albúmina vs. Medicamentos**

## Albumin vs. Azaprapazona



**Fig. 7.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Azaprapazona. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales (•), datos teóricos (—).

## Albumin vs. Azaprapazona



**Fig. 8.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Azaprapazona. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-e) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_4)$  respectivamente.

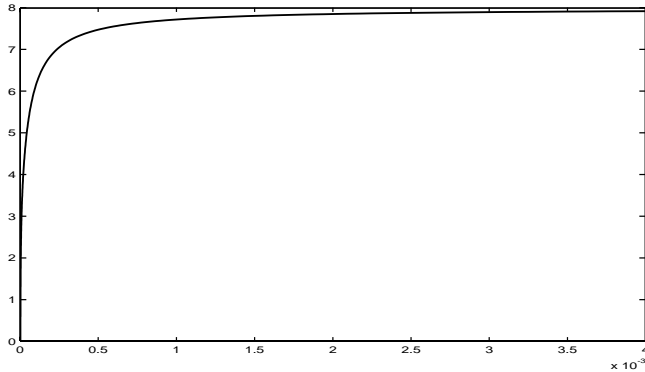
## Albumin vs. Azaprapazona

Observando las figuras 7(a-c) podríamos deducir que la saturación la obtenemos cuando el ligando se une a cuatro sitios y que probablemente existan dos poblaciones ya que, analizando la gráfica de Scatchard y la gráfica semilogarítmica, pudiéramos concluir lo anterior.

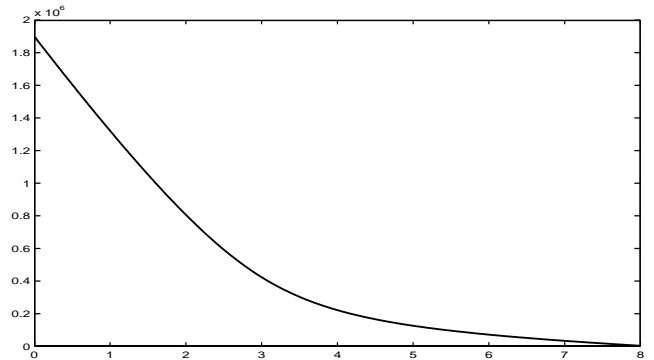
Observando la gráfica del espectro de afinidad (Fig. 8a) vemos un sistema trimodal, ninguna moda es independiente de la otra, las primeras dos modas son muy similares y la tercera es más recurrente que las otras dos. La Fig. 7d también muestra la gráfica del espectro de afinidad, sin embargo toma como base a los valores gráficos obtenidos con el programa DataThief (<http://www.datathief.org>). De acuerdo a esta gráfica los datos experimentales alcanzan a definir las tres modas, sin embargo ninguna de éstas está completa, lo que podría significar que es dentro de estos rangos donde el receptor y el ligando se mantienen unidos.

# Albumin vs. Benoxaprofeno

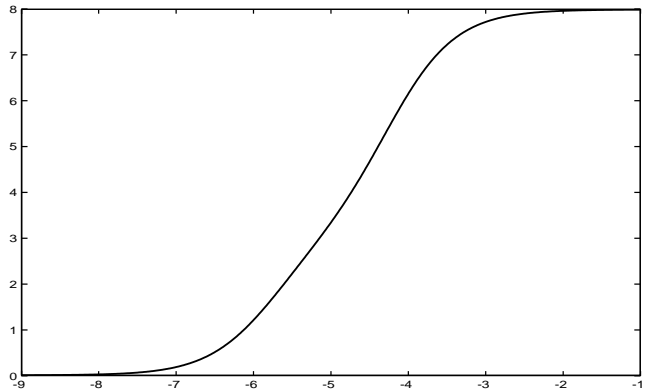
Free vs. Bound Plot



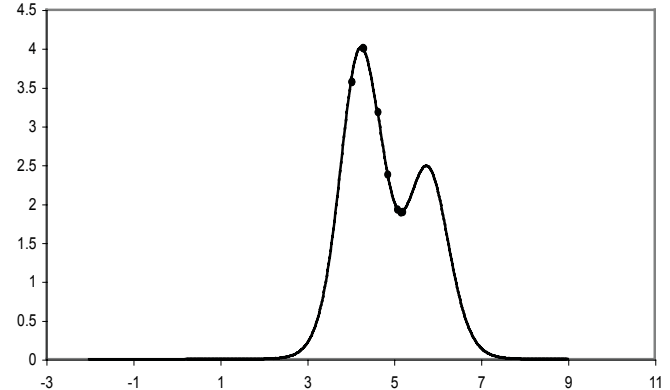
Scatchard Plot



Semilog Plot

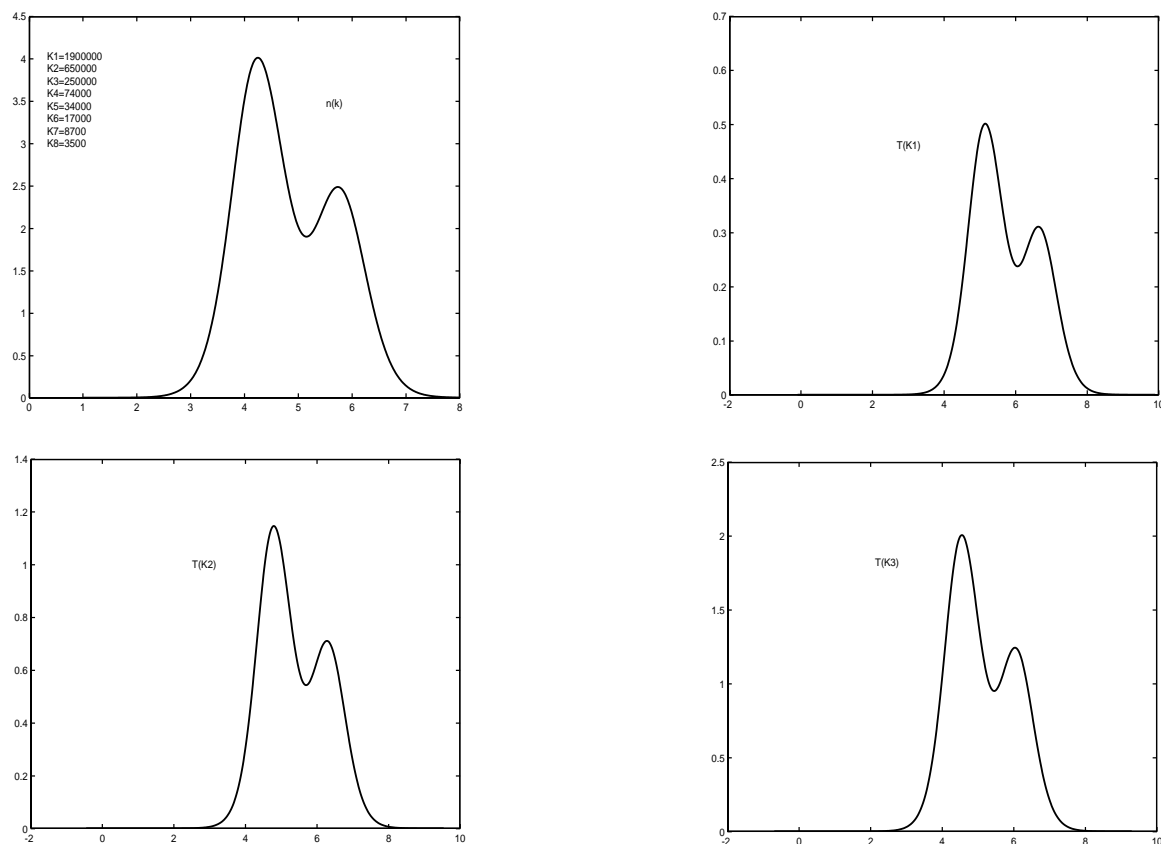


n(k) Experimental Data



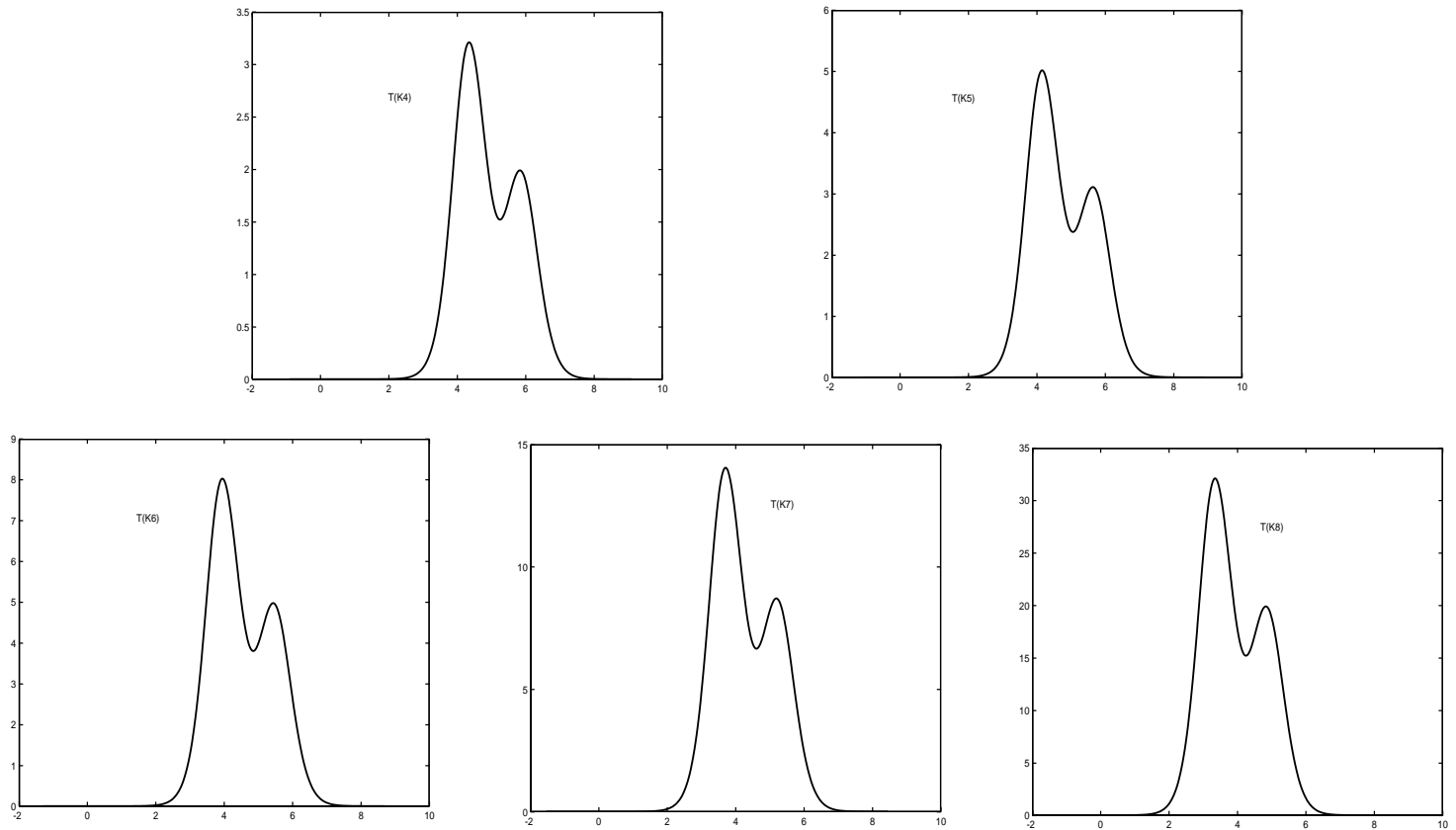
**Fig. 9.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Benoxaprofeno. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales (•), datos teóricos (—).

## Albumin vs. Benoxaprofeno



**Fig. 10.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Benoxaprofeno. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-d) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_3)$  respectivamente.

## Albumin vs. Benoxaprofeno



**Fig. 10. (e-i).** Distribucion de afinidad estequiometrica, de  $T(K_4)$  a  $T(K_8)$  respectivamente.

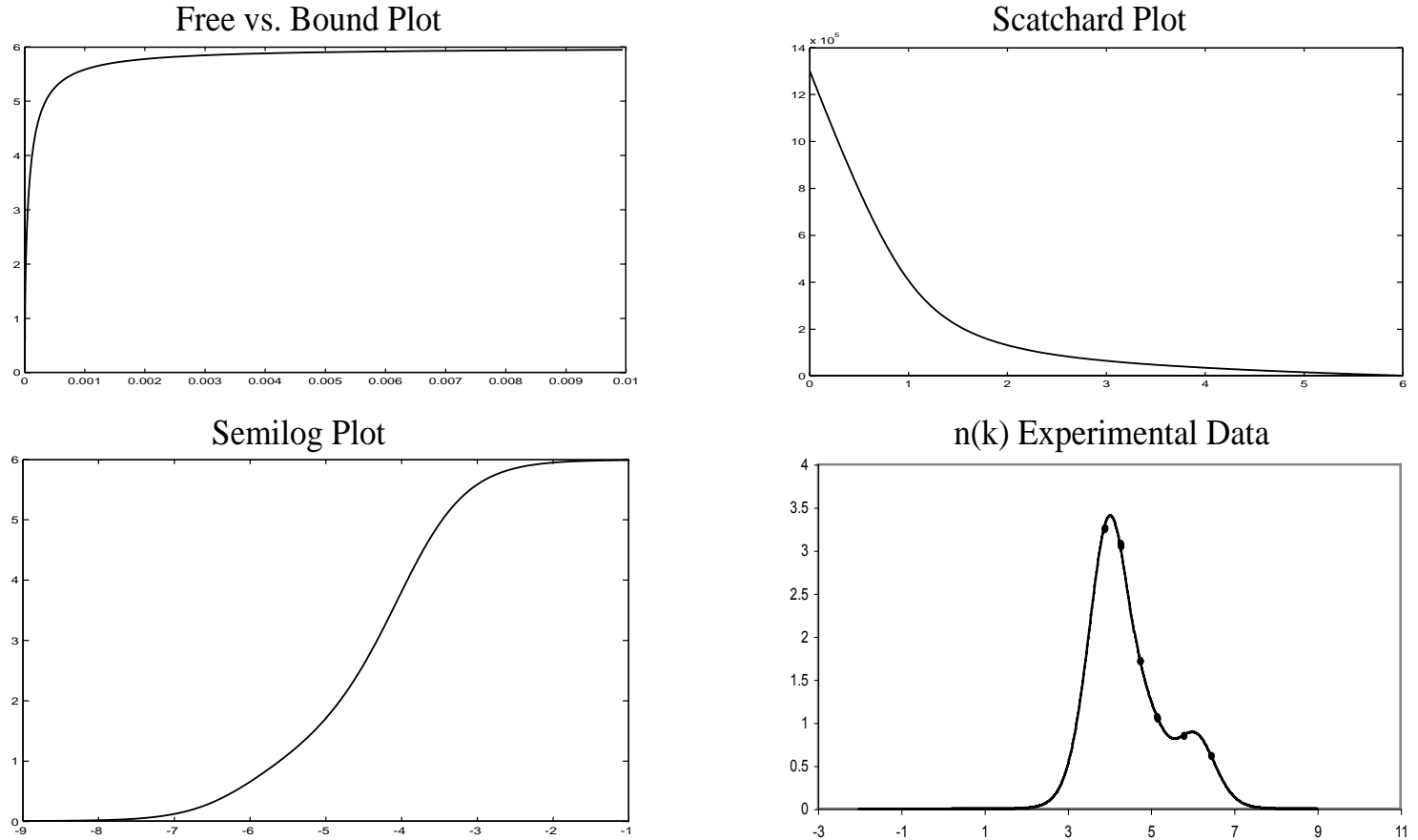
## Albumin vs. Benoxaprofeno

Analizando la fig. 9(a-c) podríamos suponer que el Benoxaprofeno se une a 8 sitios. Al observar la gráfica de Scatchard y la gráfica semilogarítmica ambas podrían ayudarnos a suponer un sistema de dos poblaciones.

En la fig. 10a, vemos un sistema bimodal donde las modas no son independientes y una es más recurrente que la otra. De la misma manera que el sistema anterior (fig. 7d) analizando la sad con los valores experimentales (fig. 9d) solamente apreciamos la segunda moda, la primera pareciera no existir.

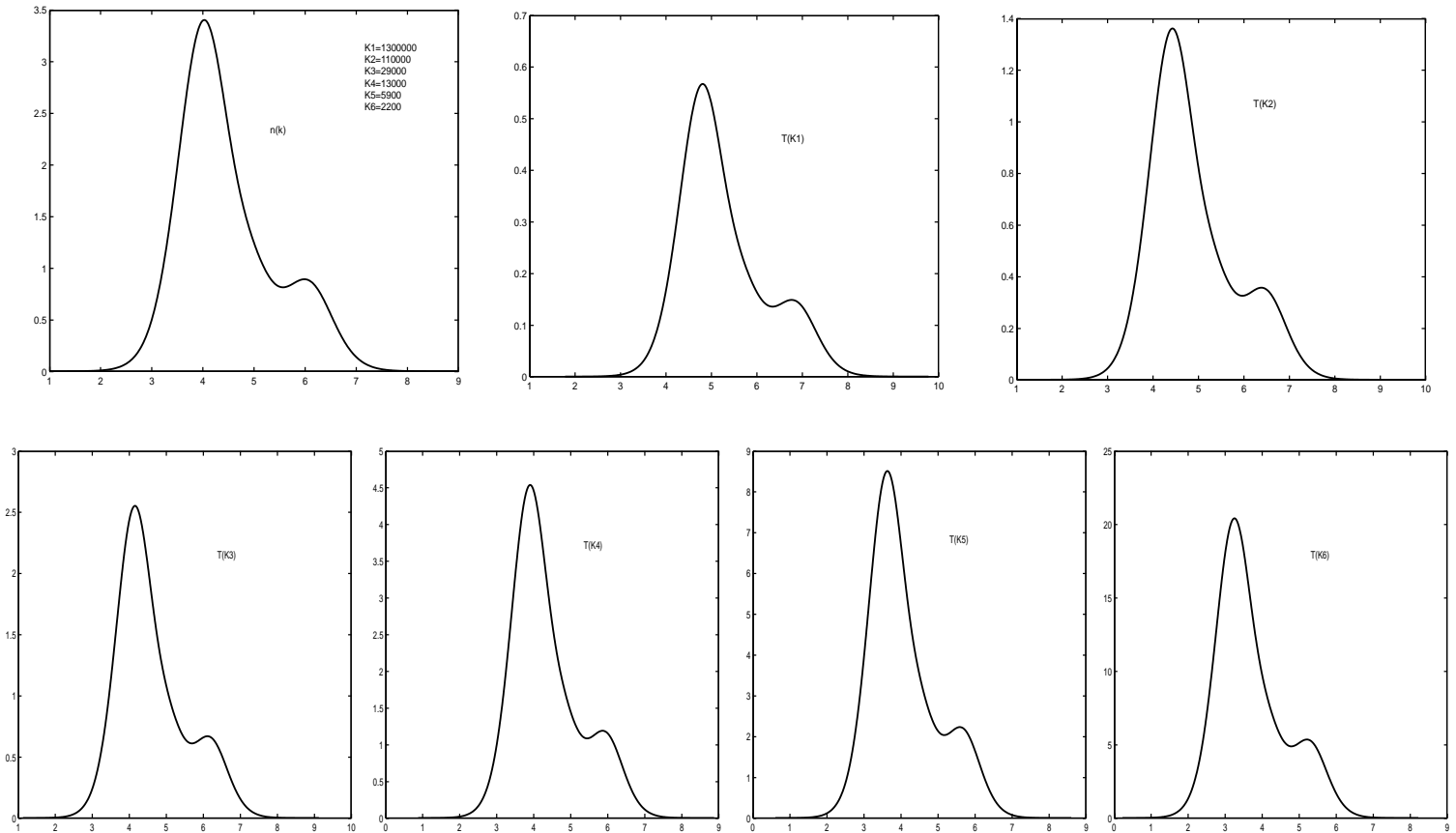


## Albumin vs. Bifenilacetato



**Fig. 11.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Bifenilacetato. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales ( $\bullet$ ), datos teóricos ( $-$ ).

## Albumin vs. Bifenilacetato



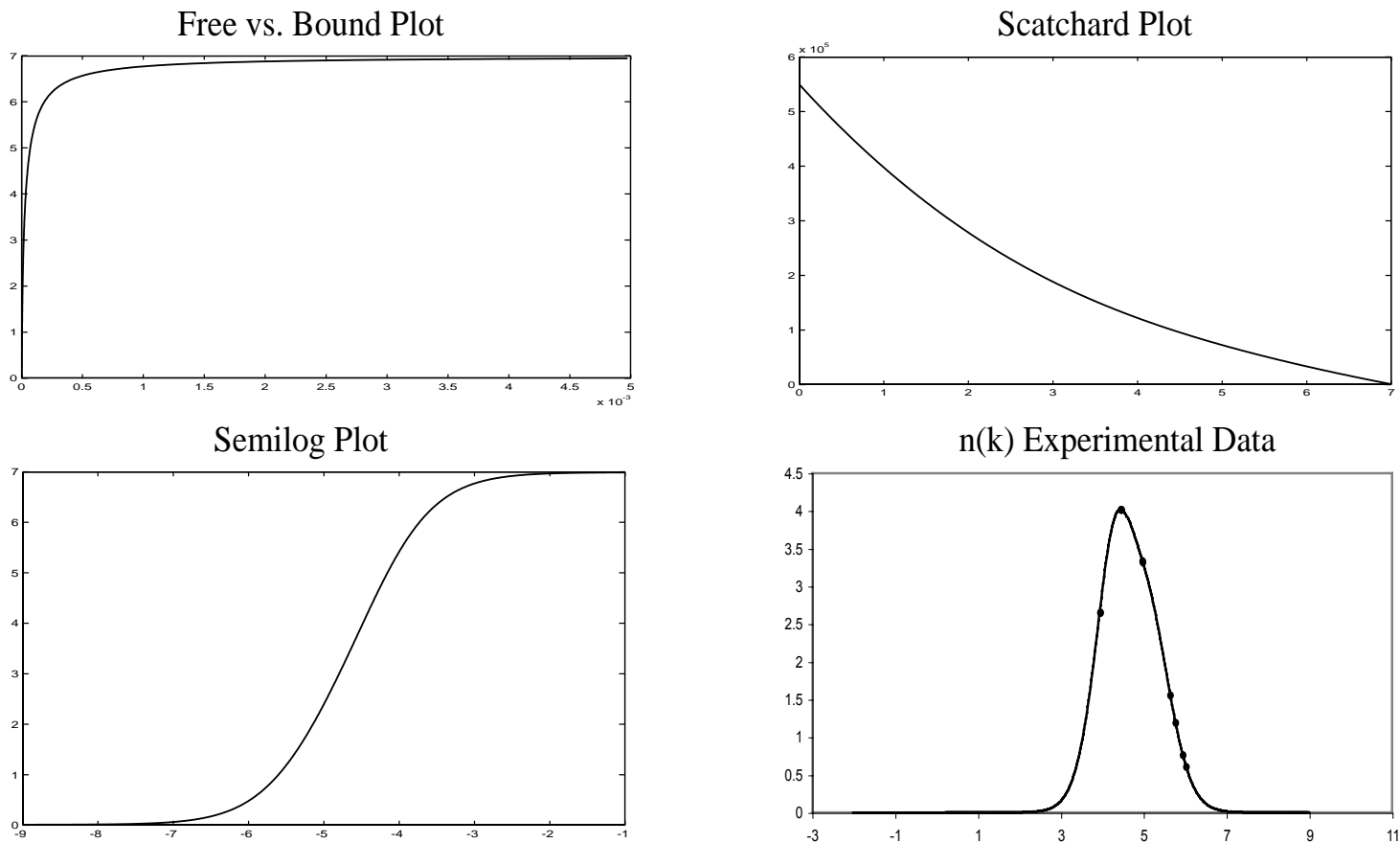
**Fig. 12.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Bifenilacetato. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-g) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_6)$  respectivamente.

