



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Estudio de las propiedades electrónicas de péptidos derivados de TP53 con posible actividad antitumoral”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

YAZMÍN MECALCO RUÍZ

TUTOR: DRA. CAROLINA BARRIENTOS SALCEDO

COTUTOR: DRA. CATALINA SORIANO CORREA

Los Reyes Iztacala, Edo. de México

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LUGAR DE REALIZACIÓN

Centro Médico Nacional Siglo XXI, Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación en Genética Humana, Laboratorio de Genética Molecular.

Laboratorio de Química Computacional y Modelado Molecular de la FES-Zaragoza Campus II, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por el financiamiento del proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e innovación Tecnológica, (PAPIIT) IN-109206.

Al IMSS por el financiamiento del proyecto “Estudio teórico de péptidos antineoplásicos y ensayos de su efecto *In Vitro*” del Fondo de Investigación en Salud FIS/ PROT/C2007/004.

A la Dirección General de Supercómputo Académico (DGSCA) de la Universidad Nacional Autónoma de México por el tiempo de cómputo otorgado en la Supercomputadora KanBalam para la realización de esta tesis.

A mi asesora la Dra. Carolina Barrientos Salcedo por su orientación y conocimientos, paciencia, apoyo y confianza que deposito en mí para la realización de esta tesis.

A la Dra. Catalina Soriano Correa por su conocimiento en el área así como el tiempo y orientación dedicados para la realización y culminación de esta investigación.

A el Dr. Diego Arenas Aranda por sus consejos y aportaciones a este trabajo, así como por sus conocimientos adquiridos como su alumna a lo largo de la carrera.

A mis sinodales el Dr. Diego Arenas Aranda, la M en C. María de Jesús Laura Castañeda Partida, la M. en C. Martha Salcedo Álvarez y a la Dra. Martha Elena Hernández Caballero por la orientación y consejos dados durante la revisión de esta tesis.

Y en especial a mi madre Josefina que me enseñó desde pequeña a tener buen desempeño en la escuela y siempre ha estado atrás de mí; así como a mi papá y hermana Marisol por su apoyo.

A mis abuelitos Herlinda y Martín que nunca me dejaron sola y me apoyaron en mi formación profesional y personal.

A mis tías Reyna, Hermelinda, Patricia, Angélica, Chrisanta, Leticia que me dieron los recursos y el apoyo para cursar mi carrera y a mis tíos Arturo, Alejandro, Roberto y Moisés.

A mi primo Jonalli que también me ha brindado su apoyo.

A Mario que siempre me apoyo, nunca me dejó sola y me dio su ayuda y consejos para seguir adelante.

A mis amigos Miguel Ángel, Fernando, Rubén, Claudia, Andrea con los que trabajé a lo largo de la carrera y me hicieron pasar momentos inolvidables.

Gracias por su apoyo, por estar siempre a mi lado.

Yazmin M. Ruiz



ÍNDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. CÁNCER	7
1.2. GENES RELACIONADOS CON CÁNCER	8
1.3. EL GEN P53	9
1.4. LA PROTEÍNA TP53 Y APOPTOSIS.	10
1.5. DOMINIO DE UNIÓN DE TP53 A HDM2	12
1.6. TERAPIA EN CÁNCER	13
1.7. PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS	13
1.8. PÉPTIDOS SINTÉTICOS	15
1.8.1. PÉPTIDOS ANTICANCERIGENOS	15
1.9. PÉPTIDOS MEMBRANOLÍTICOS Y MEMBRANA CELULAR	17
1.10. MÉTODOS QUÍMICO-CUÁNTICOS COMPUTACIONALES	19
1.11. MÉTODOS DE ESTRUCTURA ELECTRÓNICA	19
1.12. CONJUNTOS DE BASE	20
1.13. TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD (TFD)	22
1.14. DESCRIPTORES	23
1.14.1. DUREZA (χ)	23
1.14.2. POTENCIAL DE IONIZACIÓN (I)	23
1.14.3. INDICE DE ELECTROFILICIDAD (χ)	24
1.15. COEFICIENTE DE PARTICIÓN OCTANOL/AGUA (LogP)	25
2. ANTECEDENTES.	26
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. OBJETIVOS.	28
5. HIPÓTESIS	29



6. MATERIAL Y MÉTODOS	30
6.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS MOLÉCULAS EN ESTUDIO.	30
6.2. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA	30
6.3. CÁLCULOS PUNTUALES.	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS GEOMETRÍAS	32
7.2. ANÁLISIS DE CARGAS ATÓMICAS	35
7.3. DESCRIPTORES QUÍMICO CUÁNTICOS GLOBALES	44
7.5. ORBITALES MOLECULARES FRONTERA, ISOSUPERFICIE DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO Y DENSIDAD ELECTRÓNICA	48
8. CONCLUSIONES	68
9. REFERENCIAS	69
10. APÉNDICES	74
10.1. APÉNDICE I. ABREVIATURAS	74
10.2. APÉNDICE II. AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS.	75
10.3. APÉNDICE III. SOFTWARE Y HARDWARE	77

Palabras clave: TP53, gen p53, péptidos anticancerígenos, descriptores químico cuánticos



RESUMEN

El cáncer es una alteración de diversas rutas génicas, que conduce a la proliferación celular incontrolada e inhibición de la apoptosis, así como a la falta de diferenciación y a cambios en la capacidad de migración celular, lo que afecta a la estabilidad celular y tisular. Además se encuentran desreguladas muchas de las vías metabólicas celulares, así como la expresión de receptores; por lo que, los péptidos antineoplásicos independientes de receptor y de energía son deseables en el diseño de nuevas moléculas terapéuticas antineoplásicas. Desde hace varias décadas se han empleado diversas metodologías de la Química Computacional, pero es muy reciente el uso de metodologías como la Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD) en el diseño de fármacos. Este trabajo trata sobre la caracterización de la estructura electrónica y las propiedades fisicoquímicas de tres péptidos sintéticos derivados de TP53 seleccionados de un estudio previo y uno con actividad comprobada. Se emplearon los métodos Hartree-Fock y TFD con el conjunto base 3-21 G(d) para la optimización de las geometrías y el funcional híbrido (B3LYP) 6-311G(d) para los cálculos puntuales. Se obtuvieron para cada uno de los péptidos los siguientes descriptores químico cuánticos: dureza, potencial de ionización, índice de electrofilicidad, cargas atómicas y orbitales moleculares frontera (HOMO-LUMO) así como sus parámetros geométricos. El análisis de los orbitales moleculares frontera indica que en el pep2A tanto el HOMO como LUMO se localizan sobre el triptófano; mientras que en el pep0R el HOMO se localiza en el triptófano y el LUMO se localiza en la fenilalanina, ambos con alta hidrofobicidad y con grupos aromáticos en su cadena lateral. De acuerdo a los resultados obtenidos de la caracterización de la estructura electrónica, de los parámetros geométricos y de sus propiedades fisicoquímicas fue posible proponer que dos de los péptidos (pep2A y pep0R) son buenos candidatos antineoplásicos, ya que presentan propiedades de reactividad química similares al péptido de referencia con actividad antineoplásica ya comprobada.



1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER

El cáncer se ha convertido en un problema de salud pública en todo el mundo no solo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta mortalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo individuales y ambientales con los que se asocia. Para el año 2002 a nivel mundial, se estimó que hubo 10.9 millones de nuevos casos de neoplasias malignas, 6.7 millones de muertes, y 24.6 millones de personas que padecen algún tipo de cáncer, y si la tendencia continúa como hasta ahora, en el año 2020 habrá 16 millones de personas con cáncer, de las cuales, dos terceras partes vivirán en países de industrialización reciente.

El cáncer de mama es el segundo más frecuente en casos nuevos con 1.15 millones y quinto como causa de muerte, con una razón de mortalidad/incidencia de 0.35; le siguen estómago con 934 000 casos nuevos, y 700 000 muertes, hígado 626 000 casos nuevos y 598 000 muertes, así como colon y recto con 1.02 millones de casos nuevos y 529 000 muertes¹.

En México, el cáncer es una de las enfermedades que ha ido en aumento con el paso del tiempo, según cifras del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas para el año 2001 se registraron 108,064 tumores malignos, de los cuales el 35% afectaron a hombres y 65% a mujeres².

El cáncer es resultado de mutaciones sobre las células somáticas y su progresión hacia la malignidad proviene de una serie de mutaciones en diferentes genes, usualmente producidas por la acción conjunta de varios factores presentes en el medio ambiente³. La génesis de tumores en el humano ocurre como resultado de múltiples eventos genéticos que incluyen la pérdida de actividad de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes⁴. En general el riesgo para heredar cáncer es bastante bajo y en menos del 5% de los casos se puede demostrar una predisposición familiar⁵.



1.2. GENES RELACIONADOS CON CÁNCER

Los genes involucrados en la iniciación, progresión y metástasis del cáncer actúan a través de dos mecanismos biológicos. El primero se relaciona con las alteraciones estructurales de genes normales (proto-oncogenes) cuyos productos proteicos actúan a nivel celular para inducir las características de malignidad. Usualmente estos productos proteicos participan en el control de la proliferación, diferenciación o supervivencia celulares y su mutación permite el crecimiento celular descontrolado y la malignidad. El segundo mecanismo está relacionado con la pérdida o inactivación de genes cuyos productos proteicos suprimen el desarrollo de las características celulares malignas y regulan negativamente el ciclo celular. Los genes de esta clase se conocen bajo el nombre de genes supresores tumorales o anti-oncogenes y generalmente están relacionados con la susceptibilidad hereditaria al cáncer⁵. En el caso de los genes supresores de tumores, los productos proteicos de estos, participan en la regulación del ciclo y la diferenciación celular, siendo la pérdida de la actividad de estas proteínas una de las causas de proliferación celular descontrolada que se observa en la mayoría de los procesos neoplásicos. En conjunto, estos dos sucesos son suficientes para modificar la red de señales que participan en el control normal de la proliferación celular⁶.



1.3. EL GEN P53

El gen p53, también llamado el "guardián del genoma", se encuentra en la banda 13 del brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica para una proteína nuclear de 53 kDa, de ahí su nombre (Figura 1). Resulta esencial para inducir la respuesta de la célula ante el daño del DNA, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. El gen p53 es un gen supresor tumoral que, por lo tanto, desempeña un papel importante en apoptosis y control del ciclo celular⁷.

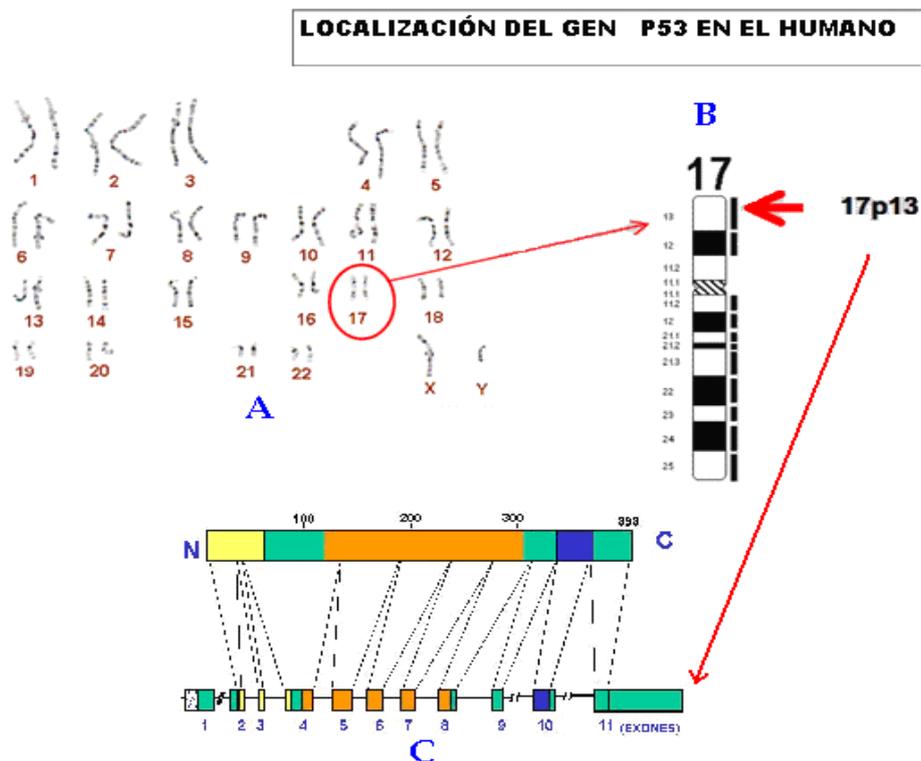


Figura 1. El gen p53 está localizado en el cromosoma 17 (en el brazo corto, 17p13); esta región que encuentra suprimida frecuentemente en el cáncer humano⁸. (A) indica el cariotipo, destacando el cromosoma 17, (B) es la representación gráfica del cromosoma 17 y (C) muestra al gen p53 con su proteína.

El gen p53 juega un papel fundamental en la carcinogénesis, ya que se encuentra mutado en aproximadamente el 50% de todos los cánceres humanos conocidos⁹ por lo que p53 representa un blanco ideal para la terapia del cáncer. TP53 es la notación correcta de la proteína para la que codifica el gen p53. TP53 es un factor de transcripción que induce arresto del ciclo celular y apoptosis en respuesta al daño al DNA¹⁰ y al estrés celular¹¹, por lo que juega un papel importante en la protección celular contra la transformación maligna.



1.4. LA PROTEÍNA TP53 Y APOPTOSIS.

Este gen da lugar a una proteína de 393 aminoácidos con tres dominios funcionales. Un dominio amino-terminal (N-), implicado en la activación transcripcional y donde se localiza una sub-región rica en prolinas que contiene cinco copias de la secuencia PXXP; un dominio central que contiene la zona de unión al DNA específica de secuencia y que es la región más conservada de la proteína, presentando una estructura de dos hojas beta y un átomo de zinc que estabiliza la estructura; el dominio carboxilo-terminal (C-) que está constituido por una región flexible, una zona de tetramerización y un extremo básico⁷ (Figura 2).

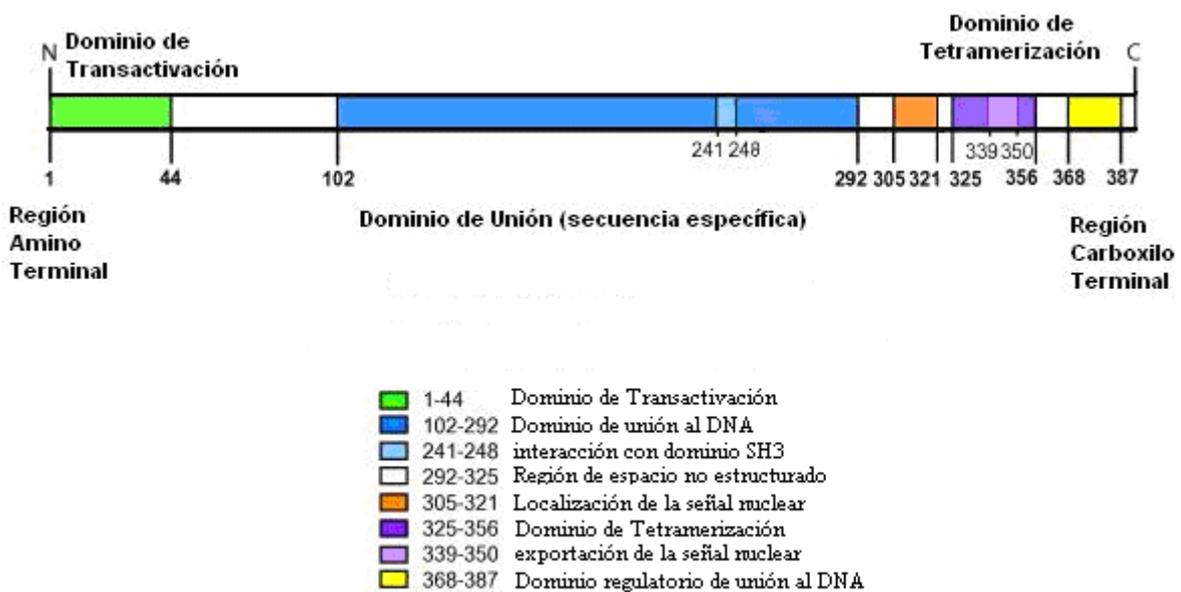


Figura 2. Dominios de la proteína TP53⁷.

Los niveles de TP53 se controlan a través de la E3 ubiquitina ligasa llamada HDM2 (MDM2 en ratón)¹² esta regulación se lleva a cabo mediante su unión directa que neutraliza la actividad de transactivación de p53 y la exportación nuclear y le imprime una marca para su degradación, por la vía de la ruta de la ubiquitinación proteosómica^{13,14}.

Como ya se mencionó, la pérdida de la actividad de p53 como consecuencia de una delección, mutación o de sobreexpresión de HDM2 son las alteraciones más frecuentes en los cánceres humanos. Los tumores que conservan la expresión de p53 de tipo silvestre lo hace accesible a abordajes terapéuticos que lo estabilizan. En este



contexto el sitio de unión entre TP53 y HDM2 es una región de interés primordial en el diseño de nuevas moléculas de tipo peptídico^{15,16}.

Un contribuyente mayor a la inestabilidad del genoma es la pérdida o la mutación de p53, el gen que codifica para el factor de transcripción TP53. Es probable que esta pérdida sea el cambio genético aislado más frecuente en cáncer. Como ya se señaló, el ciclo celular se detiene en células con DNA dañado. Si el daño no es reparable se desencadena apoptosis¹⁷.



1.5. DOMINIO DE UNIÓN DE TP53 A HDM2

En células humanas, la actividad de p53 es normalmente modulada por HDM2, el homólogo de la proteína murina Mdm2. HDM2 se une y bloquea el dominio de transactivación de TP53, para detener la transcripción de los genes blanco de TP53¹⁶. Al menos del 5 al 10% de todos los tumores humanos poseen una sobre expresión de Hdm2. La unión de HDM2 a TP53 reduce la actividad transcripcional de TP53¹⁸.

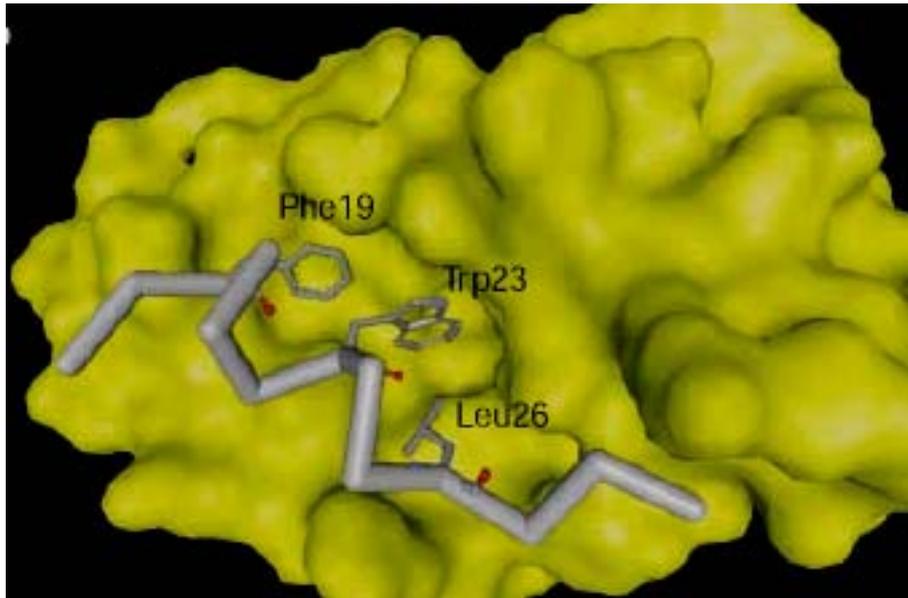


Figura 3. Sitios de unión de TP53 (gris) a hdm2 (amarillo)¹⁹.

La estructura cristalina del residuo amino-terminal 109 del dominio de HDM2 ligado al residuo 15 del dominio de transactivación TP53 revela que HDM2 tiene un lado hidrofóbico en el cuál el péptido TP53 se liga a una α hélice anfipática, el relieve de la interfase de la complementariedad entre HDM2 y la cara hidrofóbica de la α helice de TP53 y en particular, en los aminoácidos fenilalanina, triptófano y leucina que se insertan en el lado de HDM2 (Figura 3)²⁰.



