



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

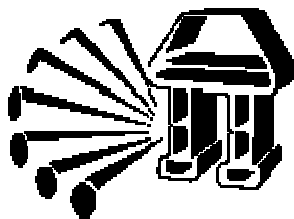
DISEÑO DE UN PÉPTIDO ACARREADOR DE  
MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO  
PRESENTA:

JOSÉ LUIS ZÁRATE ALVARADO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CAROLINA BARRIENTOS SALCEDO  
CODIRECTORA: DRA. CATALINA SOREANO CORREA



México, Enero 2010





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.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

RESÚMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 PÉPTIDOS ACARREADORES.....	3
1.1.2 PENETRATINA COMO EJEMPLO DE PÉPTIDO ACARREADOR.....	8
1.2 QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	11
1.2.1 MÉTODOS <i>AB INITIO</i> .....	12
1.2.2 MÉTODOS SEMIEMPÍRICOS.....	12
1.2.3 MÉTODOS DE TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD (DFT).....	13
1.2.4 DESCRIPTORES DE ESTRUCTURA ELECTRONICA.....	14
1.3 MEMBRANA PLASMÁTICA.....	16
1.4 TIPOS DE TRANSPORTE CELULAR.....	18
1.5 MECANISMOS DE INTERNALIZACIÓN CELULAR.....	20
1.6 FORMAS DE -ENSAMBLE DEL ACARREADOR CON SU COMPLEMENTO.....	22
CAPITULO 2 ANTECEDENTES.....	24
CAPITULO 3 JUSTIFICACIÓN.....	27
CAPITULO 4 OBJETIVOS.....	28
CAPITULO 5 HIPÓTESIS.....	29
CAPITULO 6 MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA DE PENETRATINA.....	30
6.1.1 OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA.....	30
6.1.2 CÁLCULOS PUNTUALES.....	31
6.2 CRITERIOS PARA EL DISEÑO DE UN PÈPTIDO ACARREADOR.....	31
CAPITULO 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1 GEOMETRÌAS OPTIMIZADAS.....	32
7.2 ANALISIS DE CARGAS.....	36
7.3 DESCRIPTORES QUÌMICO CUANTICOS GLOBALES.....	44
7.4 COEFICIENTE DE PARTICIÓN OCTANOL/AGUA (Log P).....	45
7.5 ORBITALES MOLECULARES FRONTERA, ISOSUPERFICIE DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO Y DENSIDAD ELECTRÓNICA.....	46
CAPITULO 8 CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	68
CAPITULO 9 APÉNDICES.....	75
9.1 ABREVIATURAS.....	76
9.1.2. ABREVIATURAS DE LOS AMINOÁCIDOS.....	76
9.2 CRITERIOS DE ELECCIÓN DE CONJUNTO BASE.....	77
9.3 PÉPTIDOS ACARREADORES CONOCIDOS.....	78
9.4 ÍNDICE DE IMÁGENES.....	81
9.5 ÍNDICE DE TABLAS.....	84

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN.** La membrana plasmática sirve como barrera selectiva a nutrientes y otras sustancias, es un sitio de control que deben salvar los fármacos para llevar a cabo su función en el citoplasma o en algún organelo celular como el núcleo. Existen péptidos catiónicos cortos capaces de pasar esta defensa que además se pueden unir a moléculas activas; son vectores que no dependen de energía ni de receptor con alta eficiencia y baja actividad citotóxica, tal es el caso de penetratina el cual se origina de la homeoproteína Antennapedia de *Drosophila melanogaster*.

**OBJETIVO.** Caracterizar y analizar la estructura electrónica y las propiedades fisicoquímicas de penetratina con la finalidad de diseñar nuevas moléculas con mayor eficiencia en el transporte de moléculas de interés biológico.

**METODOLOGÍA.** Se utilizó el método Hartree-Fock (HF) empleando el conjunto base 6-31G\*; para obtener los confórmeros de mínima energía. Los cálculos puntuales se efectuaron con la teoría de funcionales de la densidad (DFT) con la base híbrida B3LYP con la finalidad de analizar la distribución de la densidad electrónica así como el carácter nucleofílico o electrofílico de los aminoácidos.

**RESULTADOS.** Se obtuvieron los confórmeros de mínima energía de penetratina (RQIKIWFQNRMRMKWKK), así como de cuatro tetrapéptidos (RQIK, IWFQ, NRRM, KWKK) en los cuales fue fragmentada, se analizaron los siguientes descriptores: dureza ( $\eta$ ), índice de electrofilicidad ( $\omega$ ), potencial de ionización (I), orbitales moleculares frontera HOMO-LUMO, densidad electrónica, potencial electrostático y el coeficiente de partición octanol/agua (Log P) como índice de reactividad biológica global. La molécula geoméricamente más relajada fue RQIK al tener una energía más baja. La molécula más blanda fue la secuencia completa y KWKK. En cuanto al índice de electrofilicidad la secuencia completa y KWKK fueron las que presentaron los valores más bajos, para el potencial de ionización las moléculas con menor valor fueron la secuencia completa y el KWKK. De acuerdo con los resultados de Log P la secuencia completa y KWKK presentan mayor lipofilia. Los orbitales moleculares frontera se localizaron preferentemente en los residuos triptófano en las moléculas que los tenían; tanto la densidad electrónica como el potencial electrostático señalan una tendencia a localizar las cargas más negativas hacia el extremo carboxilo en las moléculas, a diferencia de NRRM donde se presenta una deslocalización de cargas.

**CONCLUSIONES.** La molécula más reactiva es la secuencia completa seguida de KWKK debido a que presentan valores bajos de dureza, potencial de ionización e índice de electrofilicidad. Los residuos glutamina y triptófano presentan mayor reactividad en todos los péptidos analizados, además de ser fundamentales en la estructura secundaria de la molécula como lo informan algunos autores, por todo esto se proponen las secuencias GKWRRRMWG, RRWRWMG y GWRKMWG como posibles acarreadores.

Palabras Clave: Química Computacional, Acarreador, Penetratina



## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Plasmatic membrane serves as a selective barrier to nutrients and other substances, that denied the access to drugs to perform their function in the cytoplasm or in a cellular organelle as nucleus. There are short cationic peptides able to pass this defense also can bind to active molecules, are vectors independent of energy or receiver with high efficiency and low cytotoxic activity, these is the case of penetratin derived from homeoprotein Antennapedia of *Drosophila melanogaster*.

**OBJECTIVE.** Characterize and analyze the electronic structure and physicochemical properties of penetratin with the aim to designing new molecules with greater efficiency in the transport of molecules of biological interest.

**METHODOLOGY.** We used the Hartree-Fock method (HF) using the basis set 6-31G \*; to get the lowest-energy conformers. Single point were calculated with the density functional theory (DFT) with B3LYP hybrid basis in order to analyze the distribution of electron density and the nucleophilic or electrophilic character of amino acids.

**RESULTS.** We obtained the lowest energy conformers of penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK) this sequence was fragmented in four tetrapeptides (RQIK, IWFQ, NRRM, KWKK), we analyzed the following descriptors: hardness ( $\eta$ ) electrophilic index ( $\omega$ ), ionization potential (I), frontier molecular orbital HOMO-LUMO, electron density, electrostatic potential and log P as an index of overall biological reactivity. The complete sequence and KWKK were softer than others, although the molecule RQIK was more relaxed geometrically to have a lower energy. On the electrophilicity index the complete sequence and KWKK reported the lowest values, for the ionization potential the molecule with the lowest value was the complete sequence and KWKK. According to the results of Log P complete sequence and KWKK have a higher lipophilicity. The location of frontier molecular orbitals were preferentially at tryptophan residues in the molecules that possessed this kind of aa. In addition the electron density and electrostatic potential had a tendency to locate more negative charges at the carboxyl terminus; in NRRM unlike molecules which presents a delocalization of charges.

**CONCLUSIONS.** The more reactive molecule is the complete sequence followed KWKK because they exhibit low values of hardness, ionization potential and rate of electrophilic and relaxed geometry. Glutamine and tryptophan residues show higher reactivity in all tested peptides, besides being fundamental in the secondary structure of the molecule, for all this are proposed GKWRRRMWG, RRWRWMG and GWRKMWG as possible carriers sequences.

Key Words: Computational Chemistry, Carrier, Penetratin



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Péptidos acarreadores

Los péptidos son secuencias de aminoácidos más cortas que las proteínas, tienen diversas funciones como las de defensa en diversos tipos de bacterias a manera de antibióticos (Matsuzaki, 2001), agentes vasoactivos como la bradiquinina, hormonas como la oxitocina, la vasopresina y neurotransmisores como encefalinas y endorfinas. Están formados por cadenas lineales de aminoácidos unidas mediante enlaces peptídicos, estos consisten en un carbono central  $\alpha$ , un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ), un grupo carboxilo ( $\text{COOH}$ ) y un grupo distintivo R llamado cadena lateral (Figura 1) (Alberts *et al.*, 2007).

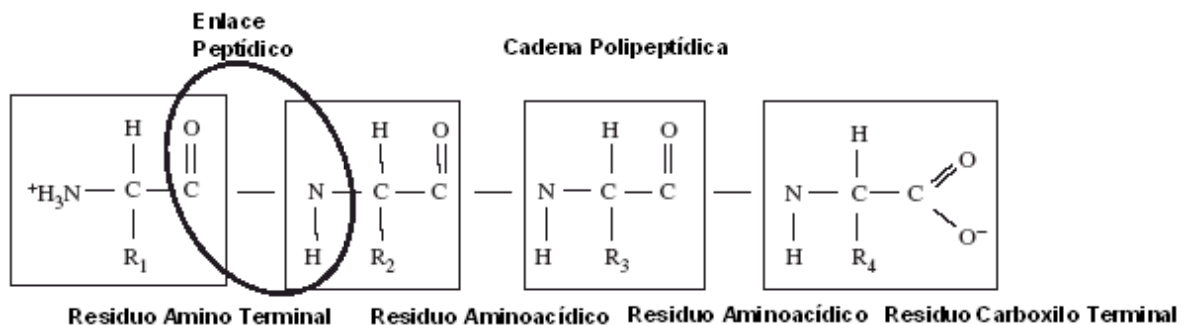


Figura. 1.-Estructura general de un péptido. Tomado de Alberts 2007

Otra aplicación de los péptidos es el transporte de diversas moléculas a través de la membrana celular (Mäe *et al.*, 2005). Este tipo de péptidos son de menos de 30 aminoácidos (aa), son llamados acarreadores o péptidos troyanos (Magzoub, 2004). El tamaño de estos péptidos se ha discutido, Andaloussi y colaboradores (2005) en una revisión sobre péptidos acarreadores mencionan que van de 5 a 40 aa; mientras que Snyder y Dowdy (2004) mencionan que son menores a 20 aa.



Los péptidos acarreadores se utilizan para la entrega de diversos agentes terapéuticos promoviendo su traspaso a través de la ruta endosomal (Figura 2) mientras que otros pueden cruzar las membranas independientemente de esta (Deshayes *et al.*, 2005). Tienen baja actividad citotóxica (Mäe *et al.*, 2006) y no dependen de receptores, generalmente son anfipáticos, aunque algunos como poliargininas son polibásicos. Diversos estudios sugieren que sus propiedades acarreadoras se deben a la carga positiva dentro de su secuencia; se ha demostrado que el cambio de las secuencias de levógiros a dextrógiros no afecta su eficiencia (Björklund *et al.*, 2006; Derossi *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2006).

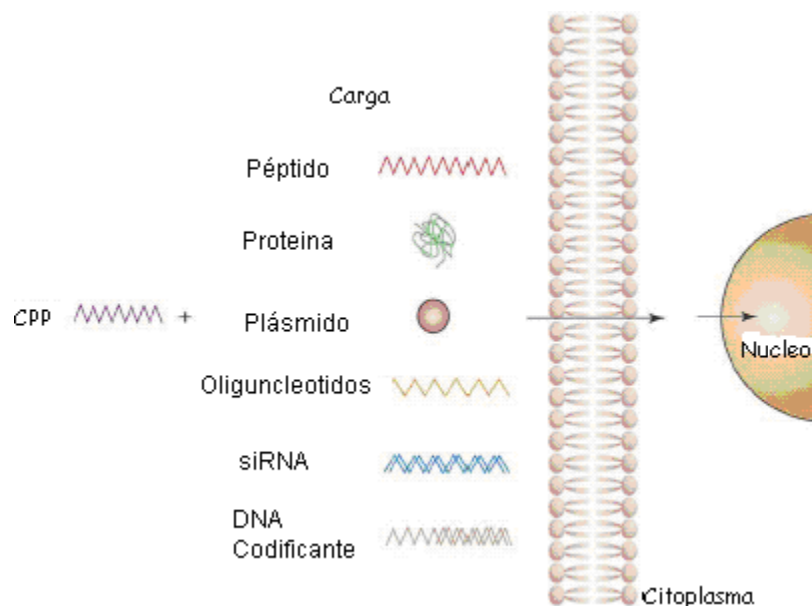


Figura 2.- Aplicaciones de los péptidos acarreadores. CPP, (péptidos penetrantes a la célula); carga, es cada una de las moléculas que se le pueden unir a los CPPs. En “rosa” se representa la membrana celular; las flechas indican el paso a través de la membrana. Tomado de Maarja y Ülo Langel, 2006

Los péptidos acarreadores provienen de diversas fuentes y generalmente están divididos en tres diferentes grupos dependiendo del origen del péptido: quiméricos, biológicos (Factores de transcripción, secuencias virales, etc.) y sintéticos (Andalousi *et al.*, 2005).