## Albumin vs. Bifenilacetato

Observando las fig. 11(a-c) las curvas parecen indicar que el receptor se satura con 6 sitios. Analizando la curva en la gráfica de Scatchard podemos suponer la existencia de dos poblaciones, y la curva en la gráfica semilogarítmica podría indicarnos la existencia de cooperatividad negativa, debido a que la “pendiente” de la curva no es muy pronunciada.

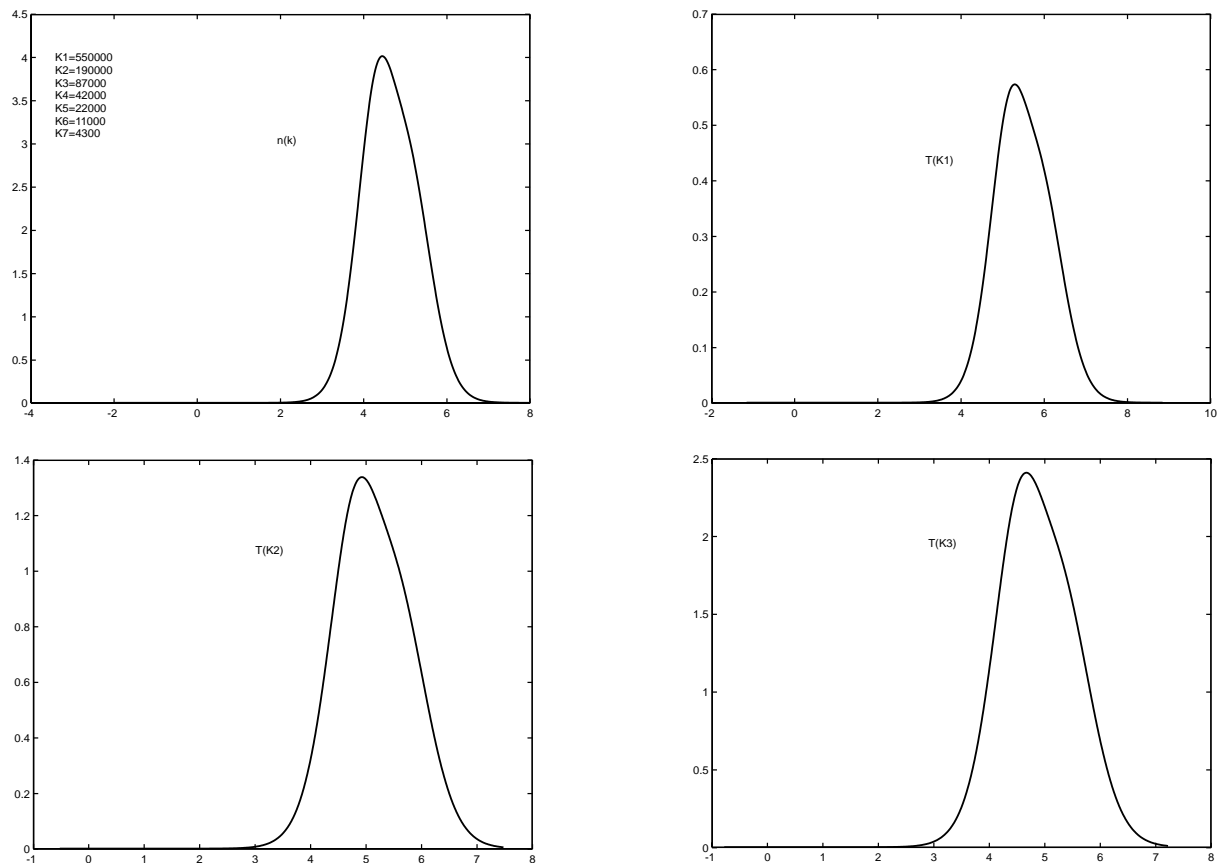
Analizando la fig. 12a notamos un sistema bimodal, sin ser independientes una de la otra y la moda con menor afinidad resulta tener más concentración que otra. La Fig. 11d también muestra la gráfica del espectro de afinidad en base a los datos extraídos de las gráficas, las dos modas se alcanzan a diferenciar, sin embargo ambas son incompletas.

## Albumin vs. Diclofenaco



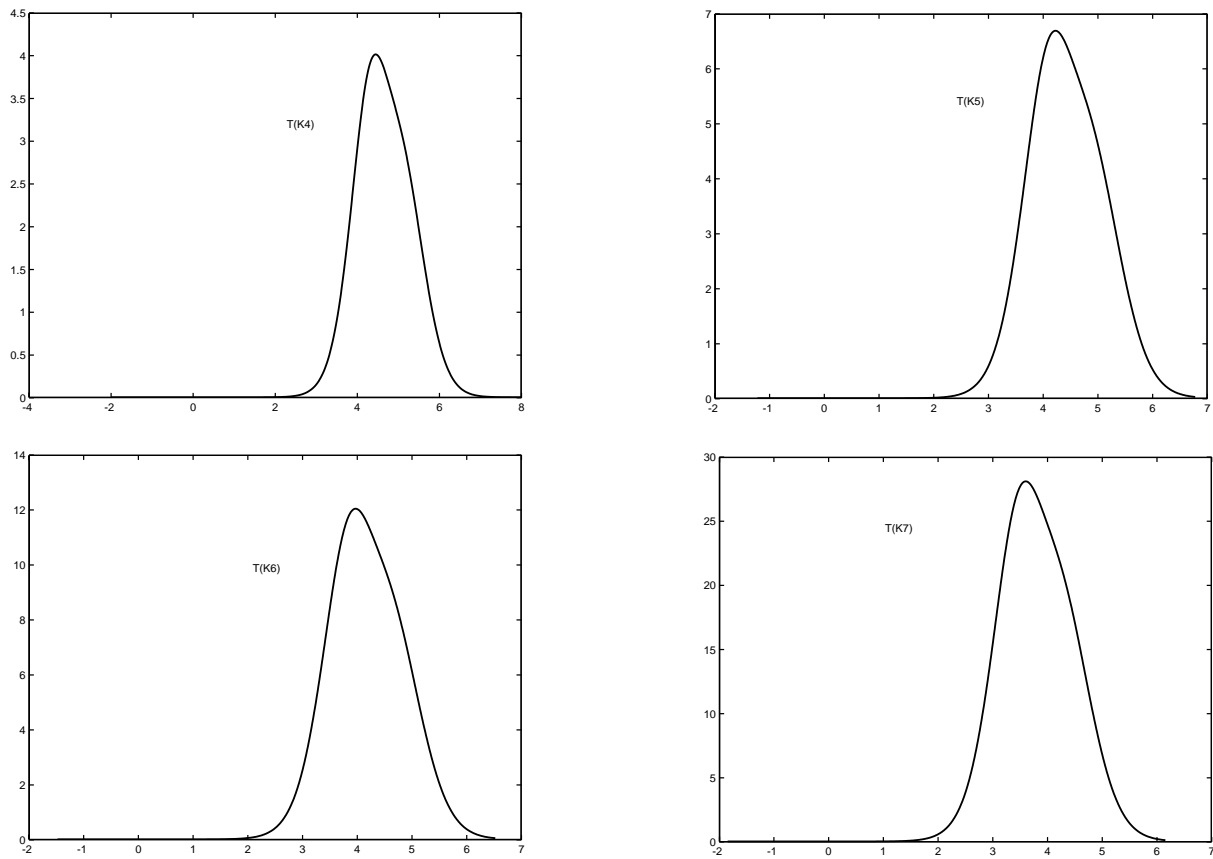
**Fig. 13.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Diclofenaco. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales (●), datos teóricos (—).

## Albumin vs. Diclofenaco



**Fig. 14.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Diclofenaco. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-d) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_3)$  respectivamente.

## Albumin vs. Diclofenaco



**Fig. 14. (e-h)** Distribucion de afinidad estequiométrica, de T(K<sub>4</sub>) a T(K<sub>7</sub>) respectivamente.

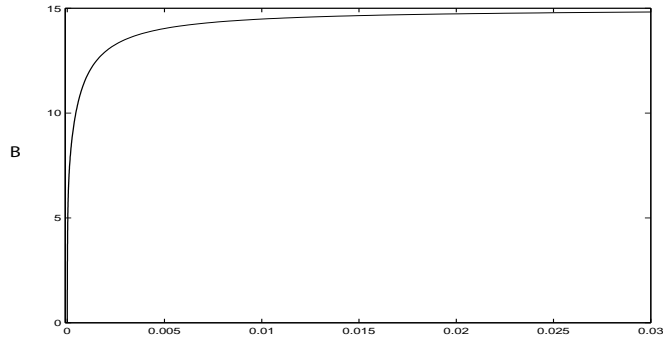
## Albumin vs. Diclofenaco

Analizando las figuras 13(a-c) suponemos que existen 7 sitios activos. La gráfica de Scatchard pareciera mostrar que tenemos dos poblaciones, sin embargo no es tan claro. Y la gráfica semilogarítmica pareciera mostrar que tenemos un sistema de una sola población.

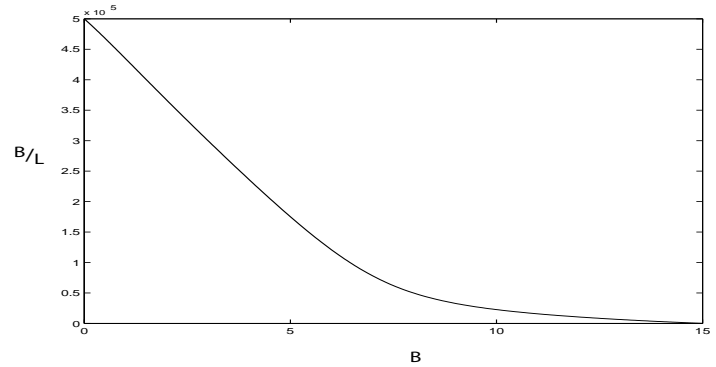
Analizando la gráfica del espectro de afinidad notamos una sola moda, lo que podría significar que tenemos tan solo una población. Y al observar la fig. 13d los datos se extienden a lo largo de la moda sin embargo ésta no se completa.

# Albumin vs. Diflunisal

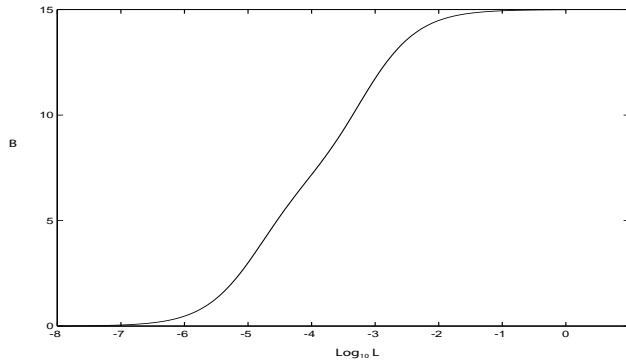
## Free vs. Bound Plot



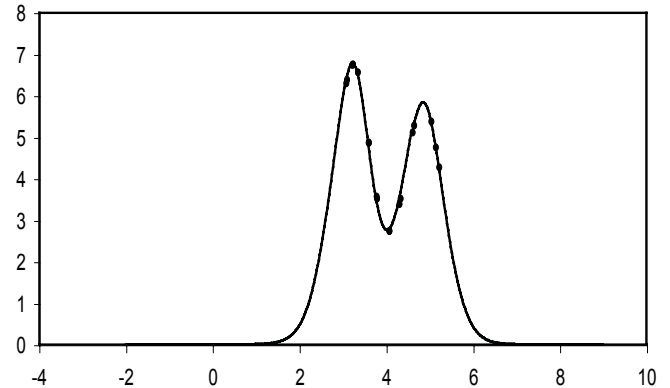
## Scatchard Plot



## Semilog Plot



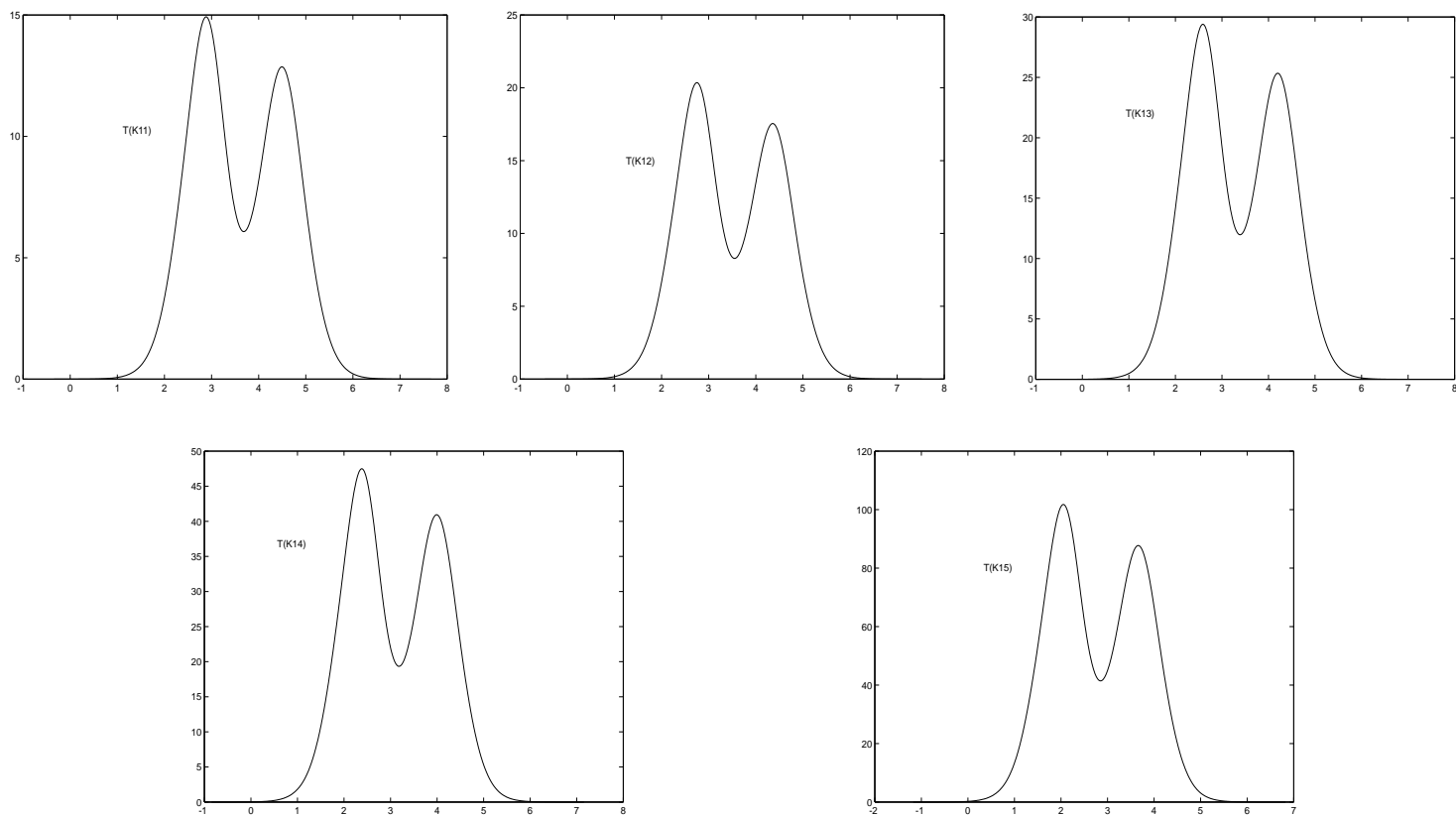
## n(k) Experimental Data



**Fig. 15.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Diflunisal. (a): Grafica de pegado vs. libre. (b): Grafica de Scatchard. (c): Grafica semilogarítmica. (d) Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales (•), datos teóricos (—).

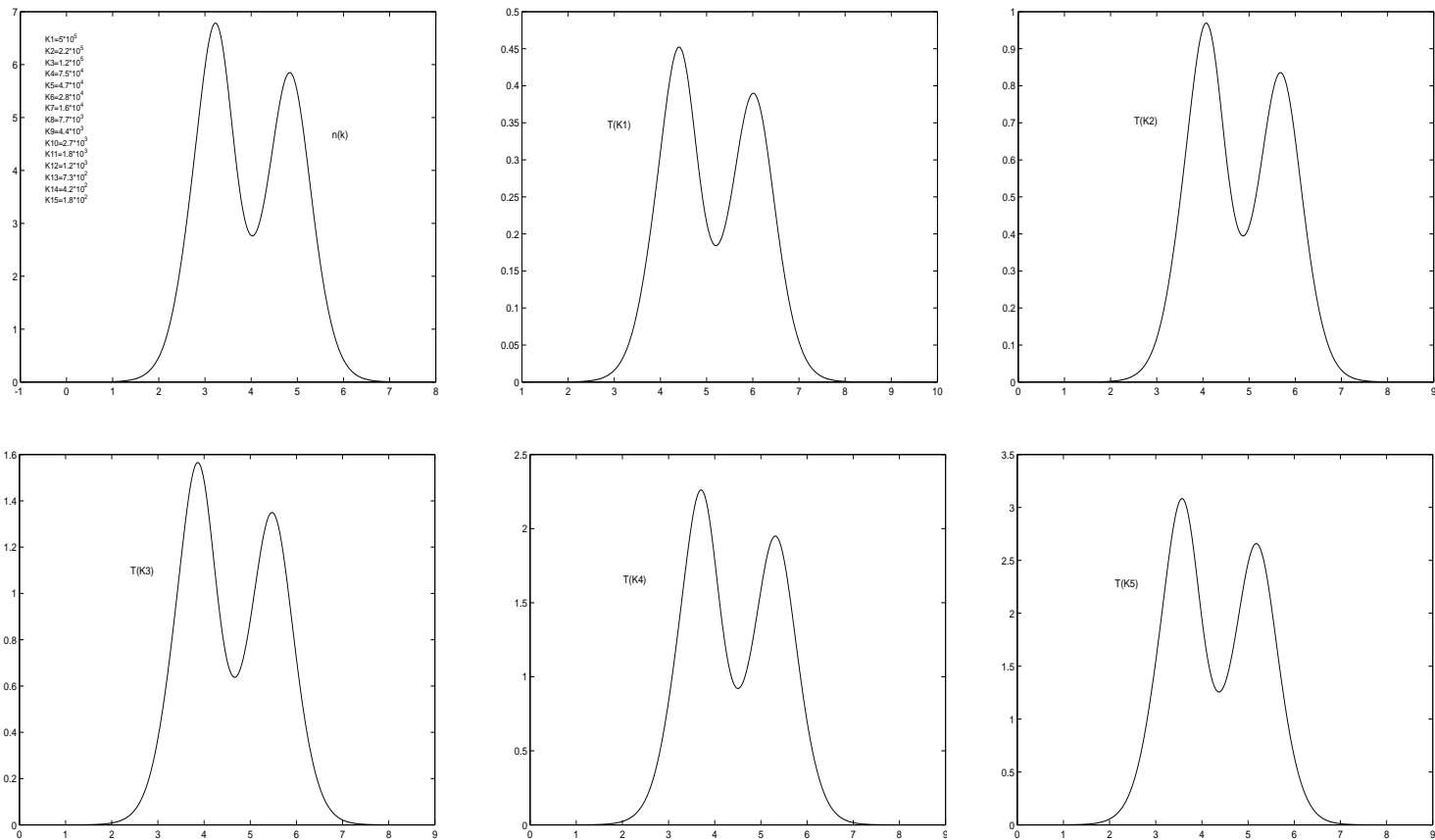


## Albumin vs. Diflunisal



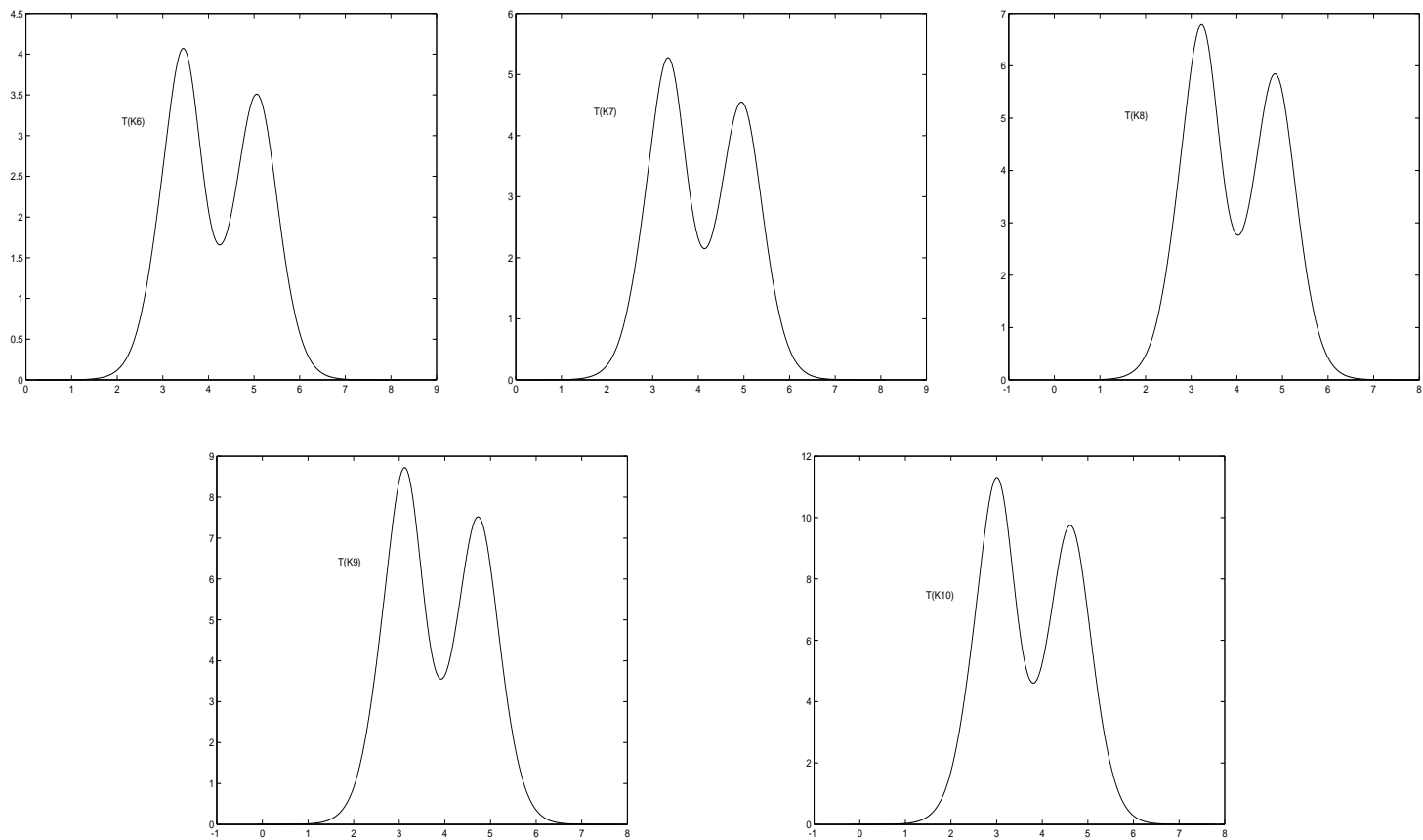
**Fig. 16. (I-p).** Distribucion de afinidad estequiometrica, de  $T(K_{11})$  a  $T(K_{15})$  respectivamente.