1.6. TERAPIA EN CÁNCER

La radiación y la quimioterapia son ampliamente utilizadas para tratar una variedad de tipos de cáncer. Sin embargo, estos tratamientos matan no solo a las células malignas sino también a las células sanas, dando como resultado efectos graves sobre el organismo. Por ejemplo, en los pacientes con tumores altamente malignos la radiación y la quimioterapia son la única opción. Un beneficio de los estudios de genética molecular es poder correlacionar los cambios genéticos específicos en oncogenes y genes supresores de tumor, con el grado de malignidad y el pronóstico y así usar esta información para un mejor tratamiento⁶.

Actualmente se encuentran en desarrollo nuevas terapias génicas que aprovechan la inducción selectiva de la apoptosis o necrosis. Una estrategia para lograr la selectividad es a través de la entrada específica de moléculas que inducen apoptosis en el tumor²¹.

Algunas líneas de investigación farmacológica, aún en fase de desarrollo, se refieren a la utilización de péptidos de regiones proteicas activas por ejemplo la proteína TP53, con el fin, de que puedan tener efecto supresor tumoral.

1.7. PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Las proteínas y los péptidos son polímeros de aminoácidos en los cuáles las unidades de aminoácidos, llamadas residuos, están enlazadas mediante uniones amida, o uniones peptídicas. Un grupo amino de un residuo forma un enlace amida con el carboxilo de un segundo residuo; el grupo amino del segundo establece un enlace amida con el carboxilo de un tercero, etc (Figura 4).

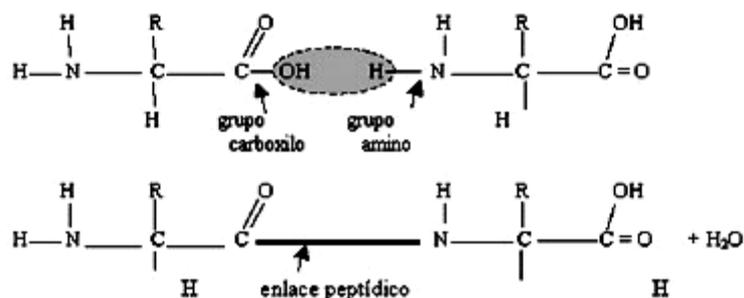


Figura 4. Enlace peptídico²².



Por convención siempre se escriben los péptidos con el aminoácido N-terminal (aquel que tiene libre el grupo amino -NH_2) a la izquierda y el aminoácido C-Terminal (el que tiene libre el grupo -COOH) a la derecha²².

El componente de los péptidos (polipéptidos y proteínas) son los aminoácidos, el esqueleto de un aminoácido consiste en un carbono central (C_α) el cual está unido a un grupo amino (NH_2), a un grupo carboxilo (CO_2H), y a un átomo de hidrógeno (H), el cuarto enlace del carbono central es con la estructura de la cadena lateral (grupo R). Los aminoácidos difieren en la terminación del grupo R^{23} (Figura 5).

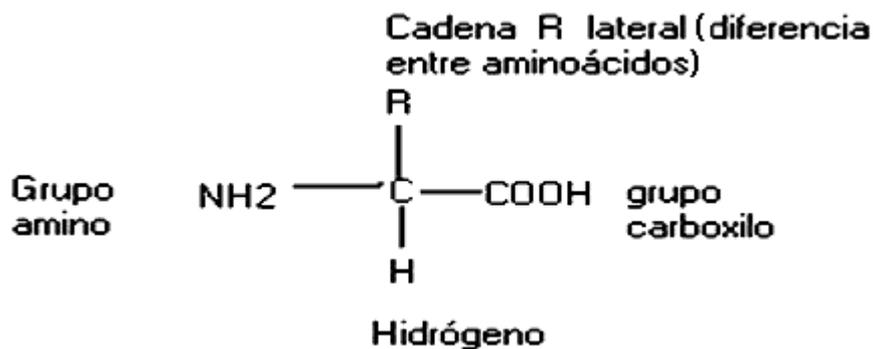


Figura 5. Estructura de un aminoácido.

Las conformaciones de los péptidos incluyen la α -helice, β -plegada, y giros β y γ . La estructura secundaria puede determinarse experimentalmente por espectroscopia y/o técnicas de cristalografía²³.

La estructura plegada final, o conformación, que adopta cualquier cadena polipeptídica es regida por aspectos energéticos: una proteína generalmente se pliega en la forma en la cuál la energía libre disminuye. Cada proteína se pliega normalmente en una única conformación estable. Sin embargo, esta conformación a menudo cambia ligeramente cuando la proteína interactúa con otras moléculas en la célula²².

1.8. PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Los péptidos antimicrobianos son evolutivamente las defensas más antiguas usadas por plantas y animales en sus sistemas inmunes para defenderse de microbios



invasores; tales péptidos interactúan con la bicapa lipídica²⁴. En general, se han utilizado péptidos de tamaños, propiedades y orígenes diversos como drogas terapéuticas. Los péptidos se pueden producir biosintéticamente (por medio de fermentaciones microbianas naturales o recombinantes) la síntesis química, la química cuántica y el modelado molecular posibilitan la modificación química y estructural de dichos péptidos y pequeñas moléculas, que se diseñan con características fisicoquímicas específicas. De forma general, los péptidos con fines terapéuticos proceden de moléculas naturales²⁵ o de diseños *de novo*^{26,27}.

Los péptidos desempeñan diversos papeles fisiológicos, estos mecanismos de acción y las funciones biológicas han sido tema de investigación de la biología celular y molecular, incluyendo investigaciones en farmacología y bioquímica. Un gran número de compañías farmacéuticas y firmas de biotecnología han logrado avances en el descubrimiento y desarrollo de péptidos recombinantes o sintéticos, para numerosas aplicaciones médicas. Con respecto a los péptidos sintéticos y el descubrimiento de drogas no peptídicas, la integración del diseño de una droga usando espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), cristalografía de rayos-X, química computacional y otros métodos biofísicos han sido útiles para proporcionar datos para conocer la relación estructura-actividad y poder relacionarlo con las propiedades biológicas necesarias para diseñar una droga selectiva, metabolitamente estable, que actúe sin daños²³.

1.8.1. PÉPTIDOS ANTICANCERIGENOS

Los péptidos con acción anticancerígena se han dividido en aquellos que inducen necrosis (membranolíticos), los que conducen a la activación de las rutas apoptóticas y los que bloquean funciones específicas en las células neoplásicas; en estos últimos se encuentran los que interactúan con receptores, los que se unen a proteínas de adhesión celular, los inhibidores de las proteínas cinasas, así como aquellos con propiedades antiangiogénicas y los que tienen actividad inmuno estimuladora²⁸.

Se han probados péptidos sintéticos derivados de la región amino terminal de TP53 por sus efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer de mama²⁹.

Tres péptidos llamados PNC-27, PNC-21 y PNC-28 del dominio de unión MDM-2 de TP53 son citotóxicos en varias líneas celulares cancerosas pero no en líneas celulares normales, induciendo necrosis membranólítica rápida. El péptido PNC-27 presenta citotoxicidad selectiva para células transformadas, pero no se sabe a través de que mecanismo se lleva a cabo³⁰.



Estudios de RMN han demostrado que en medio acuoso se presentan dos estructuras: una contiene tres hélices alfa unidas por estructuras en asa por lo que adquiere la forma de S y otra es una estructura menos helicoidal. En una solución que simula el ambiente de la membrana, aumenta la longitud de los dominios helicoidales que se observan en el medio acuoso formando tres tipos de estructuras, que generan un ensamblaje de tipo hélice-U-vuelta-hélice. En ambos sistemas de solventes, este péptido forma las estructuras anfipáticas de tal manera que sus residuos hidrofóbicos se unen en una cara mientras que los residuos polares se agregan en la cara opuesta³¹.

El péptido PNC-27 está constituido por los aminoácidos PPLSQETFSDLWKLL. Por lo tanto el péptido *PNC-27* tiene alta eficiencia y especificidad para destruir células neoplásicas, así como baja toxicidad en células sanas. PNC-27 deriva del sitio de unión de las proteínas TP53 y HDM2. El péptido PNC-28 es un péptido del dominio de unión a Hdm2, abarca los residuos del 17-26 ETFSDLWKLL que es citotóxico para las células cancerígenas. Estudios en líneas celulares de cáncer de mama utilizando PNC-27 y PNC-28 indican que ambos péptidos inducen necrosis total rápida (en 1 hora) en un número de líneas celulares de cáncer de mama, pero sin afectar a las células no transformadas³². Además se ha observado que péptidos sintéticos derivados de la región C-terminal (residuos 361 al 380 de p53) inducen apoptosis en células con cáncer de mama y péptidos derivados de la región N-Terminal (residuos 12-26 de p53) induce necrosis en células pancreáticas con cáncer³³.

A diferencia de la terapia tradicional del cáncer en donde se induce apoptosis en las células en división, los péptidos en estudio producen rápida muerte celular por necrosis en algunas líneas de células tumorales²⁹. Recientemente el uso de péptidos sintéticos en la terapéutica del cáncer ha llegado a ser muy utilizado, debido a su potencial, su especificidad y toxicidad baja¹⁵.



1.9. PÉPTIDOS MEMBRANOLÍTICOS Y MEMBRANA CELULAR

Los péptidos con secuencias cortas, compuestas en su mayoría de aminoácidos cargados positivamente, tienen mayor habilidad no solo de transportarse ellos mismos a través de la membrana celular, si no también de transportar a moléculas unidas³⁴(Figura 6). Por lo que juega un papel importante la interacción iónica entre los residuos cargados positivamente y la carga negativa de la cabeza del grupo fosfato de la bicapa lipídica³⁵.

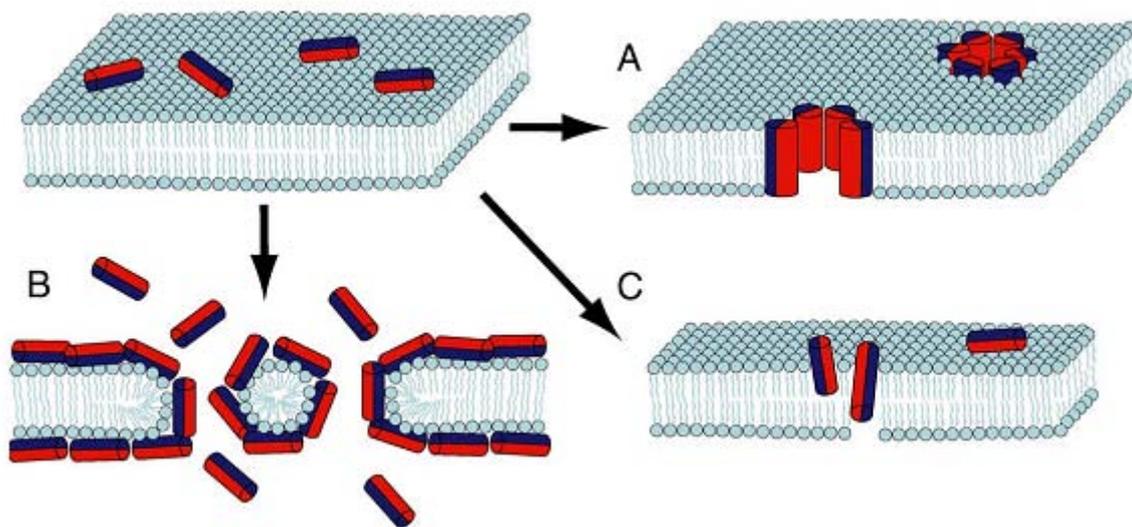


Figura 6. Modelo de la asociación de péptidos con la membrana celular, la región roja del péptidos representa la superficie hidrofílica y mientras la azul es hidrofóbica . (A) En el modelo de barril, los péptidos abarcan la membrana y forman una línea de poros con los péptidos. (B) El modelo de alfombra se caracteriza por el forro de los péptidos en paralelo a la superficie de la membrana; esto es inducido por los péptidos que causan la formación de poros. (C) El modelo del poro toroidal crea poros que contienen péptidos, así como moléculas de lípidos que son curvados hacia el interior hacia el poro de manera continua desde la superficie de la membrana³⁴.

El modelo más aceptado para las membranas es el de mosaico fluido que propone que los lípidos están en constante movimiento, deslizándose a gran velocidad. Aunque los lípidos se mueven libremente dentro de su propia capa de la bicapa, no pueden cruzar con facilidad o pasar a la otra capa lipídica³⁴. Las bicapas lipídicas se componen de fosfolípidos que tienen como constituyente principal a los ácidos grasos. Las moléculas de proteínas están adheridas a la masa de los lípidos en movimiento, algunas moviéndose y otras aparentemente ancladas en un sitio. Las proteínas periféricas se encuentran superpuestas en uno y otro lado de la bicapa lipídica. Las



proteínas integrales pueden estar parcialmente embebidas en un lado de la bicapa o atravesándola totalmente. Muchas proteínas integrales son glicoproteínas. La porción de carbohidratos de las glicoproteínas embebidas están en la superficie de la bicapa donde sus grupos OH pueden formar un puente de hidrógeno con el agua. Esto asegura una interacción favorable de la proteína con las colas hidrofóbicas lipídicas de la bicapa. Los poros aparecen a nivel de los ejes centrales de las proteínas integrales. La bicapa lipídica representa el elemento fundamental de la estructura de la membrana celular. Los lípidos presentes en las membranas celulares combinan dos propiedades muy diferentes en una misma molécula: cada lípido posee una cabeza hidrófila (que atrae el agua) y una o dos colas hidrocarbonadas hidrófobas (que repelen el agua)²².

Los péptidos membranolíticos son un grupo de péptidos que lisan las membranas celulares e inducen necrosis; ellos son una nueva clase de agentes anticancerígenos, por lo que su potencial es muy amplio. El exterior de las membranas de las células cancerosas sobreexpresan fosfatidilserina y mucinas O-glicosiladas ambas cargadas negativamente, lo que le confiere una gran carga negativa total en comparación a las células sanas. Esto favorece que péptidos cargados positivamente (catiónicos) ataquen selectivamente a las membranas más negativas lo que les confiere un mayor grado de selectividad para las células neoplásicas en relación a las drogas quimioterapéuticas tradicionales. Otra ventaja es que pueden matar a las células quimioresistentes, ya que la lisis de membranas es independiente del estado proliferativo de las células blanco y de los mecanismos celulares de multidrogoresistencia²⁸.



1.10. MÉTODOS QUÍMICO-CUÁNTICOS COMPUTACIONALES

Las mejoras en los métodos químico-cuánticos computacionales han permitido ampliar sus aplicaciones a los problemas biológicos. El incremento rápido en la capacidad computacional de los métodos teóricos además de los programas computacionales han conducido al aumento significativo del uso de la química computacional en la última década, para resolver problemas biológicos específicos. Los resultados de estos cálculos se pueden entonces utilizar para investigar directamente procesos bioquímicos (vía un modelo del sistema) con un costo de cómputo mucho más bajo³⁶. Para lograr los objetivos de este trabajo fue necesario aplicar métodos de cálculo de la estructura electrónica. A continuación se presentarán brevemente los fundamentos teóricos de las metodologías utilizadas en este trabajo.

1.11. MÉTODOS DE ESTRUCTURA ELECTRÓNICA

De acuerdo con la mecánica cuántica, la energía y las propiedades de un átomo o molécula pueden ser obtenidas mediante la ecuación de Schrödinger. El tratamiento práctico de la ecuación para otros sistemas se hace a través de los llamados métodos de estructura electrónica, los cuáles se caracterizan por las diferentes aproximaciones matemáticas involucradas en su solución. Existen dos métodos importantes para estudiar la estructura electrónica:

Métodos semiempíricos. Los cálculos semiempíricos emplean generalmente un Hamiltoniano más simple que el Hamiltoniano molecular correcto e incorporan en las ecuaciones datos experimentales o parámetros que pueden ser ajustados con datos experimentales; métodos tales como AM1, MINDO/3 y PM3, que han sido incorporados en programas comerciales conocidos como MOPAC, AMPAC y GAUSSIAN. Ya que resuelven de manera aproximada la ecuación de Schrödinger la cual depende de parámetros apropiados disponibles para el tipo de sistema bajo estudio. Los métodos semiempíricos generan información cualitativa razonable sobre ciertos sistemas moleculares, sin embargo, existen métodos más precisos para predecir la energía o las estructuras de sistemas complejos.

Métodos *ab initio*. A diferencia de los métodos semiempíricos, en los métodos *ab initio* se emplea el Hamiltoniano adecuado para el sistema, resolviendo la ecuación de Schrödinger sin emplear datos experimentales. Estos cálculos se basan solamente en



los postulados de la mecánica cuántica y en valores de constantes físicas. Por ello los métodos *ab initio* permiten encontrar mejores soluciones de la ecuación de Schrödinger^{36,37,38}.

Los cálculos de estructura electrónica de átomos y moléculas, ya sean de tipo *ab initio* o semiempíricos, tienen una gran aplicación ya que proporcionan información acerca de las estructuras y estabildades relativas. Estos cálculos se están empleando cada vez más para describir mecanismos de reacciones químicas, ya sea examinando la estructura y las energías relativas de los estados de transición de una gran cantidad de reacciones, o indirectamente de los reactivos. Asimismo, diversas técnicas de similitud molecular están siendo utilizadas por compañías farmacéuticas en el diseño y caracterización de biomoléculas con presunta actividad biológica³⁶.

Es importante mencionar que los métodos de estructura electrónica fueron inicialmente desarrollados para describir propiedades de moléculas en fase gas, sin embargo, existen diversos modelos actualmente que toman en cuenta el efecto del solvente.

Los métodos *ab initio* se apoyan en conjuntos de funciones de base que tienen particularidades de cálculo. No existe un conjunto de base que sirva de manera universal, dependiendo del tipo de molécula y de las propiedades a estudiar, será la base requerida³⁷.

El método HF es un método *ab initio* que refiere sus cálculos exclusivamente a las leyes de la mecánica cuántica y requiere de algunas constantes físicas como el valor de la masa, carga del núcleo y los electrones, sin emplear datos experimentales, usando rigurosas aproximaciones matemáticas. Estos cálculos proporcionan información acerca de las estructuras, estabildades relativas y otras propiedades³⁶. Para corroborar que teníamos el mínimo global de energía de cada péptido y no se tenían frecuencias imaginarias se realizaron los cálculos de frecuencia.

1.12. CONJUNTOS DE BASE

La mayor parte de los cálculos moleculares comienzan con la elección de las funciones de base. Tomando en cuenta que los orbitales moleculares se expresan como una combinación lineal de dichas funciones, por lo que su elección resulta fundamental. Dada la imposibilidad de utilizar un conjunto infinito de funciones de base (como se requeriría para obtener la solución exacta dentro del procedimiento escogido), en la práctica se utilizan conjuntos finitos de funciones de base normalizadas. Dos son los principales tipos de funciones de base empleadas:

a) Funciones de Slater (STO, orbitales de tipo Slater).



Fueron las primeras que se utilizaron para desarrollar los orbitales atómicos 1s, 2p, 3d. Estas funciones presentan un gran inconveniente: son muy poco manejables, dado que no permiten una resolución analítica y rápida de las integrales.

b) Funciones Gaussianas (GTO, orbitales de tipo gaussiana).

Los conjuntos de base mínima contienen el número mínimo de funciones de base requeridas para cada átomo. Estos conjuntos usan orbitales de tipo atómico de tamaño fijo. La base STO-3G es la mínima base posible y usa tres gaussianas primitivas por función, lo que se representa por 3G en su nombre y la base STO-3G aproxima orbitales de tipo Slater con funciones gaussianas.

Las funciones de bases usadas para representar la región de valencia son sumas de funciones base para cada subcapa. Por ejemplo la base 3-21G, usa tres funciones Gaussianas agrupadas en dos Gaussianas, la primera es la suma de dos funciones y la restante es una función directa³⁷. ver Tabla 1.

Tabla1. Conjunto de bases³⁶.

Conjunto de Base	Características
STO-3G	Base mínima, se utiliza principalmente para obtener resultados cualitativos en sistemas muy grandes cuando no puede permitirse siquiera 3-21g.
3-21G(d)	Se utilizan dos conjuntos de funciones en la región de valencia, para proporcionar una representación más precisa de orbitales. Se usa en moléculas de gran tamaño para las cuales utilizar el conjunto de base 6-31G(d) es más costoso.
6-31G(d)	Añade funciones de polarización para átomos pesados; se utiliza normalmente para sistemas medianos, este conjunto de base utiliza funciones de tipo "d" de 6 componentes.

1.13. TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD (TFD)

Esta es una tercera clase de método de cálculo de estructura electrónica, y es similar a los métodos *ab-initio* en muchas formas pues requiere fuentes similares de cálculo a la teoría Hartree-Fock, y tiene un costo computacional cercano, pero menor, a los métodos *ab-initio*.