Aunque otros autores los clasifican de acuerdo a su anfipaticidad es decir que contiene dos regiones, una hidrofóbica y otra hidrofílica; otra forma de clasificar estos péptidos es de acuerdo a su forma de entrada a la célula: dependiente o independiente de



energía, así como al mecanismo por el cual entra a la célula que puede ser micela invertida o a través de poros (Figura 3) (Kilk 2004; Andaloussi *et al.*, 2005; Magzoub y Gräslund 2004; Deshayes *et al.*, 2005).

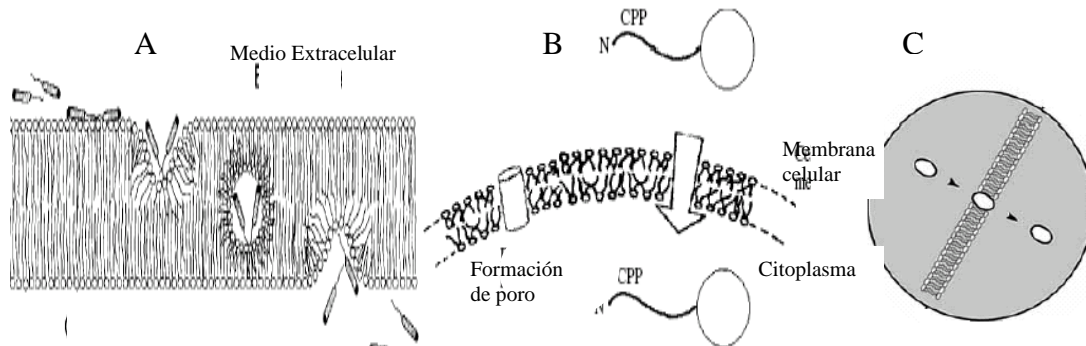


Figura 3.- Modelos de entrada a la célula de los péptidos acarreadores. A) Vía micela invertida, B) formación de poros toroidales y C) independiente de energía y receptor. Tomado de Derossi *et al.*, 1998, El-Andaloussi 2005, Magzoub y Gräslund 2004.

Los estudios funcionales han indicado que en dominios de transducción de proteínas de algunos factores de transcripción como la *Antennapedia* de donde deriva penetratina, presentan mutantes que favorecen el paso a través de la membrana (Tabla 1), así como con el factor de transcripción que proviene de la rata pls1 (Kilk *et al.*, 2001) y el HIV-1 Tat (Trans-Activator of Transcription) (Farell *et al.*, 1994).

Tabla 1.- Mutantes de Penetratina, R arginina, Q glutamina, I isoleucina, K lisina, W triptófano, F fenilalanina, N asparragina, M metionina, P prolina

Mutante	Secuencia	Referencia
43-58	RQIKIWFQNR RMKWKK	Derossi <i>et al.</i> , 1996; Apostolopoulos 2006
58-43	KKWK MRRNQFWIKIQR	Derossi <i>et al.</i> , 1997
D43-58	D-RQIKIWFQNR RMKWKK	Derossi <i>et al.</i> , 1998
Pro 50	RQIKIWF PNR RMKWKK	Derossi <i>et al.</i> , 1999; Berlose <i>et al.</i> , 1996
3Pro	RQPKIWF PNR MPWKK	Derossi <i>et al.</i> , 2000
Phe 48,56	RQIKIFFQNR RMKFKK	Derossi <i>et al.</i> , 2001; Genevieve <i>et al.</i> , 2003
Met-Arg	RQIKIWFQNR RR KWKK	Derossi <i>et al.</i> , 2002
7Arg	RQIRIWFQNR RM RWRR	Derossi <i>et al.</i> , 2003
W/R	RRWRRWRRWRRWRR	Derossi <i>et al.</i> , 2004





---

Los péptidos quiméricos fusionan las secuencias peptídicas que se originan por distintas proteínas, algunos ejemplos son: transportan, pep-1, MPG y SP (Kilk, 2004).

Los péptidos acarreadores de origen biológico derivan de péptidos antimicrobianos como buforina 2, protegrina 1 y bactenecina (Magzoub y Gräslund, 2004). También están los derivados de neuropéptidos como SubP y dinorfinas (Dietz y Bähr, 2005); además existen otros como la proteína de virión VP22 llamado pVEC derivado del virus del herpes; hCT derivado de calcitonina humana, FGFs derivados del factor de crecimiento de fibroblastos, SSHRs derivado de secuencias de señalamiento de regiones hidrofóbicas y los péptidos derivados de priones, que pueden ser útiles en el transporte de proteínas, por ejemplo bPrPp y mPrPp. (Magzoub *et al.*, 2004).

Los péptidos acarreadores sintéticos anfipáticos (MAPs), cuyos péptidos modelo son KALA, MAP, MPG, ppTG20 (Deshayes *et al.*, 2005).

De todos los péptidos acarreadores conocidos, Tat y penetratina son los más utilizados de acuerdo a una revisión de Vives (2005), menciona que de 300 casos en los que se usó la técnica de los péptidos acarreadores dichos péptidos ocupan dos terceras partes del total de los estudios (Figura 4).

Algunos autores con la finalidad de encontrar nuevas secuencias acarreadoras, han empleado diversos métodos como Hällbrink y colaboradores (2005) quienes introdujeron principios de identificación de secuencias acarreadoras utilizando la técnica de relación estructura actividad (QSAR) y descriptores fisicoquímicos usados por Sandberg y colaboradores (1998).



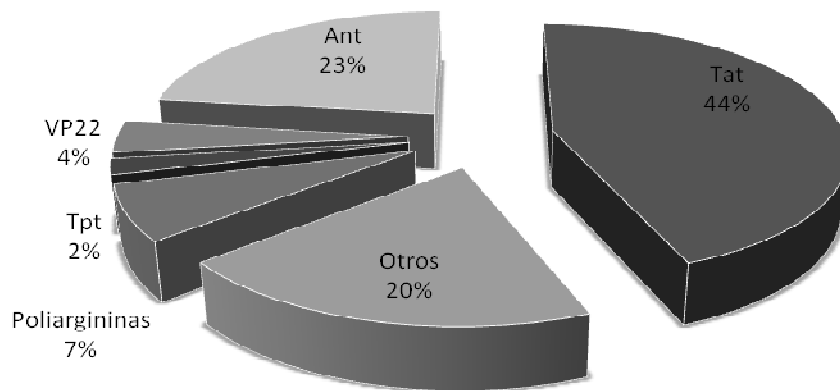


Figura 4.- Representación de la recurrencia de estudios con péptidos acarreadores. Tomado de Vives, 2005.

Para el transporte de moléculas hacia el interior de las células además de los péptidos acarreadores se han empleado otros sistemas como liposomas, microesferas, nanoesferas, polímeros solubles sintéticos y naturales; los polímeros de origen sintético tienen menor efectividad al entrar en la célula ya que son reconocidos como extraños por el sistema de defensa natural del organismo, además de que en algunos casos por si mismos presentan citotoxicidad (Villa, 2007).



### 1.1.2 Penetratina como ejemplo de péptido acarreador

La homeoproteína Antennapedia de *Drosophila* funciona como factor de transcripción y se desplaza a través de las membranas biológicas (Derossi *et al.*, 1998); este péptido tiene 2 hélices alfa con una lámina beta separando las dos hélices, la tercera se dedica al reconocimiento del blanco de DNA (Figura 5) (Gehring *et al.*, 1994).

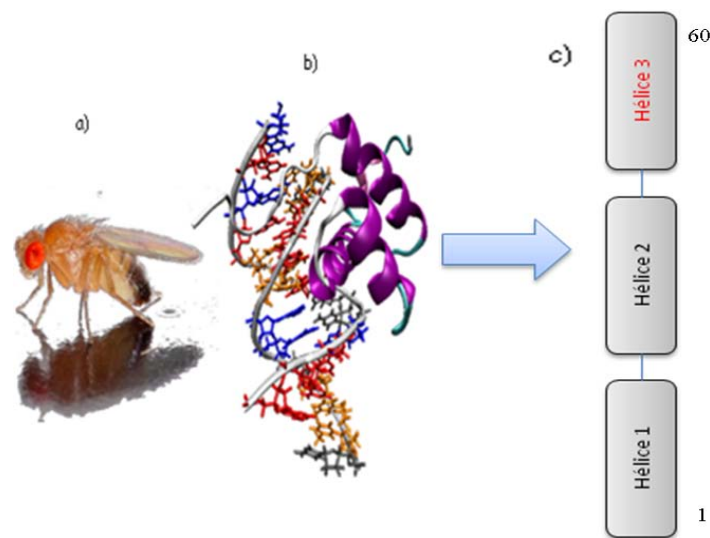


Figura 5.- Representación grafica de la penetratina. a) *Drosophila* spp; b) Interacción de Antennapedia (cintas moradas) con DNA; c) Proteína Antennapedia y en rojo tercera hélice alfa correspondiente a penetratina

Dentro de esta proteína de 60 aminoácidos (Schneuwly *et al.*, 1986), se identificó una secuencia más corta de 16 aminoácidos llamada penetratina que se ha utilizado como vector de internalización de varios tipos de moléculas dentro del citoplasma y del núcleo de células eucariontes (Prochiantz *et al.*, 1996). La penetratina (RQIKIWFQNRRMKWKK) (Figura 5) es un péptido anfipático (Genevieve *et al.*, 2003) que tiene siete residuos con carga neta positiva: 3 argininas y 4 lisinas (Björklund *et al.*, 2006).



Tabla 2.- Secuencia completa del homeodominio Antennapedia de *Drosophila melanogaster*.  
En rojo la tercera hélice alfa conocida como penetratina residuos (43-58).

Homeodominio Antennapedia				
MTMSTNNCES	MTSYFTNSYM	GADMHHGHYP	GNGVTDLDAQ	QMHHSQNAN
HQGNMPYPRF	PPYDRMPYYN	GQGMDDQQQH	QVYSRPDPS	SQVGGVMPQA
QTNGQLGVPQ	QQQQQQQPS	QNQQQQQAQQ	APQQLQQQLP	QVTQQVTHPQ
QQQQQPVVYA	SCKLQAAVGG	LGMVPEGGSP	PLVDQMSGHH	MNAQMTLPHH
MGHPQAQLGY	TDVGVPDVTE	VHQNHNNMGM	YQQQSGVPPV	GAPPQGMHQ
GQGPPQMHQG	HPGQHTPPSQ	NPNSQSSGMP	SPLYPWMRSQ	FGKQERKRG
RQTYTRYQTL	ELEKEFHNR	YLTRRRRIE	AHALCLTERQ	IKIWFQRRM
KWKKENKTKG	EPGSGGEGDE	ITPPNSPQ		

Algunos estudios han demostrado que la entrada de penetratina a las células es a través de su unión a lípidos de membrana, pero tanto la unión como la traslocación se ve afectada por las modificaciones de algunas propiedades físicoquímicas del péptido tales como carga neta, conformación tipo hélice alfa e hidrofiliidad entre otras; lo que sugiere que la composición lipídica de la membrana plasmática afecta la internalización de penetratina, que requiere tanto de la unión a los lípidos de membrana como de otras de sus propiedades (Haupt *et al.*, 1997).

Existe controversia acerca del requerimiento de energía para la internalización de penetratina; por un lado Derossi y colaboradores (1994) reportaron que es independiente de energía y de receptor, no saturable y no obstaculizado por baja temperatura (4°C) al igual que Belrose y colaboradores (1996); por otro lado Console y colaboradores (2003) demostraron que requiere de un gasto de energía y proponen que pueda ser por la vía de endocitosis; en este sentido Binder y Lindblom (2003) proponen un mecanismo de entrada de tipo electroporación al demostrar que la colocación asimétrica de penetratina entre la bicapa forma un campo eléctrico el cual altera la arquitectura de la membrana.