## Albumin vs. Diflunisal



**Fig. 16.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Diflunisal. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-f) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_5)$  respectivamente.

## Albumin vs. Diflunisal



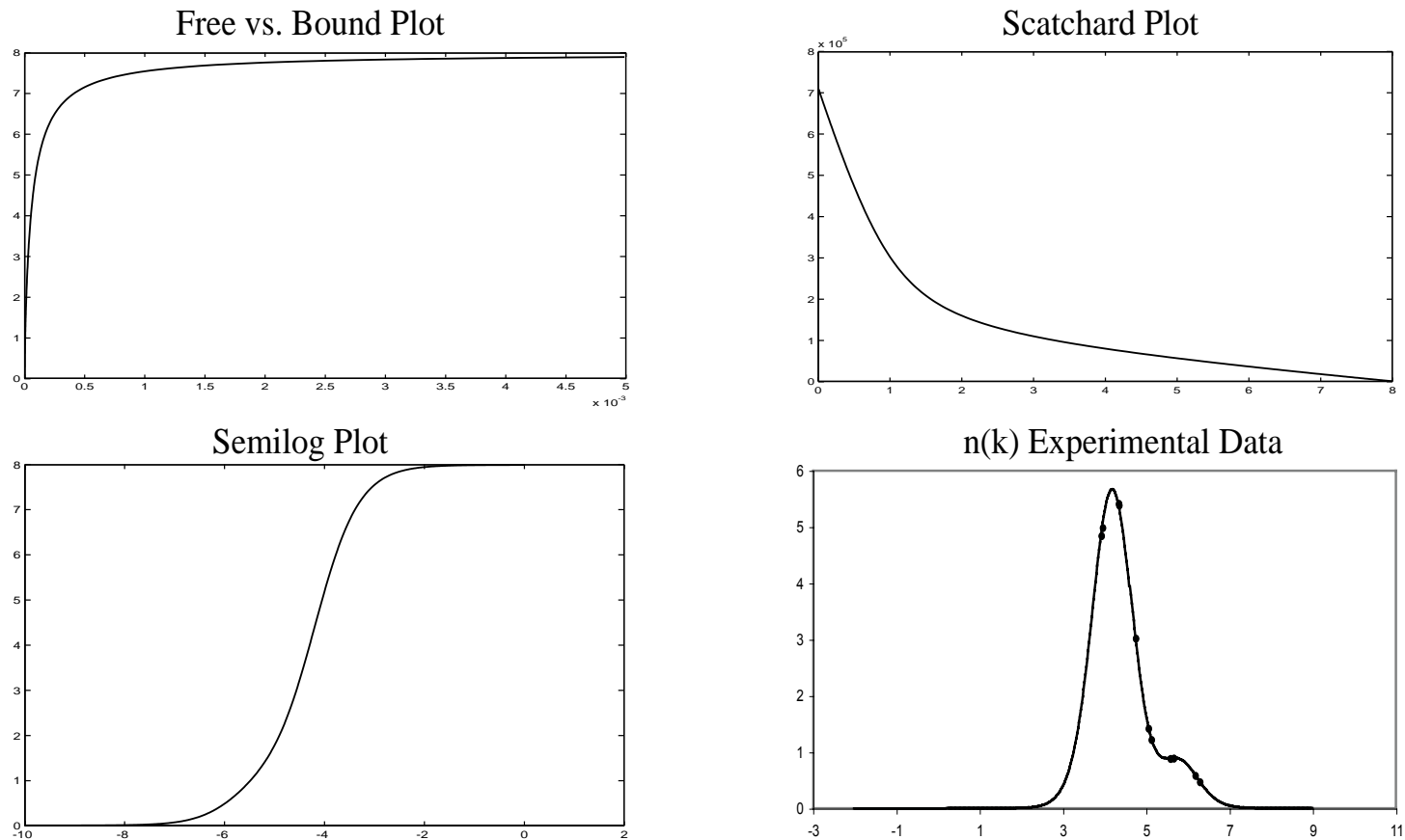
**Fig. 16. (g-k).** Distribucion de afinidad estequiometrica, de  $T(K_6)$  a  $T(K_{10})$  respectivamente.

## Albumin vs. Diflunisal

Al analizar las gráficas 15(a-c) puede concluirse que la albúmina tiene 15 sitios activos a los que se pega el diflunisal. La gráfica de Scatchard puede interpretarse como dos poblaciones con distintos rangos de afinidad, uno alto y otro bajo. Y analizando la gráfica semi-logarítmica aparentemente vemos también dos rangos de afinidades (debido a las dos “jorobas”).

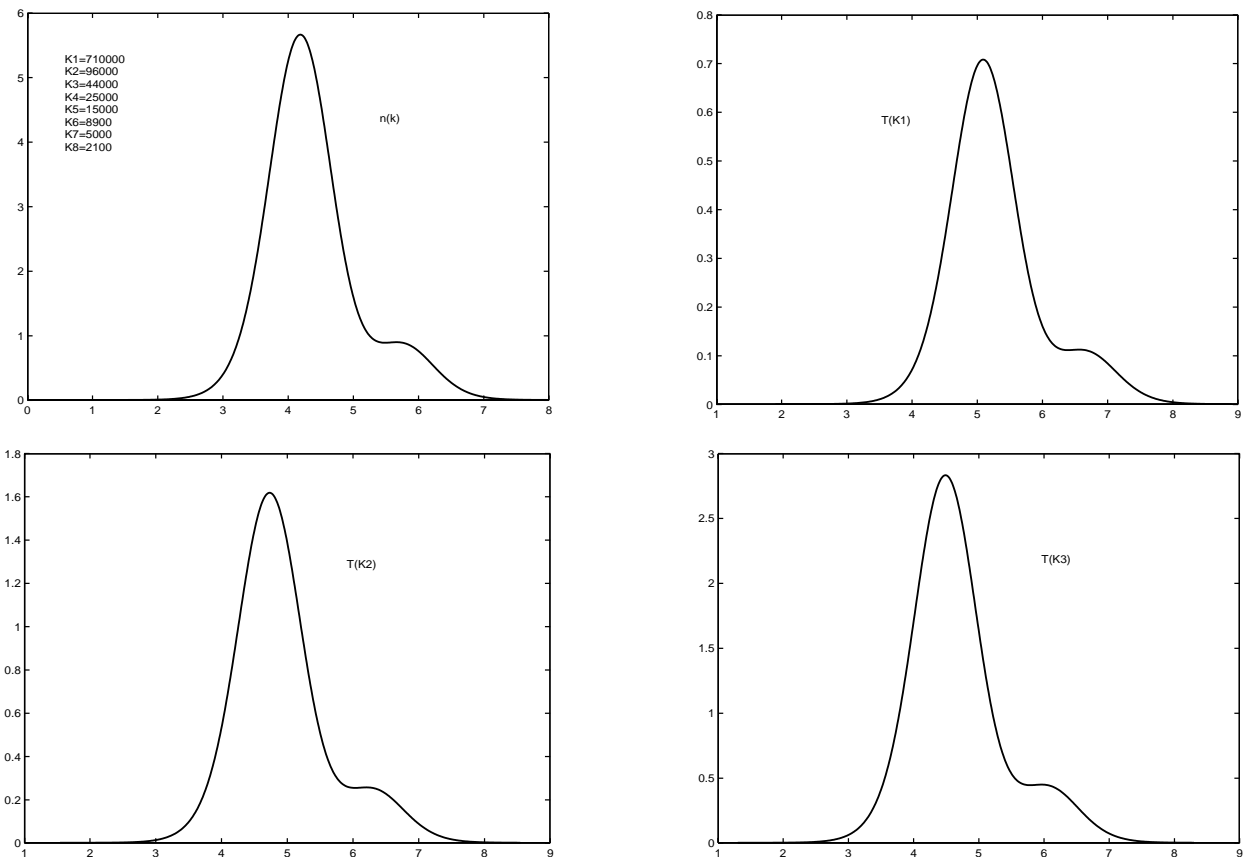
Por otro lado, observando la gráfica del espectro de afinidad, a pesar de tener 15 constantes, vemos 2 rangos de afinidades y podríamos deducir que ambas afinidades tienen aproximadamente la misma recurrencia (la afinidad alta es menos frecuente que la baja).

## Albumin vs. Fenbufen



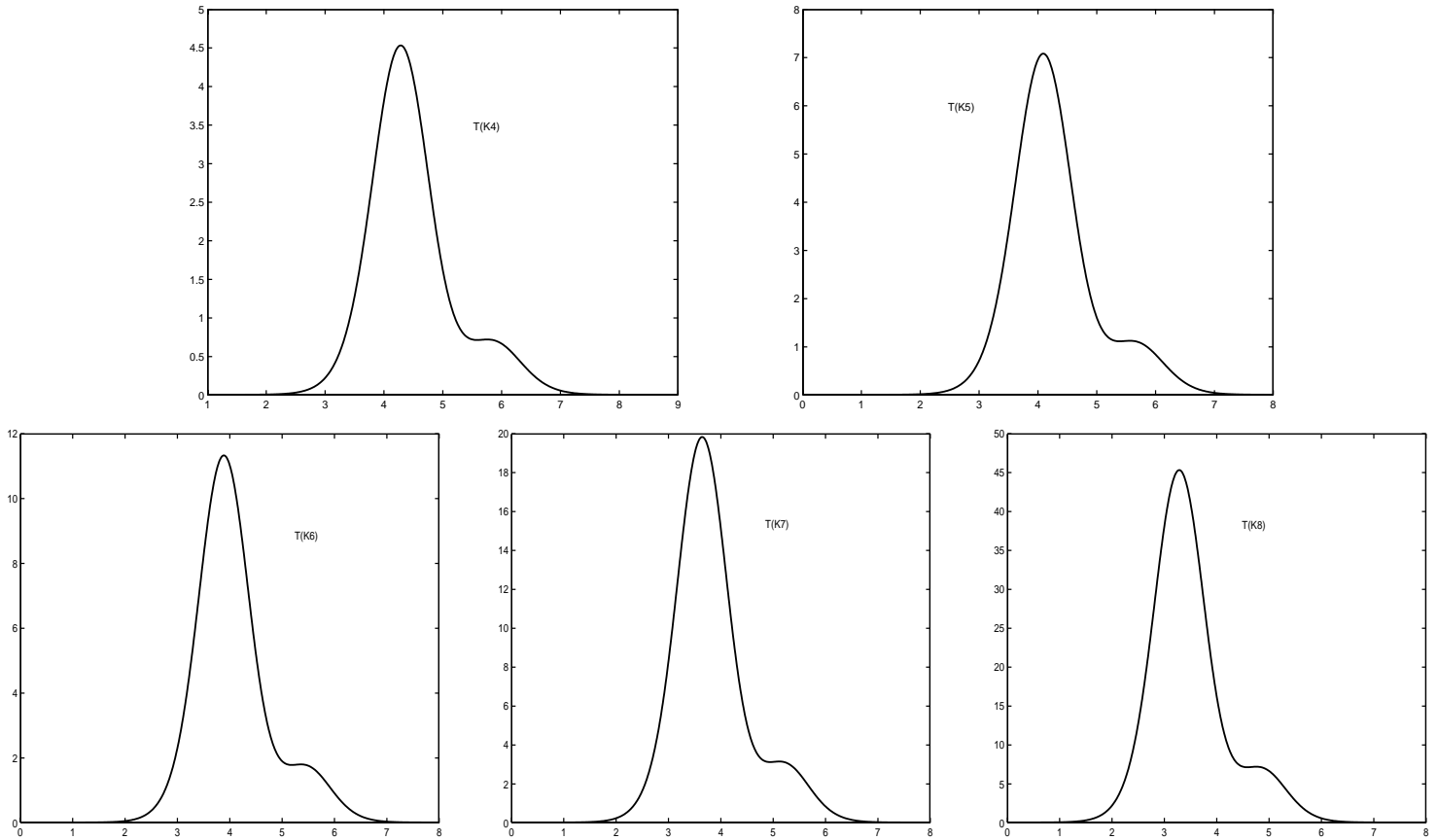
**Fig. 17.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Fenbufen. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales (•), datos teóricos (—).

## Albumin vs. Fenbufen



**Fig. 18.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Fenbufen. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-d) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_3)$  respectivamente.

## Albumin vs. Fenbufen



**Fig. 18. (e-i)** Distribucion de afinidad estequiometrica, de  $T(K_4)$  a  $T(K_8)$  respectivamente.

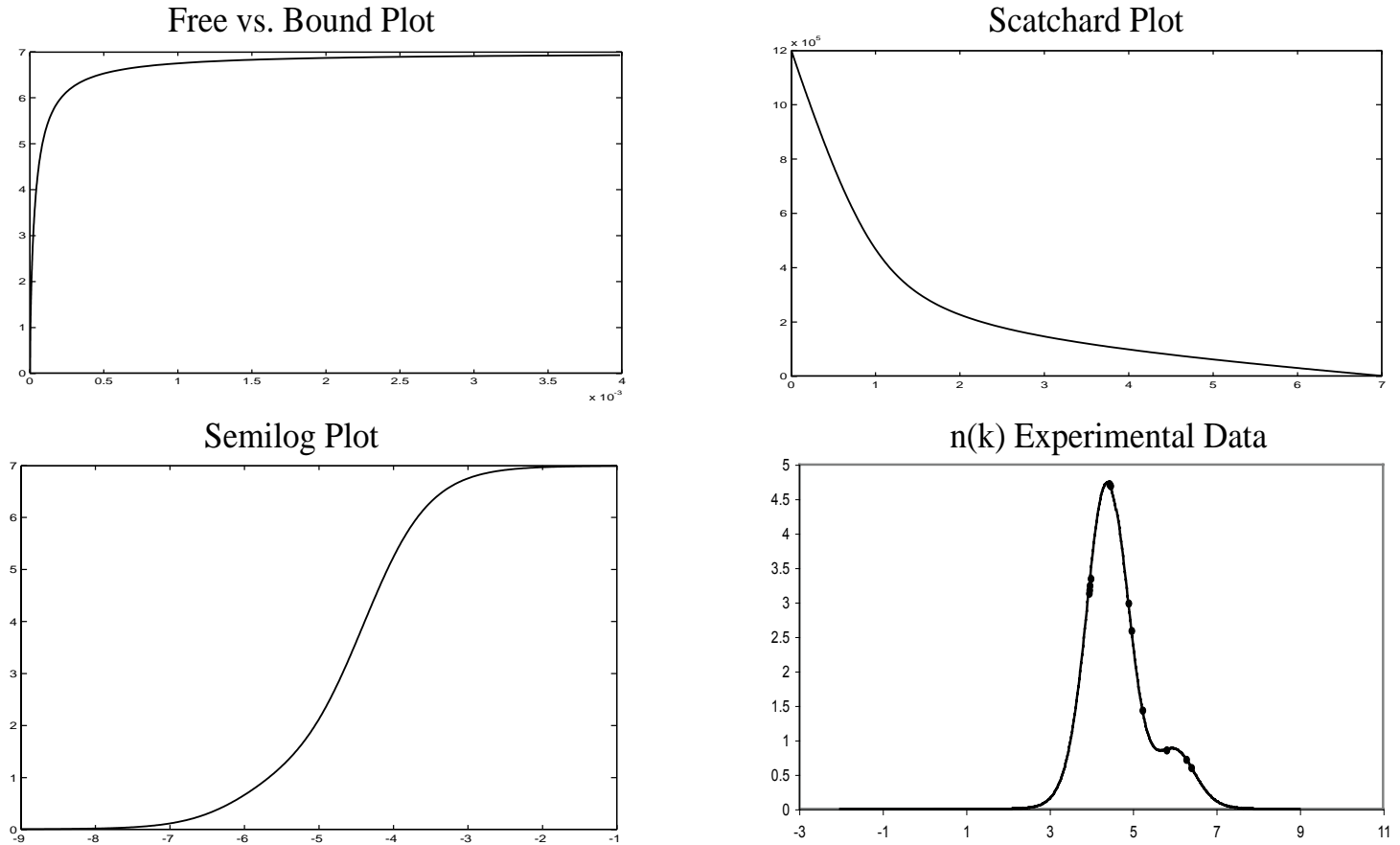
## Albumin vs. Fenbufen

Analizando las primeras tres gráficas (Fig. 17a-c) podemos concluir que el sistema se satura cuando el ligando se une a 8 sitios. Al analizar la gráfica de Scatchard podríamos suponer la existencia de dos poblaciones, una de alta afinidad y otra de baja. Finalmente, observando la gráfica semilog la idea de tener dos poblaciones no es reforzada, sin embargo podemos notar que la curva crece de manera rápida, lo que pudiera significar la existencia de cooperatividad

Analizando la fig. 18a vemos un sistema bimodal con sus modas no independientes. La Fig. 19d también muestra la distribución del espectro de afinidad tomando como base los valores experimentales; podemos notar las dos modas, sin embargo ambas se muestran incompletas.

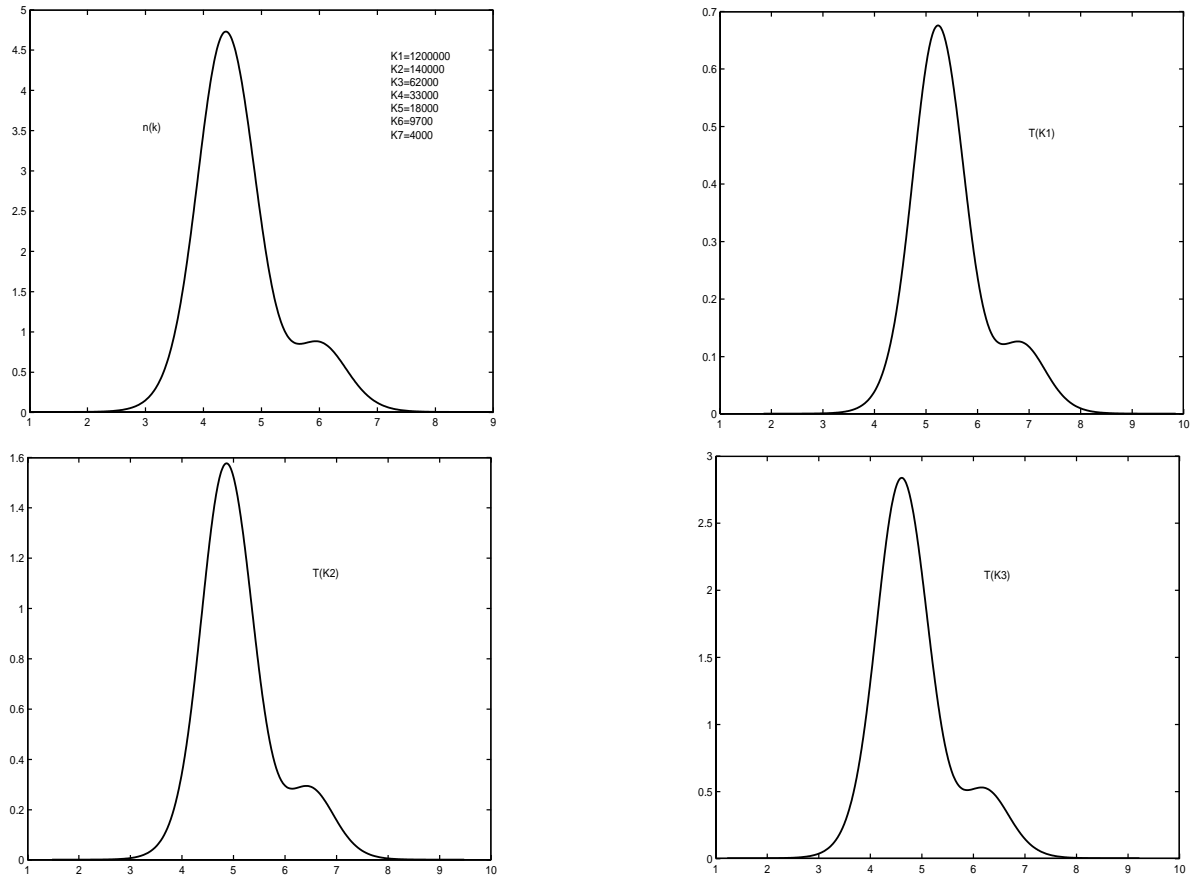


# Albumin vs. Flurbiprofeno



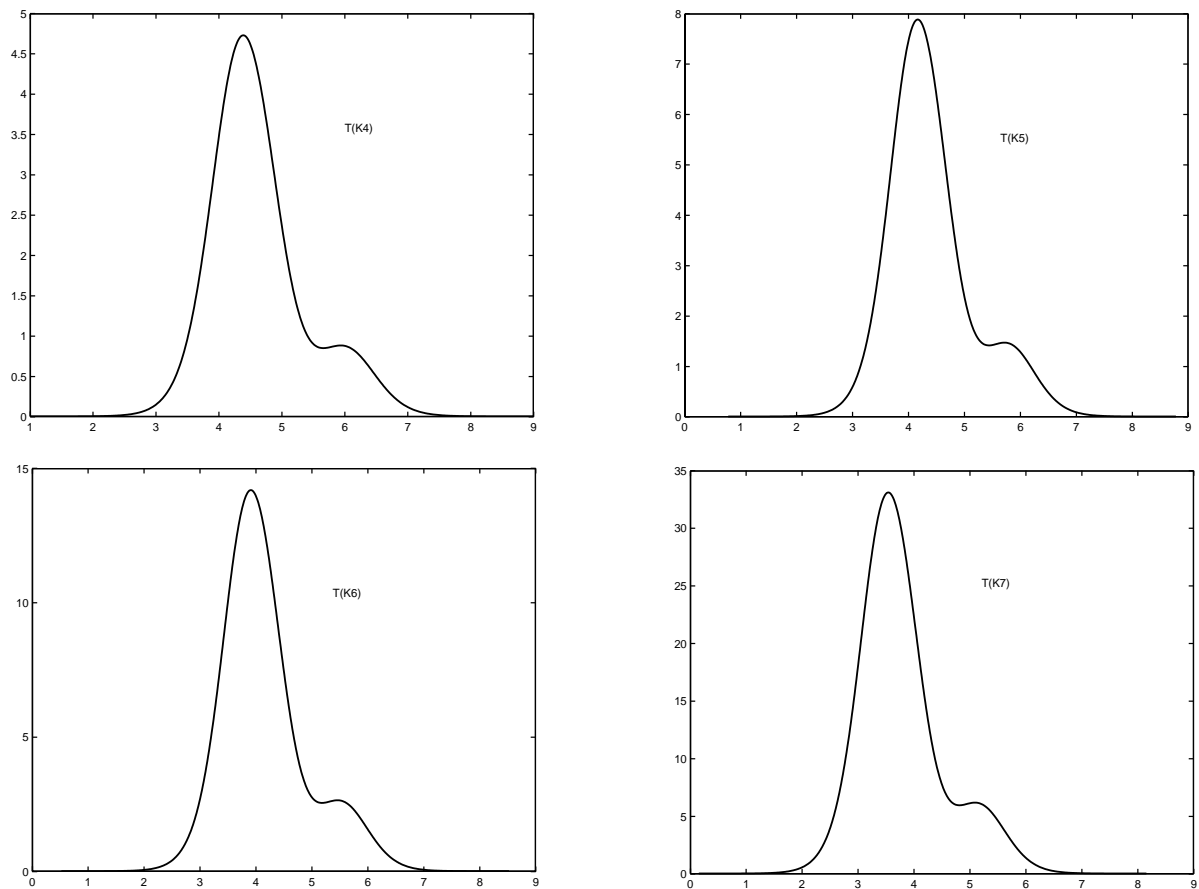
**Fig. 19.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Flurbiprofeno. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales (●), datos teóricos (—).