En 1964, Pierre Hohenberg y Walter Kohn probaron que para moléculas con un estado fundamental no degenerado, la energía molecular, la función de onda y todas las demás propiedades electrónicas están determinadas unívocamente por la densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental. La energía del estado fundamental E_0 es un funcional de ρ_0 y se escribe como $E_0 = E_0[\rho_0]$, donde los corchetes denotan la relación funcional. La TFD calcula E_0 y otras propiedades moleculares del estado fundamental a partir de la densidad electrónica del estado fundamental ρ_0 .

El objetivo de la TFD es designar funcionales que relacionan la densidad electrónica con la energía; todos los términos, excepto la repulsión núcleo-núcleo son funciones de ρ_0 . La energía funcional puede ser dividida en tres partes: energía cinética $T[\rho]$, atracción entre núcleos y electrones $E_{me}[\rho]$, y repulsión electrón-electrón $E_{ee}[\rho]$, mientras la repulsión núcleo-núcleo es una constante en la aproximación de Born-Oppenheimer. La TFD tiene un costo computacional similar al requerido por la teoría de Hartree-Fock, con la posibilidad de proveer resultados más exactos. Becke formuló funcionales híbridos a partir de las expresiones del intercambio en Hartree-Fock y TFD. Siendo el funcional híbrido que se utiliza en este estudio B3LYP³⁹.

Dentro del marco de la teoría de funcionales de la densidad se ha desarrollado un formalismo que permite determinar a partir de los parámetros obtenidos del cálculo propiedades como potencial de ionización (I), afinidad electrónica (A), electronegatividad (χ) y dureza (η); entre otras, las cuales permiten establecer la reactividad de los sistemas moleculares (propiedades globales)³⁹.

1.14. DESCRIPTORES

Los métodos cuánticos y las técnicas de modelación molecular permiten definir parámetros moleculares globales y locales para caracterizar la reactividad química, forma y propiedades de unión de una molécula completa así como de fragmentos moleculares.

Los descriptores químico-cuánticos globales utilizados fueron: la dureza, potencial de ionización, índice de electrofilicidad. A continuación se describen los descriptores utilizados en el presente trabajo.



1.14.1. DUREZA (η)

La dureza se interpreta como la resistencia al cambio del potencial químico, cuando se varía el número de electrones del sistema por lo que es la variación en la energía cuando un electrón es adicionado o removido del sistema³⁹. El incremento de la dureza como una medida del movimiento de un sistema hacia configuraciones más estables, es útil para analizar las interacciones entre diferentes especies químicas. En el contexto de la teoría de los orbitales moleculares, la dureza global puede explicarse considerando la Fórmula 1.

$$\eta \approx \frac{1}{2}(I - A) \approx \frac{1}{2}(\mathcal{E}_{LUMO} - \mathcal{E}_{HOMO}) \quad (1)$$

1.14.2. POTENCIAL DE IONIZACIÓN (I)

Es la energía necesaria para separar el electrón más externo de una molécula en fase gaseosa. (Formula 3)³⁹. Los descriptores se calcularon con los valores de los orbitales moleculares frontera (HOMO, LUMO), y se aplicó el Teorema de Koopmans para moléculas de capa cerrada; se determinaron la dureza, el potencial de ionización y el potencial químico de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\mu \approx -\frac{1}{2}(I + A) \approx \frac{1}{2}(\mathcal{E}_{HOMO} + \mathcal{E}_{LUMO}) \quad (2)$$

En donde

$$I \approx -\mathcal{E}_{HOMO} \quad \text{y} \quad A \approx -\mathcal{E}_{LUMO}$$

Donde I es el potencial de ionización y A es la afinidad electrónica de las moléculas. La afinidad electrónica se refiere a la capacidad de un ligando para aceptar a un electrón desde una molécula donadora.



1.14.3. INDICE DE ELECTROFILICIDAD (ω)

Además, el índice de electrofilicidad se calculará de acuerdo a Parr *et al.*⁴⁰, el cual se toma como una medida de la minimización de energía debido a un flujo máximo de electrones entre el donador y el aceptor y se calcula de la siguiente manera:

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (3)$$

Esta ecuación nos indica que cuando dos moléculas reaccionan, actuarán como nucleófilo o electrófilo de acuerdo a si su ω es más alto o más bajo. Este índice de reactividad mide la minimización de la energía cuando el sistema adquiere una carga adicional del ambiente (ΔN). La electrofilicidad es un descriptor de reactividad que permite una clasificación cuantitativa de la naturaleza electrofílica global de una molécula en una escala relativa³⁹.

1.15. COEFICIENTE DE PARTICIÓN OCTANOL/AGUA (LogP)

El término lipofílico literalmente significa amante del aceite, y la lipofilidad es la medida del grado en que una molécula dada prefiere un ambiente no polar (hidrofóbico) antes que un ambiente acuoso.

La medida experimental más comúnmente utilizada de la lipofilidad es el logaritmo del coeficiente de partición de un soluto distribuido entre agua y algún solvente orgánico, tal como el 1-octanol o cloroformo. Ésta medida, abreviada como log P, ha sido medida experimentalmente para un gran número de compuestos orgánicos y frecuentemente se emplea como sinónimo de índice de lipofilidad. La expresión que representa la lipofilidad es:

$$\log P = \log_{10} \frac{[(S)]_{org}}{[(S)]_{aq}}$$

El coeficiente de partición octanol/agua ($\log P_{ow}$) ha sido la medida de lipofilidad elegida en el desarrollo de moléculas activas biológicamente, para las cuales el transporte a través de las membranas biológicas es generalmente crítico. Además es



el parámetro físico-químico más utilizado para definir la lipofilicidad de compuestos en los estudios estructura-actividad.

Es prácticamente imposible medir el log P para todos los compuestos químicos existentes, y la habilidad para predecir éste valor para compuestos aún no sintetizados podría ser de suma utilidad. Bajo éstas condiciones varios modelos teóricos han sido propuestos y usados para calcular el log P_{ow} . Sin embargo éstas aproximaciones trabajan muy bien para compuestos simples, pero presentan limitaciones para compuestos complejos que persisten aún si se introduce un factor de corrección. Esto impulsó a Basak y colaboradores a desarrollar modelos para la predicción del log P_{ow} usando parámetros que pueden ser calculados directamente a partir de la estructura del compuesto⁴¹.

Se han investigado estructuras peptídicas con métodos *ab initio* representando una buena herramienta para el análisis y modificación de las moléculas gracias a estos métodos⁴².

Por lo tanto se realizó el análisis de tres péptidos prototipo cuya secuencia corresponde a algunos de los residuos del dominio de unión de TP53 a HDM2, que han sido generados a partir de cálculos teóricos previos⁴³.



2. ANTECEDENTES.

- En el 2001, Kanovsky y colaboradores³⁰ sintetizaron y caracterizaron la estructura mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de tres péptidos que derivaron del dominio de unión de TP53 con su regulador negativo HDM2. En 2003 Do y Cols.²⁹ y en 2004 Rosal y Cols.³¹ trabajaron los péptidos antes mencionados, en diferentes líneas celulares transformadas y probaron sus efectos antiproliferativos, determinando que provocan muerte celular necrótica selectiva, en lugar de apoptosis, en algunas líneas celulares de cáncer de mama.
- En el 2005 y 2006 los grupos de Rosal y Chi^{33,44} han continuado con el estudio de péptidos derivados de TP53, tanto del extremo amino como del carboxilo terminal; y a nivel experimental en líneas celulares y en ratones, han demostrado resultados prometedores para la terapéutica del cáncer empleando péptidos membranolíticos.
- Recientemente Barrientos-Salcedo y Cols. en el 2007⁴³ realizaron un análisis sobre la estructura electrónica y propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos 12 al 26 de TP53, lo que permitió que se generara la familia de péptidos de la cual trata esta tesis.



3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer constituye un problema importante de salud pública, ya que es la segunda causa de mortalidad, después de las enfermedades cardiovasculares^{1,2}. A pesar de que existen buenos esquemas terapéuticos, no tienen la eficacia que se espera en muchos casos. Sin embargo, el mayor conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos tumorales está permitiendo identificar un mayor número de blancos para nuevos fármacos y consolidar las nuevas terapias biológicas, aunque por ahora, se requiere continuar con el uso de la quimioterapia clásica. En este sentido, la química computacional es una herramienta utilizada porque permite el diseño y la modificación dirigida de las moléculas terapéuticas. Un primer paso en la aplicación de los métodos computacionales. Y la metodología elegida para realizar un estudio encaminado a caracterizar la estructura electrónica, es el análisis empleando métodos químico-cuánticos computacionales, debido a que resulta ser un abordaje más específico si se requiere de la modificación a nivel de átomos en las moléculas, ya que tiene menos aproximaciones que los métodos de modelado molecular. Cabe mencionar que existen informes en los que empleando esta metodología se ha podido encontrar el grupo farmacóforo y potenciar la actividad de otro tipo de péptidos⁴⁵.

A la química computacional también se le puede utilizar como herramienta predictiva, ya que permite “experimentar” con una molécula, conocer muchas de sus propiedades sin necesidad de sintetizarla y que éste directamente sintetice y analice aquella que más le interese, ahorrándole tiempo y dinero. Asimismo, la química teórica aborda muchas líneas de investigación pertenecientes a distintos campos de la química, como al modelado de moléculas bioactivas que puedan tener aplicaciones de tipo farmacológico⁴⁶.

Destacando que el objetivo de esta tesis, no es restablecer la función de p53, sino estudiar desde el punto de vista de reactividad química, a tres miembros de una familia de péptidos derivados de la proteína TP53 con la finalidad de seleccionar el mejor candidato para realizar futuros estudios experimentales.



4. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL:

- Describir la estructura electrónica y las propiedades fisicoquímicas de péptidos derivados de TP53 con posible actividad antitumoral, empleando métodos computacionales de química cuántica.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener la estructura de mínima energía de cada uno de los péptidos con el método Hartree-Fock, con el conjunto de base 3-21G(d).
- Calcular algunos descriptores químico-cuánticos de la densidad de carga y las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los péptidos.
- Determinar los sitios de interacción más importantes dentro del contexto de la reactividad química de cada uno de los péptidos.



5. HIPÓTESIS

- Los métodos químico cuánticos computacionales permitirán caracterizar la estructura electrónica de péptidos derivados de TP53.



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS MOLÉCULAS EN ESTUDIO.

En un estudio previo, se construyeron secuencias peptídicas con posible actividad antitumoral, de estas secuencias se seleccionaron tres (pep1A, de seis aminoácidos; pep2A, también de seis aminoácidos; pep10A, de nueve aminoácidos y pep0R, de 10 aminoácidos como grupo control) para la realización de esta tesis. Los aminoácidos que constituyen a estos péptidos forman parte del dominio de unión de la proteína TP53 a HDM2. Los criterios de diseño se basaron en sus características estructurales; tales como conservar al menos una hélice alfa, ser anfipáticos y tener un cierto grado de lipofilidad.

6.2. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA

Para cada una de las estructuras moleculares seleccionadas, se realizó la búsqueda de la estructura geométrica de mínima energía y los cálculos de la estructura electrónica de los péptidos se realizaron con el método Hartree-Fock a nivel 3-21G(d) con el paquete computacional Gaussian 03.

6.3. CÁLCULOS PUNTUALES.

A cada una de las estructuras optimizadas y después de haber realizado los cálculos de frecuencia, se efectuaron los cálculos puntuales de cada uno de los péptidos para obtener cada uno de los descriptores mecánico cuánticos seleccionados como potencial de ionización, índice de electrofilicidad y dureza; con el funcional híbrido de la Teoría de Funcionales de la Densidad (TFD) a nivel 6-311G(d,p).

La dureza y el índice de electrofilicidad se calcularon mediante la aproximación de diferencias finitas, la cuál es definida como:

$$\eta = \chi \quad \text{y} \quad \omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$$

De acuerdo con el teorema de Koopmans⁴⁷ para especies de capa cerrada, $A \approx -\mathcal{E}_{LUMO}$, que indica la afinidad electrónica y $I \approx -\mathcal{E}_{HOMO}$, corresponde al



potencial de ionización de las moléculas. Estos valores se obtienen a partir de los valores propios de los orbitales frontera HOMO y LUMO.

Todo lo anterior permitió obtener la estructura electrónica, los parámetros estructurales y las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los péptidos en estudio.

Los cálculos teóricos se realizaron en un equipo de cómputo de alto rendimiento. La visualización de las geometrías y la visualización de los orbitales moleculares frontera (HOMO-LUMO) se realizó en computadoras PC. Los cálculos teóricos se realizaron con el paquete computacional Gaussian `03⁴⁸. Con una computadora personal se realizó el enlace a estos equipos, utilizando el programa SSH Secure Shell 3.2.9. La visualización de las geometrías se realizó con los programas Spartan '06 V1.1.0, Gauss View 2.1, Moldraw 2.0 Ver. H1 (32-Bit) y ACD/CCChemSketch Ver. 10.02 estos tres últimos son programas libres (Ver Apendice III).



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados sobre la caracterización de la estructura electrónica de péptidos derivados de TP53. Como se mencionó en la metodología, el primer paso fue la optimización de las estructuras de cada péptido. De ellas se obtuvieron las cargas atómicas derivadas del potencial electrostático; estas cargas se analizaron sumando todos los átomos de un aminoácido (carga total) y también átomo por átomo de cada aminoácido (carga puntual), de aquí se obtuvieron además los valores de los orbitales moleculares frontera y sirvió de base para realizar los cálculos puntuales.

7.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS GEOMETRÍAS

A partir de la secuencia conocida del dominio de unión de TP53 a HDM2, se generaron 4 péptidos; A cada una de estas estructuras se le realizaron los cálculos de optimización de la geometría; para ello se empleó el método Hartree-Fock (HF) con los conjuntos de base STO-3G y 3-21G(d).

En cada cálculo los valores de energía fueron disminuyendo, y como ya se mencionó la estructura de menor energía por ser la más relajada, se ha propuesto pueda ser la biológicamente activa²². Las figuras 7, 8, 9 y 10 muestran las estructuras optimizadas con HF 3-21G(d) que fue la base más alta empleada. Si se sigue aumentando la base, es posible obtener una estructura con menor energía, sin embargo en esta tesis se consideró emplear la base 3-21G(d) debido a que las estructuras tienen una mayor cantidad de átomos (tamaño de las moléculas), que requieren mayor capacidad de cómputo.

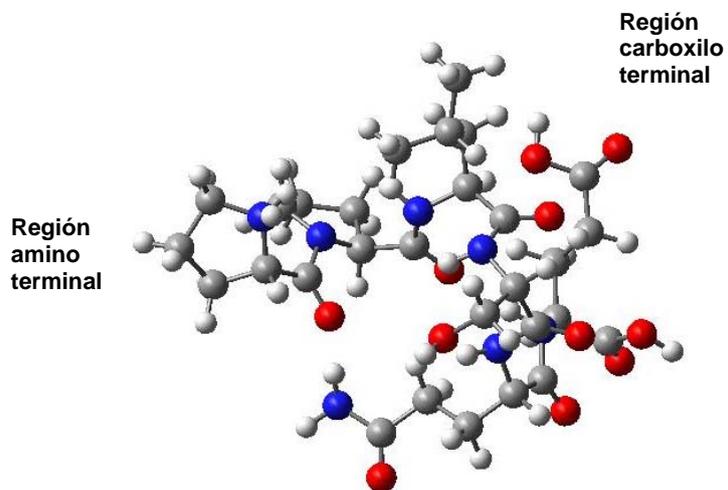


Figura 7. Estructura optimizada de pep1A con la base HF/3-21G(d).

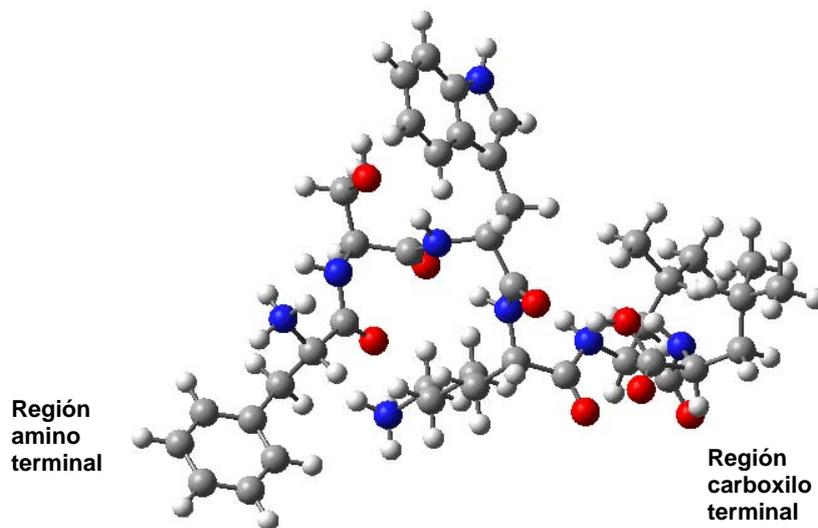


Figura 8. Estructura optimizada de pep2A con la base HF/3-21G(d).

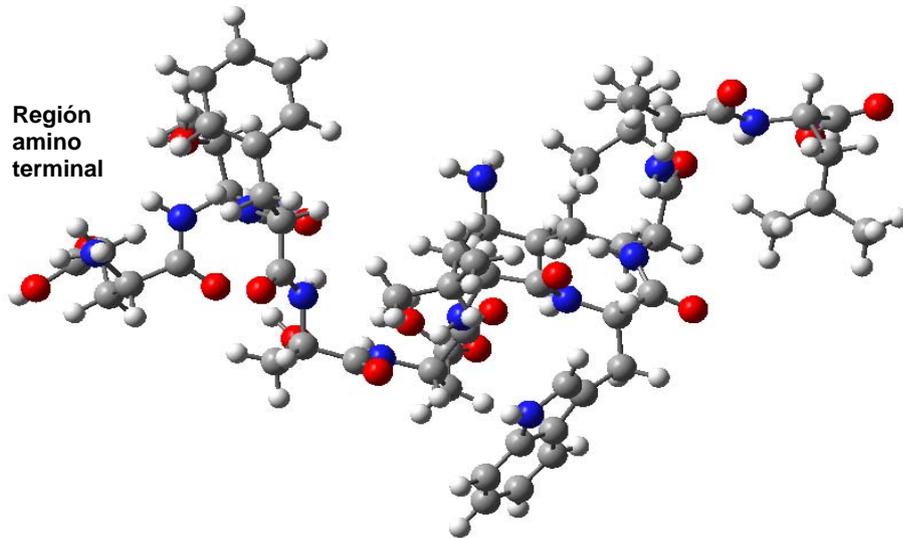


Figura 9. Estructura optimizada de pep0R con la base HF/3-21G(d).

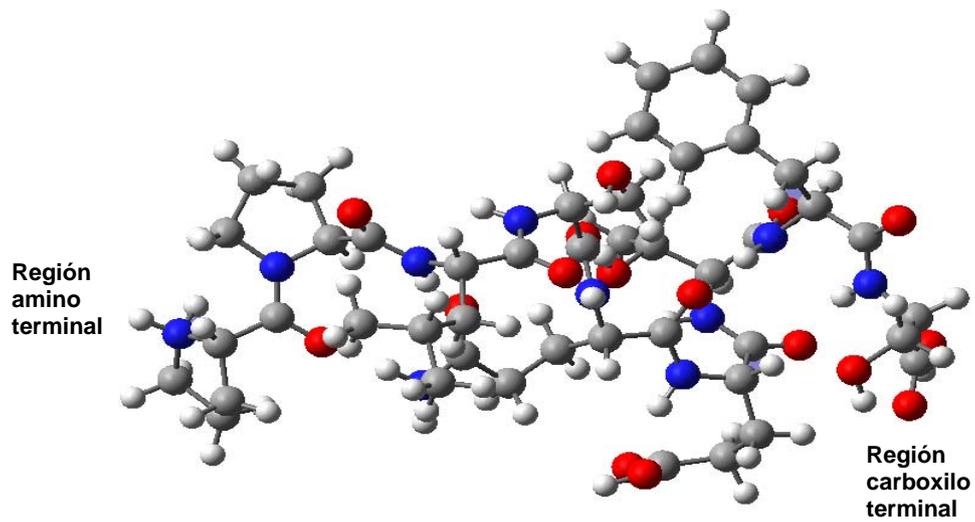


Figura 10. Estructura optimizada de pep10A con la base HF/3-21G(d).