Algunos autores han propuesto que el paso de penetratina hacia el interior celular depende de los residuos de triptófano que desestabilizan la arquitectura de la membrana y facilitan el paso hacia la célula (Geneive *et al.*, 2003; Binder *et al.*, 2004; Christiaens *et al.*, 2004) ya que este tipo de péptidos tiene un mecanismo de acción parecido al de los péptidos antimicrobianos (Plénat *et al.*, 2005), los cuales deben gran parte de su actividad a estos residuos y a las argininas (Chan *et al.*, 2006).



Un estudio de simulación propone que la hélice alfa de penetratina no se inserta profundamente en la membrana celular, si no que se mantiene paralela al plano de la misma (Drin *et al.*, 2001). Lindberg y colaboradores realizaron estudios con una mutante de penetratina en la cual sustituyeron los triptófanos por fenilalanina y demostraron que la mutante no tuvo la misma capacidad que penetratina silvestre (Lindbergh *et al.*, 2003) (Figura 6).

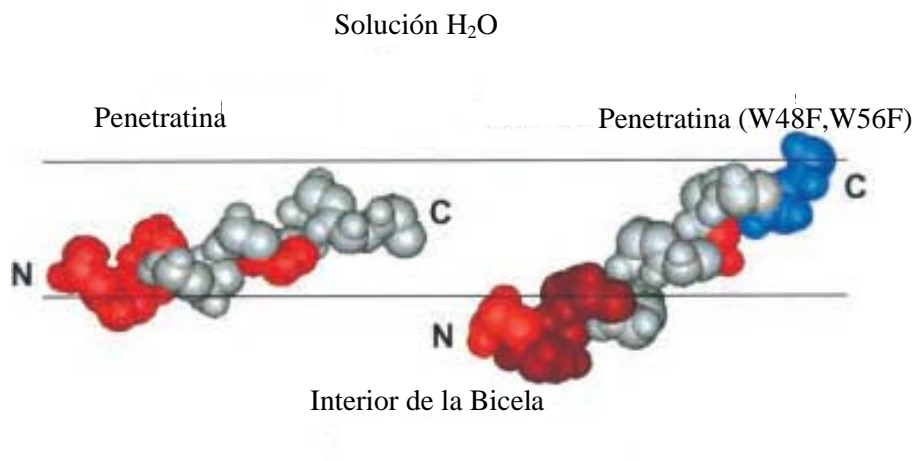


Figura 6.- Inserción de penetratina a la bicapa celular. Los residuos marcados en rojo corresponden a regiones que interaccionan con cargas positivas; en azul regiones que interaccionan con cargas negativas. Tomado de Lindberg *et al.*, 2003.

La penetratina es eficiente para la transferencia de proteínas pequeñas (menos de 100 residuos), pero su eficacia es baja para proteínas más grandes. También se utiliza para la transferencia de ácidos nucleicos, tales como oligonucleótidos antisentido, ácidos nucleicos de péptidos (PNAs) y DNA con una transferencia menos eficiente para este último (Derossi *et al.*, 1998).

Wang y colaboradores (2006) realizaron estudios con el fármaco anticancerígeno paclitaxel unido a penetratina demostrando que se mantuvo la actividad. Fischer y colaboradores (2000) demostraron que sólo se necesitan los residuos RRMKWKK para llevar a cabo la internalización de la secuencia. Ellos proponen que el último residuo lisina es importante para la actividad de traslocación.



## 1.2 Química computacional

Para comprender la reactividad de los compuestos orgánicos hay que empezar por las piezas con que están construidas las moléculas, es decir los átomos. La energía y las propiedades de un átomo o molécula pueden obtenerse mediante la ecuación de onda descrita por Schrödinger. Las soluciones de las ecuaciones de onda utilizadas para describir electrones de átomos individuales, se combinan para describir moléculas. Las predicciones geométricas teóricas suelen ser buenas ya que los ángulos de enlace de la mayoría de moléculas muestran desviaciones relativamente pequeñas con respecto a los ángulos teóricos que predicen las teorías de los orbitales moleculares (Oldfield, 2005), gracias a esto con los programas computacionales es posible estudiar la estructura electrónica a partir de estructuras optimizadas.

La química computacional es una rama de la química teórica, cuyo objetivo es el estudio de los procesos químicos mediante herramientas de cómputo. Con la finalidad de desarrollar y utilizar programas para el estudio de las propiedades de moléculas investiga la estructura electrónica, naturaleza del enlace químico, interpretación, caracterización y predicción de sus propiedades geométricas; funciones de onda y energía, tiene sus fundamentos en bases teóricas, lenguaje matemático y aspectos químicos (Nicolás *et al.*, 2006).

Las cuatro aproximaciones más importantes para calcular las propiedades moleculares son: los métodos *ab initio*, los métodos semiempíricos, los métodos de funcionales de la densidad (DFT) y los métodos de mecánica molecular (Levine, 2001). Algunas de las áreas de la química computacional importantes en el estudio de los procesos biológicos son la mecánica molecular, dinámica molecular; mientras que la química cuántica computacional describe la distribución espacial de los electrones, calcula la energía de las moléculas apoyándose en los principios de la mecánica cuántica, utiliza conceptos físicos y matemáticos para estudiar el movimiento de las partículas atómicas y subatómicas (Frisch *et al.*, 1995).



---

Uno de los principales problemas de los estudios computacionales en los péptidos, es la gran cantidad de rotámeros que presentan; como resultado de la libre rotación del enlace peptídico, lo que implica un gran número de posibles conformaciones y cada una con distinta actividad. Estas conformaciones estructurales se denominan estructuras secundarias, algunas estructuras secundarias comunes son la hélice alfa, láminas beta y beta plegadas (Creighton, 1992).

### **1.2.1 Métodos *ab initio***

Los métodos de química cuántica computacional (o estructura electrónica) toman los movimientos de los electrones y se ocupan de la optimización de la estructura electrónica de las moléculas. Los métodos mecano-cuánticos *ab initio* no requieren de calibración empírica, son aplicables a todos los sistemas moleculares y las características son intrínsecas, incluso en ausencia de datos experimentales. Como resultado de esto, tienen el potencial de proporcionar resultados más exactos para los sistemas moleculares pequeños que se estudian tradicionalmente en las ciencias de la vida (Mourik, 2004).

Los métodos *ab initio* usan solamente las constantes atómicas fundamentales como la ecuación de onda de Schrödinger, algunas constantes fisicoquímicas y los números atómicos de los átomos del sistema molecular de interés.

El método *ab initio* mas empleado es el de Hartree Fock (HF) en este método se considera que cada electrón del sistema se mueve en un campo de potencial promedio inducido por el resto de los electrones, ignora las distorsiones locales de la distribución de electrones (Mourik, 2004).

### **1.2.2 Métodos semiempíricos**

Los métodos semiempíricos se pueden utilizar como primer paso para cálculos *ab initio* de sistemas muy grandes para obtener una estructura con una geometría más estable de un sistema molecular de varios electrones. Emplean parámetros basados en datos experimentales (Levine, 2001).



### 1.2.3 Métodos de Teoría de Funcionales de la densidad (DFT)

Teoría de funcionales de la densidad (DFT por sus siglas en inglés) es una tercera clase de método de cálculo de estructura electrónica similar a los métodos *ab initio* con un costo computacional cercano pero menor. La idea principal de DFT es describir un sistema molecular directamente a través de su densidad, sin necesidad de calcular la función de onda (Mourik, 2004).

Este método calcula la energía y otras propiedades moleculares a partir de la densidad electrónica del estado fundamental, su objetivo es designar funcionales que relacionan la densidad electrónica con la energía.

Las funcionales DFT pueden calcular la estructura electrónica de las moléculas con menos recursos computacionales que los métodos *ab initio*, pero no predice las energías de los orbitales de una manera adecuada (Zhang y Musgrave, 2006).

En los métodos basados en HF los orbitales moleculares son una representación de la función de onda, mientras que en DFT también llamados orbitales Kohn-Sham son una forma de representar la densidad (Zhang y Musgrave, 2006).

Ambos métodos *ab initio* y DFT generalmente utilizan un conjunto de bases establecidas, las cuales son una colección de funciones representando orbitales atómicos.





#### 1.2.4 Descriptores de estructura electrónica

En el estudio de las interacciones moleculares uno de los aspectos más importantes de una molécula es su reactividad química, por ello son importantes los estudios de descriptores moleculares, tales como, los orbitales moleculares frontera HOMO-LUMO, la dureza, la electronegatividad, el momento dipolar.

Momento dipolar es la distancia con que el centro de distribución de las cargas negativas, se aparta del centro de las cargas nucleares positivas, el producto de la magnitud de las cargas parciales positivas y negativas por la distancia que la separa, se refiere a la distribución de carga electrónica; informa acerca de la posición atómica relativa en el espacio de una especie molecular obteniendo su simetría axial (Kotz *et. al.*, 2003).

Los orbitales moleculares frontera HOMO (orbital molecular de mayor energía que contiene electrones) LUMO (orbital molecular más bajo desocupado), (Kotz *et. al.*, 2003); son utilizados para describir el comportamiento químico, describe otras características involucrados en la estructura molecular electrónica, entre estas la transferencia de cargas, fotoexcitación, magnetismo y electrónica molecular. (Zhang y Musgrave 2006).

El teorema de Koopmans sugiere que la energía del orbital frontera HOMO es una aproximación cercana al inverso aditivo del potencial de ionización (-IP), de igual manera esto sugiere que la afinidad electrónica por un determinado número de electrones en un sistema es igual al negativo de la energía del orbital frontera LUMO, asumiendo que los orbitales no estén relajados (Zhang y Musgrave 2006).

El potencial de ionización se define como la energía necesaria para separar un electrón de una molécula en fase gaseosa, el primer potencial de ionización es la energía necesaria para separar al electrón más externo de la molécula.

La afinidad electrónica (A) es la energía liberada en el proceso en el cual una molécula adquiere un electrón, computado como la diferencia de energía entre la forma neutra y



---

el anión (Kotz *et al.*, 2003). Dicho de otra forma la capacidad de un ligando para aceptar a un electrón desde una molécula donadora.

$$A \approx -\epsilon_{\text{LUMO}}$$

La energía de ionización (I) se expresa como la facilidad con la que un átomo pierde electrones (Chattaraj *et al.*, 2006).

$$I \approx -\epsilon_{\text{HOMO}}$$

La dureza química ( $\eta$ ) es una propiedad global del sistema y mide la resistencia impuesta por éste al cambio en su distribución electrónica.

$$\eta \approx 1/2(I-A) \approx 1/2(\epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}})$$

El índice de electrofilicidad ( $\omega$ ) es una medida de minimización de energía debido a un flujo máximo de electrones entre el donador y el aceptor, es un descriptor de reactividad que permite una clasificación cuantitativa de la naturaleza electrofílica global de una molécula en una escala relativa es decir, indica que cuando dos moléculas reaccionan, actuarán como nucleófilo o electrófilo (Chattaraj *et al.*, 2006).

$$\omega = \mu^2 / \eta^2$$



### 1.3 Membrana plasmática

Las membranas plasmáticas sirven como barreras selectivas a nutrientes y otras sustancias (Peña, 2007); su estructura está constituida por: fosfolípidos, proteínas, glicoproteínas y carbohidratos.

Las funciones principales de las membranas plasmáticas son: el transporte, el mantenimiento de las concentraciones de sales, la asimilación o transformación de energía, la comunicación con otras células y la adhesión entre ellas.

Se pueden encontrar membranas con un alto grado de especificidad como son las neuronas y la piel, así como todas las relacionadas a los sistemas de recepción de estímulos ambientales: luz, temperatura, sonido, olor etc. (Heijne y Gavel, 1998; Eyre *et al.*, 2004).

La membrana consiste de una bicapa de lípidos dentro de los cuales se insertan proteínas. La naturaleza hidrofóbica de los lípidos en la membrana la hace impermeable para la mayoría de las moléculas (figura 7). Las moléculas pequeñas como iones, azúcares y aminoácidos pueden atravesar la membrana con difusión pasiva o con la acción de bombas y de canales de membrana. Para moléculas más grandes, como las proteínas, la internalización ocurre por otros mecanismos, conocidos colectivamente como endocitosis (El-Andaloussi, 2005).