## Albumin vs. Flurbiprofeno



**Fig. 20.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Flurbiprofeno. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-d) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_3)$  respectivamente.

## Albumin vs. Flurbiprofeno



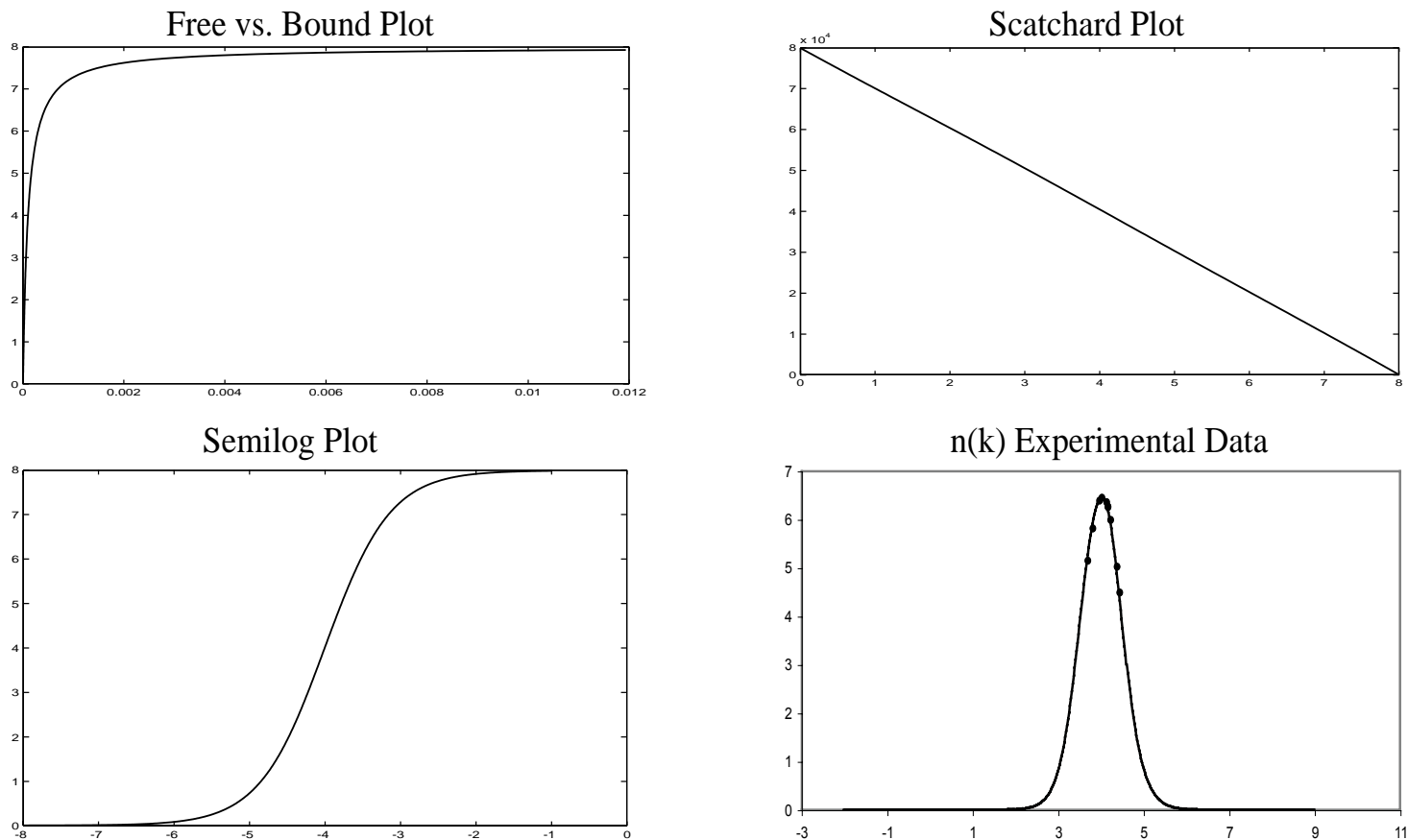
**Fig. 20. (e-h)** Distribucion de afinidad estequiometrica, de  $T(K_4)$  a  $T(K_7)$  respectivamente.

## Albumin vs. Flurbiprofeno

Observando las gráficas 19(a-c) las curvas parecen indicarnos que existen 7 sitios. Observando la gráfica de Scatchard podríamos suponer dos rangos de afinidades, sin embargo en la gráfica semilog difícilmente podríamos notar la existencia de dos rangos.

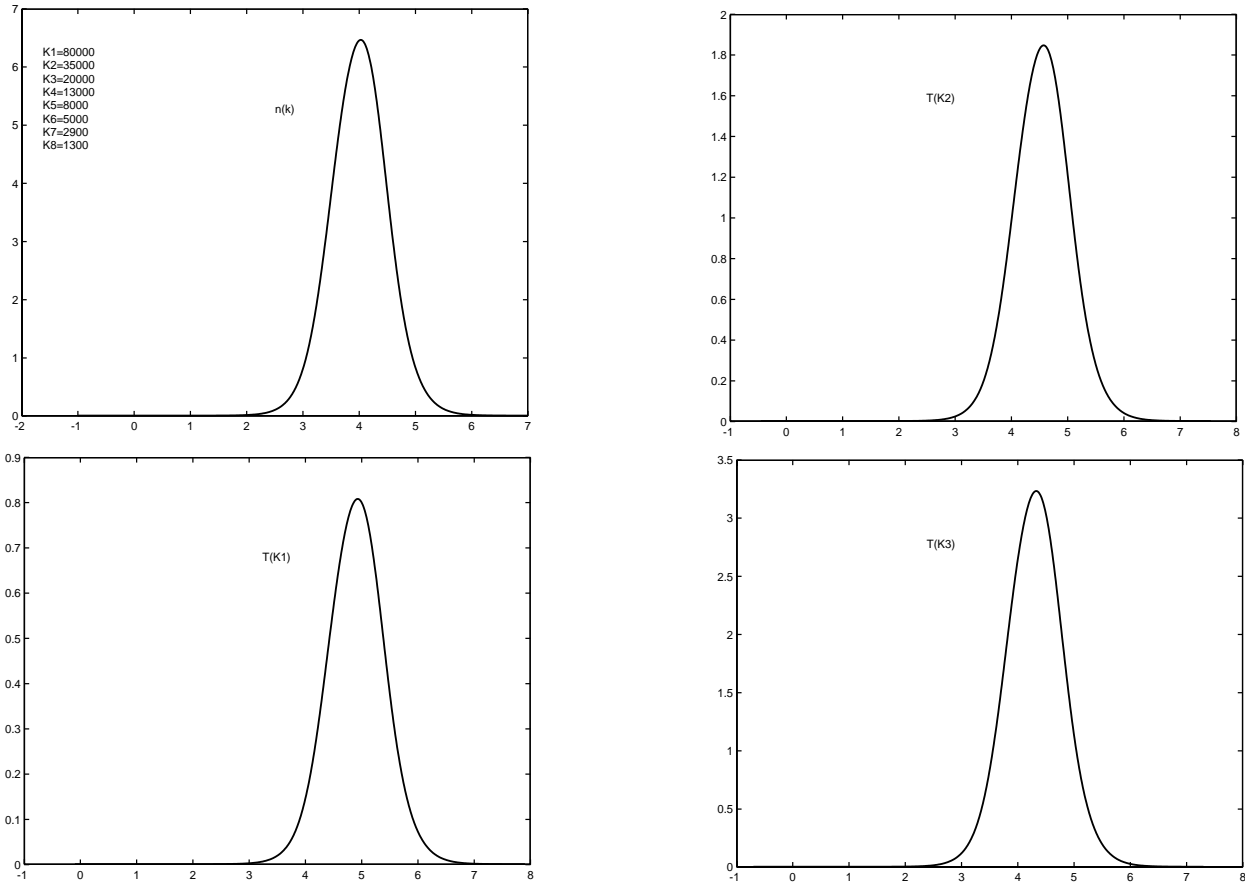
Analizando la fig. 20a vemos un sistema bimodal, las modas no son independientes una de la otra y la moda de menor afinidad predomina, lo que significa que este rango de afinidad se presenta con mayor frecuencia que el otro. Al analizar la fig. 20d, que muestra también esta distribución con los valores gráficos, notamos también la existencia de dos modas que no son independientes y ambas son incompletas, tanto en el inicio como en la parte final.

## Albumin vs. Ibuprofeno



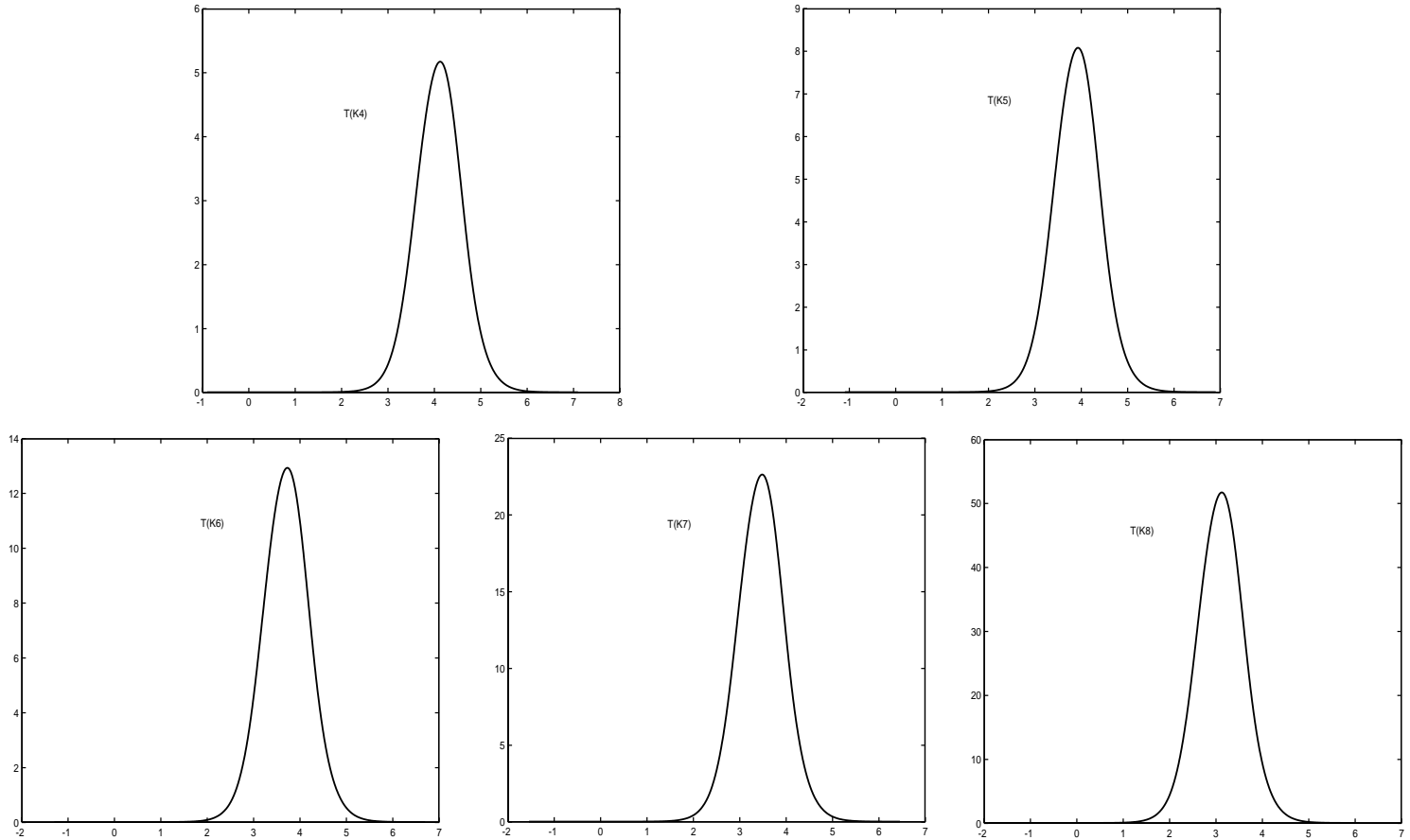
**Fig. 21.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Ibuprofeno. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales ( $\bullet$ ), datos teóricos ( $-$ ).

## Albumin vs. Ibuprofeno



**Fig. 22.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Ibuprofeno (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-d) Distribucion de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_3)$  respectivamente.

## Albumin vs. Ibuprofeno



**Fig. 22. (e-i)** Distribucion de afinidad estequiométrica, de  $T(K_4)$  a  $T(K_8)$  respectivamente.

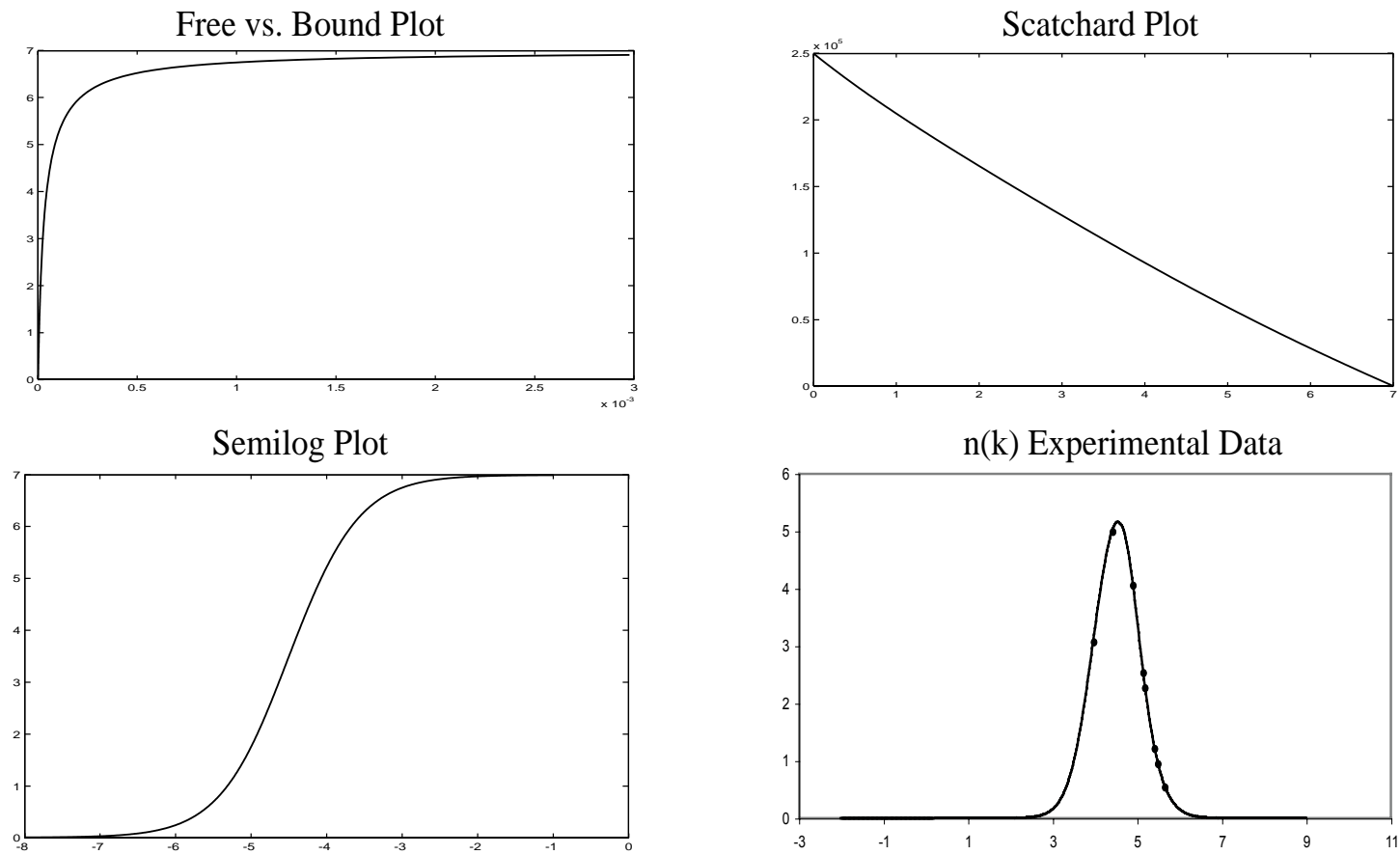
## Albumin vs. Ibuprofeno

Analizando las fig. 21(a-c) podríamos suponer que el sistema se satura cuando 8 sitios son ocupados. Observando la gráfica de Scatchard (fig. 21b) pareciera que el sistema consta de una sola población y pudiéramos pensar que en el sistema existe cooperatividad (ya que la curva parece ser ligeramente cóncava). La gráfica semilog (fig. 21c) no parece darnos mucha información.

Observando la gráfica del espectro de afinidad (Fig. 22a) vemos un sistema con una sola moda, lo que significa la existencia de una sola población. La Fig. 21d también muestra la gráfica del espectro de afinidad, sin embargo toma como base a los valores gráficos obtenidos con DataThief. Analizando esta gráfica notamos solamente una moda y los valores se esparcen sobre la cima de ésta.