7.2. ANÁLISIS DE CARGAS ATÓMICAS

Debido a que la actividad biológica de una molécula depende de la naturaleza química del componente (propiedades fisicoquímicas y estructura electrónica)⁴⁹ se planteó el estudio de las propiedades electrónicas de péptidos con probable actividad antitumoral. Por lo que a cada una de las estructuras optimizadas y después de haber realizado los cálculos de frecuencia, se efectuaron los cálculos puntuales de cada uno de los péptidos. Y finalmente se obtuvieron las cargas atómicas derivadas del potencial electrostático de cada uno de los átomos de los aminoácidos que forman a los péptidos estudiados (pep1A, pep2A, pep10A y pep0R).



7.2.1. CARGAS ATÓMICAS DE pep1A.

En la Tabla 2 se muestran las cargas más relevantes de cada aminoácido del pep1A.

Se destaca de esta tabla que la carga total de los aminoácidos P12 y E17 poseen las cargas más negativas; estos resultados sugieren que en pep1A la prolina (P12) y el ácido glutámico (E17) son más susceptibles a ataques electrofílicos, recordando que un electrofilo es pobre en electrones y puede formar enlaces aceptando un par de electrones de un nucleófilo⁵⁰.

En este sentido el aminoácido S15 tiene valores de carga positiva más alta comparada con los aminoácidos restantes en pep1A, ello le confiere características electro-atractoras al ser una molécula rica en electrones y por tanto podrían ocurrir en este aminoácido ataques nucleofílicos.

A sí mismo los valores de las cargas atómicas también se analizaron a nivel de cada átomo, para conocer la naturaleza nucleofílica o electrofílica de los sitios puntuales. En este sentido, los átomos de nitrógeno de los aminoácidos P12 (N₃) y Q16(N₇₇) de pep1A poseen cargas negativas mayores de los grupos amida, esto sugiere que entre más negativos son los átomos de nitrógeno, están más expuestos a ataques electrofílicos en estos átomos debido a su basicidad.

Referente a los grupos carbonilo se observa que los átomos de oxígeno de los aminoácidos P12 (O₁₁) y E17(O₈₄,O₉₃) tienen cargas más negativas con respecto al resto de sus análogos; por lo tanto pueden ocurrir los ataques electrofílicos en estos sitios. Mientras que se observó que átomos de carbono del carbonilo de los aminoácidos S15(C₅₂), Q16(C₇₃) y E17(C₇₈, C₉₀) poseen las cargas más positivas comparadas con el resto de los átomos, por lo tanto, los ataques nucleofílicos pueden ocurrir en estos lugares.



Tabla 2. Cargas de algunos átomos seleccionados y de los aminoácidos de pep1A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).

P12	P13	L14	S15	Q16	E17
Prolina	Prolina	Leucina	Serina	Glutamina	Glutámico
-0.101	0.111	-0.043	0.112	-0.008	-0.071
Sitios Puntuales					
N₃	C₂₃	O₃₆	C₅₂	C₆₃	C₇₈
-0.779	0.439	-0.522	0.638	0.561	0.645
O₁₁	O₂₉	C₃₈	O₅₅	C₇₃	O₈₄
-0.633	-0.532	0.460	-0.544	0.687	-0.625
		C₄₃	O₅₆	O₇₆	C₉₀
		-0.366	-0.583	-0.561	0.667
			H₆₀	N₇₇	H₉₁
			0.376	-0.844	0.446
				H₈₁	O₉₃
				0.389	-0.592



7.2.3. CARGAS ATÓMICAS DE pep2A

En la Tabla 3, se muestran las cargas puntuales del péptido pep2A; aquí se observa que el aminoácido F19 tiene valores de la carga total positiva más alta comparada con los restantes aminoácidos; mientras que el aminoácido K24 posee cargas negativas mayores, esto concuerda con la carga negativa total del aminoácido, de ahí sus propiedades atractoras al ser sustancias ricas en electrones; por lo tanto en el aminoácido pueden ocurrir ataques nucleofílicos.

De acuerdo a el análisis de las cargas atómicas de los grupos amida, se observó la naturaleza nucleofílica o electrofílica de los sitios puntuales de pep2A, la cuál muestra que los átomos de nitrógeno de los aminoácidos F19(N1), W23(N31) y K24(N43,N81) poseen las cargas negativas mayores, por lo que estos átomos están más expuestos a ataques electrofílicos.

Referente a los grupos carbonilo se observa que los átomos de oxígeno de la serina S20(O27 y O28), tiene cargas más negativas, por lo tanto también pueden ocurrir ataques electrofílicos en estos sitios. Por otro lado los átomos de carbono de los aminoácidos S20 (C21) y L26(C100) poseen cargas positivas mayores comparadas con el resto de los átomos, por lo tanto pueden ocurrir ataques nucleofílicos en estos sitios.



Tabla 3. Cargas atómicas de algunos átomos seleccionados y de los aminoácidos de pep2A a nivel B3LYP/6-311Gd//HF/3-21G(d).

F19	S20	W23	K24	L25	L26
Fenilalanina	Serina	Triptófano	Lisina	Leucina	Leucina
0.070	0.021	0.029	-0.114	0.006	-0.012
Sitios Puntuales					
N₁	C₂₁	N₃₁	N₄₃	C₇₆	C₁₀₀
-0.858	0.677	-0.638	-0.673	0.468	0.640
H₃	O₂₇	C₃₆	H₄₇	O₈₂	O₁₀₃
0.338	-0.567	0.554	0.385	-0.530	-0.517
C₅	O₂₈	O₃₉	O₅₉	C₈₄	O₁₀₄
0.485	-0.567	-0.542	-0.537	0.482	-0.527
		H₅₅	N₈₁		H₁₁₁
		0.368	-1.067		0.399



7.2.4 CARGAS ATÓMICAS DE pep0R

El péptido pep0R está constituido por los aminoácidos E17, T18, F19, S20, D21, L22, W23, K24, L25 y L26 de la región amino terminal de la proteína TP53. Se tomó como péptido de referencia debido a que presenta actividad membranolítica en diferentes líneas celulares cancerosas y tiene poca citotoxicidad en células sanas.

En la Tabla 4 se presentan las cargas atómicas de este péptido (pep0R); se observa que los aminoácidos S20 y L26 poseen las cargas totales más negativas lo que indica que son aminoácidos con sitios reactivos importantes para que se puedan llevar a cabo ataques electrofílicos. Además, T18 y D21 tienen valores de cargas totales más positivas por lo que pueden ocurrir ataques nucleofílicos en estos aminoácidos.

Respecto al análisis de los valores de las cargas puntuales, los sitios más expuestos a ataques electrofílicos se localizan sobre los átomos de nitrógeno de los grupos amida de los aminoácidos E17(N₁), F19(N₂₈), K24(N₁₄₃) poseen las cargas más negativas.

En este péptido las cargas más negativas que se observan en los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de los aminoácidos son E17(O₁₉), T18(O₂₅), S20(O₅₈), mientras que los átomos de carbono E17(C₁₅), T18(C₂₀), D21(C₇₀) poseen cargas más positivas comparadas con el resto de los átomos, por lo que, en el péptido pueden ocurrir los ataques nucleofílicos en estos sitios.

Este péptido es el que tiene una mayor densidad electrónica de todos los péptidos en estudio, lo que indica que le será más difícil tener reacción con la región negativa de la membrana que le confiere la cabeza de los fosfolípidos de los que esta compuesta; cabe aclarar que este es el péptido más grande.



Tabla 4. Cargas atómicas de algunos átomos seleccionados y de los aminoácidos del péptido de referencia pep0R a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).

E17	T18	F19	S20	D21	L22	W23	K24	L25	L26
Glutámico	Treonina	Fenilalanina	Serina	Aspártico	Leucina	Triptófano	Lisina	Leucina	Leucina
-0.013	0.077	0.010	-0.107	0.070	-0.015	-0.005	0.036	0.025	-0.079
Sitios Puntuales									
N₁	C₂₀	N₂₈	C₅₁	C₆₆	N₇₃	C₉₈	O₁₂₁	C₁₃₈	N₁₄₈
-0.921	0.618	-0.628	0.453	0.512	-0.569	0.416	-0.512	0.560	-0.568
O₁₉	O₂₅	C₃₅	O₅₇	C₇₀	C₇₉	O₁₀₁	N₁₄₃	O₁₄₄	C₁₆₂
-0.609	-0.609	0.514	-0.549	0.708	0.464	-0.522	-1.003	-0.512	0.590
C₁₅		O₃₈	O₅₈	O₇₄	O₈₂	N₁₁₁			O₁₆₅
0.656		-0.518	-0.617	-0.525	-0.484	-0.507			-0.521
			H₆₃	O₇₅	C₈₄				C₁₆₇
			0.451	-0.559	0.419				0.502



7.2.5 CÁRGAS ATÓMICAS DE pep10A

En la Tabla 5, los aminoácidos L14 y E17 poseen cargas totales más negativas, mientras el aminoácido Q16 del péptido tiene el valor de carga total más positiva comparada con los aminoácidos restantes; este resultado sugiere que los aminoácidos L14 y E17 podrían ser susceptibles a los ataques electrofílicos.

Respecto a los átomos de nitrógeno de los grupos amina de los aminoácidos P12(N₁), Q16(N₅₇, N₇₇) poseen cargas negativas mayores.

Referente a los grupos carbonilo se observa que los átomos de oxígeno como S15(O₅₆) y T18(O₁₀₀) tienen las cargas más negativas. Contrariamente a los átomos de carbono de los aminoácidos S15(C₄₆), Q16(C₇₁), E17(C₉₀) y S20(C₁₂₆) poseen cargas positivas mayores comparadas con el resto de sus análogos.

De acuerdo a sus características electrónicas, los aminoácidos S15, E17, S20 presentan la mayor reactividad química, es decir, son aminoácidos en los que se localizan sitios puntuales con cargas atómicas muy positivas, siendo éste un sitio de naturaleza electrofílico en el cuál se darían ataques nucleofílicos con mayor facilidad, lo que podría ser relevante en el diseño de este tipo de péptidos. Estos datos están de acuerdo con los resultados experimentales de Kanovsky y colaboradores en el 2001³⁰ y coincide con la importancia del segmento 17-20 ETFS.

Entre los aminoácidos P12 y E17 se encuentran los sitios más ácidos y básicos del péptido pep1A y en la S15 se encuentran las cargas más ácidas. En pep2A en la F19 y K24 y S20 se encuentran los sitios más ácidos y básicos, teniendo mayor número de sitios básicos, comparado con el péptido 2. En el péptido pep10A los aminoácidos E17 y T18 poseen las cargas más básicas así como las ácidas, siendo mayores los sitios básicos con respecto al péptido pep0R que es el de referencia. En el caso del pep2A es un péptido de menor tamaño que tiene el mayor número de regiones básicas, resultando este péptido el mejor candidato debido a su mayor reactividad.



Tabla 5. Cargas atómicas de algunos átomos seleccionados y de sus aminoácidos de pep10A con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).

P12	P13	L14	S15	Q16	E17	T18	F19	S20
Prolina	Prolina	Leucina	Serina	Glutamina	Glutámico	Treonina	Fenilalanina	Serina
0.048	0.020	-0.086	0.047	0.098	-0.073	-0.037	0.020	-0.037
Sitios Puntuales								
N₁	C₁₉	N₂₆	N₃₈	N₅₇	N₆₈	C₉₇	C₁₁₀	N₁₁₇
-0.606	0.457	-0.533	-0.582	-0.736	-0.567	0.565	0.518	-0.449
C₅	O₂₅	C₃₃	C₄₆	H₆₂	C₉₀	O₉₉	O₁₁₃	C₁₂₆
0.496	-0.462	0.497	0.627	0.399	0.664	-0.522	-0.559	0.622
O₁₁		O₃₆	O₅₅	C₆₄	O₉₄	O₁₀₀		O₁₃₂
-0.492		-0.560	-0.598	0.478	-0.575	-0.752		-0.514
			O₅₆	C₇₁	H₉₈	H₁₀₄		O₁₃₃
			-0.657	0.777	0.407	0.492		-0.564
			H₆₁	O₇₆				O₁₃₄
			0.408	-0.547				-0.582
				N₇₇				H₁₃₉
				-0.962				0.440



7.3. DESCRIPTORES QUÍMICO CUÁNTICOS GLOBALES

A partir de la optimización, se realizaron los cálculos puntuales que sirvieron para obtener diversos descriptores químico cuánticos con base en el Teorema de Koopmans⁴⁷, se obtuvieron los siguientes descriptores químico-cuánticos globales: dureza (η), potencial de ionización (I,) índice de electrofilicidad (ω), y los orbitales moleculares (HOMO y LUMO).

En la tabla 6 se muestran los valores de los descriptores globales de reactividad química (dentro del contexto de la TFD) para los péptidos en estudio.

Se puede observar que el péptido pep1A exhibe un valor más alto para el potencial de ionización (I) lo cual proporciona una mejor estabilidad química global, valores relativamente mayores pueden indicar efectos oxidativos menores, y se puede observar que los péptidos pep10A, pep2A y pep0R muestran un orden decreciente del potencial, recordando que el potencial de ionización es la energía necesaria para separar un electrón más externo de una molécula y nos vincula con una reactividad química relativa de los péptidos.

Tabla 6. Descriptores globales de reactividad para los péptidos en estudio con una base B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).

Péptido	w(eV)	n(eV)	I(eV)
pep1A	0.72	6.73	9.83
pep2A	0.69	5.65	8.44
pep10A	0.39	6.34	8.56
pep0R	0.51	5.35	7.68

En donde eV = electrón Volts.

En lo que respecta al índice de electrofilicidad, que es un descriptor útil para cuantificar la capacidad electrofílica global de las moléculas⁴⁹, indicando que los péptidos pep1A y pep2A poseen una mayor capacidad electrofílica global que los péptidos pep10A y pep0R. Los péptidos pep1A y pep2A en orden decreciente poseen una mayor



predisposición de adquirir una carga electrónica adicional entre los demás péptidos excepto pep10A que muestra valores menores de esta propiedad y concuerda con lo reportado por Soriano-Correa y col. en el 2008⁵¹ sobre que las moléculas menos ácidas son menos propensas a adquirir carga.

En el caso de la dureza (η) nos indica que las moléculas más estables son menos reactivas y poseen valores mayores de dureza, el péptido pep1A es el péptido más duro seguido de pep10A, siendo más difícil que estos puedan tener una reactividad química ya que tendrán una mayor resistencia a la redistribución de los electrones del péptido, siendo más blandos pep0R, y pep2A que podrían ser los más reactivos.

Por lo tanto los péptidos menos ácidos van a poseer valores menores de potencial de ionización (I), mayor dureza (η), valores menores de índice de electrofilicidad (ω)⁵¹.



7.4. DESCRIPTOR QUÍMICO BIOLÓGICO GLOBAL (LogP)

En el caso del coeficiente de partición octanol/agua (LogP) el péptido pep2A fue el que tuvo un valor mayor (6.53 ± 0.98), lo que indica que es más lipofílico, característica importante para el desarrollo de moléculas activas biológicamente, para las cuales el transporte a través de las membranas biológicas es mejor; teniendo valores menores pep1A (0.83 ± 0.99), pep0R (2.86 ± 1.11) y pep10A (6.14 ± 1.12).

En el caso del pep1A los tres primeros aminoácidos P12, P13 y L14 son hidrofóbicos y S15, Q16 y E17 son hidrofílicos, lo que indica que solo la mitad del péptido lograría internarse en la membrana. El péptido de referencia (pep0R) contiene el mismo número de aminoácidos hidrofóbicos (F19, L22, W23, L25 y L26), que de hidrofílicos (E17, T18, S20, D21 y K24) encontrando la diferencia en que se encuentran dispersos en toda la secuencia, teniendo una mejor posibilidad de integrarse el péptido completo a la membrana con respecto a pep1A.

En general, el pep10A posee menor región hidrofóbica que se podría internar en la membrana, constituida por los aminoácidos P12, P13, L14 y F19. Teniendo por el contrario más aminoácidos hidrofílicos como S15, Q16, E17, T18 y S20.

La leucina L14 y las prolinas P12 y P13 son aminoácidos con cadenas laterales no polares: estos aminoácidos poseen una cadena lateral no polar que no une o entrega protones ni participa en uniones de tipo puentes de hidrógeno. En las proteínas, las cadenas laterales de estos aminoácidos pueden agruparse debido a su hidrofobicidad, tal como ocurre con las gotas de aceite en soluciones acuosas. La importancia de estas interacciones hidrofóbicas radica en la estabilización de la estructura péptida.

Después de analizar las secuencias del péptido se puede decir que pep1A tiene 2 regiones, la primera mitad es una región hidrofóbica y la segunda mitad es una zona hidrofílica que puede formar puentes de hidrógeno con el agua, o servir como sitio de unión de grupos fosfatos o carbohidratos⁴⁷.

Por lo tanto el péptido pep1A tiene mayor número de aminoácidos hidrofílicos, incluyendo un aminoácido básico, con respecto a pep2A.

Lo anterior indica que el péptido pep2A está formado por estructuras anfipáticas con residuos hidrofóbicos que se encuentran en una cara del péptido, mientras los residuos polares se encuentran agregados en la cara opuesta, confiriéndole buenas características para que la mayor parte del péptido se interne en la región hidrofóbica de la membrana, coincidiendo con lo reportado en secuencias similares por Rosal 2005³³, en donde se propone que la estructura de la hélice alfa puede causar la formación de poros en la membrana celular para poder inducir muerte celular.



Comparado con pep1A, pep2A tiene el mayor número de aminoácidos hidrofóbicos incluyendo un aminoácido básico que puede aceptar un protón, alternados con los aminoácidos hidrofílicos, que pueden formar puentes de hidrógeno con otras moléculas.

El péptido pep0R de referencia tiene el mayor número de aminoácidos hidrofóbicos comparado con los demás péptidos, estos se encuentran alternados con los aminoácidos hidrofílicos.

El péptido pep10A posee más aminoácidos hidrofílicos incluyendo un aminoácido de cadena lateral ácida que acepta electrones, estos se encuentran rodeados por los aminoácidos hidrofóbicos.



7.5. ORBITALES MOLECULARES FRONTERA, ISOSUPERFICIE DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO Y DENSIDAD ELECTRÓNICA

El análisis de los orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO sugiere la existencia de posibles sitios reactivos, indicando los aminoácidos donde ocurrirán los ataques nucleofílicos o electrofílicos; así como las isosuperficies del potencial electrostático y la densidad electrónica que indican la distribución de la densidad electrónica al final del carboxilo terminal de cada aminoácido y la tendencia a las cargas positivas o negativas de todos los péptidos respectivamente.

7.5.1. pep1A

Los resultados ilustran que los orbitales frontera se encuentran localizados en el caso de pep1A HOMO se encontró en la glutamina 16 y el ácido glutámico 17 siendo aminoácidos hidrofílicos (Figura 11) y LUMO en la prolina 13 siendo un aminoácido hidrofóbico (Figura 12).

En la isosuperficie del potencial electrostático de pep1A, las regiones en donde se concentra la mayor cantidad de carga negativa es en los aminoácidos glutamina 16 y ácido glutámico 17 como puede observarse en la Figura 13.

Respecto a la densidad electrónica se usó un código de colores en donde la región que esta cargada positivamente indica una actividad electrófila, resultando la interacción repulsiva en un incremento del potencial de energía (coloreado de tono azul), encontrándose en este caso en la glutamina 16. Así mismo las regiones que se acercan de la carga positiva a la negativa indican una región nucleofílica, resultando la interacción atractiva en un potencial de la energía negativo (coloreado de tono rojo), encontrándose en el ácido glutámico 17 (Figura 14).