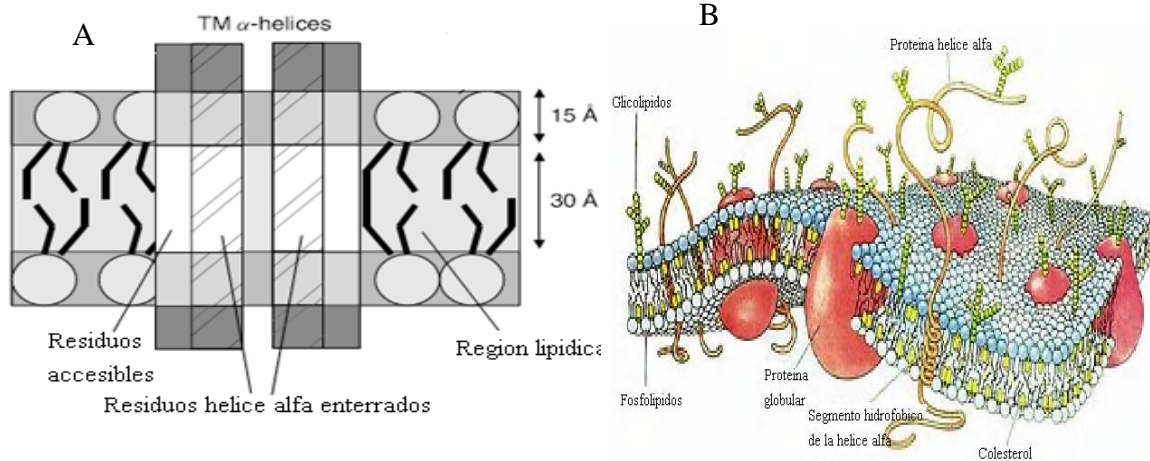


Figura. 7.-Topología de la membrana celular. A) diagrama de la distribución espacial de las proteínas transmembranales (TM) en relación a su hidrofobicidad. B. Representación esquemática de la membrana plasmática. Tomado de Eyre *et al.*, 2004

Para que un fármaco llegue al sitio donde lleve a cabo su acción, y al lugar donde será biotransformado y eliminado, debe atravesar estas barreras biológicas que pueden ser varias capas celulares (como la piel), una sola capa de células (epitelio intestinal) o incluso ser de tamaño inferior a la célula (membrana que limita un organelo intracelular, como el núcleo y las mitocondrias) (Villa, 2007).

La naturaleza de la membrana celular limita el potencial terapéutico de las macromoléculas como los péptidos, las proteínas, el DNA y a los oligonucleótidos. El descubrimiento reciente de péptidos catiónicos cortos que pueden cruzar la membrana ha posibilitado nuevas estrategias en la entrega intracelular de tales macromoléculas (Kabouridis, 2003).



#### 1.4 Tipo de transporte celular

La toma de nutrientes y la comunicación entre células y su ambiente ocurre a través de la endocitosis, este término engloba diversos mecanismos por los cuales la célula internaliza macromoléculas y partículas dentro de vesículas de transporte derivadas de la membrana plasmática que es una estructura dinámica.

La endocitosis se divide en dos eventos: Fagocitosis es típica de células de mamíferos especializadas incluyendo macrófagos, monocitos y neutrófilos y es cuando la célula internaliza partículas grandes mayores a una micra y son generalmente sólidos; por otro lado la pinocitosis y sus mecanismos conocidos como macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina y la endocitosis independiente de estas (figura 8).

Éste es un proceso altamente regulado que involucra receptores de superficie de membrana y cascadas de señalamiento mediadas por GTPasas de la familia Rho; estas señales también activan respuestas inflamatorias en las células y además es crucial para la limpieza de células apoptóticas.

El paso de los fármacos a través de las membranas se efectúa mediante mecanismos pasivos y activos, estos últimos implican la participación de los constituyentes de la membrana. Los mecanismos de absorción particulares como la absorción activa, la difusión facilitada o la pinocitosis y endocitosis son utilizados por pocos fármacos para absorberse desde el lugar de administración.

Existen varios datos experimentales *in vitro* e *in vivo* que han conducido al desarrollo de tecnología de transducción de proteínas como herramienta útil en investigación biológica. Algunos péptidos acarreadores se utilizan para transportar ácidos nucleicos y promueven su paso a través de la membrana plasmática, mientras que otros pueden cruzar independientemente de la ruta endosomal (Deshayes *et al.*, 2005).



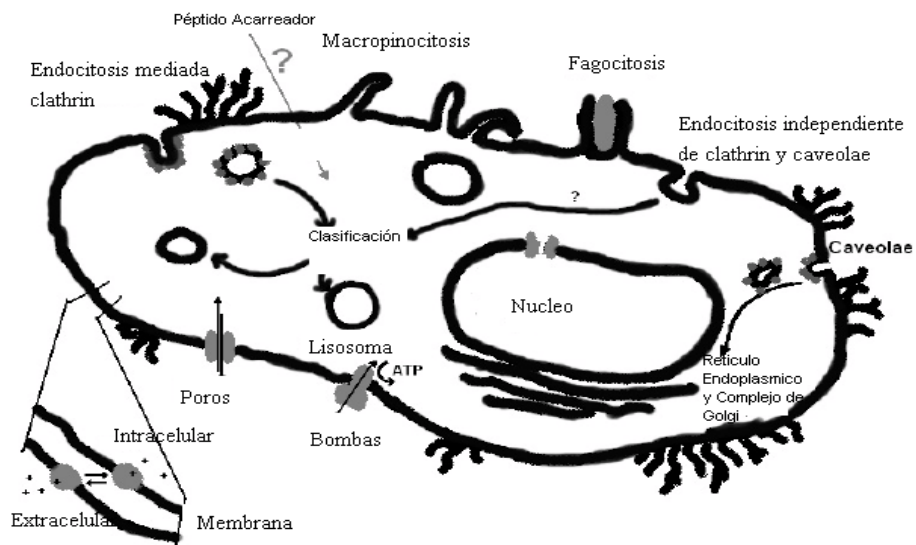


Fig. 8.-Tipo de transporte del medio extracelular hacia el interior de la célula; CPP péptidos penetrantes celulares por sus siglas en ingles (cell penetrating peptides). Tomado de Killk (2004).



### 1.5 Mecanismos de internalización celular

Existen varios modelos por los cuales se piensa podría entrar el péptido acarreador a la célula, estos se dividen en los que no necesitan energía, y los que interaccionan con la membrana para su paso, aunque esto sigue aún en controversia en el caso de penetratina, para los que no dependen de energía es la micela invertida y la penetración directa, y para los que interaccionan con la membrana son los poros toroidales, los poros de barril y el modelo de carpeta (Figura 9) (Magzoub y Gräslund 2004).

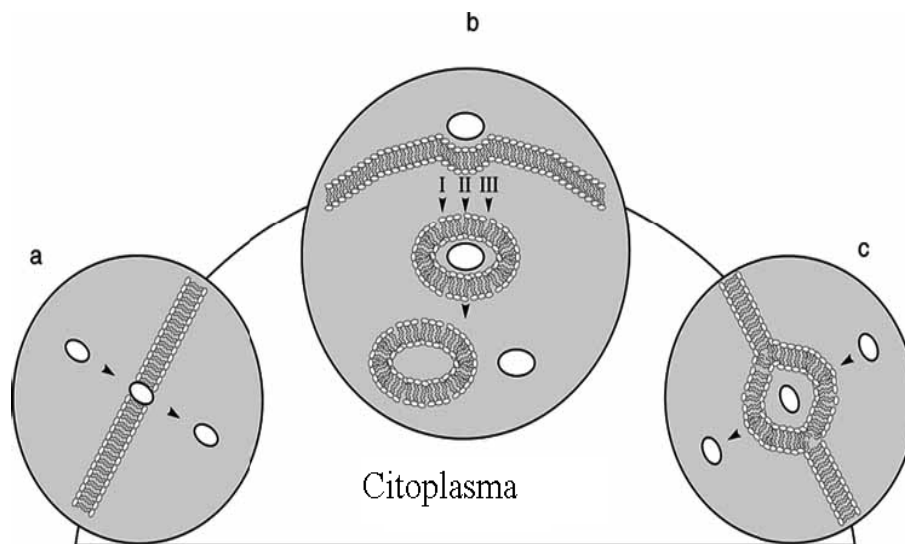


Figura 9.- Propuestas del mecanismo de paso a través de la célula de péptidos acarreadores; a) Independiente de receptor y energía; b) Vía endocitosis I macropinocitosis, II vía caveolina, III vía clatrina; c) Micela invertida. Tomado de Andaloussi *et al.*, 2005.

Las estructuras anfipáticas de tipo hélice alfa y lamina beta pueden interactuar selectivamente con membranas aniónicas bacterianas por interacciones electrostáticas (Matsuzaki, 2001). En el caso de penetratina las interacciones electrostáticas son muy rápidas con los residuos cargados positivamente (Lesink *et al.*, 2005), pasando por un estado de transición de hélice alfa a lamina beta (Persson *et al.*, 2001; Binder y Lindblom, 2004), después los triptófanos que dentro de la secuencia interaccionan con la membrana plasmática forman una estructura de tipo beta plegada (Binder y Lindblom 2004; Lesink *et al.*, 2005)



Uno de los modelos más aceptados sobre el paso de penetratina por la membrana celular es del reconocimiento o afinidad electrónica de los aminoácidos con los lípidos insertos en la bicapa celular (Figura 10), después existe una interacción entre las cargas electrostáticas entre estas dos generando un gradiente electrónico promoviendo el paso a través de la membrana hacia el ambiente celular (Binder y Lindblom 2003; Björklund *et al.*, 2006)

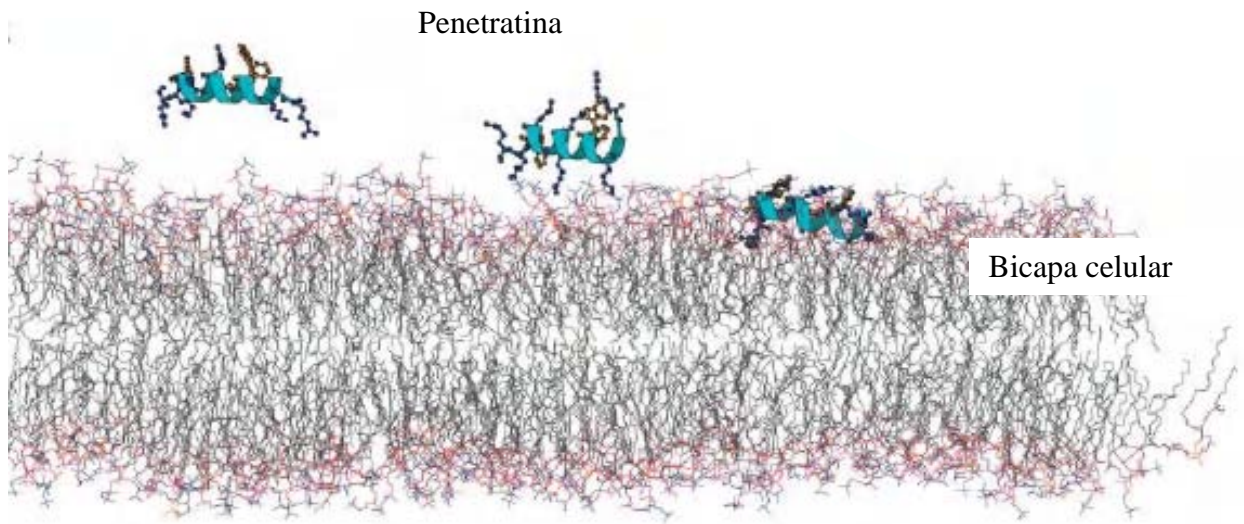


Figura 10.- Representación de interacción de penetratina con fosfolípidos de membrana utilizando dinámica molecular. Tomado de Lesink *et al.*, 2005.





## 1.6 Formas de ensamble del acarreador con su complemento

La unión entre un acarreador y la molécula que transporta (carga) depende significativamente de la carga ya que puede alterar el paso a través de la membrana; el acarreador puede, a su vez, modificar su expresión biológica, esto se debe a las características fisicoquímicas de ambos.

Existen tres formas por las cuales penetra se une a su carga, una de ellas es la síntesis y acoplamiento químico debido a puentes de disulfuro, donde la tercera hélice alfa del péptido es sintetizado con una cisteína N-terminal adicional activada; esta reacción previene la homodimerización del vector y hace a la cisteína más propensa a formar enlaces disulfuro con los grupos tiol libres presentes en la carga (Figura 11). La adhesión de la carga (oligonucleótidos y péptidos) es muy rápida a 37° C en el agua, o soluciones agua-DMSO, dependiendo de la solubilidad de la carga.