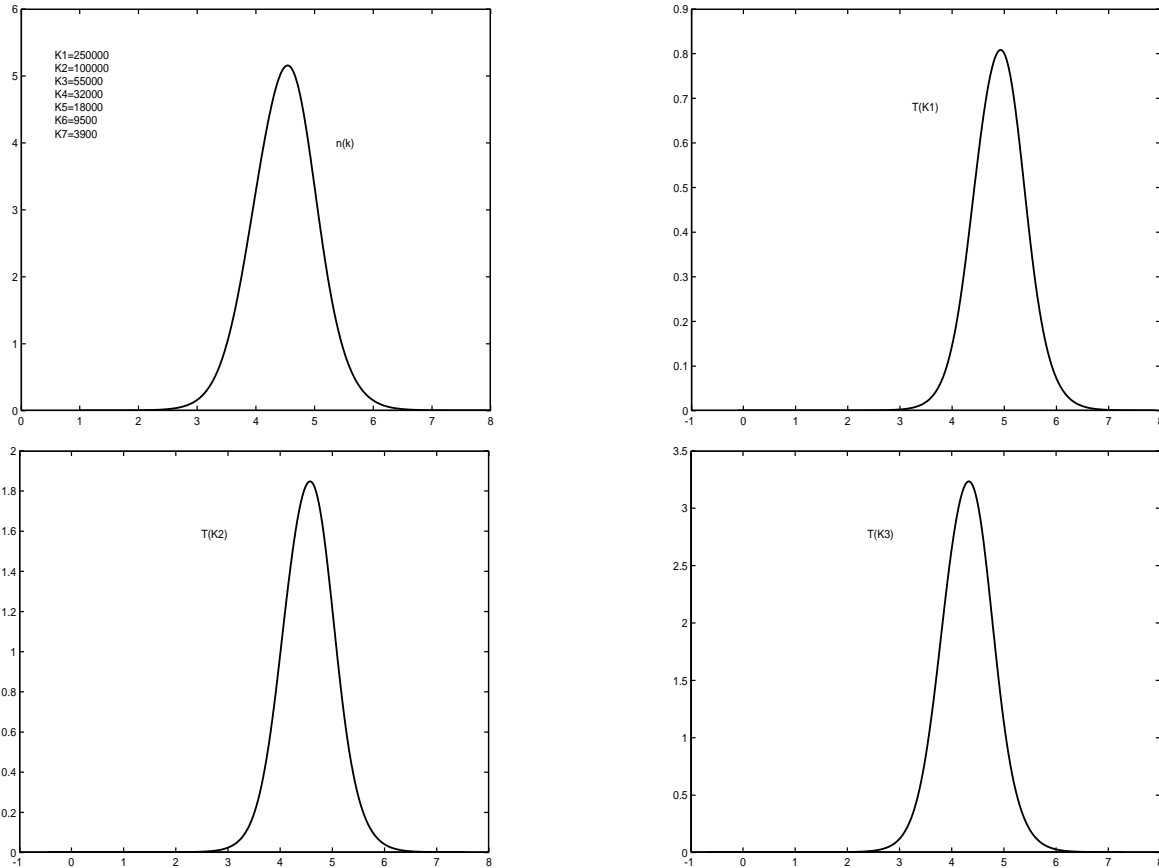


## Albumin vs. Indometacina



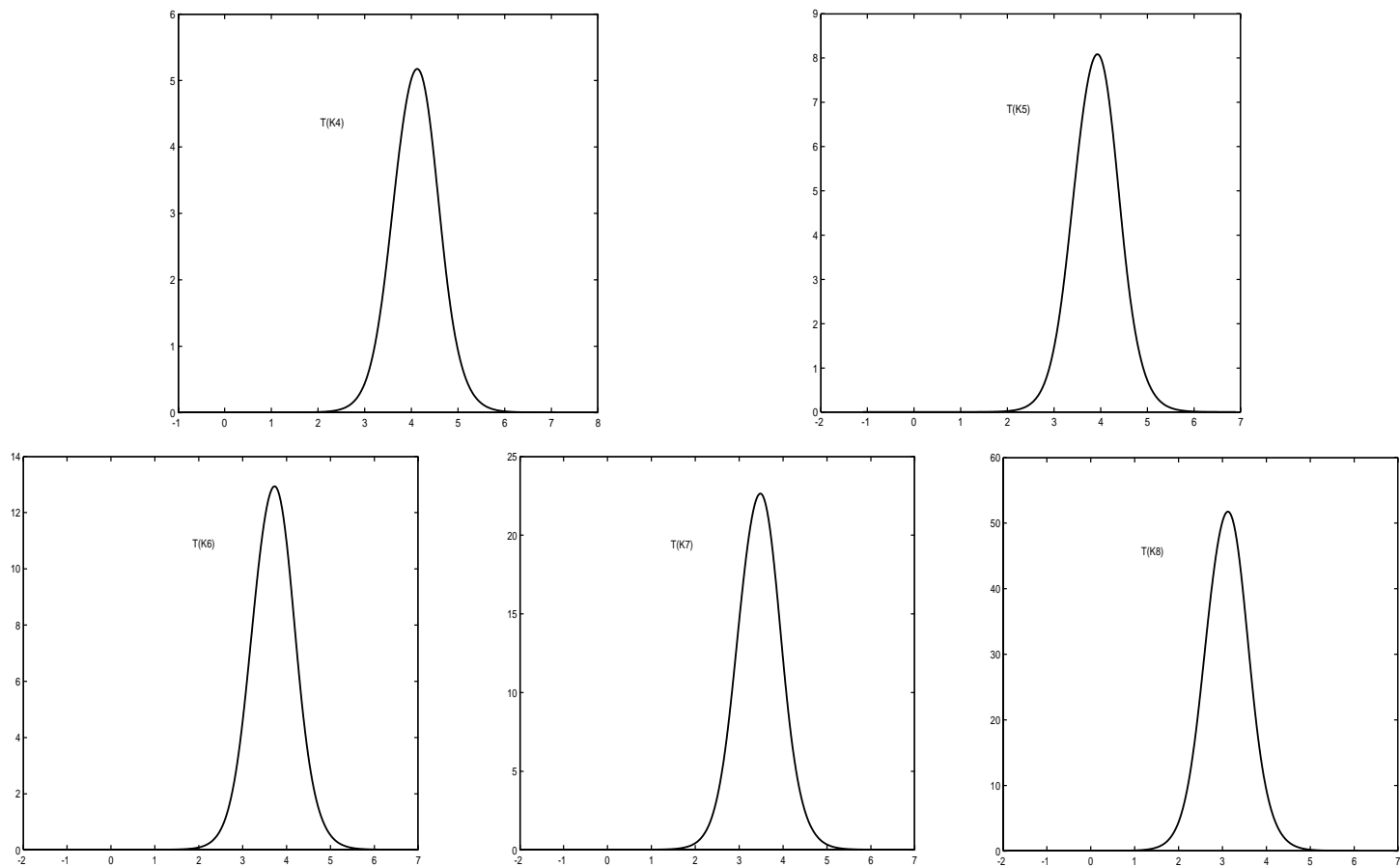
**Fig. 23.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Indometacina. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales (•), datos teóricos (—).

## Albumin vs. Indometacina



**Fig. 24.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Indometacina. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-d) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_3)$  respectivamente.

## Albumin vs. Indometacina



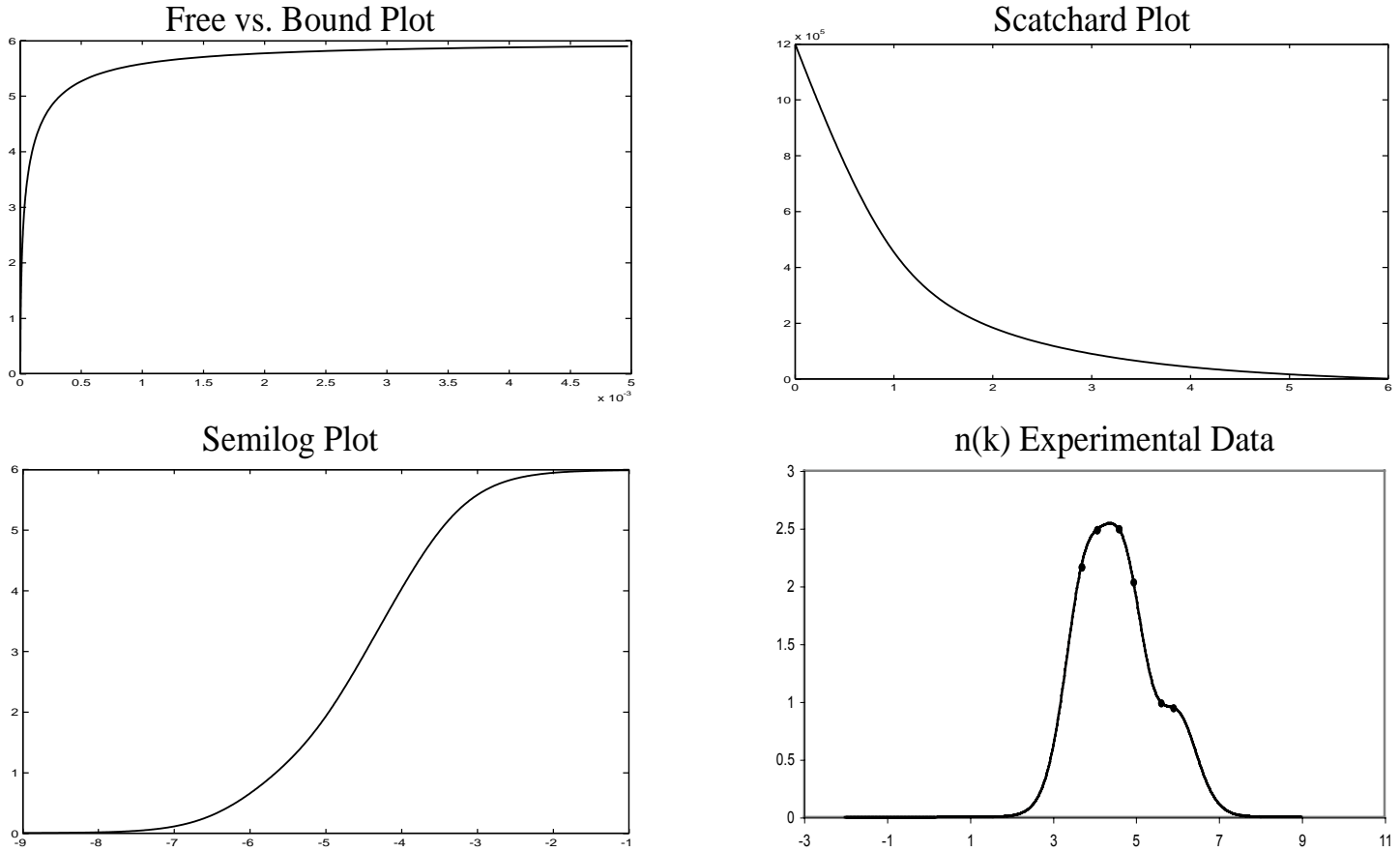
**Fig. 24. (e-i)** Distribucion de afinidad estequiométrica, de  $T(K_4)$  a  $T(K_8)$  respectivamente.

## Albumin vs. Indometacina

Analizando las figuras 23(a-c) podemos concluir que hay 7 sitios. Al analizar las gráficas de Scatchard y semilog (fig. 23b-c) suponemos que el sistema contiene tan solo una población.

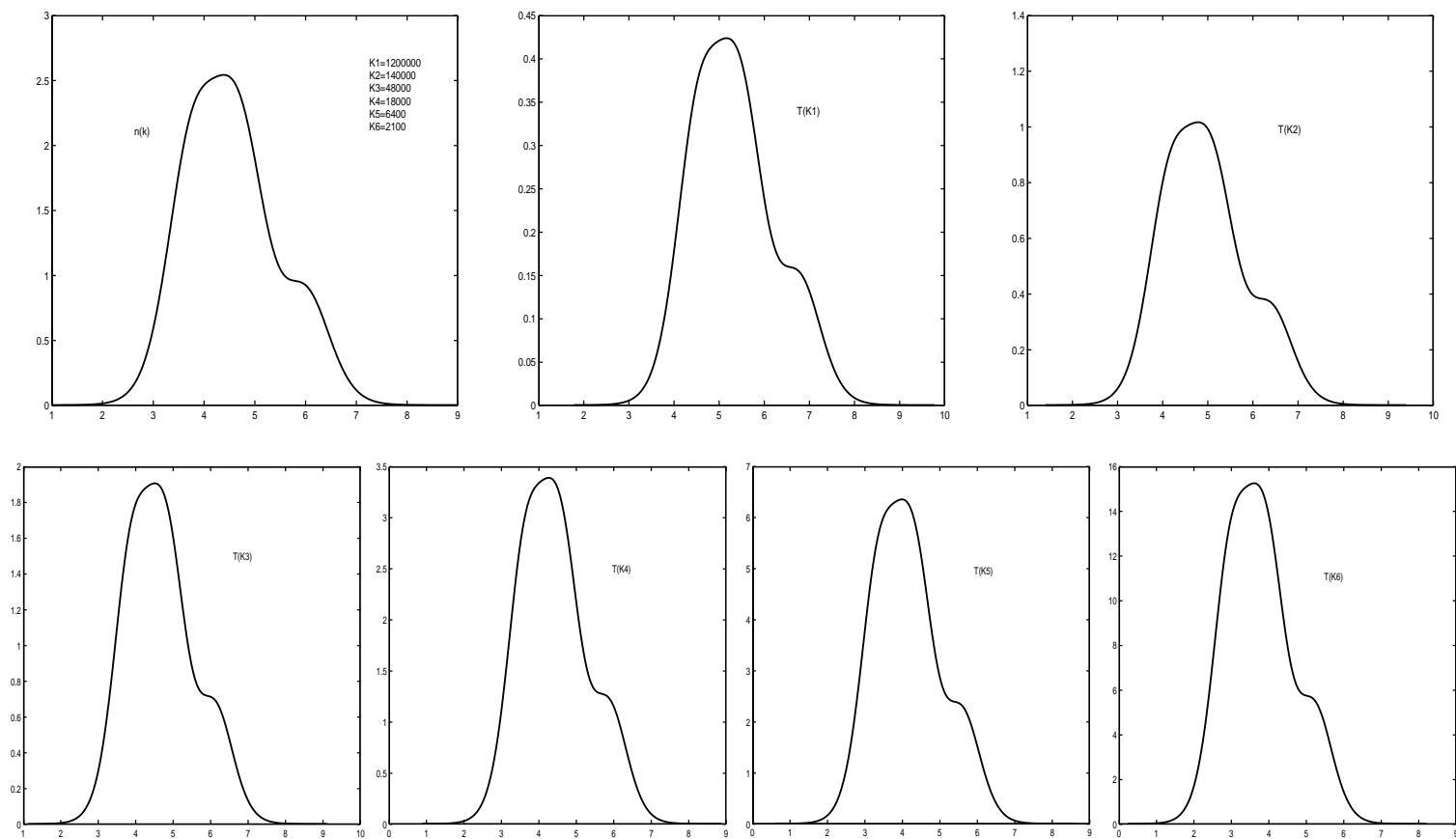
Esta idea es reforzada al analizar la fig. 24a ya que la distribución presenta solamente una moda. La Fig. 23d también muestra la gráfica del espectro de afinidad en base a los datos extraídos de los valores experimentales; éstos se distribuyen a lo largo de la moda, sin embargo, la moda no está completa.

## Albumin vs. Naproxeno



**Fig. 25.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Naproxeno. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales ( $\bullet$ ), datos teóricos (—).

## Albumin vs. Naproxeno



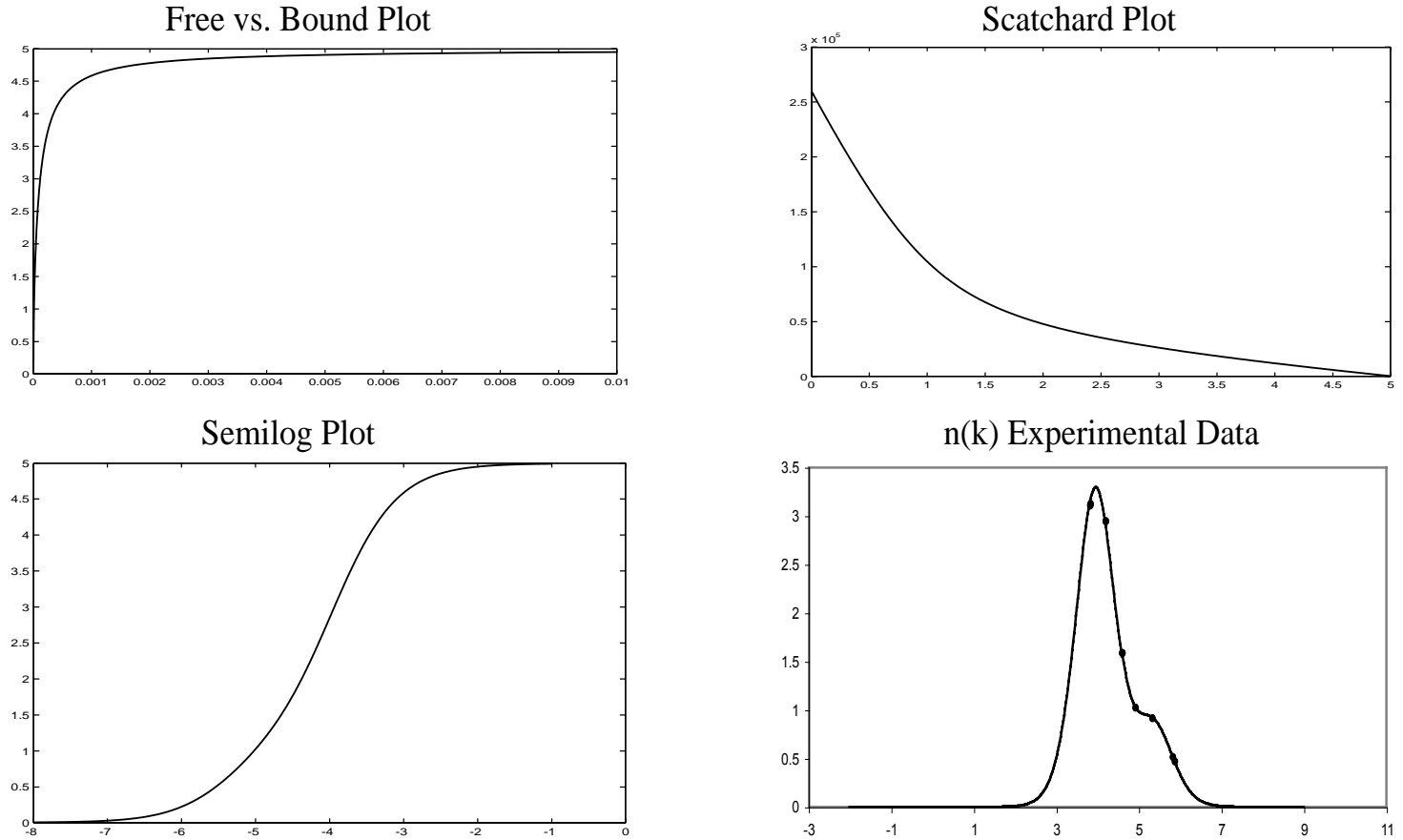
**Fig. 26.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Naproxeno. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-g) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_6)$  respectivamente.

## Albumin vs. Naproxeno

Observando las fig. 25(a-c) notamos que el sistema tiene 6 sitios. Analizando la curva en la gráfica de Scatchard ésta pareciera indicarnos que existen dos poblaciones; y al analizar la gráfica semilog no notamos la existencia de dos poblaciones, pero pareciera que el sistema presenta interacciones negativas (debido a que la sigmoide parece estar muy acostada).

Analizando la fig. 26a vemos un sistema bimodal donde las modas no son independientes. Pudiéramos concluir también que los dos rangos de afinidades no son muy distintos uno del otro, sin embargo uno se presenta en mayor concentración que el otro. En la fig. 25d vemos el mismo resultado basado en los valores gráficos; analizando esta gráfica podemos notar las dos modas sin embargo ambas están incompletas.

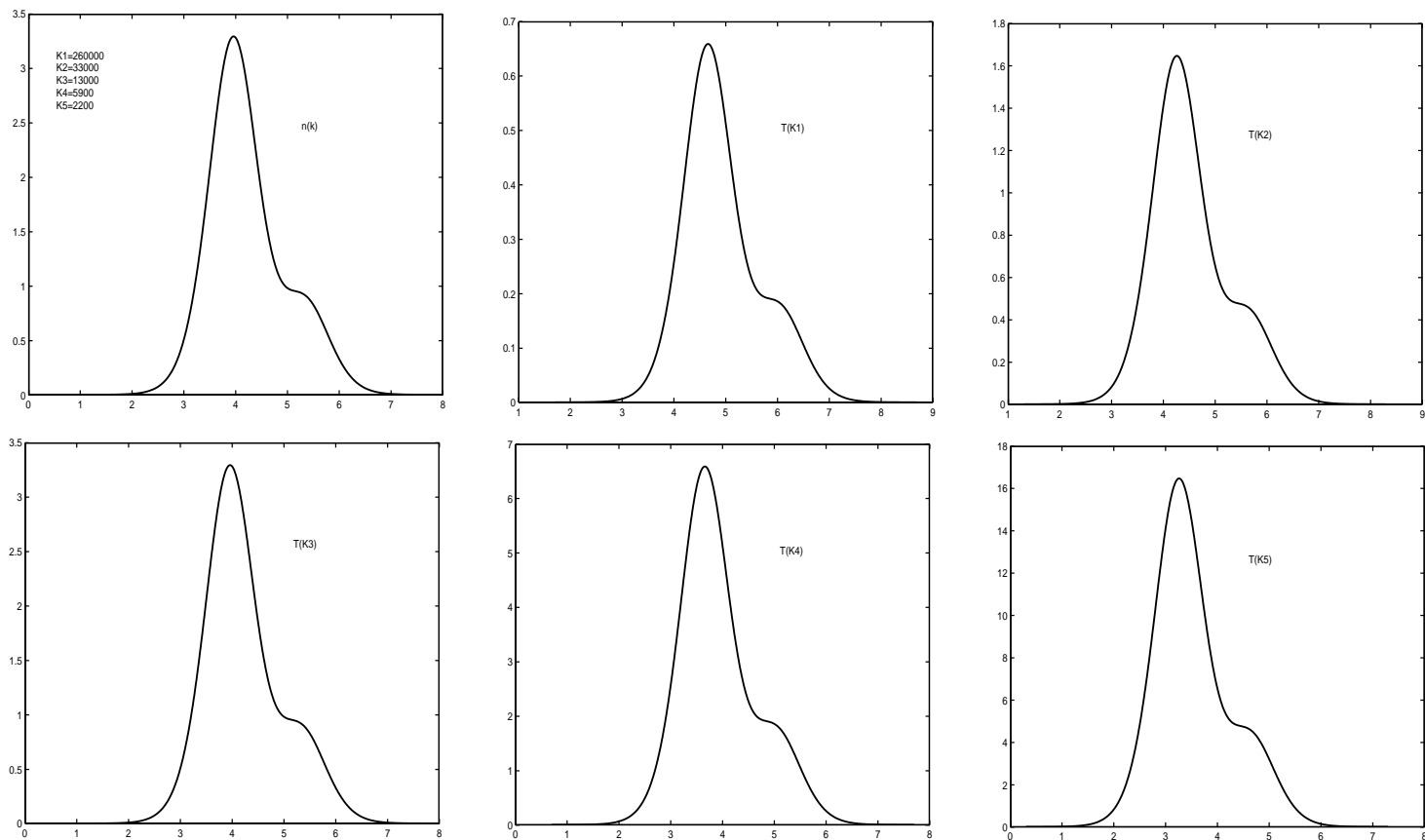
## Albumin vs. Fenilbutazona



**Fig. 27.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Fenilbutazona. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales (●), datos teóricos (—).