CÓDIGO DE COLORES

 **Región negativa
(básica)**
 **Región positiva
(ácida)**

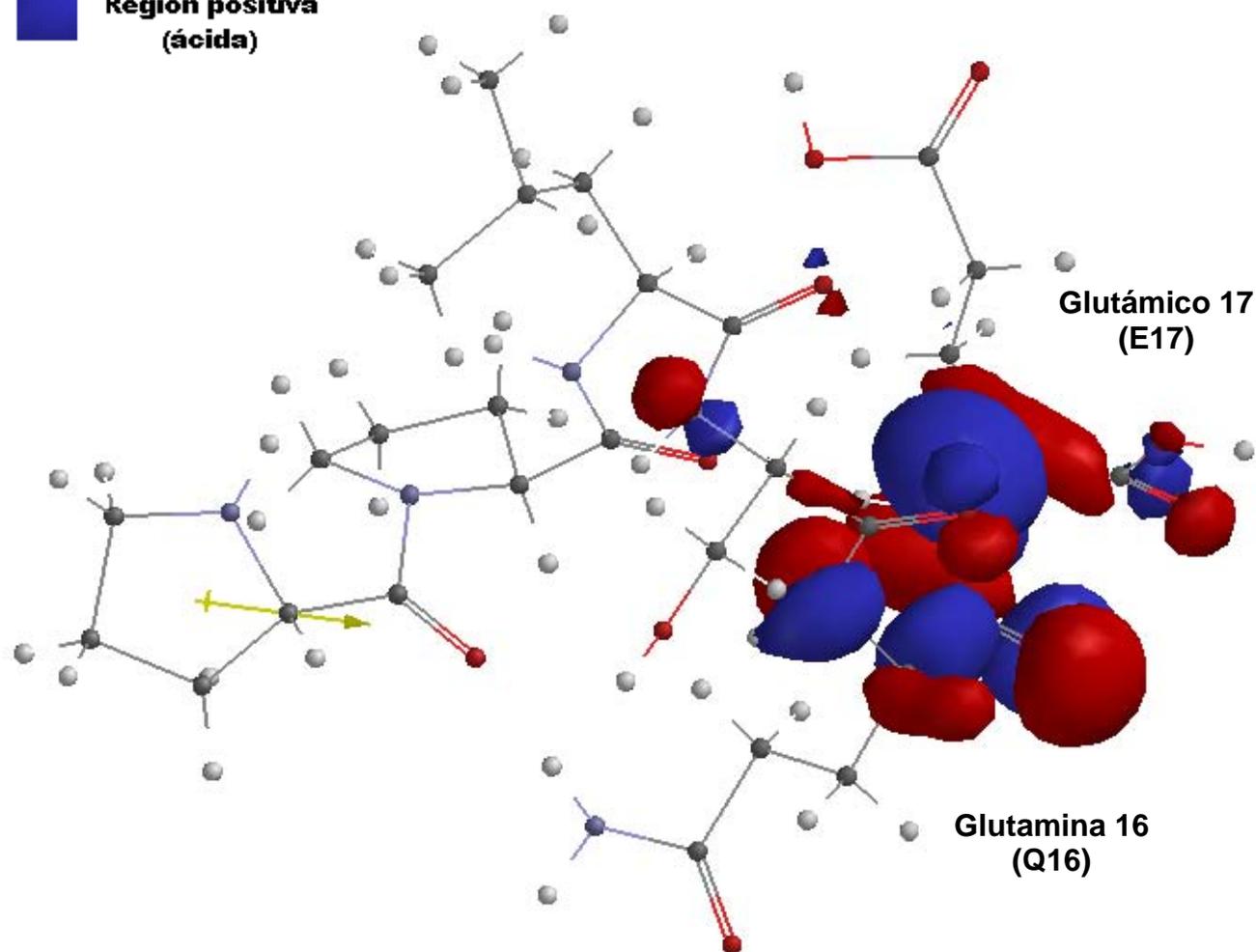


Figura 11. Orbital Molecular HOMO de pep1A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



CÓDIGO DE COLORES

 **Región negativa
(básica)**
 **Región positiva
(ácida)**

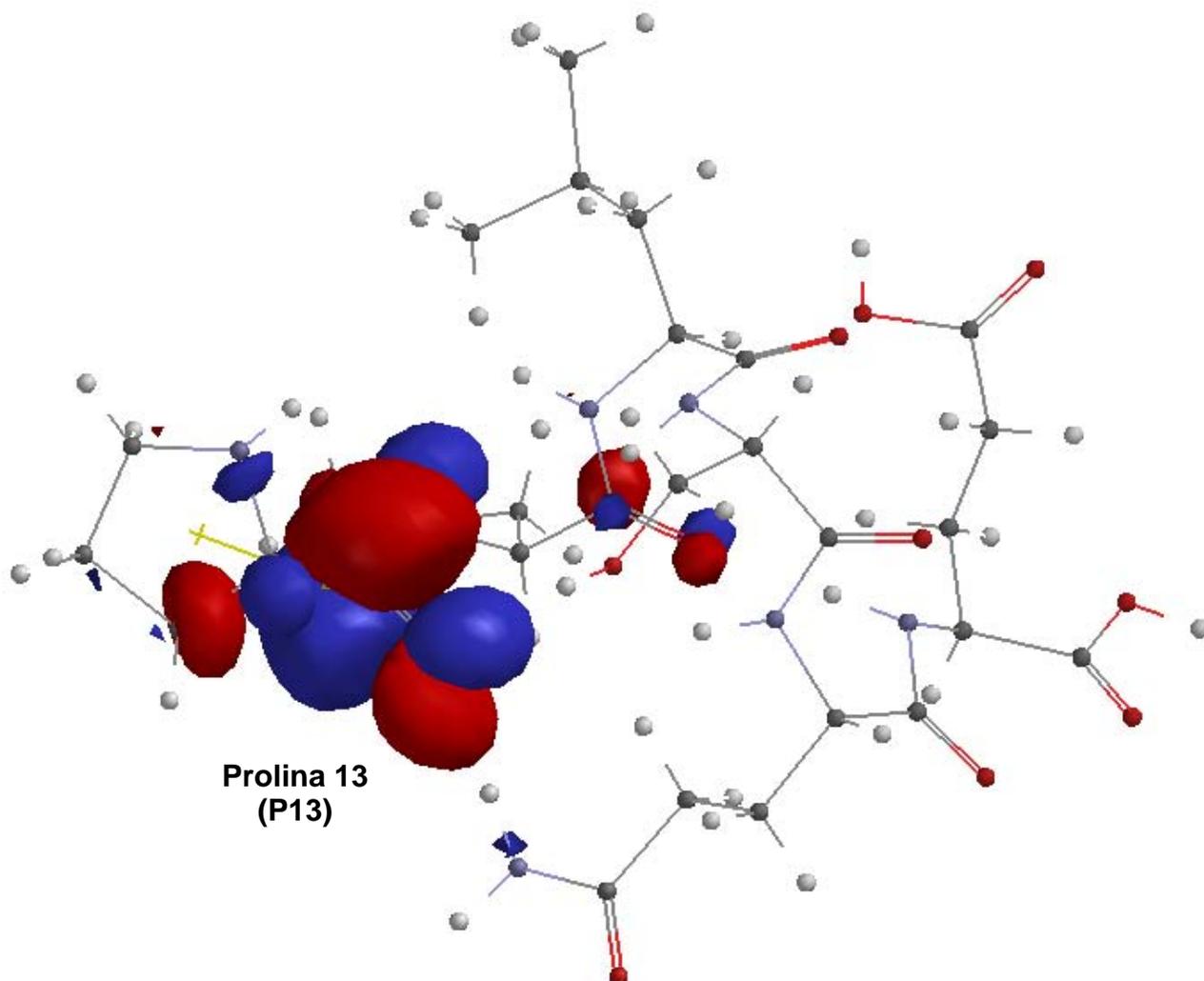


Figura 12. Orbital Molecular LUMO de pep1A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).

**Glutámico 17
(E17)**

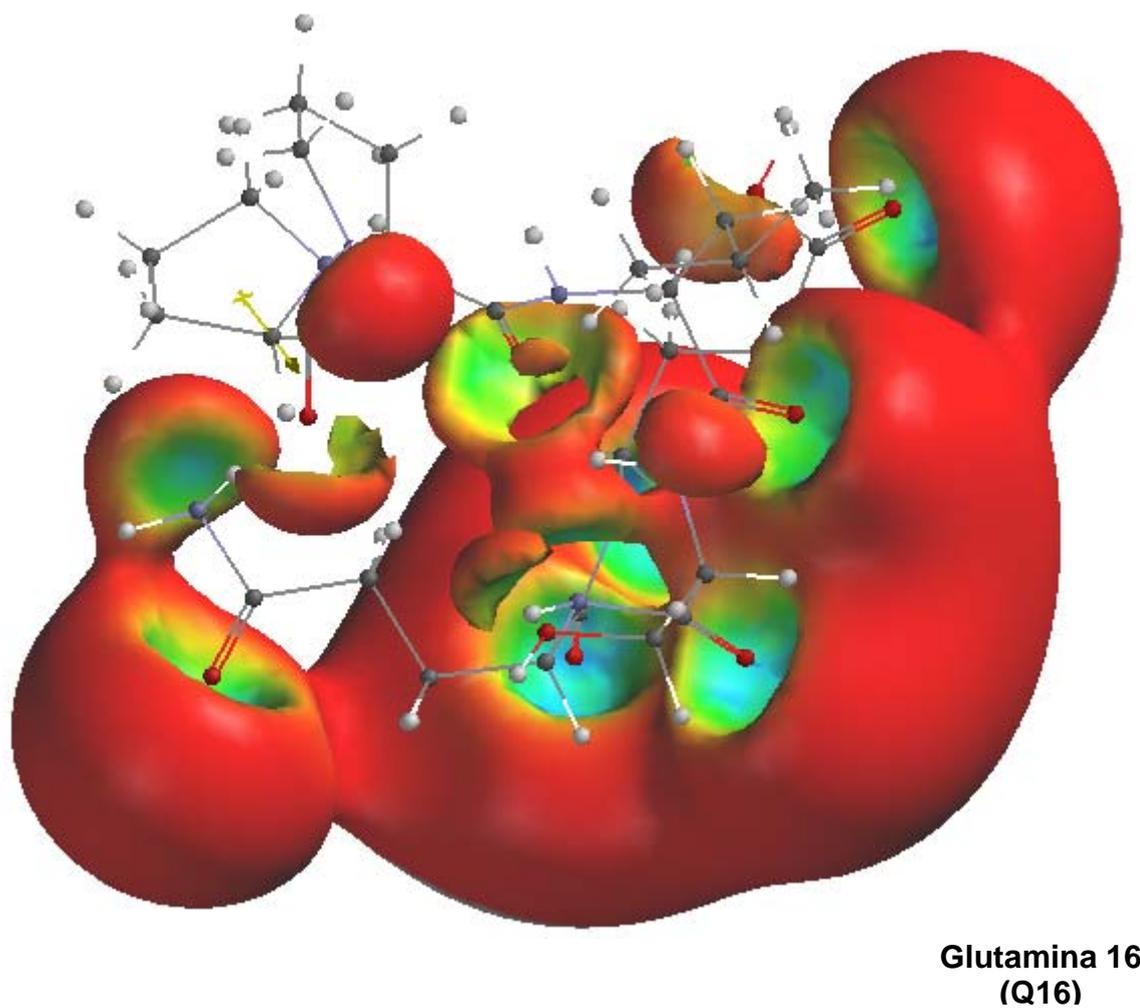


Figura 13. Isosuperficie del potencial electrostático de pep1A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



CÓDIGO DE COLORES

	Región negativa (básica)
	Región neutra
	Región positiva (ácida)

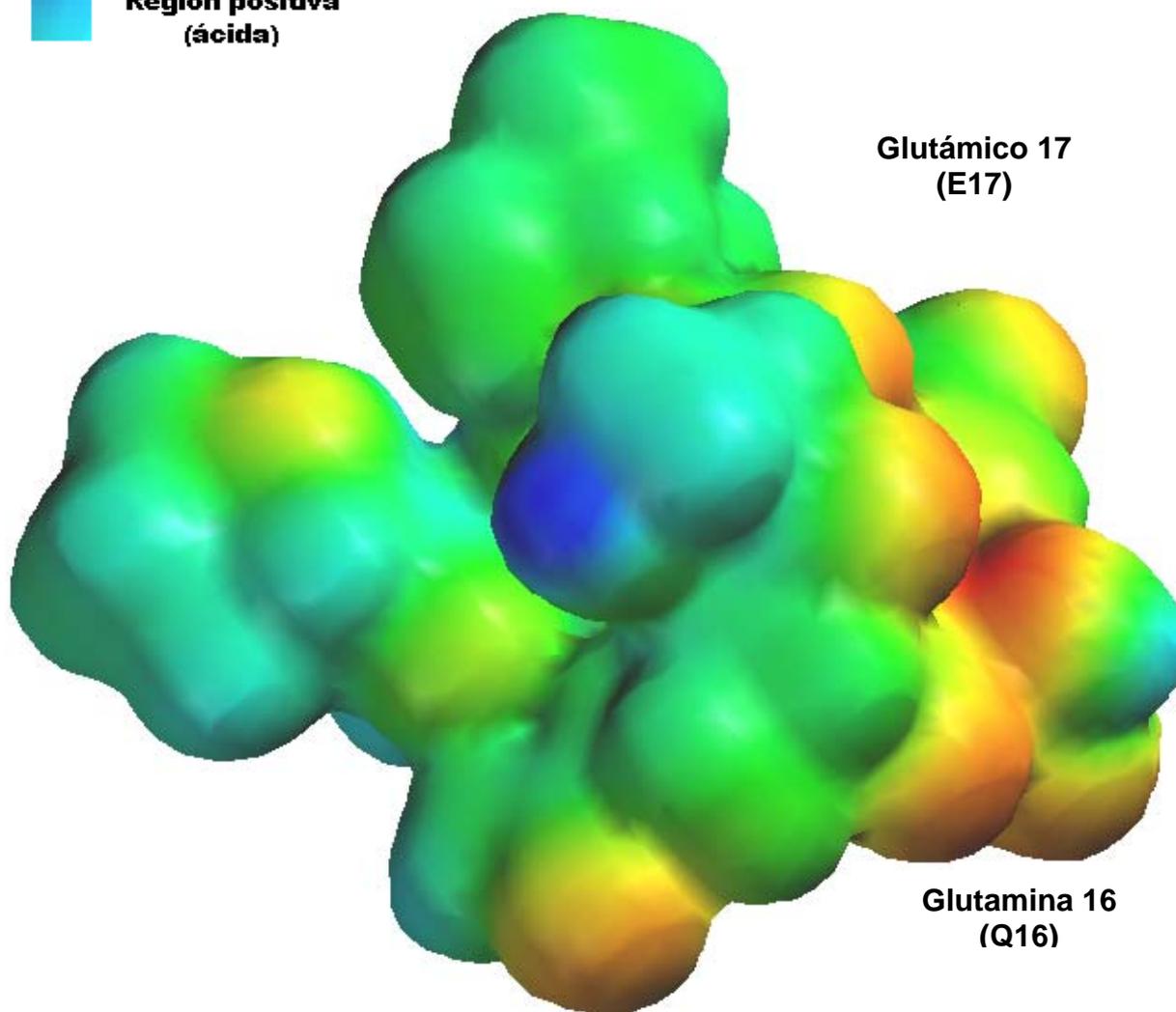


Figura 14. Densidad electrónica de pep1A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



7.5.2. Pep2A

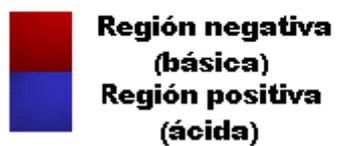
En el caso de los orbitales HOMO y LUMO en el caso de pep2A se encuentran ambos en el triptófano 23 que es un aminoácido hidrofóbico (Figura 15 y 16) pudiendo tener este una mayor posibilidad de entrar a la membrana más fácilmente.

Respecto a la isosuperficie del potencial electrostático de pep2A, las regiones donde se encuentra la mayor concentración de carga negativa es en los aminoácidos leucina 25 y 26, así como en el carboxilo terminal de cada aminoácido que lo constituye. (Figura 17).

En la densidad electrónica de pep2A la región que esta cargada positivamente indica una actividad electrofílica (coloreada de tono azul), encontrándose en este caso en fenilalanina 19, y triptófano 23. Las regiones que se acercan a la carga negativa indican una región nucleofílica, (coloreada de tono rojo), encontrándose en la lisina 24 (Figura 18).



CÓDIGO DE COLORES



Triptófano 23
(W23)

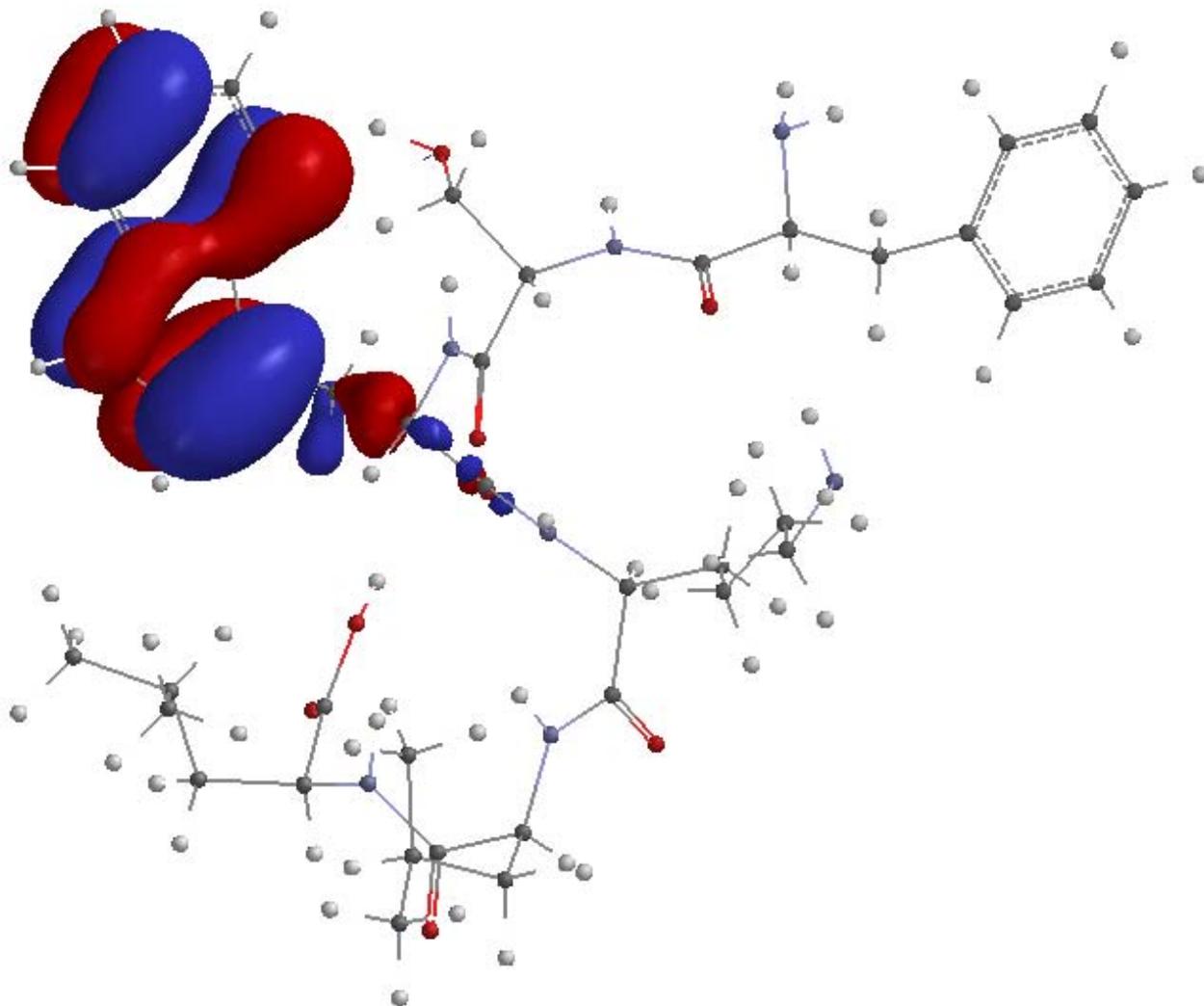


Figura 15. Orbital Molecular HOMO de pep2A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



CÓDIGO DE COLORES

-  **Región negativa (básica)**
-  **Región positiva (ácida)**

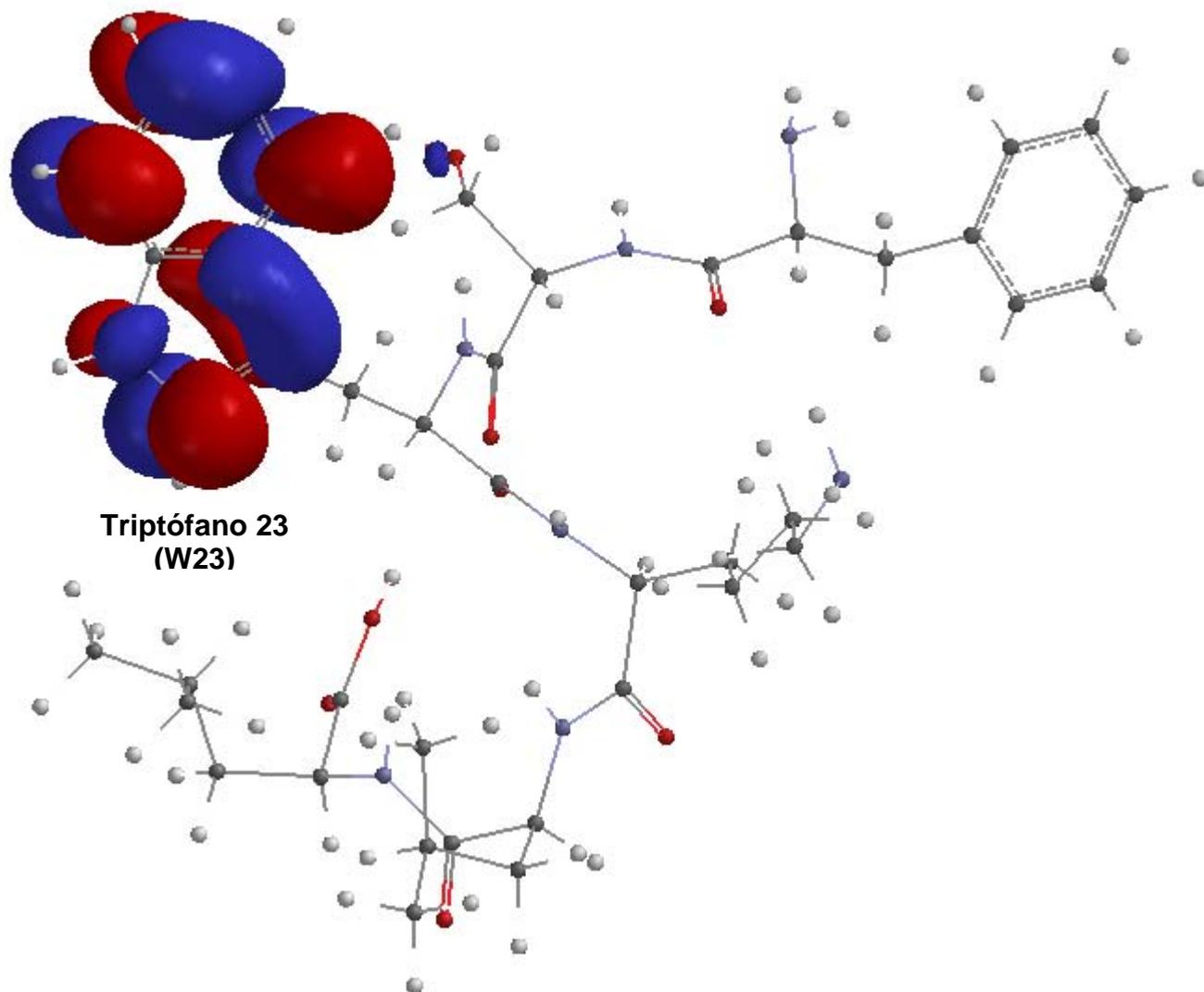


Figura 16. Orbital Molecular LUMO de pep2A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).