Esta técnica tiene la ventaja de la liberación de la carga en el citoplasma debido a que el enlace disulfuro se rompe en el ambiente reductor del citoplasma minimizando las Interacciones entre el vector y la carga (Derossi *et al.*, 1998; Kilk, 2004).

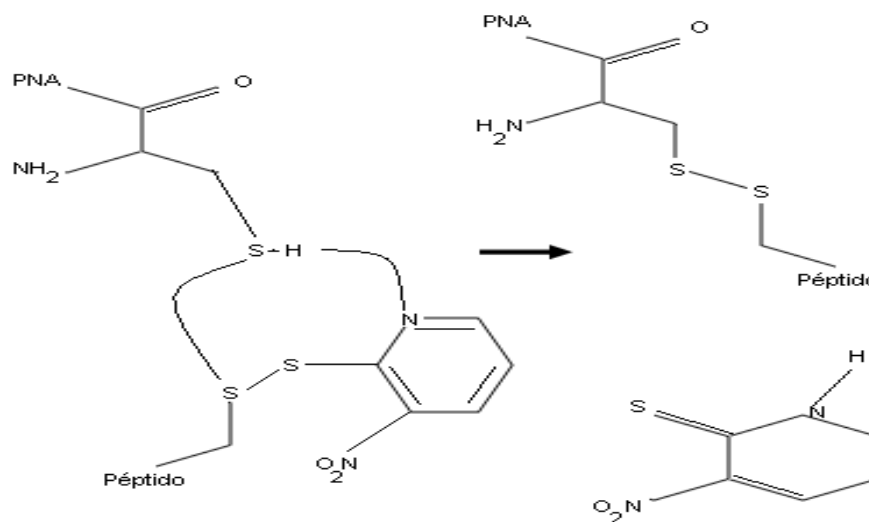


Fig. 11.- Puentes de disulfuro entre PNA y péptido.



Otra manera de ensamblaje es la síntesis química en tándem donde las dos partes vector y carga se sintetizan juntas (Figura 12), su ventaja es que no son necesarias reacciones de acoplamiento, además la síntesis con marcadores moleculares permite el seguimiento del péptido a través de la célula (Derossi *et al.*, 1998; Derossi *et al.*, 1996; Mäe *et al.*, 2005).

Por último la utilización de la tecnología de DNA recombinante con plásmidos de *E. coli*, esta técnica se limita a cargas de péptidos, se requiere un paso de purificación consistente en ciclos termales cortos después de la inducción de síntesis proteica en *E. coli*, este protocolo es de bajo costo sobre todo cuando se requieren de grandes cargas (Figura 13), (Derossi *et al.*, 1998; Mittelman y Gudkov, 2000).

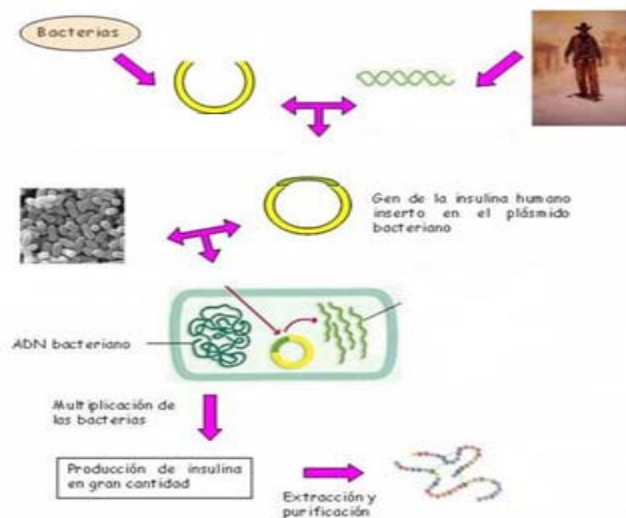


Figura. 12.- Síntesis de péptido y acarreador utilizando recombinación genética por medio de *E.coli*.



## 1. ANTECEDENTES

Hosotani y colaboradores (2002) demostraron que un péptido homólogo a p16 podía restituir la función suprimida de este gen en cáncer de páncreas; como vector de entrega utilizaron a penetratina y llamaron al péptido “trojan p16 peptide”, los estudios de histopatología revelaron, que el grupo de tratamiento con “trojan p16 peptide” presentó apoptosis, además de formación de vacuolas.

Por su parte Mäe y colaboradores (2005) estudiaron el potencial de entrega en los péptidos acarreadores: transportan, TP10, penetratina y pVEC en células modificadas de *Nicotiana tabacum* sin pared celular y células de melanoma de Bowes, encontraron que todos los péptidos pasaban la membrana y el péptido transportan fue el que tuvo mayor eficiencia en ambas líneas celulares, con menos eficiencia que en el melanoma por lo que hipotetizaron que esto se debía a los esteroides, ya que estos difieren en células animales y vegetales.

Por otro lado Czajlik y Percze (2004) realizaron un estudio de química computacional con la secuencia de penetratina, a nivel *ab initio*, la molécula fue fragmentada en mono, tri y octapéptidos, encontraron relación en cuanto al uso de las bases desde 3-21G hasta 6-311++Gd,p, con el esqueleto de dichos péptidos y los carbonos alfa ellos concluyeron que la estructura es muy rígida y conserva sus propiedades aún fragmentada, debido a su esqueleto.

D’Ursi y colaboradores, sintetizaron un péptido quimérico que poseía una secuencia N-terminal a base de penetratina y una secuencia C-terminal que corresponde a los 21 últimos residuos de  $G\alpha_s$  (proteína G). Este péptido fue un inhibidor eficaz de 5-N-ethylcarboxamidoadenosina (NECA) e isoproterenol estimulando producción de cAMP en la rata PC12 y células humanas del endotelio microvascular (HMEC-1), mientras que el péptido penetratina no tenía ningún efecto por sí solo.



Yun-Long Tseng *et al.*, (2002) realizaron un estudio donde quisieron aumentar la eficiencia de la entrega de drogas de liposomas en células neoplásicas HTB-9 (carcinoma humano de vejiga) y C26 (carcinoma de colon) con penetratina y TAT un péptido derivado del HIV, encontraron que su modelo fue inadecuado ya que no aumentaba la eficiencia y que la actividad de penetratina empieza a decaer antes que la de TAT.

Guillaume Drin *et al.*, (2000) investigaron la capacidad de translocación de penetratina a través de una membrana con proteínas libres de fosfolípidos comparándola con un análogo anfipático AP-2AL; esto lo realizaron con: espectroscopia fluorescente, dicroísmo circular, espectroscopia, NRM y modelado molecular; encontraron que no es suficiente la hélice penetratina para cruzar su modelo de membrana, respaldando así anteriores estudios en los cuales penetratina interactúa con los fosfolípidos de membrana.

Mattias Lindberg y Astrid Gräslund (2001) midieron la posición de penetratina en una micela de sodio dodecilsulfato; los resultados obtenidos por estos autores fueron que el extremo C-Terminal estaba dentro de la micela y el extremo N-Terminal cerca de la superficie.

Kilk (2002) comparó la internalización de una proteína larga de 63 kDa (avidina), con penetratina y pls1 ambas son las tercer hélices alfa de homeodominios relacionados, Antennapedia factor de transcripción de *Drosophila* e Islet1 que es un factor de transcripción de rata; este gen muestra funciones como amplificador de insulina-1, ambos fueron comparados con micelas SDS por espectroscopia fluorescente, tuvieron eficiencias similares en cultivos celulares con melanoma Bowes.

Comparado con penetratina pls1 solo tiene un triptófano el cual simplifica la interpretación de la fluorescencia y además un residuo nativo de cisteína el cual puede ser usado para acoplarse a reacciones alternativas de cargas de distinto carácter; estos autores proponen que ambas entran por el mismo mecanismo y su localización intracelular es similar.

Este estudio demuestra que una secuencia homologa a penetratina tomada de un homeodominio de un factor de transcripción puede acarrear cargas de proteínas largas a través de las membranas celulares aun si tienen diferentes secuencias y cargas netas pero idéntica localización en sus cargas positivas.



Fischer y colaboradores (2000) demostraron que la secuencia de pAntp RRMKWKK es suficiente para atravesar la membrana pero que el residuo trp no es tan importante ya que no causa un efecto mayor que un cambio en otro residuo (60%) y su nuevo péptido acarreador tiene un cambio en dicho triptófano



### 3. JUSTIFICACIÓN

Los avances en la biología y en la farmacología están permitiendo el desarrollo de moléculas bioactivas altamente específicas; sin embargo, su biodisponibilidad en el sitio de acción depende de sus propiedades fisicoquímicas, ya que para que un fármaco llegue a su blanco tiene que pasar por barreras selectivas, como la membrana celular y mecanismos de degradación, los cuales disminuyen o anulan su efecto.

Existen varios proyectos para diseñar moléculas transportadoras que faciliten la entrada de las sustancias activas a la célula, para que estas lleguen al sitio blanco en las células y tejidos.

Se ha documentado la eficacia en la transferencia y los efectos farmacológicos subsecuentes de las moléculas transportadas, pero siguen siendo necesarios los estudios sobre los efectos de los acarreadores por sí mismos sobre las células blanco. Las tecnologías genómicas y proteómicas posibilitan el descubrimiento rápido de RNAs y proteínas que son buenos candidatos terapéuticos. Sin embargo, el costo de manufacturación ha sido el principal impedimento para su uso extensivo, a pesar de la tecnología del DNA recombinante; por ello la Química Computacional es de gran ayuda en este campo. Ya que las proteínas y péptidos con actividad demostrada a nivel celular y molecular con frecuencia no producen la suficiente eficacia *in vivo* debido a malos perfiles farmacocinéticos, lo que incluye mala penetración a través de las membranas biológicas. Por lo anterior, es prioritario diseñar sistemas acarreadores para estas moléculas que lleguen al sitio específico de acción farmacológica.

Uno de los péptidos acarreadores que cruzan las membranas celulares (CPP) es Penetratina-1 (Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys).

Este trabajo plantea el análisis de la estructura electrónica de este péptido acarreador bien caracterizado experimentalmente, con la finalidad de poder proponer otros acarreadores de origen peptídico, considerando los sitios de mayor reactividad de la Penetratina.



#### 4. OBJETIVOS

General.-

Diseñar un nuevo péptido acarreador de moléculas de interés biológico, partiendo del análisis de la estructura electrónica del acarreador penetratina y de las propiedades fisicoquímicas y biológicas informadas experimentalmente en la literatura.

Particulares.-

- Optimizar la geometría a partir de la estructura informada por resonancia magnética nuclear de la molécula penetratina (ID PDB: 1KZ0) empleando el método Hartree Fock con el conjunto base 6-31G(d).
- Fragmentar la molécula penetratina en cuatro tetrapéptidos y construir la estructura geométrica de cada uno de ellos, para optimizarlos con el mismo método y base que a la molécula completa.
- Calcular los valores de los descriptores químico cuánticos: índice de electrofilicidad ( $\omega$ ), Dureza ( $\eta$ ), potencial de ionización (I) y potencial químico de penetratina con el método de la teoría de funcionales de la densidad con el funcional híbrido B3LYP y el conjunto base 6-311G(d).
- Calcular los valores de logP de la penetratina y de cada uno de los tetrapéptidos derivados de Penetratina.
- Con base en los resultados obtenidos de la estructura electrónica así como en las propiedades geométricas y las propiedades físico-químicas informadas de penetratina, proponer una serie de nuevas secuencias acarreadoras de moléculas de interés biológico.



## **5. HIPÓTESIS**

El análisis de la estructura electrónica proporcionara los posibles sitios de mayor reactividad química, del acarreador conocido penetratina; estos datos aunados a los informados experimentalmente sobre sus propiedades fisicoquímicas, permitirá proponer una nueva molécula acarreadora.





## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Caracterización de la estructura electrónica de penetratina

Se construyeron las secuencias DE AMINOÁCIDOS correspondientes al tercer dominio de Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK), tomando como base la secuencia 1kz0, proveniente del "Protein Data Bank"; y esta fue segmentada en cuatro tetrapéptidos: RQIK, IWFQ, NRRM, KWKK. Para editarla se utilizaron los programas Deep View Swiss-Pdb Viewer (Guex y Peitsch 1997) y Spartan 2006 para Windows (Spartan`06).

Se emplearon métodos *ab initio* a nivel Hartree-Fock (HF) y de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) que conforman el modelo químico B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d) para analizar parámetros estructurales y fisicoquímicos del péptido mediante descriptores químico-cuánticos seleccionados como son orbitales moleculares frontera HOMO-LUMO, dureza, momento dipolar, afinidad electrónica, índice de electrofilicidad, energía de ionización, energía de la molécula.