## Albumin vs. Fenilbutazona



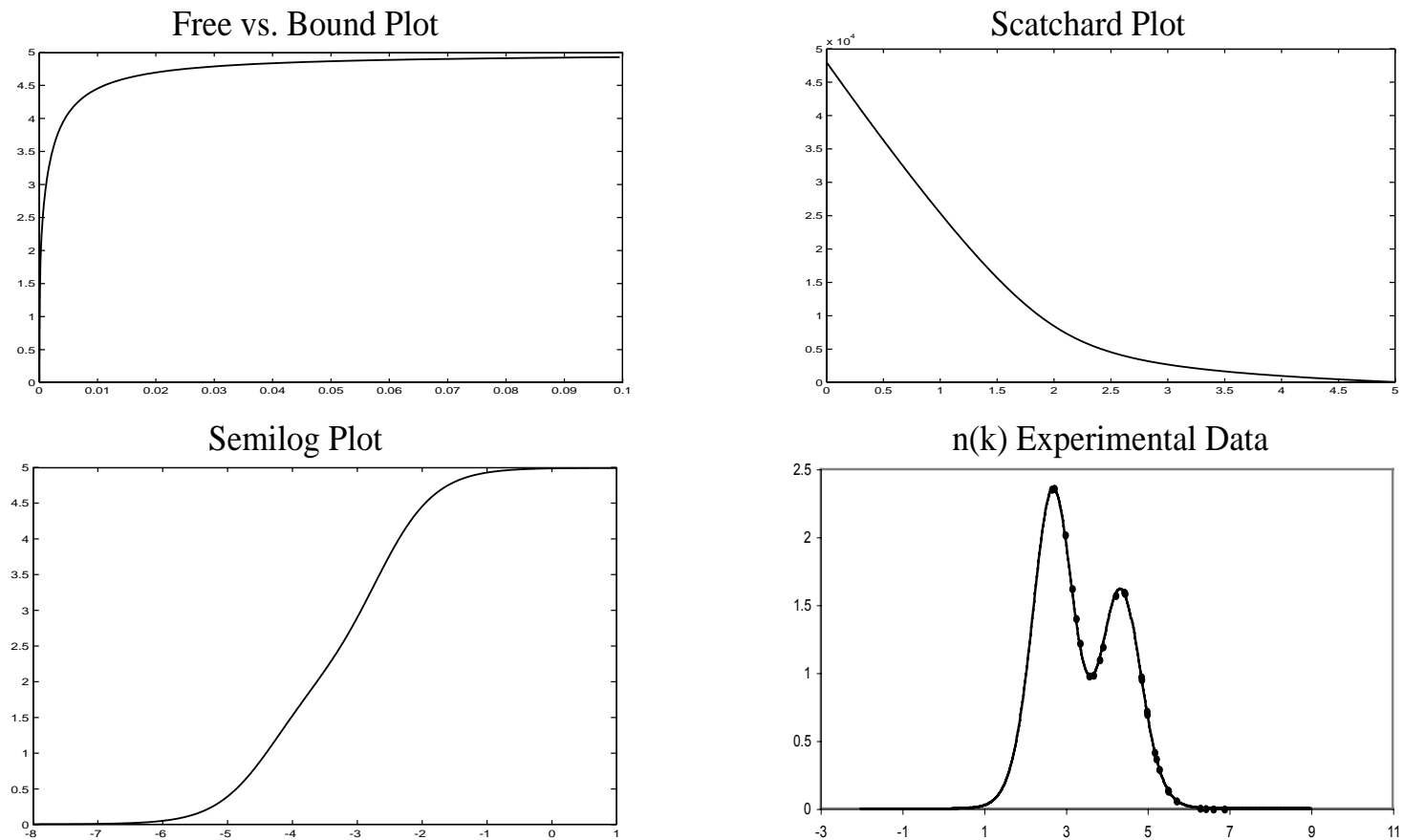
**Fig. 28.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Fenilbutazona. (a) Distribución de afinidad de sitio. (b-f) Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_5)$  respectivamente.

## Albumin vs. Fenilbutazona

Analizando las figuras 27(a-c) podemos suponer que existen 5 sitios a los que el ligando se une. Observando la gráfica de Scatchard (fig. 27b) podríamos suponer la existencia de dos rangos de afinidad y la gráfica semilogarítmica no parece darnos mucha información.

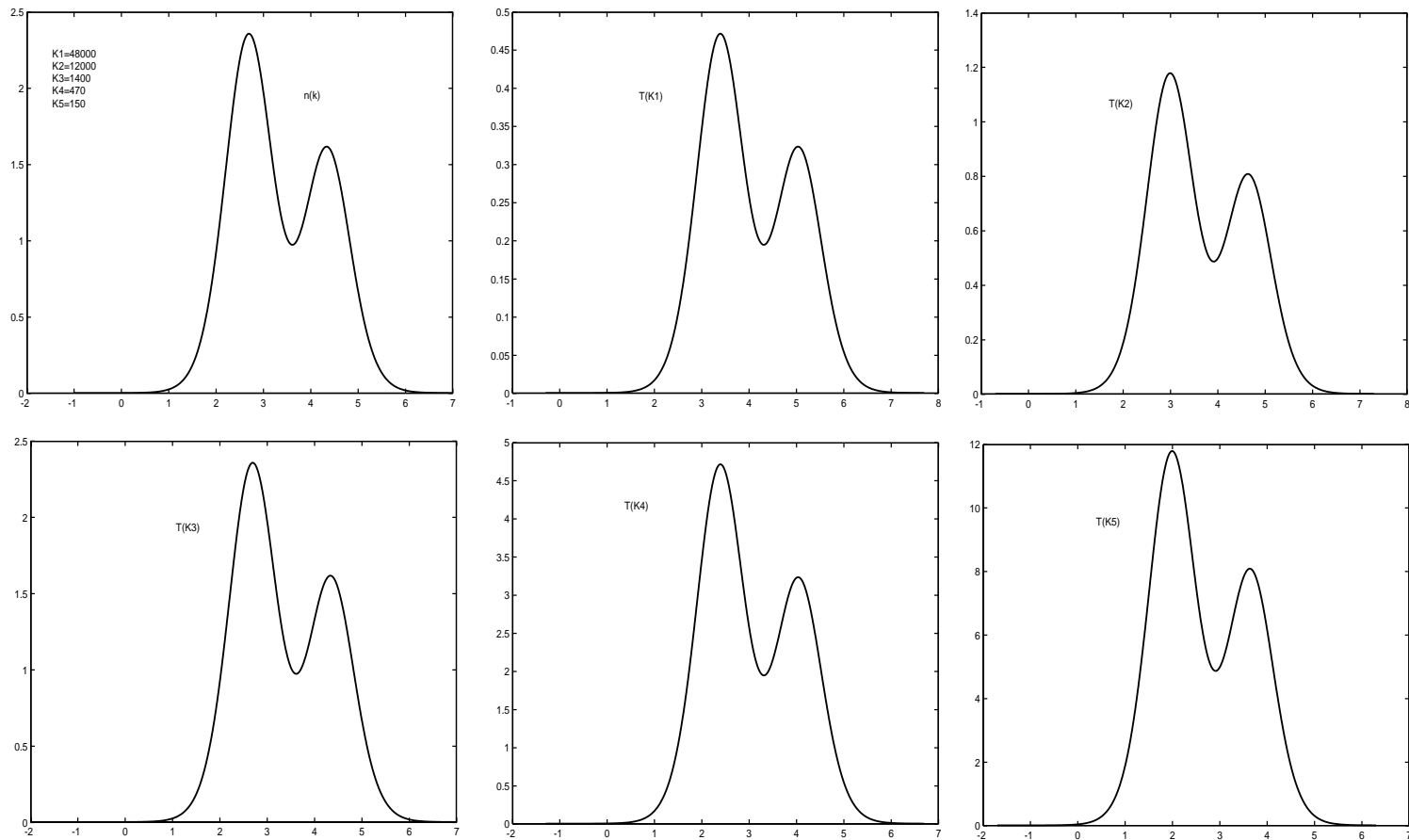
Observando la fig. 28a vemos un sistema bimodal, las modas no son independientes y la segunda moda contiene más concentración que la otra. Analizando la SAD con los valores experimentales (fig. 27d), las dos modas alcanzan a diferenciarse, pero ninguna está completa.

## Albumin vs. Salicilato



**Fig. 29.** Curvas representativas de la unión de Albumina y el ligando Salicilato. **(a):** Grafica de pegado vs. libre. **(b):** Grafica de Scatchard. **(c):** Grafica semilogarítmica. **(d)** Distribución de afinidad de sitio; datos experimentales (•), datos teóricos (-).

## Albumin vs. Salicilato



**Fig. 30.** sad y SADs de la unión de Albumina y el ligando Salicilato. **(a)** Distribución de afinidad de sitio. **(b-f)** Distribución de afinidad estequiométrica, de  $T(K_1)$  a  $T(K_5)$  respectivamente.

## Albumin vs. Salicilato

Analizando las figuras 29(a-c) notamos un sistema de 5 sitios. Al analizar la gráfica de Scatchard (fig. 29b) y la gráfica semilog (fig. 29c) podríamos suponer que el sistema consta de dos poblaciones.

Analizando la  $\text{sat}$  (fig. 30a) para este sistema vemos dos modas, cada una con distinta concentración y también observamos que la primera moda no es independiente de la segunda. Analizando la fig. 29d, notamos las dos modas y, a diferencia de los sistemas anteriores, la primer moda se nota completa (desde el principio), sin embargo la última también está incompleta.

# **VI**

## **CONCLUSIONES**

Utilizando las ecuaciones 2.9 y 2.17 se obtuvieron la *sad* y la *SAD* de la unión de algunos iones y medicamentos NSAID a la albumina para obtener más información y poder conocer mejor a esta molécula.

Es evidente que la *sad* aporta mucha más información sobre el sistema que se está analizando, a diferencia de las gráficas de Scatchard, Klotz y Semilogarítmica las cuales nos ayudan a encontrar, principalmente, el número de sitios activos que tiene la molécula y, en ocasiones, la presencia de interacciones (sobre todo la gráfica Semilog). Sin embargo, en cuanto se analiza la *sad*, podemos deducir mucha más información, como el número exacto de poblaciones, si éstas son disjuntas o no, o la frecuencia de cada población.

Toda esta información se traduce en cambios conformacionales que sufre la molécula. En nuestro caso, que analizamos a la Albúmina, podemos concluir que ésta es una molécula versátil ya que se comporta de cierta manera ante una familia de ligandos y de una manera muy distinta ante otra familia: las distribuciones de afinidad de sitio (*sad*) de la albumina vs. los iones son muy diferentes a aquellas en las que se liga a los medicamentos.

Observamos como, ante los iones, los cambios conformacionales que sufre la macromolécula son diversos y en algunos casos son también drásticos (se nota ya que las modas entre cada afinidad son independientes). Esto quiere decir que, mientras los sitios activos de la albúmina van siendo ocupados, ésta cambia drásticamente su estructura (esto depende del ligando con el que esté interactuando).

Para los tres iones que analizamos, el comportamiento de la albúmina difiere entre cada sistema, sin embargo en los tres casos notamos muchas modas, distintas poblaciones y solamente al unirse al Laurato no vemos modas independientes. También notamos que para el Octanoato y el Hexanoato existen interacciones tanto positivas como negativas.

En cambio, al analizar las gráficas de la albúmina unida a los medicamentos, vemos que la macromolécula se comporta muy parecida en todos los casos, es decir, sus cambios conformacionales parecieran ser muy similares sin

importar a quién se esté uniendo: en todos los casos vemos entre una y dos modas no disjuntas. Solamente al unirse al Naproxeno notamos un comportamiento muy diferente: 4 ó 5 modas disjuntas, lo que significa que en este caso seguramente existe cooperatividad y/o interacciones negativas; cuando analizamos la gráfica Semilogarítmica notamos que existen los dos tipos de interacciones.

Después de analizar todos los resultados obtenidos podemos concluir que el modelo de las ecuaciones 2.9 y 2.17 nos ayuda a dilucidar los cambios conformacionales que sufre la Albúmina al unirse a diferentes ligandos. Saber exactamente qué sucede en la molécula o por qué la relación o las diferencias del comportamiento entre cada grupo de ligandos no es parte de este trabajo, sin embargo la información aquí obtenida puede ser de gran ayuda para obtener estas respuestas.



# **BIBLIOGRAFIA**

1. Klotz, Irving M. *Ligand-Receptor Energetics, A guide for the Perplexed*. Wiley-Interscience Publication.
2. Et. Al. Drug-Receptor Thermodynamics, Introduction and Applications. John Wiley & Sons, Ltd.
3. José V. Marco, José V Jorge. *Probability Distributions of Thermodynamic Affinities for Heterogeneous Receptor Populations*. J. Theor. Biol 190 (1998) 85-92.
4. del Mar Hernández, María; José, Marco V. *Positive cooperativity induces multimodal site and thermodynamic affinity distributions in multivalent proteins*. Analytical Biochemistry 313 (2003) 226-233.
5. Hunston, Donald L. *Two Techniques for Evaluation Small Molecule-Macromolecule Binding in Complex System*. Analytical Biochemistry 63 (1975) 99-109.
6. Thakur, A., Meter M., Nunston D., Rodbard, D. *Characterization of Ligand-Binding Systems by Continuous Affinity Distributions of Arbitrary Shape*. Analytical Biochemistry 103 (1980) 240-254.
7. Honoré, Bent; Brodersen, Rolf. *Albumin Binding of Anti-Inflammatory Drugs, Utility of a Site-Oriented versus a Stoichiometric Analysis*. Molecular Pharmacology 25. 137-150.
8. Kragh-Hansen, U., Chiang, V., Otagiri, M. *Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin*. Biol. Pharm. Bull. 25(6) (2002) 695-704.
9. Krag-Hansen U., Pedersen, A., Galliano, M., Et. Al. *High-affinity binding of laurate to naturally occurring mutants of human serum albumin and proalbumin*. Biochem. J. 320 (1996) 911-916.
10. Flower, R. *Non-steroidal anti-inflammatory drugs: back to the future*. Department of Biochemical Pharmacology, The Medical College of St. Bartholomew's Hospital.
11. Nelson, David; Cox, Michael; *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th Edition. Ed. W. H. Freeman and Company.
12. Alberts, B; Jonson, A; Lewis, J; et. al. *Molecular Biology of The Cell*. 4th Edition. Ed. Garland Science.
13. Everything Bio. <http://www.everythingbio.com/index.php>
14. General Chemistry. <http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/index.shtml>

15. *pH Paradoxes: Demonstrating That It Is Not True That  $pH \equiv -\log[H^+]$*   
Christopher G. McCarty and Ed Vitz *Journal of Chemical Education* Vol. 83  
752 2006

# **APENDICE I**

## **UNION RECEPTOR-LIGANDO**

## A1.1 CONSTANTES DE AFINIDAD

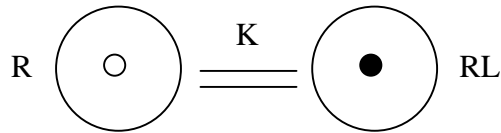
La afinidad es la fuerza de interacción que dos moléculas manifiestan mientras se mantienen parcialmente unidas o, dicho de otra manera, es la fuerza de atracción que se produce entre dos moléculas, una unida específicamente a otra. La constante de afinidad, que muestra qué tan fuerte o qué tan débil el ligando se une a su receptor, es representada por la letra  $K$  o  $k$ , que son la constante termodinámica o estequiométrica y la constante probabilística, respectivamente.

El principal factor que influye en las constantes de afinidad probabilísticas es la aleatoriedad. Cuando el receptor está libre, es decir, aún no se le ha pegado ningún ligando, la probabilidad de que éste se pegue en algún sitio activo es de  $1/n$  donde  $n$  es el número de sitios activos que tiene el receptor. En cuanto se pega el primer ligando, la probabilidad para que los siguientes sitios sean ocupados es mayor ( $1/(n-1)$ ) y así sucesivamente. Es por esto que existe una constante de afinidad probabilística para cada sitio que tiene el receptor. Las fuerzas de atracción o tipos de enlaces (si la unión está compuesta por puentes de hidrógeno, o si son enlaces iónicos, etc), también son factores que influyen para determinar estas constantes.

Al contrario, las constantes estequiométricas, son aquellas que solo toman en cuenta la unión del ligando al receptor, sin importar el sitio que haya sido ocupado, las probabilidades, las fuerzas de atracción, etc.

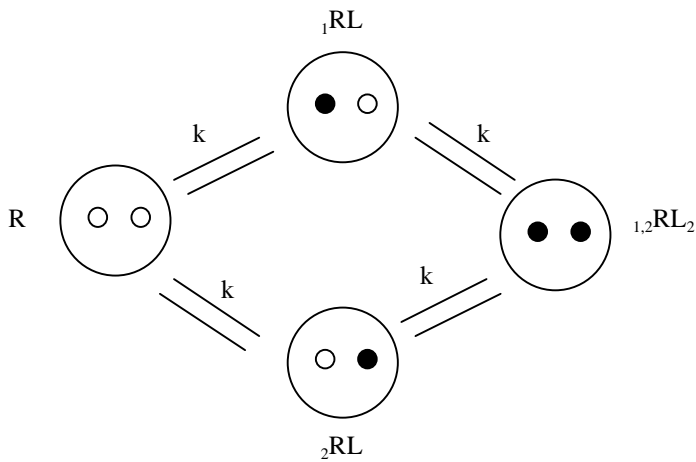
### A1.1.1 RECEPTORES CON SITIOS IDÉNTICOS E INDEPENDIENTES

Para los receptores **univalentes** es claro que solo existe una constante de afinidad (Fig. A1.1)



**Fig. A1.1** Receptor univalente.

Lo mismo sucede para los receptores multivalentes con sitios idénticos e independientes, la molécula tiene varios sitios activos, pero todos con la misma afinidad.



**Fig. A1.2** Receptor bivalente con sitios idénticos.  ${}_1RL$  representa al receptor con el ligando en el primer sitio ocupado;  ${}_2RL$  es el receptor con el segundo sitio ocupado;  ${}_{1,2}RL_2$  el ligando con ambos sitios ocupados.

### A1.1.2 RECEPTORES MULTIVALENTES CON SITIOS NO IDENTICOS E INDEPENDIENTES.

La Fig. A1.3 nos muestra el caso de una molécula con dos sitios activos no idénticos e independientes.  $k_1$  es la constante de afinidad que le corresponde al hecho en el que el primer sitio de la molécula es ocupado;  $k_2$  corresponde al segundo sitio. Como la figura lo enseña, la afinidad solo depende de las fuerzas necesarias para mantener unidas a las moléculas, la probabilidad no influye, es decir, no importa si el primer sitio es el primero en ser ocupado o no ya que, en este caso, los sitios son independientes (no existen interacciones).

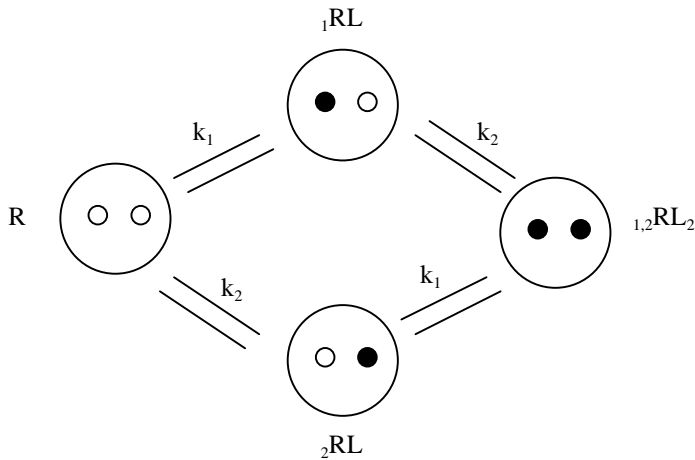


Fig. A1.3 Receptor bivalente con sitios no idénticos e independientes.

Para las constantes estequiométricas tenemos lo siguiente:

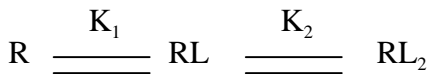
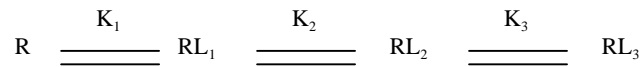


Fig. A1.4 Receptor bivalente con sitios independientes.

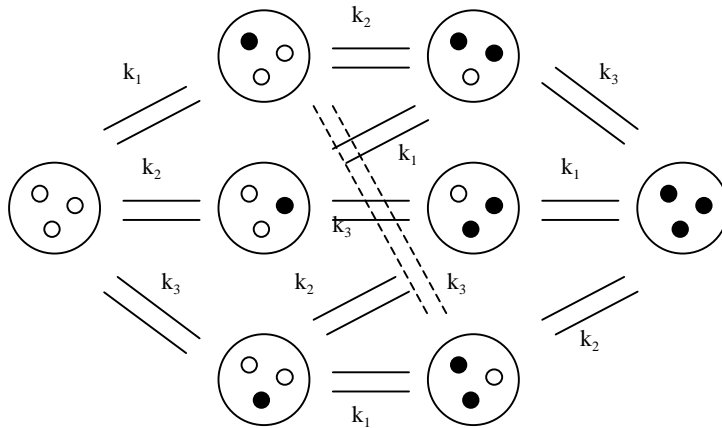
Sin importar qué sitio se ocupe primero tendremos dos constantes, cada una equivalente al paso de unión correspondiente:  $K_1$  para el primer paso y  $K_2$  para el segundo.

De la misma manera se puede considerar para una molécula con tres sitios activos.

a)



b)



**Fig. A1.5** Receptor trivalente con sitios no idénticos e independientes.

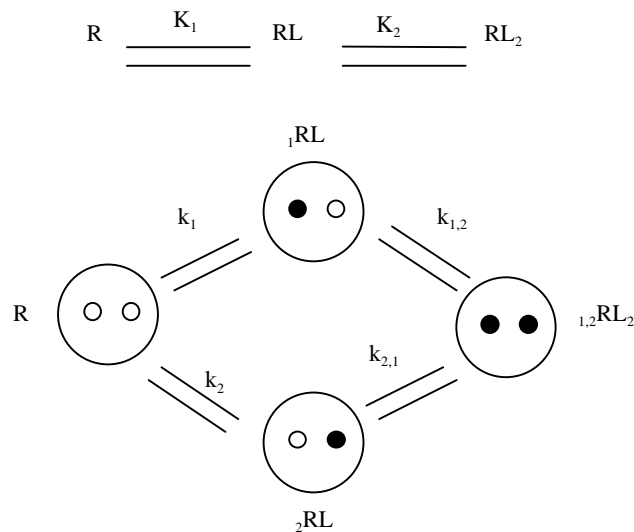
a) Representación estequiométrica. b) Representación probabilística.