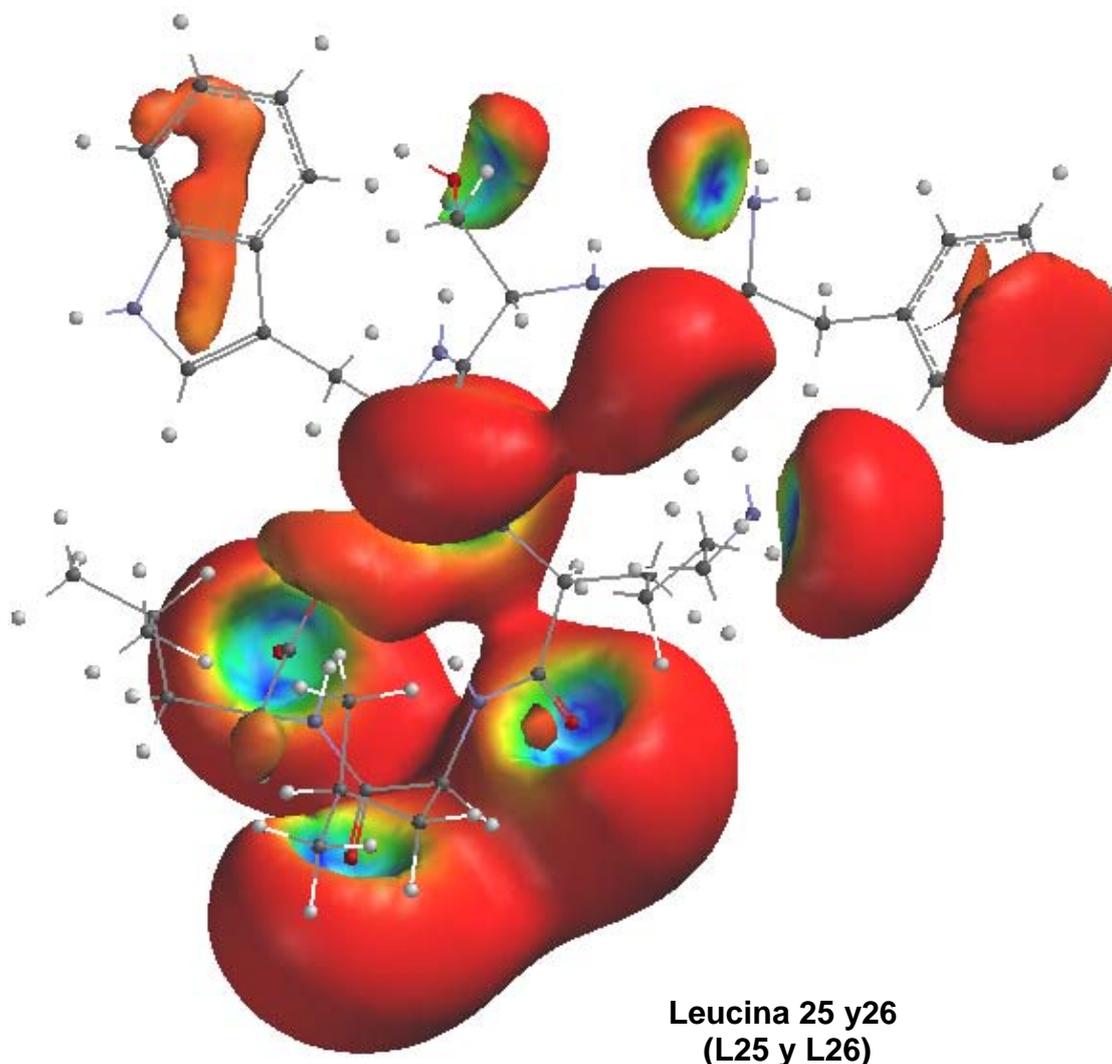


Figura 17. Isosuperficie del potencial electrostático de pep2A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



CÓDIGO DE COLORES

	Región negativa (básica)
	Región neutra
	Región positiva (ácida)

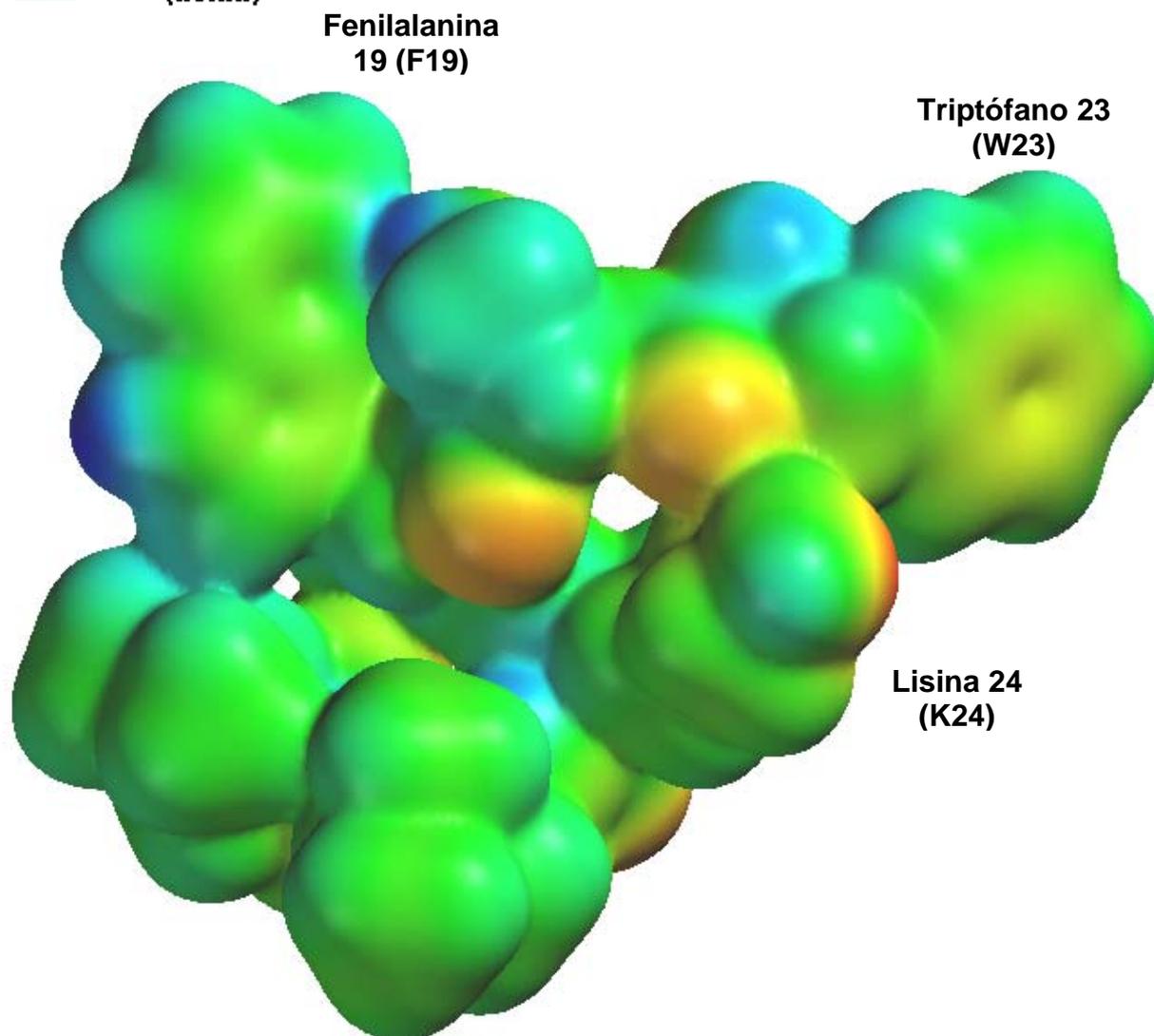


Figura 18. Densidad electrónica de pep2A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



7.5.3. Pep10A

En pep10A el orbital molecular HOMO se localiza en la fenilalanina 19 (Figura 19) y LUMO en las prolinas 12 y 13 (Figura 20) siendo ambos aminoácidos hidrofóbicos, coincidiendo con los estudios de iones en fase gas que han llevado a un modelo sobre el efecto en la bioactividad de los sistemas aromáticos⁴². Estos resultados sugieren la existencia de un posible sitio de reactividad de los péptidos previamente mencionados. Por tanto los ataques nucleofílicos o electrofílicos pueden ser en estos sitios.

Respecto a la isosuperficie del potencial electrostático de pep10A, las regiones en donde se concentra la mayor cantidad de carga negativa es en los aminoácidos treonina 18, fenilalanina 19 y serina 20. (Figura 21).

Respecto a la densidad electrónica se usó un código de colores en donde la región que esta cargada positivamente indica una actividad electrófila, (coloreada de tono azul), encontrándose en este caso en la leucina 14. Las regiones que se acercan a la carga negativa indican una región nucleofílica, (coloreada de tono rojo), encontrándose en la fenilalanina 19 y serina 20 (Figura 22).



CÓDIGO DE COLORES

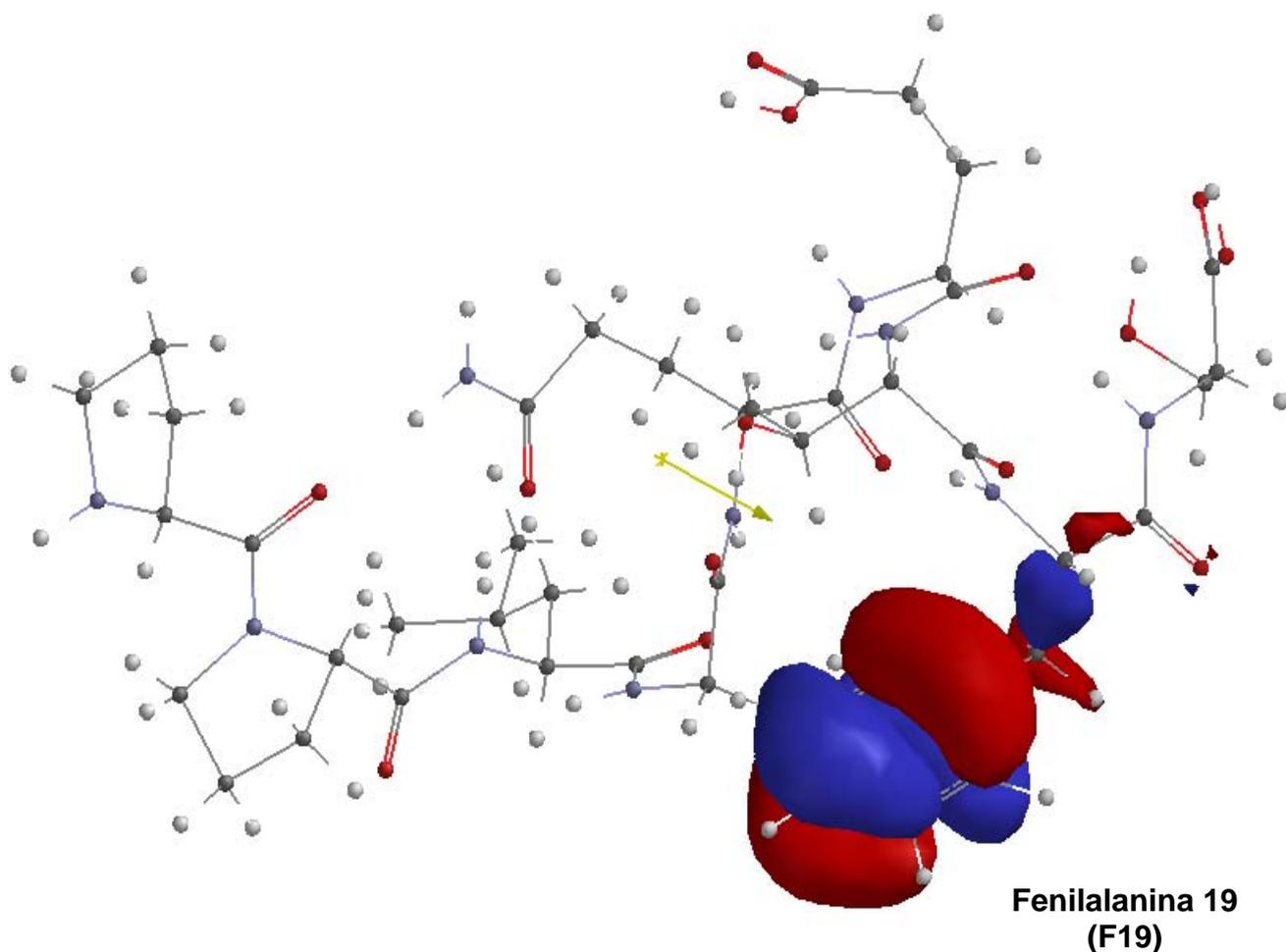
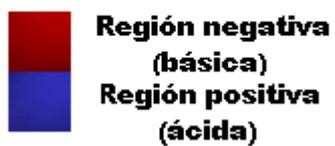


Figura 19. Orbital molecular HOMO de pep10A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



CÓDIGO DE COLORES

 **Región negativa
(básica)**
 **Región positiva
(ácida)**

Glutamina 16 y
Glutámico 17
(Q16 y T17)

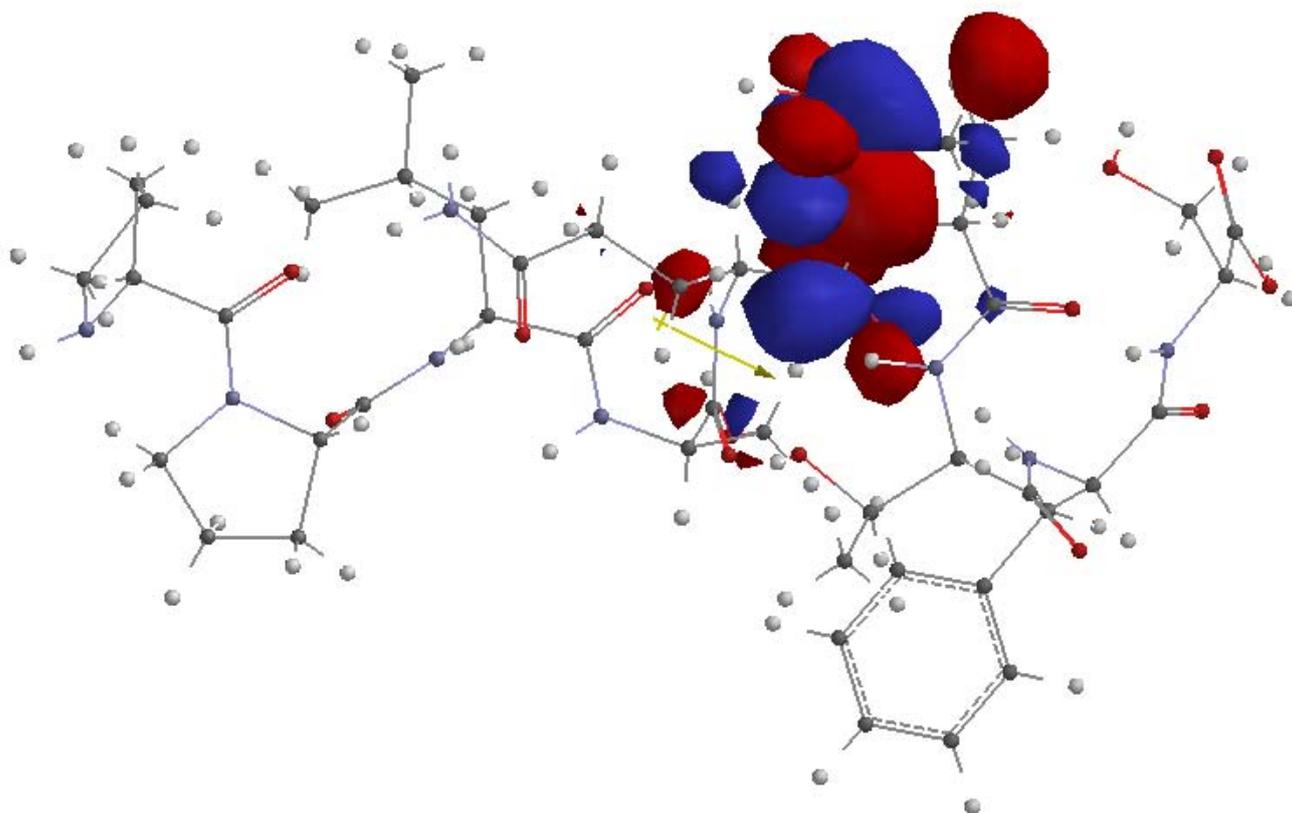


Figura 20. Orbital Molecular LUMO de pep10A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).