Estos estudios teóricos se realizaron, en equipo de cómputo de la Universidad Autónoma Metropolitana y de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El enlace se lleva a cabo vía SSH Secure Shell desde una computadora personal.

#### 6.1.1 Optimización de Geometría

Para cada una de estas moléculas peptídicas, se realizaron cálculos de la optimización de la geometría mediante el método Hartree-Fock (HF) con el conjunto base 6-31G(d), con el paquete computacional Gaussian 03 (Frisch 2003).

Para la optimización de la geometría de cada una de las moléculas analizadas, se inició el estudio con la base gaussiana mínima STO-3G; los parámetros de la geometría final de este cálculo se tomaron para elevar el nivel y se realizó el cálculo siguiente con la base 3-21G(d); nuevamente se tomaron los parámetros geométricos finales y se elevó el



nivel de cálculo a la base 6-31G(d) para así obtener la estructura de más baja energía o confórmero de mínima energía.

Posteriormente se realizaron cálculos de frecuencia sólo para los fragmentos (debido al alto costo computacional que requiere la molécula completa), para asegurarnos de tener una estructura con mínima energía.

### **6.1.2 Cálculos puntuales**

Se efectuaron los cálculos puntuales de cada uno de los péptidos, con la metodología de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) a nivel 6-311G(d,p).

Los cálculos puntuales proporcionaron los valores de cargas atómicas, estos se tomaron a partir de las cargas del potencial electrostático. así como del momento dipolar y sus componentes (x, y, z).

### **6.2 Criterios para el diseño de péptidos**

Para el diseño de la nueva secuencia se tomaron en cuenta los resultados obtenidos de la caracterización de la estructura electrónica de penetratina y sus fragmentos junto con otros parámetros seleccionados, dichos resultados se compararon con los descritos en antecedentes así como con otras secuencias ya publicadas de acarreadores sintéticos, de esta manera se propusieron una serie de secuencias peptídicas.



## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Geometrías Optimizadas

A partir de la estructura de penetratina tomada de Protein Data Bank (ID:1kz0) se construyeron las secuencias RQIKIWFQNRRMKWKK que corresponde a la secuencia completa del péptido acarrador; por otra parte debido al alto costo computacional que requería en su forma completa se fragmentó la molécula y se construyeron también cuatro tetrapéptidos: RQIK, IWFQ, NRRM, KWKK, correspondientes a la misma secuencia.

Tomando estas estructuras (Figuras 13, 14, 15, 16 y 17) se realizaron los cálculos de optimización de geometría con los conjuntos base HF/STO 3-G, HF/3-21G y HF/6-31G(d); para asegurar que la geometría final obtenida correspondía a alguno de los conformeros de mínima energía; se realizaron cálculos de frecuencia ya que de acuerdo a Boyer (2000) se piensa son los biológicamente mas reactivos.



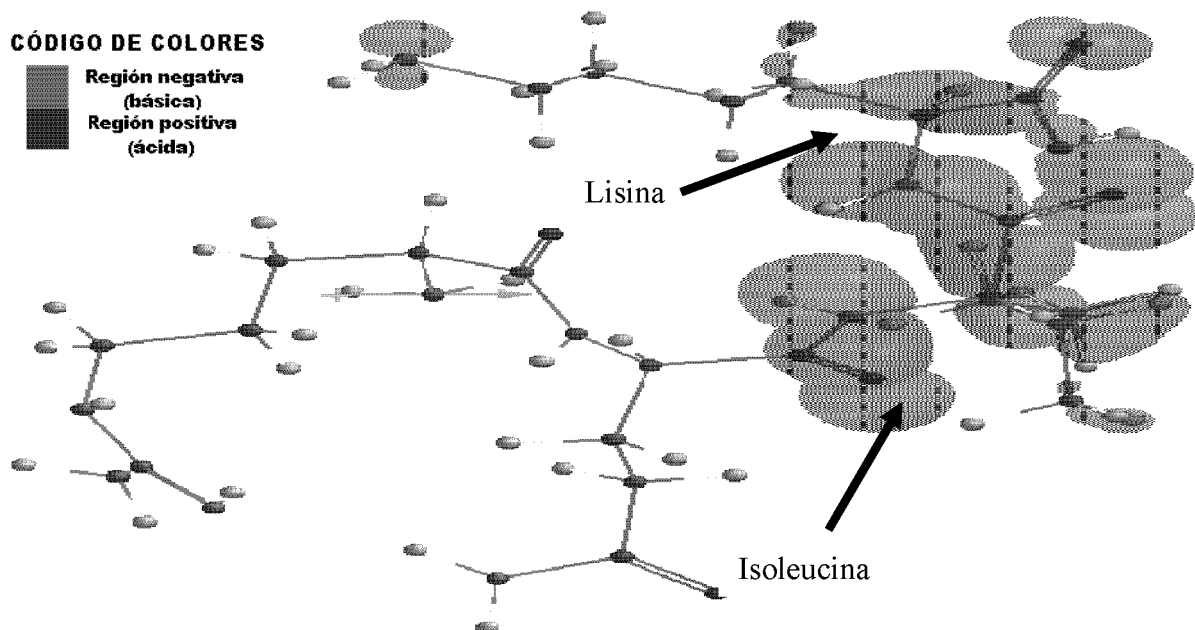


Figura 22. Orbital Molecular LUMO del fragmento 1 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

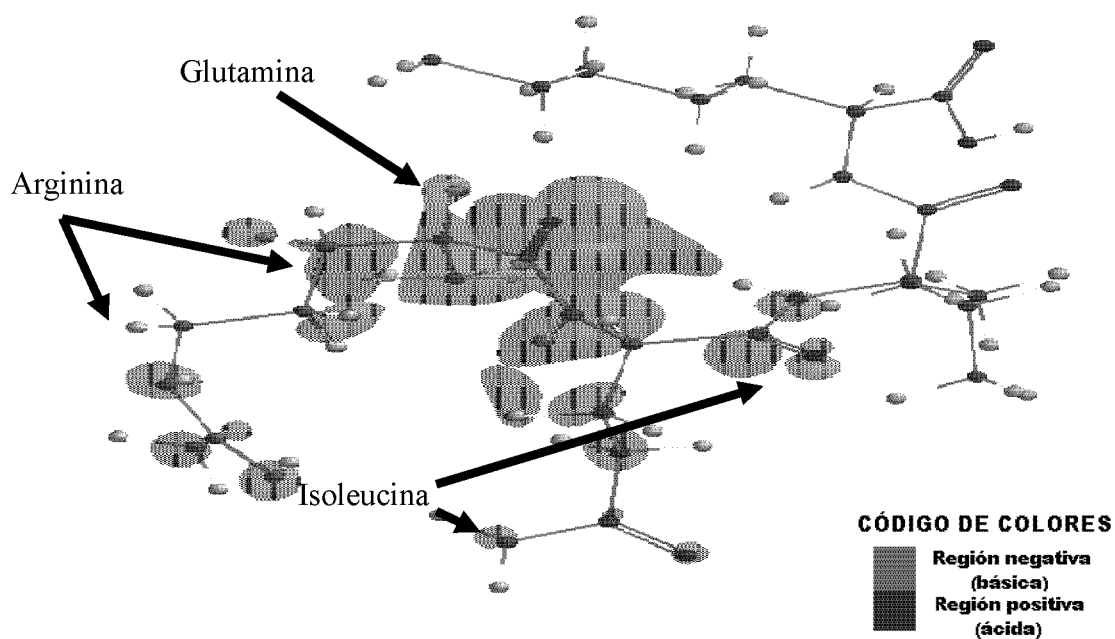


Figura 23. Orbital Molecular HOMO del Fragmento 1 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).



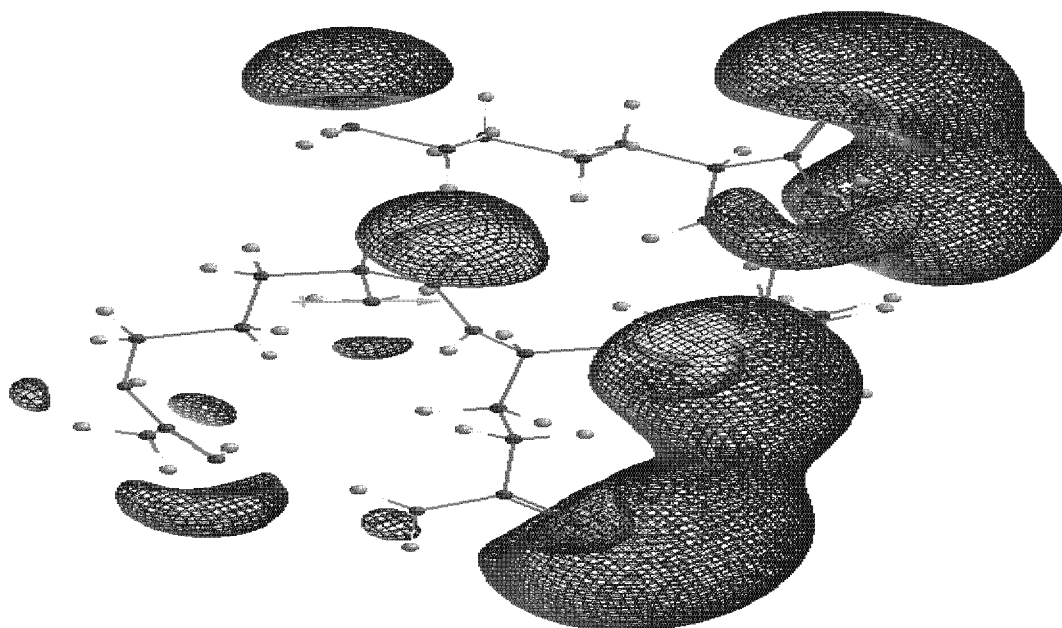


Figura 24. Isosuperficie del potencial electrostático del fragmento 1 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

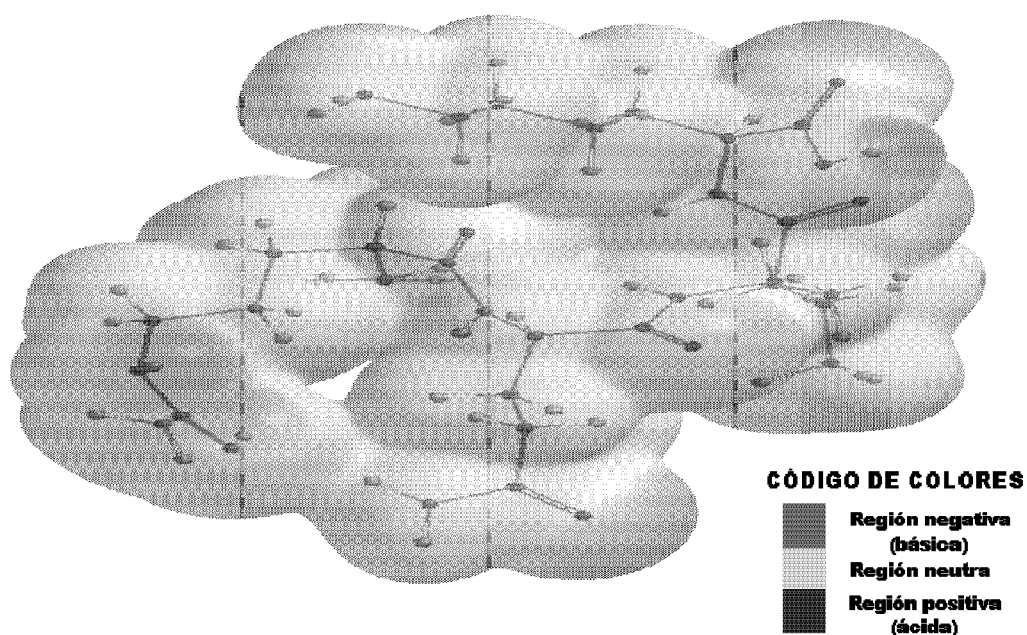


Figura 25. Densidad electrónica del Fragmento 1 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).



## Fragmento 2

En el caso del Fragmento 2 los orbitales moleculares frontera, HOMO (Figura 26) y LUMO (Figura 27) se localizan en el residuo triptófano, las cargas negativas más altas las aporta principalmente la glutamina y en segundo lugar la isoleucina y la fenilalanina; las cargas más positivas se localizan principalmente en la glutamina y sólo un átomo del triptófano.