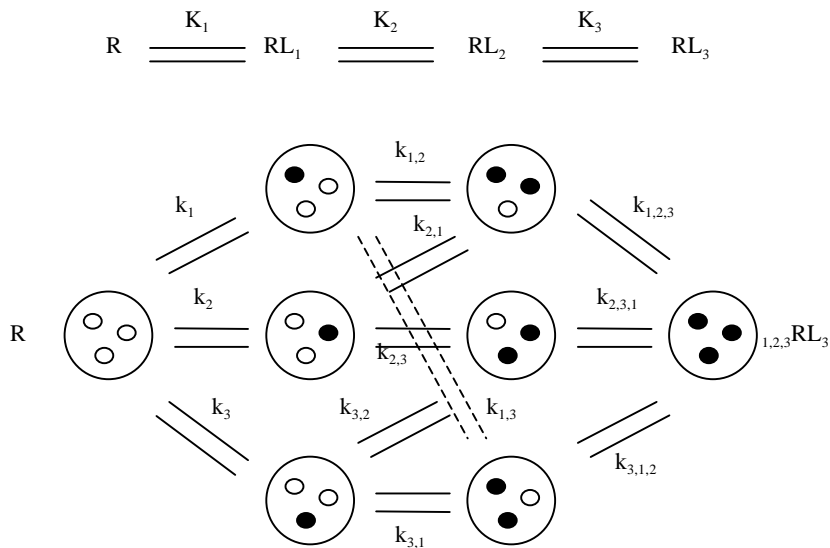
### A1.1.3 RECEPTORES CON SITIOS NO IDÉNTICOS Y NO INDEPENDIENTES (SITIOS INTERACTIVOS)

Por interactividad entendemos la capacidad que tiene un receptor para que, al momento de unirse uno de los ligandos, el receptor modifique su comportamiento e influya, ya sea positiva o negativamente, en la unión de los siguientes ligandos. Las interacciones positivas son aquellas que ayudan a que el siguiente ligando que debe unirse lo haga de manera más rápida y/o fuerte, al contrario de las interacciones negativas, las cuales disminuyen la fuerza de afinidad.

En este caso, nuestros sistemas bivalente y trivalente quedan como se muestra en las figuras A1.6 y A1.7.



**Fig. A1.6** Receptor bivalente con sitios que presentan interacciones, en los cuáles cada afinidad cambia con la unión de un ligando en otro sitio. Representación probabilística y estequiométrica. Los subíndices 1,2 y 2,1 especifican el orden en que los sitios son ocupados.



**Fig. A1.7** Receptor trivalente con sitios no idénticos y que presentan interacciones. Representación con constantes de afinidad probabilísticas y estequiométricas. Los subíndices 1,2, 2,1, etc. especifican el orden en que los sitios son ocupados.

De la misma manera, para una molécula multivalente de  $n$  sitios, la cantidad de constantes aumenta de manera abrupta conforme el número de sitios aumenta.

**TABLA A1.1** Numero de constantes de afinidad para un receptor de  $n$  sitios activos.

Numero de Sitios Activos	Numero Total de Constantes de Afinidad	Numero Total de Constantes de Afinidad Independientes
2	4	3
3	12	7
4	32	15
6	192	63
8	1,024	255
12	24,576	4095

## A1.2 UNIÓN RECEPTOR-LIGANDO (BINDING)

### A1.2.1 RECEPTORES MONOVALENTES

La reacción de unión entre la **concentración libre** y la **concentración de pegado** puede ser expresada (químicamente) de la siguiente manera:



donde  $R$  representa la concentración de receptor y  $L$  la del ligando. Ya vimos que para que el proceso esté en equilibrio necesitamos de las constantes de afinidad, por lo tanto:

$$k = \frac{(RL)}{(R)(L)} \quad (\text{A1.2})$$

Podemos formar una ecuación para expresar los moles de ligando pegado,  $B$ , como una función de la concentración de ligando libre

$$B = \frac{\text{moles de ligando pegado}}{\text{moles totales de receptor}} = \frac{(RL)}{(R) + (RL)} \quad (\text{A1.3})$$

Sabemos que

$$(RL) = k(R)(L)$$

sustituyendo en (2.3) tenemos que

$$B = \frac{k(L)}{1 + k(L)} \quad (\text{A1.4})$$

Para el caso de las constantes estequiométricas, ya vimos que

$$k = K$$

entonces

$$B = \frac{k(L)}{1 + k(L)} = \frac{K(L)}{1 + K(L)} \quad (\text{A1.5})$$

### A1.2.2 RECEPTORES MULTIVALENTES UNIFORMES: SITOS IDÉNTICOS CON AFINIDADES IDÉNTICAS

En este caso cada sitio activo del receptor presenta la misma afinidad y no se presentan interacciones (Fig. A1.2); entonces para cada sitio individualmente escribimos

$$B_1 = \frac{k_1(L)}{1 + k_1(L)} \quad (\text{A1.6})$$

$$B_2 = \frac{k_2(L)}{1 + k_2(L)} \quad (\text{A1.7})$$

⋮

$$B_j = \frac{k_j(L)}{1 + k_j(L)} \quad (\text{A1.8})$$

⋮

$$B_n = \frac{k_n(L)}{1 + k_n(L)} \quad (\text{A1.9})$$

donde  $n$  es el número total de sitios activos. Para la molécula entera tenemos que

$$B = B_1 + B_2 + \dots + B_j + \dots B_n \quad (\text{A1.10})$$

Como cada sitio es idéntico con los demás al igual que su afinidad

$$k_1 + k_2 + \dots + k_j + \dots k_n \equiv k = K \quad (\text{A1.11})$$

Finalmente

$$B = n \frac{k(L)}{1 + k(L)} = n \frac{K(L)}{1 + K(L)} \quad (\text{A1.12})$$

Lo que quiere decir que  $B$  es  $n$  veces la unión de un ligando, para la cuál  $k=K$ .

### **A1.2.3 RECEPTORES MULTIVALENTES: SITOS CON AFINIDADES DIFERENTES PERO INVARIANTES (SIN INTERACCIONES)**

Este tipo de moléculas tiene la característica de que cada sito activo tiene diferente afinidad, que no cambia cuando otra molécula se une (Fig. A1.3). De esta manera tendríamos que

$$B_1 = \frac{k_1(L)}{1 + k_1(L)} \quad (\text{A1.13})$$

$$B_2 = \frac{k_2(L)}{1 + k_2(L)} \quad (\text{A1.14})$$

⋮

$$B_j = \frac{k_j(L)}{1 + k_j(L)} \quad (\text{A1.15})$$

⋮

$$B_n = \frac{k_n(L)}{1 + k_n(L)} \quad (\text{A1.16})$$

Entonces, para todo el sistema tenemos que:

$$B = \frac{k_1(L)}{1 + k_1(L)} + \frac{k_2(L)}{1 + k_2(L)} + \dots + \frac{k_j(L)}{1 + k_j(L)} + \dots + \frac{k_n(L)}{1 + k_n(L)}$$

$$B = \sum_{j=1}^n \frac{k_j(L)}{1 + k_j(L)} \quad (\text{A1.17})$$

donde cada constante  $k_j, j=1,2,\dots,n$  es diferente.

Un caso especial en el cual el comportamiento es similar es cuando tenemos un sistema con dos o más clases o poblaciones de sitios, es decir, un conjunto de sitios tiene cierta afinidad, otro conjunto se comporta con otra afinidad y así sucesivamente. De esta manera, para un sistema con solo dos clases de afinidad, la ecuación A1.17 se reduce a lo siguiente

$$B = \frac{n_1 k_1(L)}{1 + k_1(L)} + \frac{n_2 k_2(L)}{1 + k_2(L)}$$

Para un sistema con  $j$  poblaciones tenemos que:

$$B = \frac{n_1 k_1(L)}{1 + k_1(L)} + \frac{n_2 k_2(L)}{1 + k_2(L)} + \dots + \frac{n_j k_j(L)}{1 + k_j(L)} \quad (\text{A1.18})$$

#### **A1.2.4 RECEPTORES MULTIVALENTES: SITIOS ACTIVOS NO INDEPENDIENTES**

En capítulos anteriores se explicó lo que es un receptor multivalente que presenta interacciones y vimos que tendríamos muchas constantes de afinidad, ya que cada una se ve afectada conforme a la unión de ligándose en el receptor (Fig. A1.6). Por lo tanto, para un sistema con dos sitios, tenemos que

$$k_1 = \frac{({}_1 RL)}{(R)(L)} \quad (\text{A1.19})$$

$$k_2 = \frac{({}_2 RL)}{(R)(L)} \quad (\text{A1.20})$$

$$k_{1,2} = \frac{({}_{1,2} RL_2)}{({}_1 RL)(L)} \quad (\text{A1.21})$$

$$k_{2,1} = \frac{({}_{2,1} RL_2)}{({}_2 RL)(L)} \quad (\text{A1.22})$$

Los subíndices  $k_{1,2}$ ,  $k_{2,1}$ , etc. especifican el orden en que los sitios son ocupados, el primer índice es el primer sitio ocupado. Aquellos subíndices que se encuentran en la parte inferior de  ${}_{a,b}RL_m$  especifican: los del lado izquierdo, qué sitios ya han sido ocupados en un complejo (o molécula) de  $m$  sitios activos ( $m$  siendo el índice de la derecha).

Cuando los sitios no presentan interacciones, tenemos que

$$k_1 = k_{2,1} \quad (\text{A1.23a})$$

$$k_2 = k_{1,2} \quad (\text{A1.24a})$$

y entonces  $B$  puede ser escrita como en la ecuación A1.17 con dos sumandos ( $n=2$ ).

Sin embargo, cuando se presentan interacciones tenemos que

$$k_1 \neq k_{2,1} \quad (\text{A1.23b})$$

$$k_2 \neq k_{1,2} \quad (\text{A1.24b})$$

A primera instancia podríamos pensar que

$$B = \frac{k_1(L)}{1 + k_1(L)} + \frac{k_2(L)}{1 + k_2(L)} + \frac{k_{1,2}(L)}{1 + k_{1,2}(L)} + \frac{k_{2,1}(L)}{1 + k_{2,1}(L)} \quad (\text{A1.25})$$

No obstante, a simple vista podemos ver que esta ecuación es incorrecta ya que mientras más cantidad de ligando ( $L$ ) se administre, cada término del lado derecho de la ecuación tiene a uno. Por lo tanto

$$\lim_{(L) \rightarrow \infty} B(\text{predictivo}) = 1 + 1 + 1 + 1 = 4 \quad (\text{A1.26})$$

Pero nuestro receptor tiene solo 2 sitios, así que el límite verdadero de nuestro complejo cuando obtenemos la saturación es

$$\lim_{(L) \rightarrow \infty} B(\text{verdadero}) = 2 \quad (\text{A1.27})$$

Es por esto que la ecuación A1.25 es totalmente incorrecta.

Sin embargo, para este tipo de sistemas es conveniente usar las constantes de afinidad estequiométricas.

### **A1.2.5 AFINIDAD CON LAS CONSTANTES ESTEQUIOMÉTRICAS**

El caso de un receptor monovalente ya fue tratado anteriormente (A1.2.1.) Para receptores bivalentes la representación química puede ser de la siguiente manera:



Expresando cada ecuación con su constante de equilibrio tenemos que

$$K_1 = \frac{(RL_1)}{(R)(L)} \quad (\text{A1.30})$$

$$(\text{A1.31})$$



$$K_2 = \frac{(RL_2)}{(RL_1)(L)}$$

Despejando y sustituyendo

$$(RL_1) = K_1 (R)(L) \quad (A1.32)$$

$$(RL_2) = K_2 (RL_1)(L) = K_1 K_2 (R)(L)^2 \quad (A1.33)$$

Entonces, para la ecuación de moles de ligando unidos,  $B$  es igual a

$$B = \frac{\text{moles de ligando pegado}}{\text{moles totales de receptor}} = \frac{(RL_1) + 2(RL_2)}{(R) + (RL_1) + (RL_2)} \quad (A1.34)$$

donde  $(RL_1)$  es la concentración de 1 mol de ligando unido,  $2(RL_2)$  corresponde a los 2 moles de ligando unidos (o pegados) en cada  $RL_2$  (éste se le atribuye al complejo cuando tiene ambos sitios ocupados, o sea, cuando los dos ligandos ya están pegados). Entonces, sustituyendo las ecuaciones A1.32 y A1.33 tenemos que:

$$B = \frac{K_1(L) + 2K_1K_2(L)^2}{1 + K_1(L) + K_1K_2(L)^2} \quad (A1.35)$$

De la misma manera sucede para un sistema multivalente:

$$R + L = RL_1; \quad K_1 = \frac{(RL_1)}{(R)(L)}; \quad (RL_1) = K_1(R)(L) \quad (\text{A1.36})$$

$$RL_1 + L = RL_2; \quad K_2 = \frac{(RL_2)}{(RL_1)(L)}; \quad (RL_2) = K_1 K_2 (R)(L)^2 \quad (\text{A1.37})$$

⋮

$$RL_{i-1} + L = RL_i; \quad K_i = \frac{(RL_i)}{(RL_{i-1})(L)}; \quad (RL_i) = K_1 K_2 \dots K_i (R)(L)^i \quad (\text{A1.38})$$

⋮

$$RL_{n-1} + L = RL_n; \quad K_n = \frac{(RL_n)}{(RL_{n-1})(L)}; \quad (RL_n) = K_1 K_2 \dots K_n (R)(L)^n \quad (\text{A1.39})$$

Entonces, la ecuación para  $B$  queda de la siguiente manera:

$$B = \frac{(RL_1) + 2(RL_2) + \dots + i(RL_i) + \dots + n(RL_n)}{(R) + (RL_1) + (RL_2) + \dots + (RL_i) + \dots + (RL_n)} \quad (\text{A1.40})$$

Sustituyendo tenemos:

$$B = \frac{K_1(L) + 2K_1 K_2 (L)^2 + \dots + i K_1 K_2 \dots K_i (L)^i + \dots + n K_1 K_2 \dots K_n (L)^n}{1 + K_1(L) + K_1 K_2 (L)^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_i (L)^i + \dots + K_1 K_2 \dots K_n (L)^n} \quad (\text{A1.41})$$

$$B = \frac{K_1(L) + 2K_1 K_2 (L)^2 + \dots + i \left( \prod_{j=1}^i K_j \right) (L)^i + \dots + n \left( \prod_{j=1}^n K_j \right) (L)^n}{1 + K_1(L) + 2K_1 K_2 (L)^2 + \dots + \left( \prod_{j=1}^i K_j \right) (L)^i + \dots + \left( \prod_{j=1}^n K_j \right) (L)^n} \quad (\text{A1.42})$$

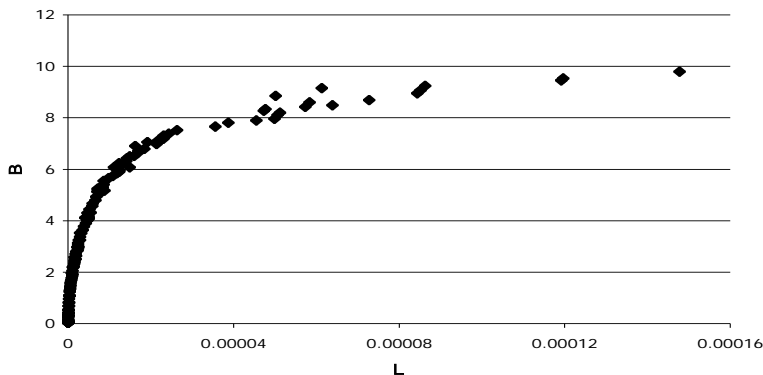
Con esta ecuación y teniendo datos experimentales de  $L$  y  $B$  podemos obtener los valores de cada  $K_i$ .

## A1.3 REPRESENTACIÓN GRÁFICA

Diferentes gráficas para representar la unión entre ligando y receptor se han utilizado a través de los años. A continuación presentaremos cada una de ellas y expondremos los pros y contras de las mismas.

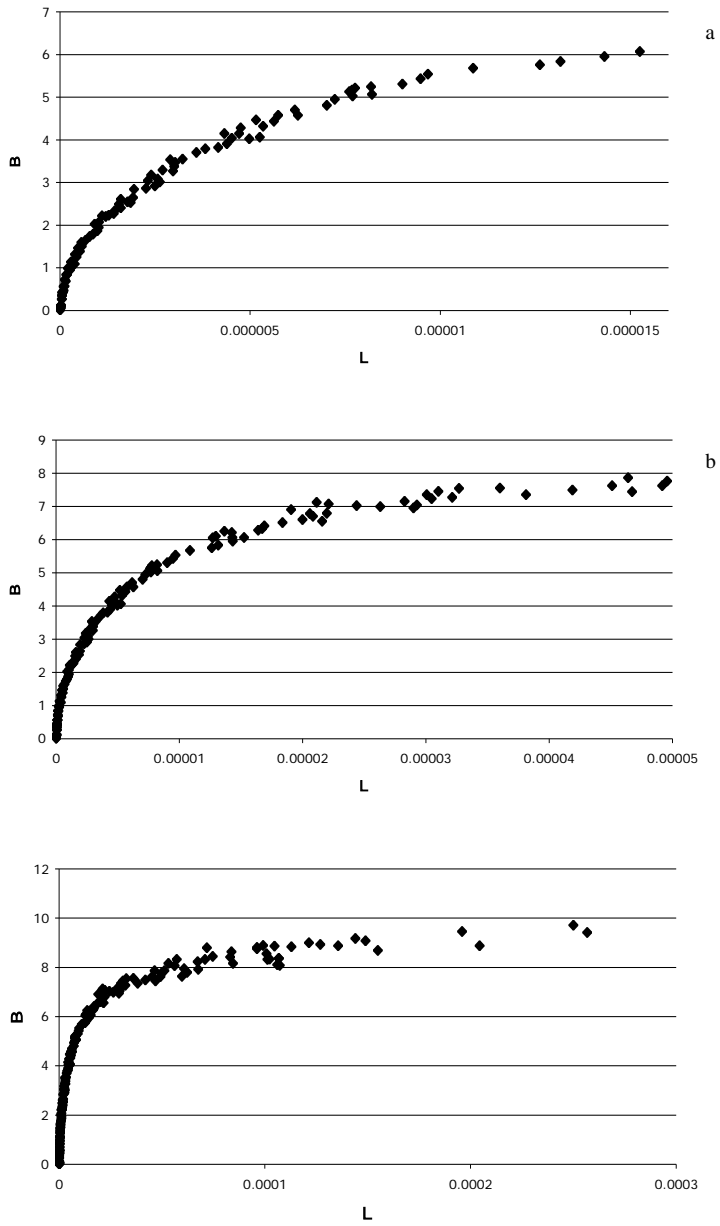
### A1.3.1 PEGADO VS. LIBRE

Esta es la gráfica más simple ya que solamente se grafican los valores de concentración libre contra los valores del número de sitios ocupados, llamado también “pegado”.



**Fig. A1.7** Gráfica de pegado vs. libre de laurato y albúmina humana.

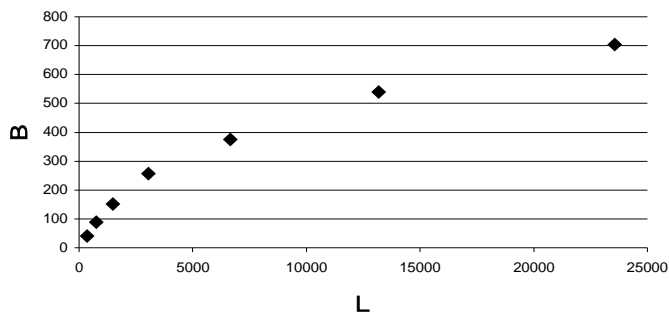
La ventaja de ésta gráfica es que mientras más nos acercamos hacia la saturación del sistema los puntos en la gráfica tienden a acostarse formando una línea casi paralela al eje de las abscisas y así es posible, y al mismo tiempo fácil para nosotros, suponer cuándo hemos llegado a la saturación; sin embargo el problema más significativo es que en algunos casos esas suposiciones nos puede llevar a resultados erróneos. En la Fig. A1.8a podemos ver que existe una tendencia en los datos que nos hace creer



**Fig. A1.8** Gráfica de la unión del ion laurato con albúmina humana con tres distintos rangos de concentración.

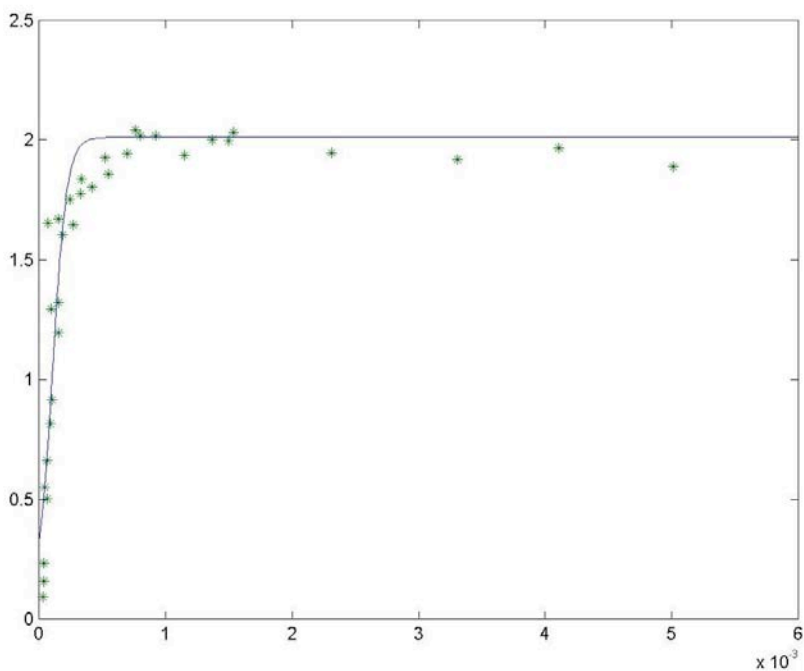
que hemos llegado a la saturación con  $n=6$  ó  $n=7$ , pero en la Fig. A1.8b observamos la misma tendencia en  $n=8$ , ésto después de haber vertido más concentración de ligando libre; finalmente, en la Fig. A1.8c, nuevamente los datos se acuestan en  $n=10$ . Si no se tienen los suficientes datos podemos cometer el error de suponer cierta saturación cuando en realidad ésta se encuentra más adelante (en realidad, para la albúmina, la molécula que se muestra en la Fig. A1.8, la saturación no ocurre en  $n=10$ ).

Otra gran desventaja con este tipo de gráficas es que en la práctica resulta muy difícil poder conseguir tantos datos experimentales como los que hay en la Fig. A1.8; la mayoría de los métodos que existen para obtener estos datos es complicada y por lo tanto el máximo que puede obtenerse, en promedio, son entre 10 y 15 valores. Esto nos lleva también a conclusiones erróneas ya que con tan pocos datos no podemos distinguir en dónde hemos llegado a la saturación Fig. A1.9.



**Fig. A1.9** Datos experimentales de la unión de diazepam en benzodiazepine.

Sin embargo, cuándo el receptor resulta tener sitios cooperativos este tipo de gráficas nos indica de manera muy acertada el número de sitios con el que consta. En la Fig. A1.10 podemos ver como los últimos valores de pegado ( $B$ ) se acuestan de tal manera que casi podemos dibujar una línea horizontal.