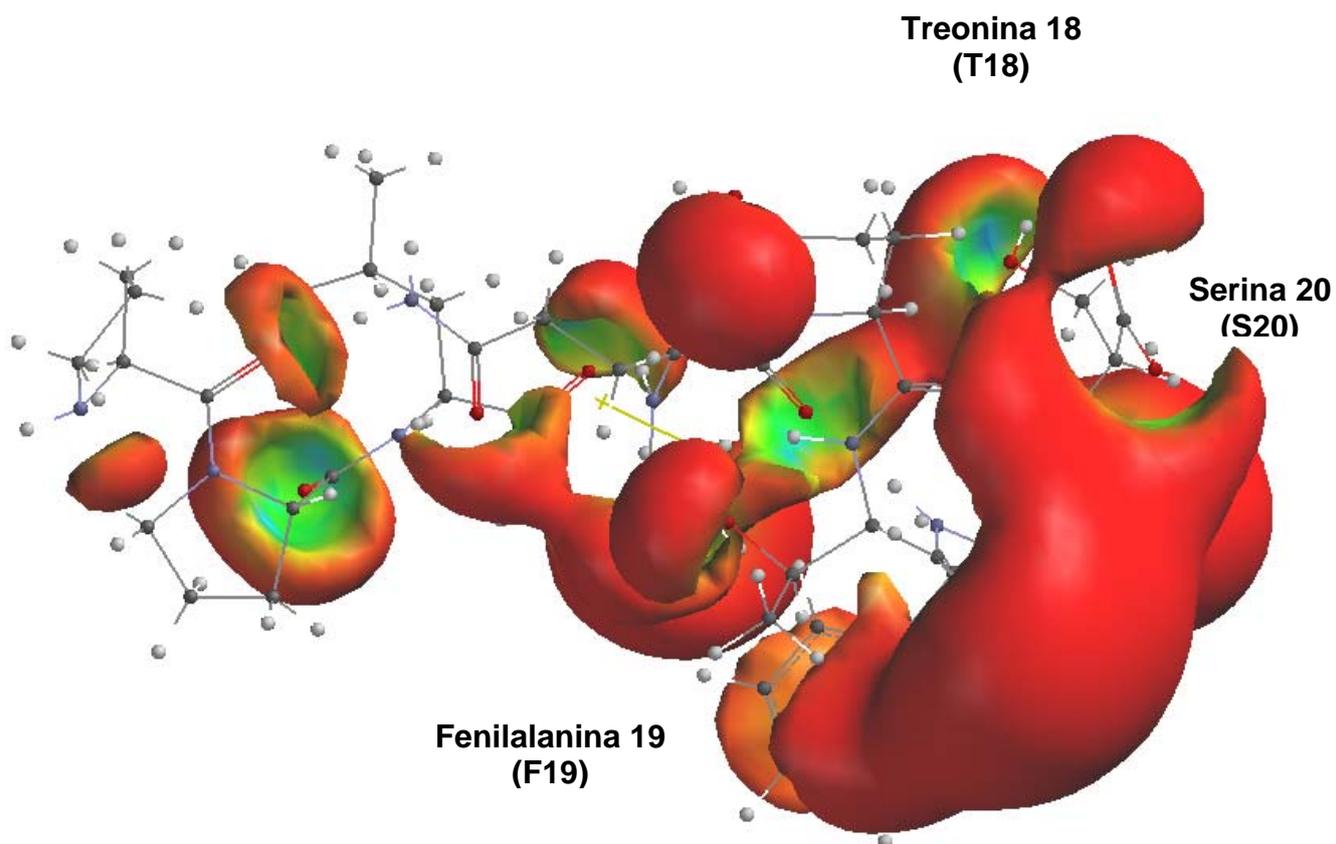


Figura 21. Isosuperficie del potencial electrostático de pep10A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



CÓDIGO DE COLORES

	Región negativa (básica)
	Región neutra
	Región positiva (ácida)

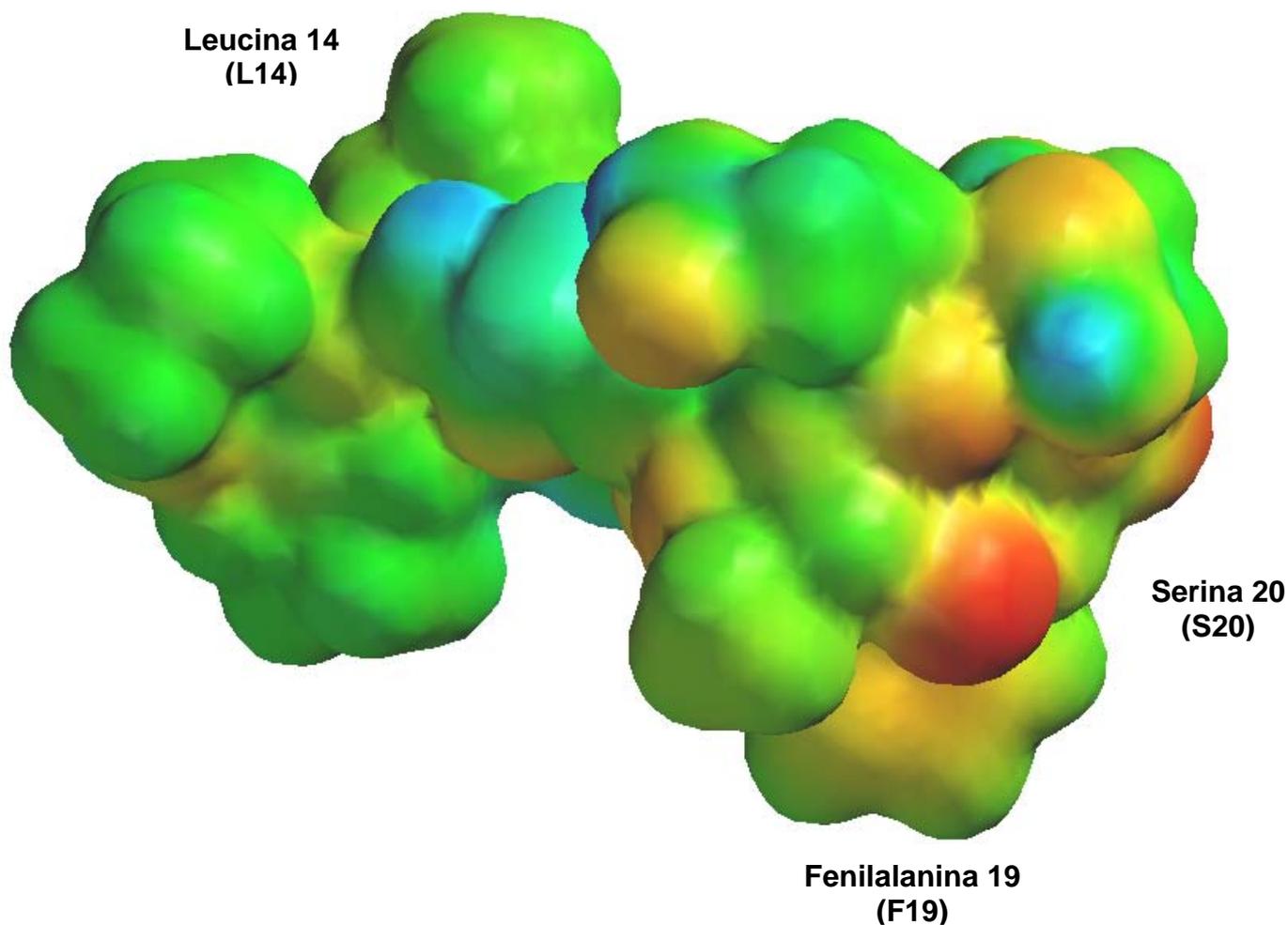


Figura 22. Densidad electrónica de pepe10A a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



7.5.4 pep0R

En pep0R el orbital molecular HOMO se localiza en el Triptófano 23 (Figura 23) y LUMO en la fenilalanina 19 (Figura 24), ambos aminoácidos hidrofóbicos por lo que tienen posibilidad de integrarse a la membrana celular³⁹.

En el caso de la isosuperficie del potencial electrostático de pep0R, se va a encontrar en los aminoácidos ácido aspártico 21, triptófano 23 y leucinas 25 y 26; destacando que la región carboxilo de cada aminoácido envuelve al resto del péptido dificultando que las regiones positivas ó más ácidas interactúen con la región negativa de la membrana celular (Figura 25).

En la densidad electrónica se usó un código de colores en donde la región que está cargada positivamente indica una actividad electrófila, (coloreada de tono azul), encontrándose en este caso en la treonina 18. Las regiones que se acercan a la carga negativa indican una región nucleofílica, (coloreada de tono rojo), encontrándose en el triptófano 23 y la lisina 24 (Figura 26).



CÓDIGO DE COLORES

-  **Región negativa (básica)**
-  **Región positiva (ácida)**

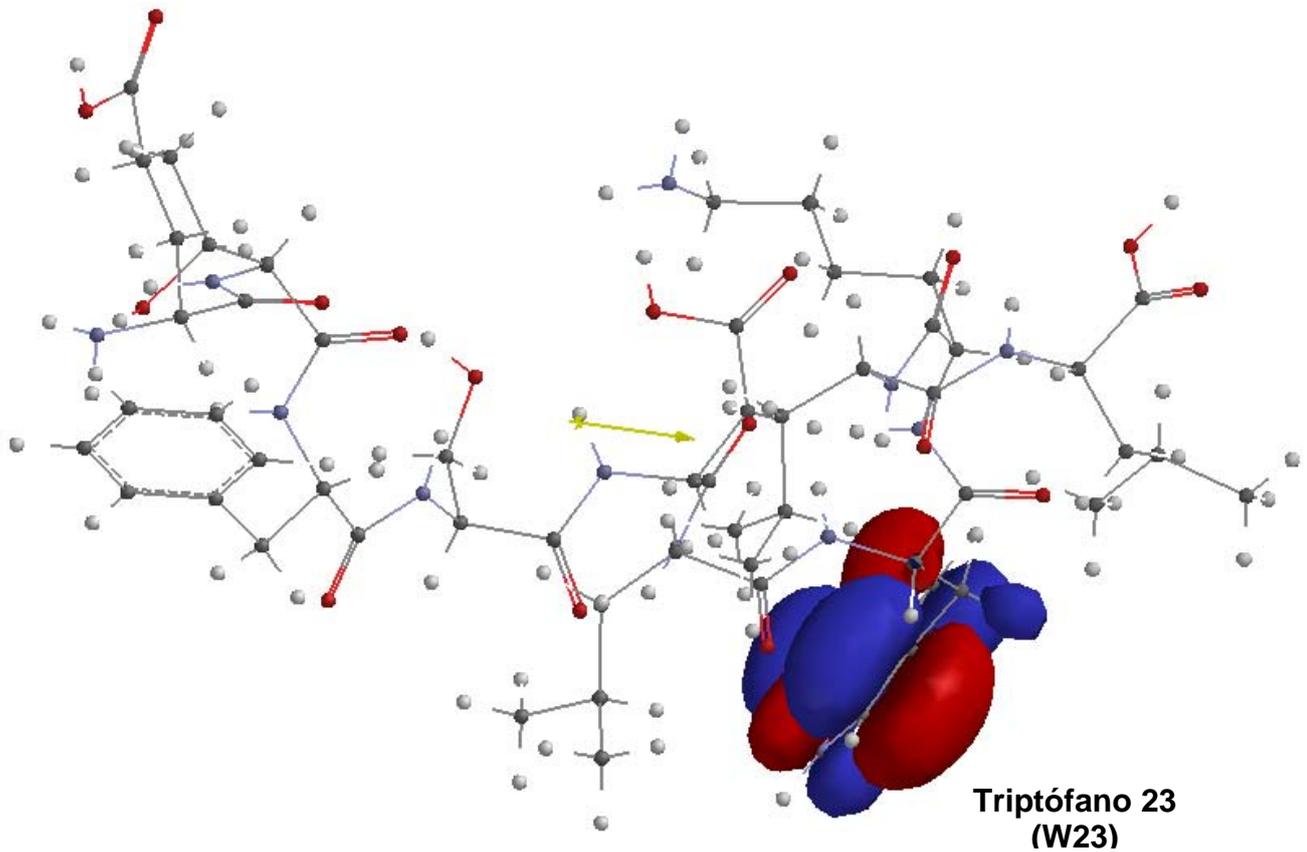


Figura 23. Orbital Molecular HOMO de pep0R a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



CÓDIGO DE COLORES

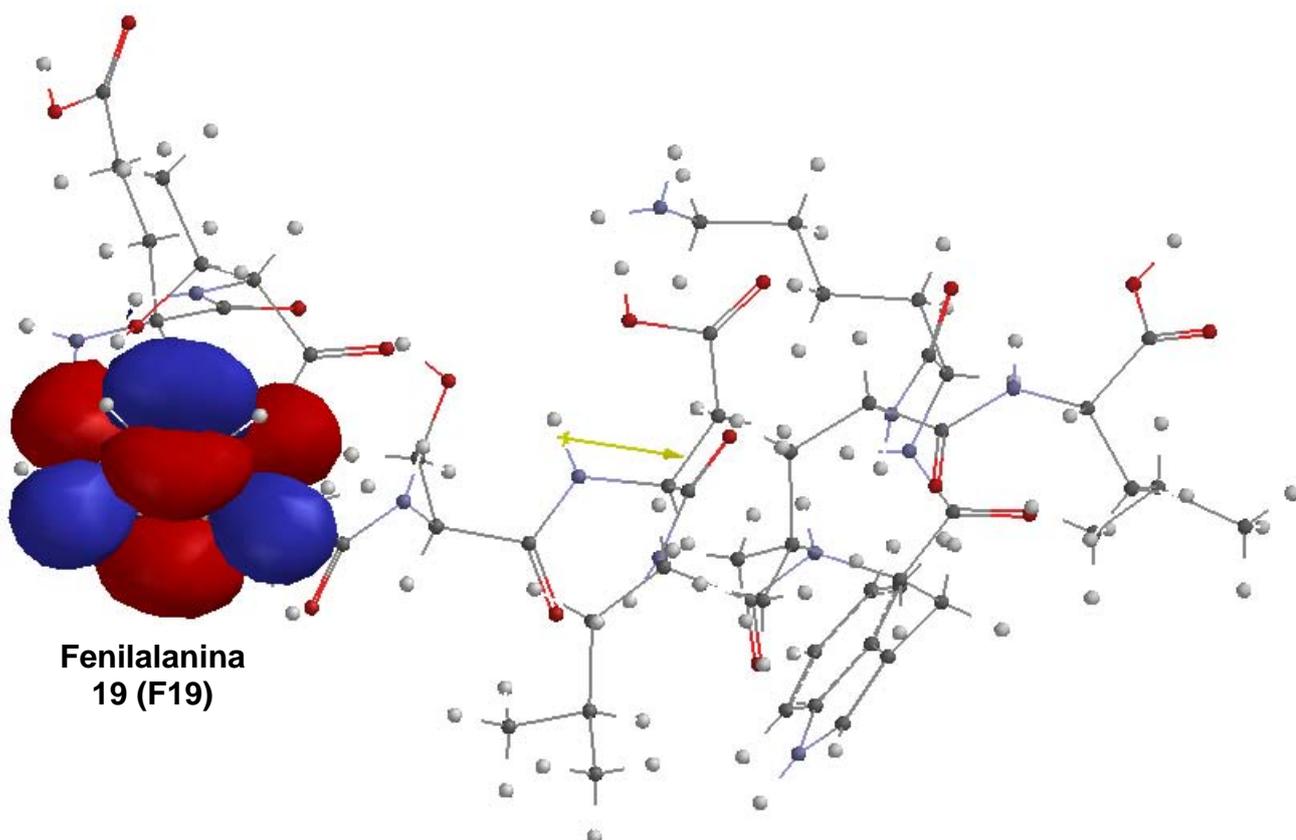
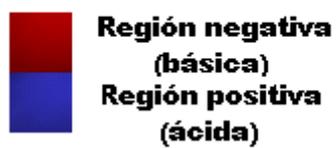


Figura 24. Orbital Molecular LUMO de pep0R a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).

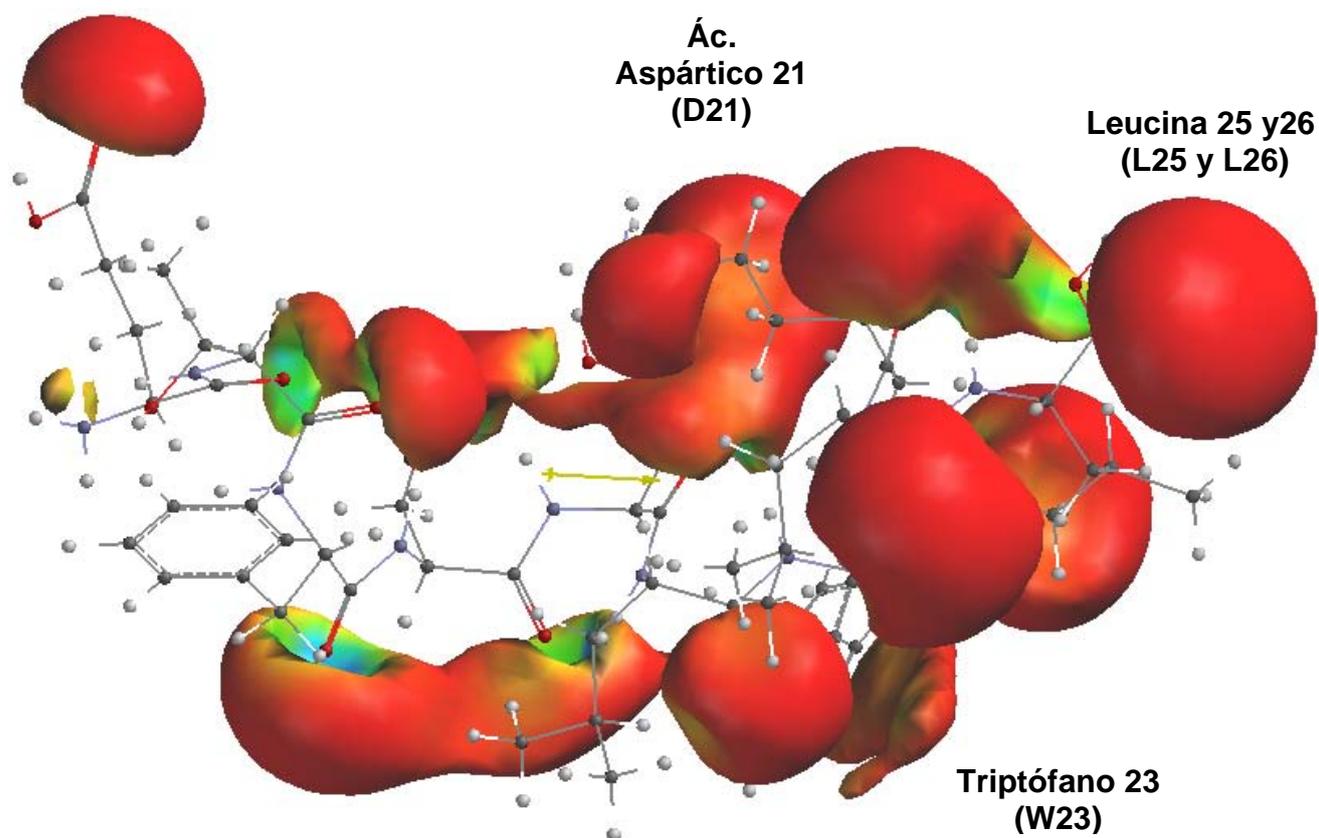


Figura 25. Isosuperficie del potencial electrostático de pep0R a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



CÓDIGO DE COLORES

	Región negativa (básica)
	Región neutra
	Región positiva (ácida)

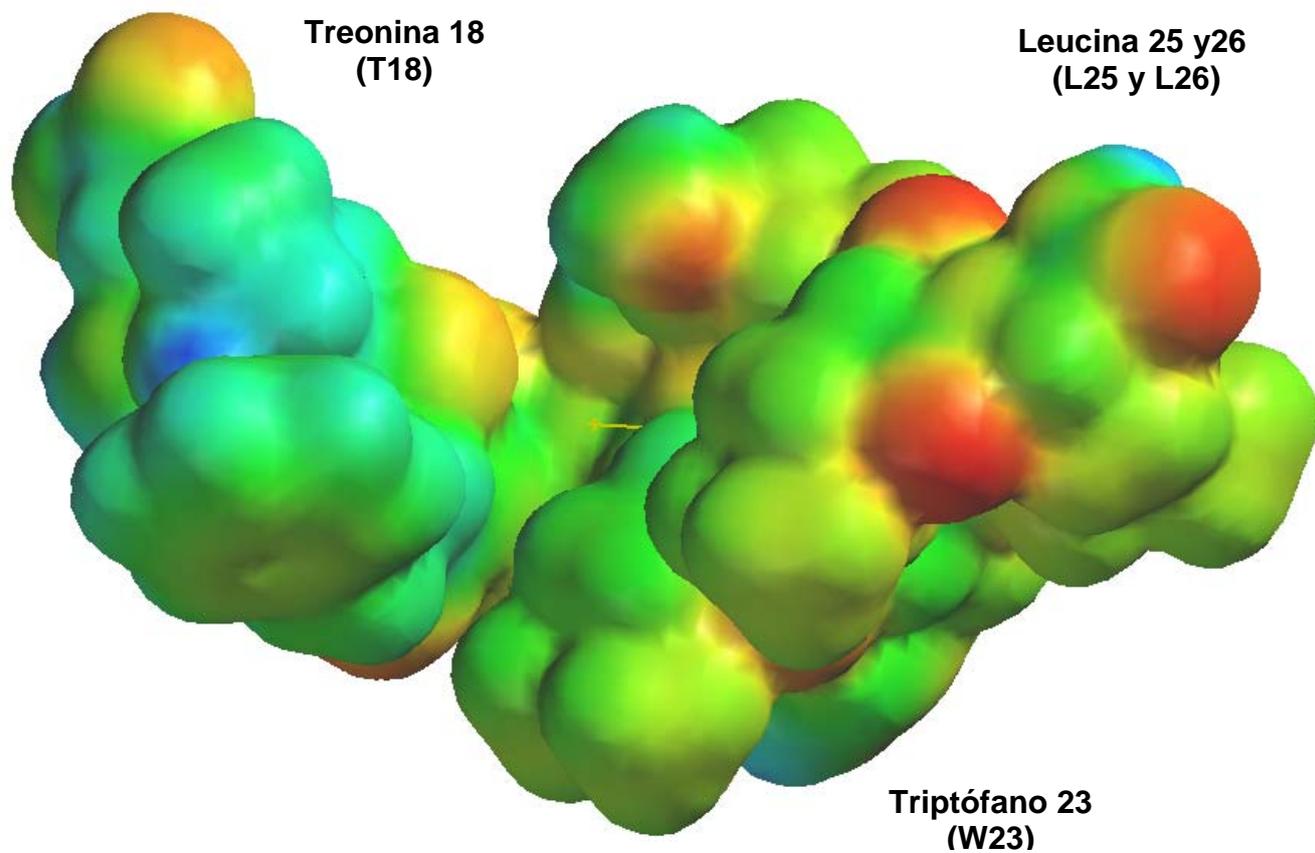


Figura 26. Densidad electrónica de pep0R a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/3-21G(d).