Nuevamente los oxígeno especialmente los de la última glutamina del extremo carboxilo tienen mayor aporte a la isosuperficie del potencial electrostático (Figura 28) con cargas negativas.

En la densidad electrónica (Figura 29) de esta molécula no existe una tendencia marcada a regiones ácidas o básicas ya que ambas se presentan en ambos lados de la molécula.



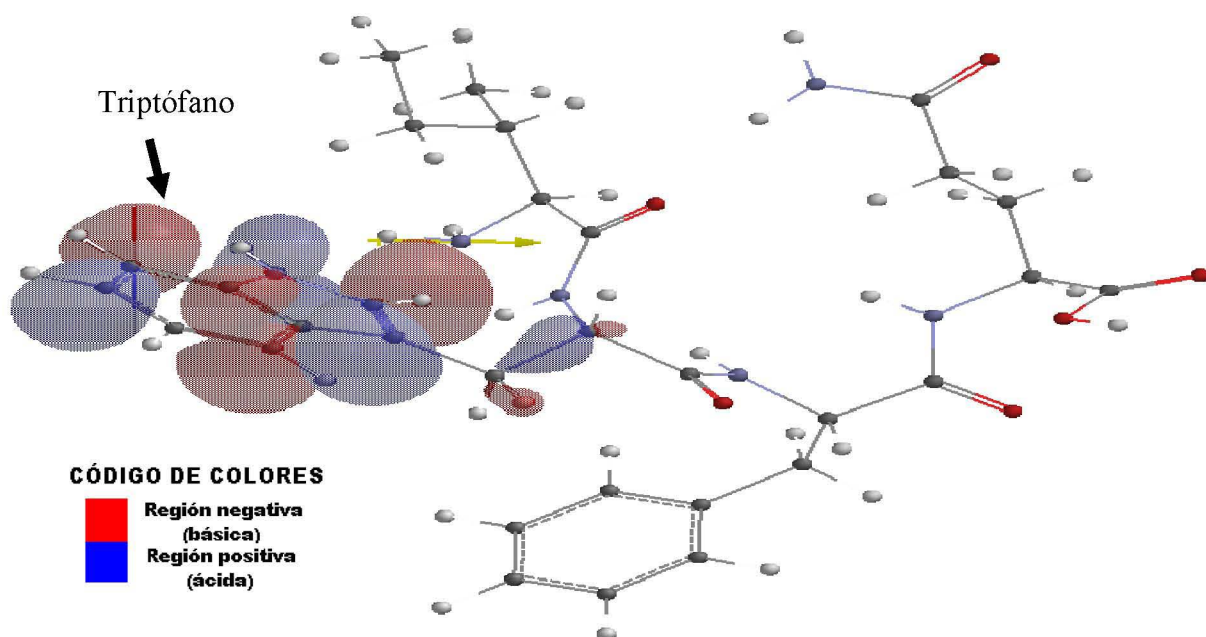


Figura 26. Orbital Molecular HOMO del Fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

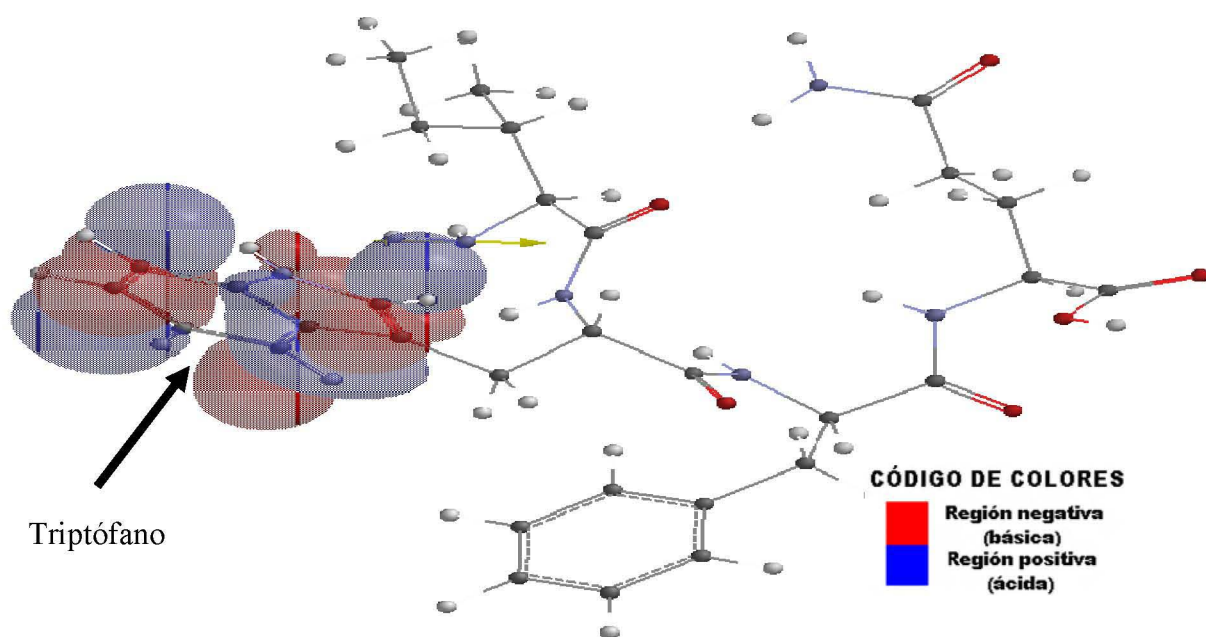


Figura 27. Orbital Molecular LUMO del Fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).



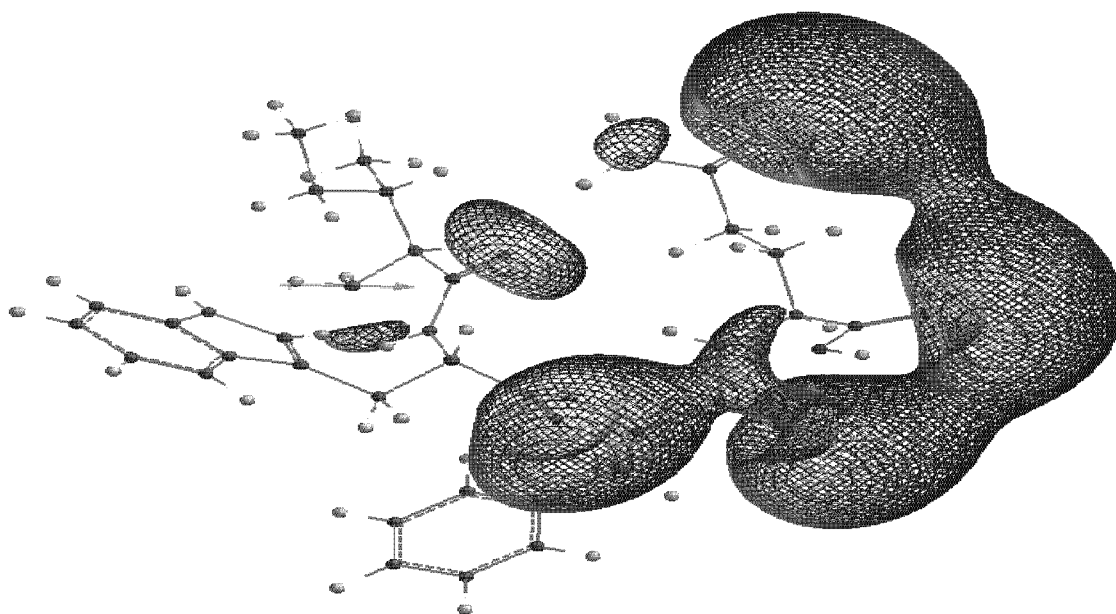


Figura28. Isuperficie del potencial electrostático del Fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/631G(d).

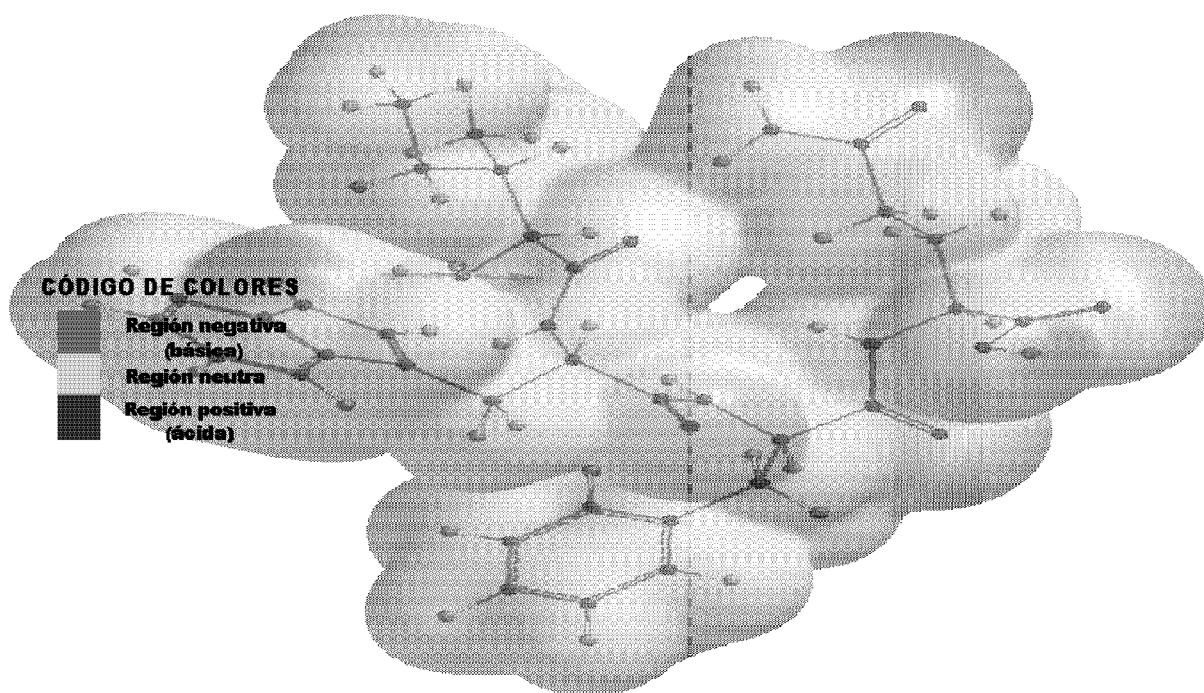


Figura 29. Densidad electrónica del Fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).





### Fragmento 3

En el caso del Fragmento 3 los orbitales moleculares frontera, HOMO (Figura 30) se localiza en el residuo metionina y LUMO (Figura 31) se localiza principalmente en los residuos arginina, las cargas negativas más altas las aporta principalmente la asparragina con el átomo más negativo y en segundo lugar las argininas también mientras que las cargas más positivas se localizan igualmente en las argininas.

La isosuperficie del potencial electrostático (Figura 32) muestra una deslocalización de cargas originando un momento dipolar grande con respecto a las demás moléculas en estudio.

La densidad electrónica del fragmento 3 (Figura 33) marca regiones básicas preferentemente hacia el extremo carboxilo y regiones ácidas hacia el extremo amino.