**Fig. A1.10** Datos experimentales de la unión de leucina e isopropilmalato.

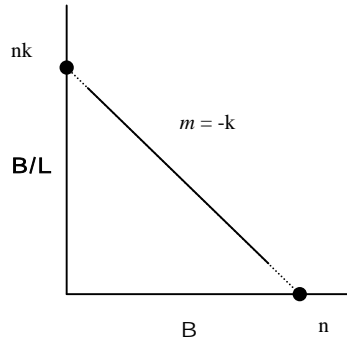
### A1.3.2 GRAFICA DE SCATCHARD

Esta gráfica fue propuesta por B. Wolff en 1920 y se deriva de la ecuación A1.12. Es llamada también gráfica de Eadie o Eadie-Hofstee.

$$B[1 + k(L)] = nk(L) \quad (\text{A1.43})$$

$$B = nk(L) - Bk(L) \quad (\text{A1.44})$$

$$\frac{B}{L} = nk - kB \quad (\text{A1.45})$$

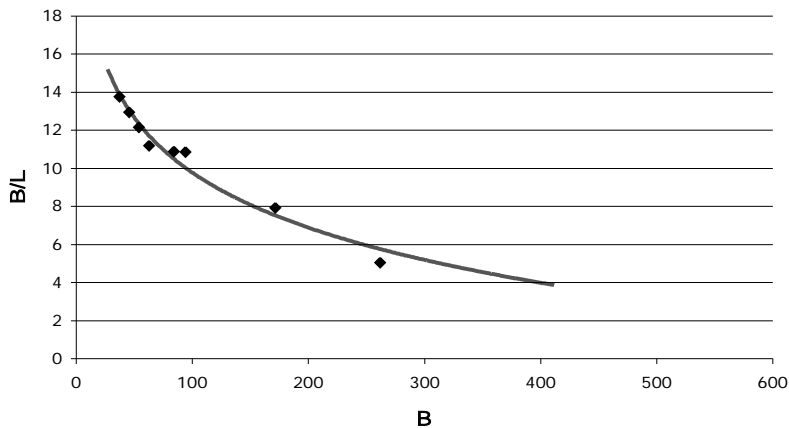


**Fig. A1.11** Grafica de Scatchard suponiendo un modelo ideal de  $n$  sitios activos idénticos

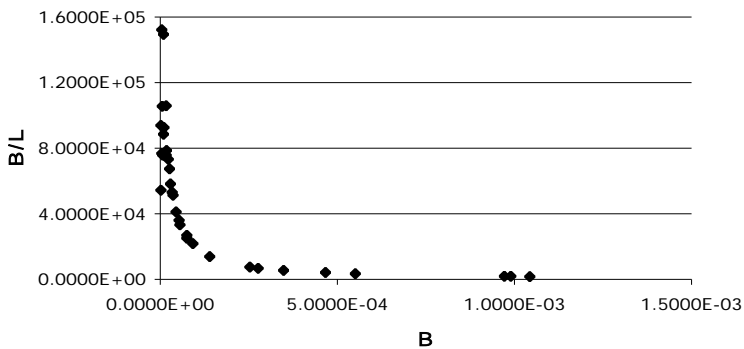
Como muestra la figura A1.11, esta gráfica exhibe los datos de  $B/L$  vs.  $B$ , lo que hace que éstos se ajusten a una línea recta (para un sistema ideal) y que el cruce de ésta con el eje de las abscisas sea en  $n$ . De cierta forma podemos creer que ésta puede ser la mejor manera de graficar nuestros datos para así ver el número de sitios activos del receptor, sin embargo eso solo sucede de manera exacta para un modelo ideal.

Cuando tenemos un sistema multimodal y/o interacciones (ya sean negativas o positivas) los valores tienden a formar una curva (Fig. A1.12) y el ajustar una línea recta para suponer la intersección nos puede llevar a un error, incluso cuando el coeficiente de correlación sea bueno. También existen casos en los que, mientras más nos acercamos a  $B=0$  los puntos se acuestan formando una recta imaginaria con pendiente igual a cero. Esto hace aún más complicado encontrar la intersección con el eje, y por lo tanto más difícil saber el número de sitios activos (Fig. A1.13), y asumir algún valor pudiera llevarnos a un error.



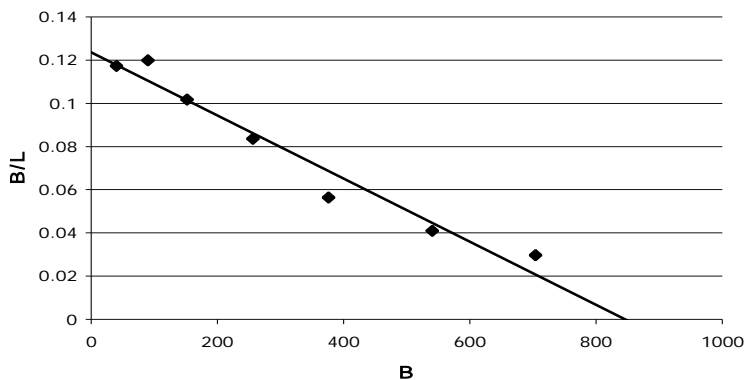


**Fig. A1.12** Gráfica de Scatchard de la unión de iones de calcio a una proteína transportadora (la calbidina). La línea curva que ajusta los datos asume un modelo en donde no existen interacciones entre sitios y asume dos poblaciones del receptor, una de alta y otra de baja afinidad .



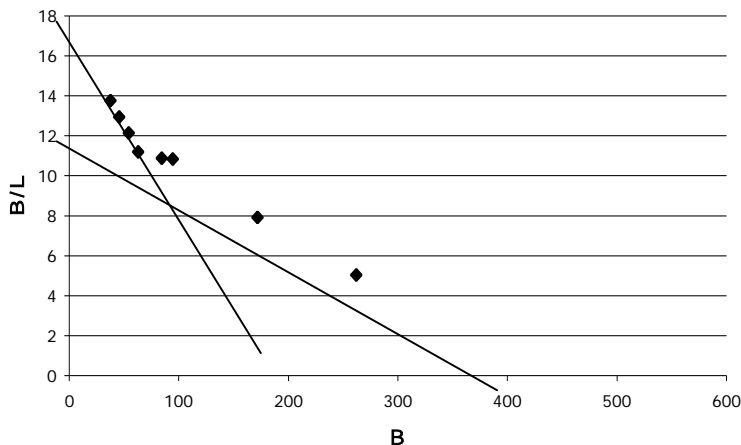
**Fig. A1.13** Gráfica de Scatchard de la unión de leucine por isopropylmalate synthase con los mismos datos de la figura 3.4. A simple vista es complicado determinar los rangos para la afinidad alta y la baja.

En la Figura A1.14 tenemos los datos experimentales del diazepam unido al benzodiazepine ajustados por una línea recta. Podríamos suponer que la saturación la obtenemos aproximadamente en  $n=8$  ya que es en dónde la recta cruza el eje de las  $x$ ; sin embargo como lo explicamos en la sección anterior y observando la Fig. A1.9 notamos que difícilmente hemos llegado a ésta.



**Fig. A1.14** Grafica de Scatchard de los datos experimentales de la unión de diazepam en benzodiazepine.

Un método que se utilizó por mucho tiempo fue el de asumir, cuando los valores forman una curva, que existen dos rangos de afinidad (Fig. A1.15). El gran inconveniente al hacer ésto, es que solamente nos sirve para estimar 2 constantes de afinidad (ya que solo estamos suponiendo 2 rangos) y para sistemas de  $n$  constantes de afinidad ( $n>2$ ) resulta inútil. Además, al hacer esta suposición podríamos perder parte de la información del sistema, por ejemplo, es posible que existan 3 rangos de afinidades, pero nosotros ya asumimos solamente dos rangos, y analizando esta gráfica no podríamos notar la existencia de más rangos. Otra desventaja al asumir dos rangos de afinidades es que, en la práctica, identificar la afinidad alta y la baja resulta complicado, a menos que las afinidades sean significativamente distintas (Fig. A1.13).

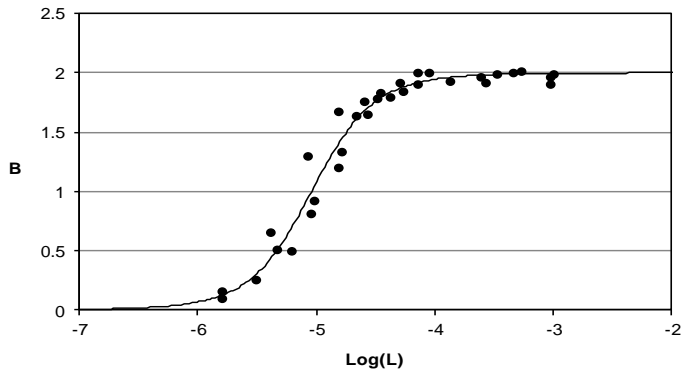


**Fig. A1.15** Grafica de Scatchard para la unión de iones de calcio a una proteína transportista. Se puede ver que tenemos un rango de afinidad alta y otro de baja.

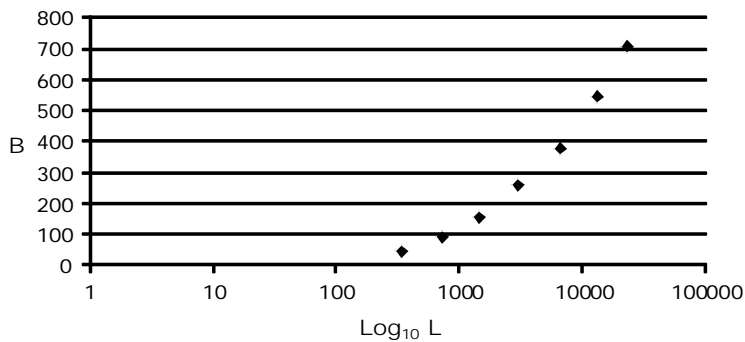
Por otro lado, una ventaja que nos da la gráfica de Scatchard es que algunas veces podemos identificar la presencia de interacciones. Cuando existen interacciones negativas la curva tiende a ser muy convexa (Fig. A1.13), al contrario de las interacciones positivas, que la curva parece ser menos convexa y en algunos casos cóncava (Fig. A1.14); es solo en estos casos, cuando la curva es cóncava, que podemos identificar, de manera más clara, la existencia de cooperatividad (interacciones positivas). Sin embargo, cuando la curva es muy convexa pudieramos cometer el error de asumir interacciones negativas, cuando en realidad el sistema solamente presenta dos poblaciones bien definidas (Fig. A1.13). La figura A1.13 es de un sistema que DECIR SI PRESENTA INTERACCIONES O NO.

### A1.3.3 GRAFICA SEMILOGARÍTMICA

Es de las gráficas más usadas ya que en ella se puede ver, de manera más clara, si hemos o no llegado a la saturación. En ésta nuestros datos se asemejan a una S y cuando hemos llegado a la saturación los datos se acuestan formando una línea horizontal imaginaria (Fig. A1.16 y A1.17).

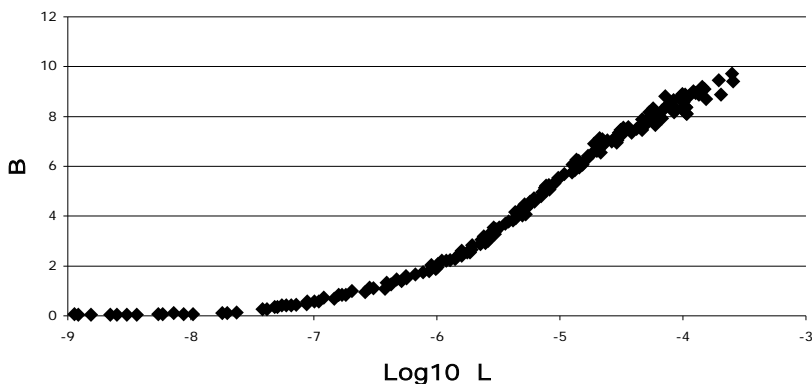


**Fig. A1.16** Gráfica Semilogarítmica de la unión de leucine por isopropylmalate synthase con los mismos datos de la figura A1.13. La línea horizontal imaginaria se puede dibujar; esto indica que podemos deducir el número de sitios activos.



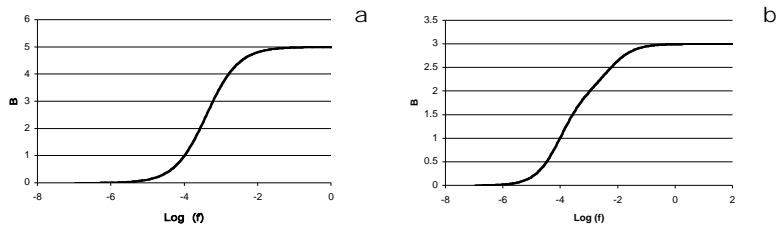
**Fig. A1.17** Gráfica Semilogarítmica de la unión de diazepam en benzodiazepine con los mismos datos de la figura A1.14. Claramente podemos ver que aún no hemos logrado saturar ya que no se ha logrado la línea horizontal imaginaria.

En la Fig. A1.8 se muestra que la gráfica de  $B$  vs.  $L$  puede llevarnos a conclusiones erróneas ya que aunque pareciera que finalmente hemos logrado saturar lo suficiente para encontrar el número de sitios activos de la molécula, la Fig. A1.17 nos enseña que aún no lo hemos logrado ya que los valores, mientras más grande es  $B$ , aún no forman una la recta imaginaria.

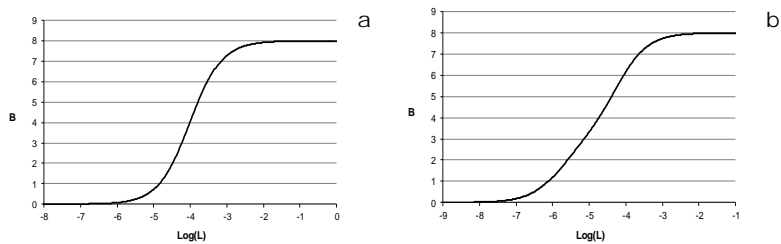


**Fig. A1.18** Gráfica Semilogarítmica de la unión de unión de diazepam en benzodiazepina con los mismos datos de la figura A1.8. Claramente podemos ver que aún no hemos logrado saturar ya que no se ha logrado la línea horizontal imaginaria.

Este tipo de gráficas también nos ayuda a suponer cierta información como, si el complejo tiene afinidad invariante o no, es decir, podemos apreciar si existe o no, en el sistema, afinidades altas y bajas. Cuando el sistema presenta una misma afinidad la curva es simétrica con respecto al punto de inflexión (Fig. A1.19a), en el caso contrario no lo es (Fig. A1.19b). Podemos apreciar también si existen interacciones positivas o negativas ya que, en el caso de las interacciones positivas la curva crece de manera más rápida (Fig. A1.20) y cuando se presentan interacciones negativas el crecimiento de la curva es más lento.



**Fig. A1.19** Grafica semilogarítmica de la unión de dos moléculas. a) Curva con afinidad invariante. Podemos ver que ésta es simétrica con respecto al punto de inflexión; este es el caso de un receptor monovalente o multivalente con afinidades idénticas. b) Representa el caso de un complejo multivalente con afinidades distintas; específicamente es un receptor trivalente con dos clases de sitios.



**Fig. A1.20** Grafica semilogarítmica de la unión de dos moléculas con 8 sitios activos. a) Unión de Albúmina e Ibuprofeno; se presentan interacciones positivas, por ello la curva “crece” más aceleradamente. b) Unión de Albúmina y Benoxaprofeno; se presentan interacciones negativas y por ello el “crecimiento” de la curva no es tan acelerado.

# **APÉNDICE II**

## **DELTA DE DIRAC**

## A.2 FUNCIÓN DELTA DE DIRAC

La función Delta de Dirac se define de la siguiente manera:

$$\delta(t - t_0) = 0 \quad \text{para } t \neq t_0$$

$$\lim_{t \rightarrow t_0} \delta(t - t_0) \rightarrow \infty$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} \delta(t - t_0) dt = 1$$

$$\int_{-\infty}^{\infty} f(t) \delta(t - t_0) dt = f(t_0)$$

En un sentido estrictamente matemático ésta no puede considerarse como una función, sin embargo puede ser definida informalmente como el límite de una sucesión de funciones.

A lo largo de los años se ha trabajado sobre esta función para que sus bases sean matemáticamente válidas y se ha logrado. En este trabajo no explicaremos éstas, sin embargo enunciaremos sus propiedades.

Consideremos la distribución Gaussiana:

$$f(t - t_0) = \frac{1}{\sqrt{2\Pi}\sigma} e^{-(t-t_0)^2/2\sigma^2}$$

Mientras más pequeña es  $\sigma$ , el ancho de la función  $f(t-t_0)$  decrece y su altura aumenta, por lo tanto tenemos que:

$$\int_{-\infty}^{\infty} f(t - t_0) dt \equiv 1 \quad \forall \sigma$$



Par demostrar este enunciado, hagamos

$$I = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-(t-t_0)^2/2\sigma^2} dt$$

Ahora:

$$S = \int_{-\infty}^{\infty} e^{-x^2} dx$$

$$S^2 = \left( \int_{-\infty}^{\infty} e^{-x^2} dx \right) \left( \int_{-\infty}^{\infty} e^{-x^2} dx \right)$$

$$S^2 = \left( \int_{-\infty}^{\infty} e^{-x^2} dx \right) \left( \int_{-\infty}^{\infty} e^{-y^2} dy \right)$$

Por el teorema de Fubini:

$$S^2 = \iint_{\mathfrak{R}} e^{-x^2} e^{-y^2} dx dy$$

$$S^2 = \int_{\mathfrak{R}} e^{-(x^2+y^2)} dx dy$$

Por la definición de Integral Impropia:

$$S^2 = \lim_{\mathfrak{R} \rightarrow \infty} \int_{B_{\mathfrak{R}}(0)} e^{-(x^2+y^2)} dx dy$$

Cambiando a coordenadas polares:

$$S^2 = \lim_{\mathfrak{R} \rightarrow \infty} \int_{A(r)} e^{-r^2} r dr d\theta \quad \text{donde} \quad A(r) = [0, 2\pi] \times (0, r)$$

$$S^2 = \lim_{\mathfrak{R} \rightarrow \infty} \int_0^{2\pi} \int_0^{\mathfrak{R}} e^{-r^2} r dr d\theta$$

$$S^2 = \frac{1}{2} \left( \lim_{\mathfrak{R} \rightarrow \infty} \int_0^{\mathfrak{R}^2} e^{-w} dw \right) 2\pi$$

$$S^2 = \pi \lim_{\mathfrak{R} \rightarrow \infty} (e^{-\mathfrak{R}^2} + e^0)$$

$$S^2 = \pi$$

$$S = \sqrt{\pi}$$

Por lo tanto:

$$I = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-(t-t_0)^2/2\sigma^2} dt \equiv 1$$

Este resultado es estándar en temas de ingeniería y teoría de probabilidad.

Esta función tiene también la siguiente propiedad:

$$I(a) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t)\delta(at - t_0)dt \quad \text{donde } a \in \Re$$

Haciendo

$$at = u \quad \Rightarrow \quad I(a) = \frac{1}{|a|} \int_{-\infty}^{\infty} f\left(\frac{u}{a}\right)\delta(u - t_0)du$$

Evaluando

$$I(a) = \frac{1}{|a|} f\left(\frac{t_0}{a}\right)$$

Por último, mostramos otra de las propiedades de la función Delta de Dirac:

$$\int_{-\infty}^{\infty} \delta'(t - t_0)f(t)dt = -f'(t_0)$$

donde (') indica la primera derivada. Para la  $n$ -ésima derivada tenemos que:

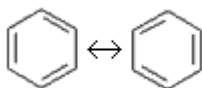
$$\int_{-\infty}^{\infty} \delta^{(n)}(t - t_0)f(t)dt = (-1)^{(n)} f^{(n)}(t_0)$$

# **GLOSARIO**

**afinidad:** parámetro utilizado para medir la atracción entre una molécula unida a otra macromolécula, ya sea para modificarla, destruirla o formar compuestos.

**ciclooxigenaza:** encima que juega un papel principal en la síntesis de prostaglandinas

**compuestos aromáticos:** compuestos cuyas moléculas son cíclicas y poseen electrones deslocalizados. Se pueden representar como si tuvieran enlaces dobles y sencillos alternados entre los átomos de carbono.



**concentración:** relación entre la cantidad de soluto y solvente de una solución; pueden ser expresadas como moles, masas o volúmenes.

**concentración molar:** número de moles de soluto por litro de solvente.

**endócrino:** relacionado a las glándulas que secretan hormonas dirigidas hacia el torrente sanguíneo.

**endógeno:** parte del entorno interno de un organismo o célula.

**enlace covalente:** Fuerza de atracción que mantiene unido a dos o más átomos compartiendo sus electrones

**equilibrio (equilibrio termodinámico):** un sistema se encuentra en equilibrio termodinámico si la energía que gana de su entorno (entalpía) está balanceada por la energía que pierde (entropía) sin importar el tiempo transcurrido.

**exógeno:** originario del entorno externo de un organismo o célula.

**hipotálamo:** área del cerebro que regula, tanto actividades endócrinas como somáticas; ejemplos: temperatura del cuerpo, apetito, sueño.

**inactividad:** En química, la **actividad** es una medida de una "concentración efectiva" de una especie. Los efectos de la actividad son el resultado de las interacciones entre los iones, tanto electrostáticas como covalentes

**macromolécula:** nombre que se le da a un polímero muy grande.

**mol:** Unidad utilizada en química, que corresponde a la cantidad de: átomos, iones, moléculas, electrones, protones u otras entidades específicas cuyo valor es  $6 \cdot 10^{23}$  unidades.

**monómero:** compuesto cuyas moléculas reaccionan para formar un polímero.

**plaqueta:** célula que ayuda a la coagulación de la sangre.

**población:** grupo de organismos de la misma especie relativamente aislados de otros grupos de organismos de la misma especie.

**polímero:** molécula grande compuesta por varias subunidades o monómeros.

**prostaglandinas:** células de comportamiento parecido a las hormonas que regulan actividades celulares y se producen en casi todos los tejidos del cuerpo humano.

**saturación:** se refiere a cuando el total de los sitios activos de una proteína se encuentran ocupados.

**síntesis:** formación de un compuesto a partir de simples reactivos.

**sitio activo:** parte de la proteína dónde los reactivos (o ligandos) se unen.

**soluto:** es aquel componente de una solución que se encuentra en menor cantidad y corresponde al componente que se disuelve en el solvente.

**solvente:** es aquel componente de una solución que se encuentra en mayor cantidad y corresponde al componente que disuelve al soluto.

**tromboxanos:** células de comportamiento parecido a las hormonas que regulan actividades celulares y se producen en casi todos los tejidos del cuerpo humano.

**valencia:** también conocida como número de valencia, es una medida de la cantidad de enlaces químicos formados por los átomos de un elemento químico.