8. CONCLUSIONES

- Con base en las cargas atómicas, los descriptores químico cuánticos (índice de electrofilicidad, potencial de ionización, dureza) y en los orbitales moleculares frontera, se observó que los péptidos pep5A y pep2A muestran una mayor reactividad química, respecto al péptido de referencia (pep0R).
- Los valores de LogP muestran que tanto pep0R como pep2A tienen un mayor índice de hidrofobicidad.
- Los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) se localizaron en el triptófano (pep2A y pep0R), la fenilalanina (pep0R y pep10A) y la prolina (pep1A).
- El estudio de la estructura electrónica de péptidos derivados de TP53 permitió distinguir al péptido pep2A como la estructura con mayor reactividad química, lo cual sugiere que es el mejor candidato a presentar actividad antitumoral.



9. REFERENCIAS

1. Parkin M. D., Bray Ferlay J. and Pisani P. 2005. Global Cancer Statistics of 2002. *CA Cancer J. Clin.* **55**:74-108.
2. Rizo R. P., Sierra C. M.I., Vázquez P. G., Cano G. M., Meneses G. A. y Mohar A. 2007. Registro Hospitalario de Cáncer: Compendio de Cáncer 2000-2004. Instituto Nacional de Cancerología. *Cancerología.* **2** :203-287.
3. Klug S.W. and Cummings R.M. 2003. Concepts of Genetics. 7 Edit. Prentice Hall. New Jersey. Upper Saddle River. 607pp.
4. Flores P. and Sobrevia C. L.,. 2000. Tumorigénesis y proteína mdm2. *Rev. Méd. Chile.* **128** (5):539-546.
5. Mojica A., T. y Ramos, M., F. 2001. Genética Molecular Humana. Librería Médica Celsus. Colombia. 495pp.
6. Strachan T. and Read P.A. 2004. Human molecular genetics 3rd edit. Garland Science. New Delhi, India. 676pp.
7. Fernández-Gómez F., J. y Gómez-Lázaro M. y Jordan J. 2004. P53 Nuestro Guardián, celebra sus bodas de plata. *Actividad en Farmacología y Terapéutica.* **2**(3):195-203.
8. Bourdon J. C. and Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas P. D., Savolle K. M. and Lane P. D. 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes and Development.* **19**:2122-2137.
9. Soussi T. and Beroud C. 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* **1**:233-240.
10. Kastan M. B., Onyekwere O., Sidransky P., Vogelstein B. and Craig R. W. 1991. Participation of P53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**:6303-6304.
11. Wu X., Bayle J., Olson D. and Levine A. 1993. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* **7**:1126-1132.
12. Kostic M., Matt T., Martínez-Yamout M., Dyrson H. and Wright P. 2006. Solution structure of the Hdm2 C2H2C4 RING, a domain critical for ubiquitination of p53. *J Mol Biol.* **363**:433-450.
13. Li M., Brooks C., Wu-Baer F., Chen D., Baer R. and Gu W. 2003. Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science.* **302**:1972-1975.
14. Levine A.J, Hu W. and Feng Z. 2006. The P53 pathway: what questions remain to be explored?. *Cell Death Diff.* **13**:1027-1036.



15. Haupt, S. and Haupt, Y..2006. Importance of p53 for the beginning and the therapy of the cancer. *Anticancer drugs*. **7**: 725-732.
16. Grasberger,B.,L.; Tianbao L., et al. 2005.Discovery and Cocystal Structure of Benzodiazepinedione HDM2 Antagonists that activate p53 in cells. *J.Med.Chem.* **48**:909-912.
17. Bernal F., Tyler A., Korsmeyer S., Walensky L. and Verdine G. 2007. Reactivation of the p53 tumor suppressor pathway by a stapled p53 peptide. *J Am Chem Soc.* **129**:2456-2457.
18. Higashitsuji,H.,Itoh K.,Sakurai, T., et al. 2005. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53.*Cancer Cell*.**8**:75-87.
19. Chene P. 2003.Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nature Reviews*.**3**:102-109.
20. Liang, H.,and Lunec.,J.2005. Characterisation of a novel p53 down-regulated promoter in intron 3 of the human MDM2 oncogene. *Gene*. **361**:112-118.
21. Mendoza-Rodriguez C.,A. and Cerbón M.,A. 2001. El gen supresor de tumores p53: mecanismos de acción en la proliferación y muerte celular. *Rev. Invest. Clin.* **53**(3):266-273.
22. Boyer R. 2000.Conceptos en bioquímica. Internacional Thomson. México, México.375pp.
23. Meyers A., P. 2007. Proteins, From Analytics to Structural Genomics. Wiley-VCH. Federal Republic of Germany. Vol. 1:453-483pp.
24. Järver, P and Langel, Ü. 2006. Cell-penetrating peptides-Abrief introduccion. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. **1758** (3), pp. 260-263.
25. Kontijevskis A., Petrovska R., Mutule I, Uhlen S., Komorowski J., Prusis P. and Wikberg JE. 2007. Proteochemometric analysis of small cyclic peptides' interaction with wild-type and chimeric melanocortin receptors. *Proteins*. **1**;69,1:83-96.
26. Nakamura G., Reynolds M., Chen Y., Starovasnik M. And Lowman H. 2002. Stable “zeta” peptides that act as potent antagonist of the high-affinity IgE receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**:1303-1308.
27. Meerrifield B. 1995. Solid phase peptide synthesis.: Peptides, synthesis, structures and applications. Gutte B Eds. Academic Press.1-38.
28. Bhutia S. K. and Maiti T. K. 2008. Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends in Biotechnology*. **26**,4:210-7.



29. Do T. N., Rosal R.V., Drew L., Raffo A.J., Mich J., Pincus M.R., Friedman F.K., Petrylak D.P., Cassai N., Szmulewicks J., Sidhu G., Fine R., and Brandt-Rauf P. 2003. Preferential induction of necrosis in human breast cancer cells by a p53 peptides derived from the MDM2 binding site. *Oncogene*. **22**:1431-1444.
30. Kanovsky M., Raffo A., Drew L., Rosal R., Drew L., Do T., Friedman F., Rubisteins P., Visser J., Robinson R., Brandt P., Michl J., Fine R., and Pincus M. 2001. peptides from the amino terminal mdm-2-binding domain of p53, designed from conformational analysis, are selectively cytotoxic to transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**:12438.
31. Rosal R., Pincus M., Brandt-Rauf P., Fine R., Michl J., and Wnag H. 2004. NMR Solution Structure of a peptide from the mdm-2 Binding Domain of the p53 Protein that Is Selectively Cytotoxic to Cancer Cells. *Biochem*. **43**:1854-1861.
32. Michl J., Scharft B., Schmidt A., Huynh C., Hannan R., Gizycki H., Friedman F.K., Brandt-Rauf P., Fine R.L. and Pincus M. R. 2006. PNC-28, a p53-derived peptide that is cytotoxic to cancer cells, blocks pancreatic cancer cell grow in vivo. *Int.j. Cancer*. **119**: 1577-1585.
33. Rosal R., Brandt-Rauf P., Pincus M.R., Wang H., Mao Y., Li Y., and Fine R.L. 2005. The role of alpha-helical structure in p53 peptides as a determinant for their mechanism of cell death: necrosis versus apoptosis. *Adv Drug Deliv Rev*. **57**:653-660.
34. Chan I., D., Prenner J. E., and Vogel J. H., 2006. Tryptophan- and arginine- rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica*. **1758**:1184-1202.
35. McMurry J. 2001. Química orgánica. 5a Edición. Internacional Thomson. México, México. 1078 pp.
36. Foresman J.B. and Frisch A. 1996. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods. Gaussian, Inc. Second Edition. Pittsburgh, U.S.A. 467pp.
37. Sánchez Ruíz J.F. Estudio farmacológico de antibióticos beta lactámicos mediante parámetros mecanocuánticos. Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Química). UAM .92
38. Levine I. N. 1991. Quantum Chemistry, 5ª Edición. Prentice Hall, New Jersey, USA. 714pp.
39. Nicolás V. M. I., Marín C. E., castro M. F. M., Miranda R. R. 2006. Algunos aspectos básicos de la química computacional. UNAM, FES-Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 39-48.



40. [Parr R. G., Liu S., Kugler A.A., and Nagy A.](#) 1995. Some identities in density-functional theory. *Phys Rev A*. **52**:969-976.
41. Marinich J.A., Maguna F. P., Okulik, N. B., and Castro E. A. Caracterización óptima de la estructura mediante varios índices de complejidad y conectividad molecular. Facultad de Agroindustrias. UNNE. Cdte. Fernández. Pcia. R. Sáenz Peña .Chaco, Argentina. 755.
42. Keefe, D. C. and Pearson K.J. 2004. Ab initio investigations of dipeptide structures. *Journal of Molecular Structure. Theochem*.**679**:65-72 pp.
43. Barrientos-Salcedo C., Ortiz M. R., Arenas A. D., Salamanca G. F., and Soriano-Correa C. 2007. Electronic Structure and physicochemical properties characterization of the amino acids 12-26 of TP53: A Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry A*. **111**:4362-4369.
44. [Chi Y.](#), and [Gellman S.H.](#) 2006. Enantioselective organocatalytic aminomethylation of aldehydes: a role for ionic interactions and efficient access to beta2-amino acids. *J Am Chem Soc*. **128**:6804-6805.
45. Soriano-Correa C., Sánchez-Ruiz J.F., Rico-Rosillo G., Giménez-Scherer, J.A., Velázquez J.R., and Kretschmer R.R. 2006. Electronic structure and physicochemical properties of the anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica*: A theoretical study. *J Mol Struct, Theochem*.**769**: 91-95.
46. Begoña M. M. 2004. Análogos tiofénicos del tcnq: estudio teórico de las propiedades estructurales y electrónicas. Tesis Doctoral. Servei de Publicacions. Universitat de Valencia. 340pp.
47. K. Ohta, Y. Kamimae, and Y. Okuyama, 2003. Hartree–Fock Equation for Hole States: Extension of the Variational Meaning of Koopmans’ Theorem to Many–Electron Ionization, *Internet Electron. J. Mol. Des.* **2**,50–54.
48. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; et al. 1998. Gaussian 98; Revision A.6. Pittsburgh, PA, USA: Gaussian.302pp.
49. Parthasarathi R, Subramanian V, Roy R. D, and Cahattarajab, K, P. 2004. Electrophilicity index as a possible descriptor of biological activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **12**:5533-5543.
50. Van de Waterbend, H; Carter, R. E.; Grassy, G.; Kubinyi, H.; Martin, Y. C.; Tute, M. S.; and Willet, P. 1997. Glossary of Terms Used in Computational Drug Desing. UIPAC. *Pure and applied Chemistry*. **69**:1137-1152.
51. Soriano-Correa C, Raya, A., and Esquivel O.R. 2008. Characterization of electronic structure and physicochemical properties of antiparasitic nifurtimox



- Analogues: A theoretical study. *International Journal of Quantum Chemistry*. **108**:1369-1379.
52. Wavefunction, Inc. Spartan '06 for Windows and Linux.
53. Gauss View. Gaussian Inc. Pittsburgh, PA, USA. www.gaussian.com.
54. Uglienco, P.; Viterbo, D. and Borzani, J. 1988. Moldraw: program for the Graphical Manipulation of molecules on Personal Computers. Release 2.0, version H1(32bit). www.moldraw.unito.it
55. ACD/ChemSketch Freeware. 2006 version 10.00, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada. www.acdlabs.com/products/chem_dsn_lab/chemsketch



10. APÉNDICES

10.1. APÉNDICE I. ABREVIATURAS

Nombre	Código de una letra
Glicina	G
Alanina	A
Valina	V
Leucina	L
Isoleucina	I
Metionina	M
Fenilalanin	F
a	
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Cisterna	C
Asparragin	N
a	
Glutamina	Q
Tirosina	Y
Triptófano	W
Aspartato	D
Glutamato	E
Histidina	H
Lisina	K
Arginina	R

Tabla 7. Abreviaturas de los 20 aminoácidos encontrados en las proteínas.



10.2. APÉNDICE II. AMINOÁCIDOS, PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS.

Las proteínas son biomoléculas grandes que se encuentran en todo organismo vivo. Existen muchos tipos y tienen funciones biológicas diferentes. La queratina de la piel y las uñas, la fibroína de la seda, las telas de la araña y la mayor parte de las enzimas que catalizan los millares de reacciones biológicas dentro de las células son proteínas. Sea cuál sea su función, todas las proteínas están construídas de muchas unidades de aminoácidos enlazados en una cadena larga.

Los aminoácidos, como su nombre lo indica, son bifuncionales. Contienen un grupo amino básico y un grupo carboxilo ácido. Su valor como bloques biológicos de construcción proviene del hecho de que se pueden asociar en grandes cadenas formando enlaces amida entre el $-NH_2$ de un aminoácido y el $-COOH$ de otro. Con fines de clasificación, las cadenas con menos de 50 aminoácidos suelen denominarse péptidos, en tanto que el término proteína se reserva para cadenas más largas.

Como los aminoácidos contienen un grupo ácido y un grupo básico, presentan una reacción ácido-base y se encuentran principalmente en la forma de un ion bipolar o zwitterion (del alemán zwitter, "híbrido"). Además, los aminoácidos son anfóteros: pueden reaccionar como ácidos o bases, dependiendo de las circunstancias. En solución acuosa ácida, un ion dipolo de un aminoácido es una base que acepta un protón para formar un catión; en solución acuosa básica, es un ácido que pierde un protón y da lugar a un anión³⁵.

Cada tipo de proteína tiene una estructura particular definida por su secuencia de aminoácidos la cuál esta determinada genéticamente. La información necesaria para incorporar los aminoácidos en la proporción y el orden adecuados reside en la secuencia de bases de nucleótidos de un gen (una región del DNA). La composición y secuencia de aminoácidos característicos de cada proteína es lo que le permite plegarse en un arreglo tridimensional preciso para que lleve a cabo la función bioquímica para la cuál fue diseñada³⁶.

La estructura o el orden en que se colocan los aminoácidos es el fruto de la información que se encuentra en el genoma de cada individuo, Sin embargo, la estructura primaria es solo parte de la historia. Se sabe que la formación de una proteína funcionalmente competente requiere que la cadena polipeptídica se distorsione y así permita la interacción entre dos sitios de la cadena polipeptídica; los sitios pueden estar a distancias de unos cuantos o muchos aminoácidos.

Cuando todas las interacciones entre distintos sitios de la proteína se establecen se llega al producto final, una molécula con una estructura tridimensional precisa y



funcionalmente competente. Las interacciones que se establecen entre distintos segmentos de la cadena polipeptídica ocurren principalmente entre las cadenas laterales de los aminoácidos. Es importante señalar que estas interacciones no son covalentes, aunque en algunas proteínas existen puentes disulfuro que son necesarios para mantener su estructura y función. Las interacciones no covalentes pertenecen a la categoría de uniones débiles - puentes de sal, interacciones tipo van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

Un aminoácido es una molécula que contiene un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) libres. Los alfa-aminoácidos pueden representarse en general por NH₂-CHR-COOH, siendo R un radical o cadena lateral característica de cada aminoácido. Estos grupos R son muy variados químicamente. Muchos aminoácidos forman proteínas (aminoácidos proteicos), mientras otros nunca se encuentran en ellas. En todos los aminoácidos que componen proteínas -excepto la glicina- el carbono alfa es un carbono asimétrico. (El carbono alfa es el adyacente al grupo carboxilo).

El enlace peptídico tiene lugar mediante la pérdida de una molécula de agua entre el grupo amino de un aminoácido y el carboxilo de otro:

El resultado es un enlace covalente CO-NH, que es, en realidad, un enlace amida sustituido. Podemos seguir añadiendo aminoácidos al péptido, porque siempre hay un extremo NH₂ terminal y un COOH terminal.

Para nombrar el péptido se empieza por el NH₂ terminal por acuerdo. Si el primer aminoácido de nuestro péptido fuera alanina y el segundo serina tendríamos el péptido Alanil-serina.



10.3. APÉNDICE III. SOFTWARE Y HARDWARE

SPARTAN '06 V1.1.0.

Es una herramienta para explorar la química orgánica, bioorgánica, inorgánica y organometálica por el camino de la mecánica molecular y cálculos químico cuánticos, en conjunto con modelos gráficos para convertir los resultados obtenidos de estos cálculos⁵².

GAUSSIAN 03

Es un conjunto de programas conectados para llevar a cabo diferentes tipos de cálculos. Incluye todos los métodos *ab initio* comunes, muchos métodos semiempíricos y los métodos DFT⁵⁰. Es capaz de predecir un gran número de propiedades de las moléculas y de sus reacciones, tales como energías y estructuras moleculares, estados de transición, frecuencias de vibración, propiedades termoquímicas, orbitales moleculares, cargas atómicas y momentos multipolares, entre otras. Los cálculos se pueden llevar a cabo sobre sistemas en fase gas y en disolución, y tanto en estado fundamental como en estado excitado⁵³.

GAUSS VIEW 2.1

Es una interfaz gráfica avanzada diseñada para facilitar la preparación de los cálculos de Gaussian 98 y el análisis gráfico de los resultados del programa. Algunos de los resultados que se pueden analizar utilizando GaussView son: estructuras moleculares optimizadas, orbitales moleculares, superficies de densidad electrónica, superficies de potencial electrostático y representaciones animadas de los modos normales de vibración. Está disponible en versiones para supercomputador, estaciones de trabajo y computadores personales que trabajan bajo Windows⁵³.



MOLDRAW 2.0 VER. H1 (32-BIT)

MOLDRAW es un visualizador de gráficos moleculares y manipulador. Se trata de un programa de 32 bits que funciona bajo cualquier tipo de Windows de Microsoft. Por lo que la rotación y la manipulación de la estructura de los átomos a 5000 en representación de palo es muy práctico con los modernos CPUs.

MOLDRAW permite visualizar moléculas de los cristales y la estructura de los cuales provienen de una variedad de recursos estructurales. Las estructuras pueden ser presentadas en una variedad de representación gráfica. MOLDRAW también pueden manipular cada estructura, por ejemplo, añadiendo, eliminando, cambiando el nombre o el cambio de la posición de los átomos.

Las estructuras se pueden exportar en una variedad de formatos estándar para más manipulaciones. Introduce tensión en la estructura. Obteniendo la Geometría relajación que se puede lograr mediante la exportación a la estructura gaussiana o MOPAC programa de perfeccionamiento.

MOLDRAW es capaz de exportar archivos de entrada y salida de los archivos de importación para gaussian que es un conjunto de programas⁵⁴.

ACD/CHEMSKETCH VER. 10.02

ACD / ChemSketch es una avanzada herramienta de dibujo y química, es el aceptado en la interfaz de la industria de la RMN para mejores predicciones de propiedad y molecular, nomenclatura, y el manejo de software de análisis de datos. y facilita la transformación estructural o de análisis de datos, siendo una de sus funciones calcular el coeficiente de partición octanol/agua (LogP)⁵⁵.