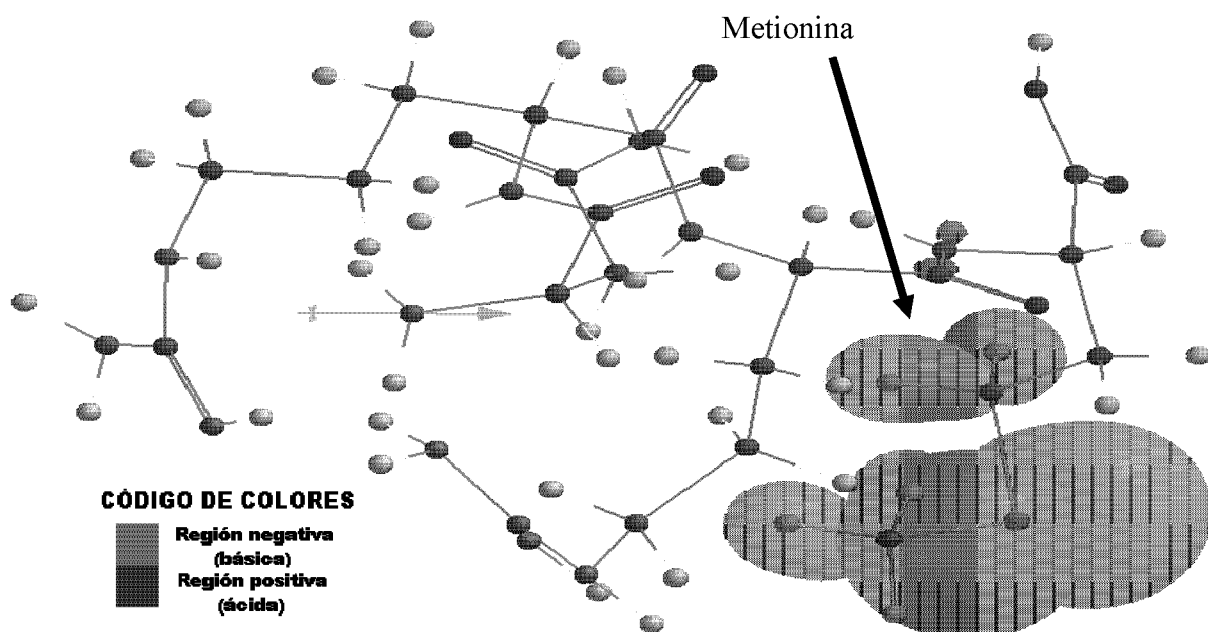


Figura 30. Orbital molecular HOMO del Fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

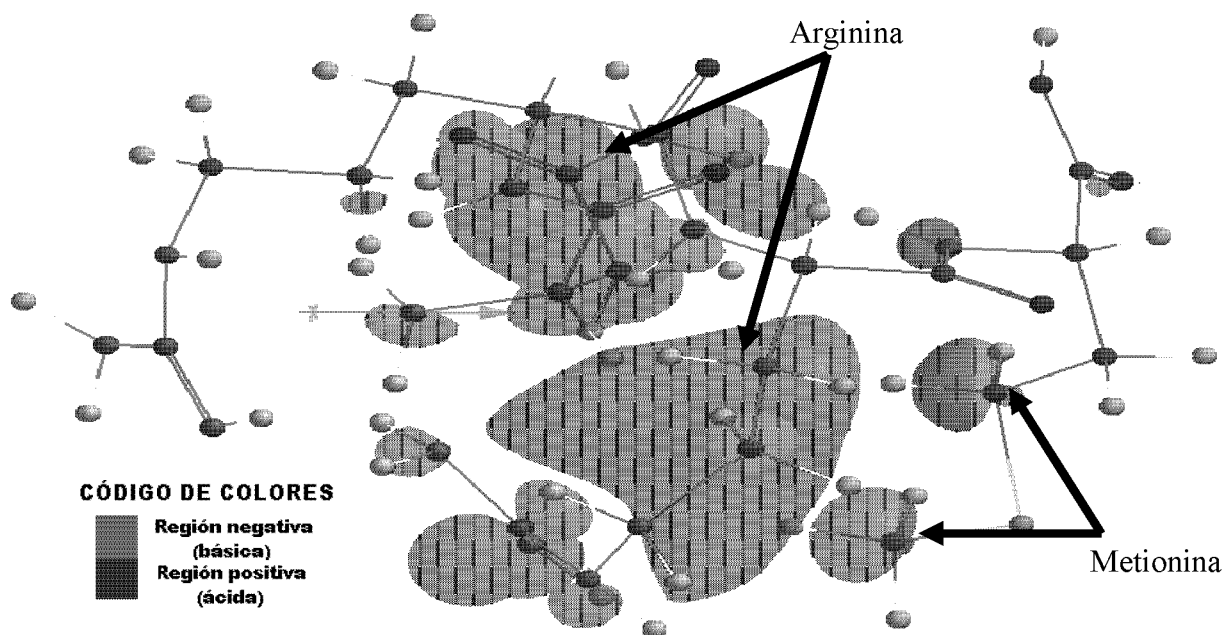


Figura 31. Orbital Molecular LUMO del fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).



### 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 los posibles sitios reactivos, indicando los aminoácidos donde ocurrirán los ataques nucleofílicos o electrofílicos y los posibles sitios de interacción de este tipo de péptidos con la membrana plasmática; así como las isosuperficies del potencial electrostático y 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.

Respecto a la densidad electrónica la región que está cargada positivamente indica una actividad electrófila, resultando la interacción repulsiva en un incremento del potencial de energía (color azul). 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 (color rojo).

La isosuperficie del potencial electrostático es la energía de interacción de las cargas positivas de los péptidos analizados, representa un balance entre las interacciones de repulsión que involucran los electrones, quienes están cargados negativamente, esta región rica en electrones es básica y está expuesta a ataques electrofílicos mientras que las regiones pobres en electrones o acídicas están sujetas a ataques nucleofílicos.



### Secuencia completa

Las imágenes ilustran que los orbitales moleculares frontera HOMO (Figura 18) y LUMO (Figura 19) se encuentran localizados en los residuos triptófanos y en la primer glutamina del lado amino terminal.

Mientras que la densidad electrónica (Figura 20) y la isosuperficie del potencial electrónico (Figura 21) demuestran que las regiones básicas del péptido se cargan hacia el extremo carboxilo de la molécula donde las lisinas aportan la mayor parte de las cargas negativas, puntualmente los oxígenos hacen el mayor aporte como lo representa el potencial.



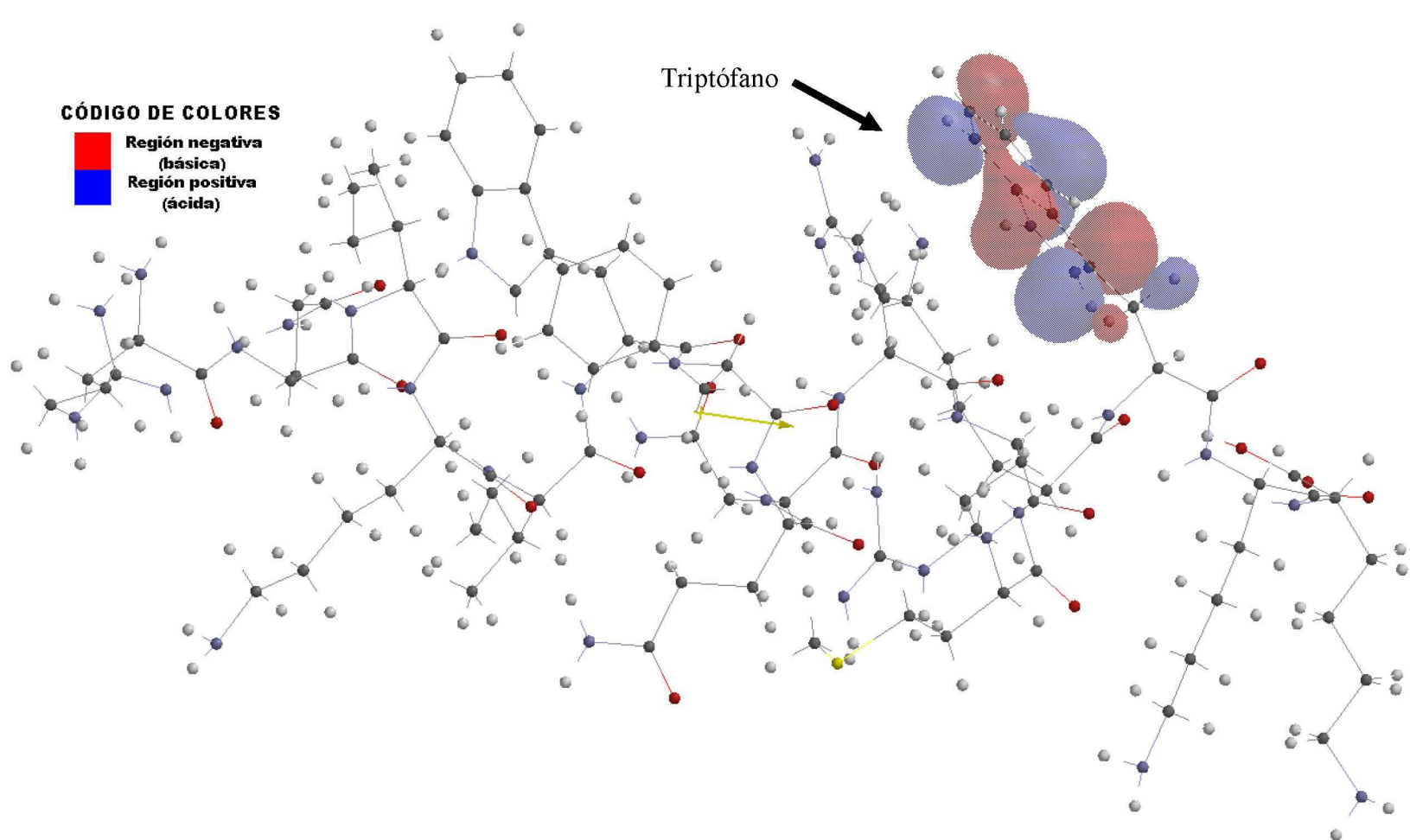


Figura 18. Orbital Molecular HOMO de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).



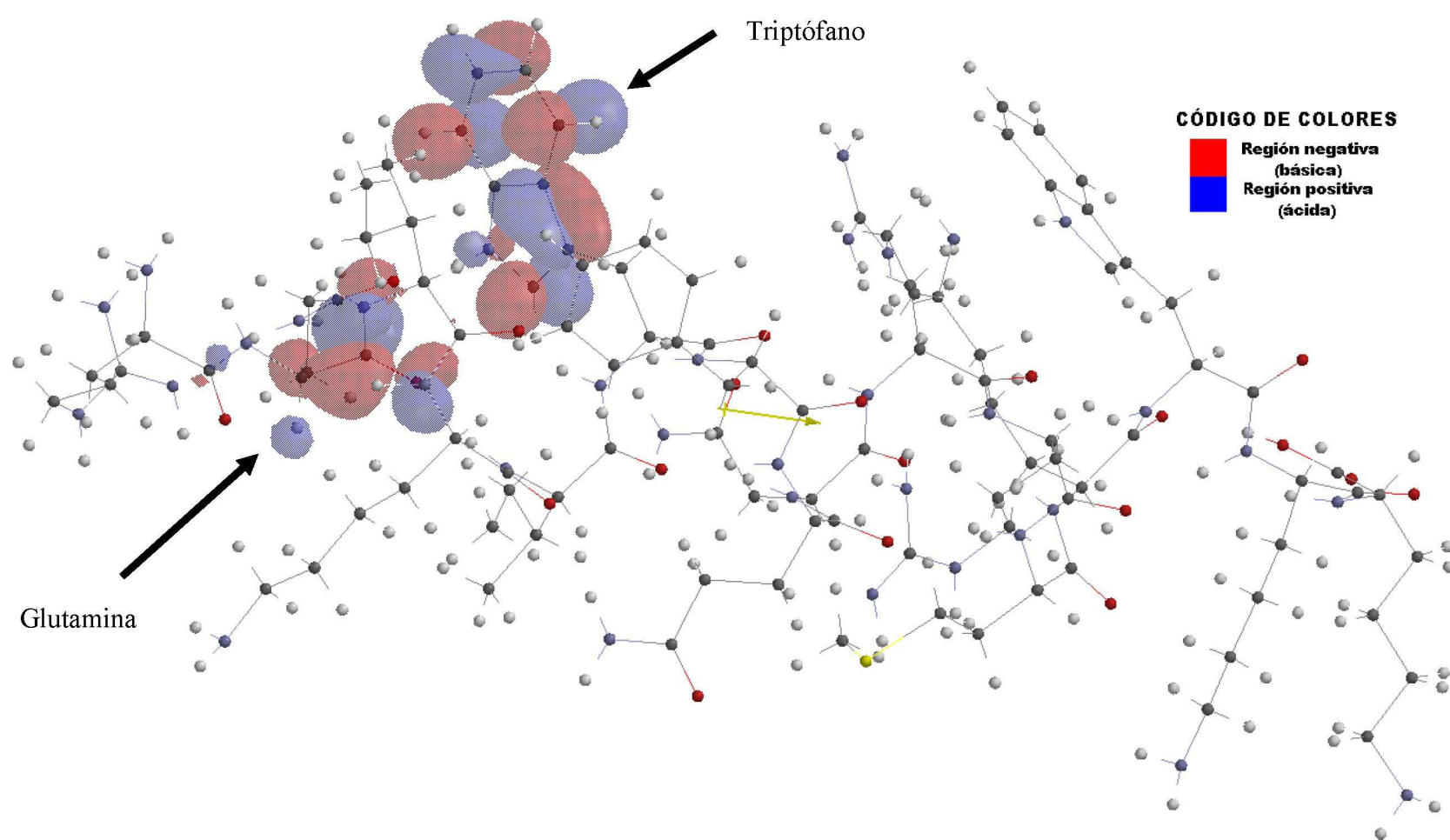


Figura 19. Orbital Molecular LUMO de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).





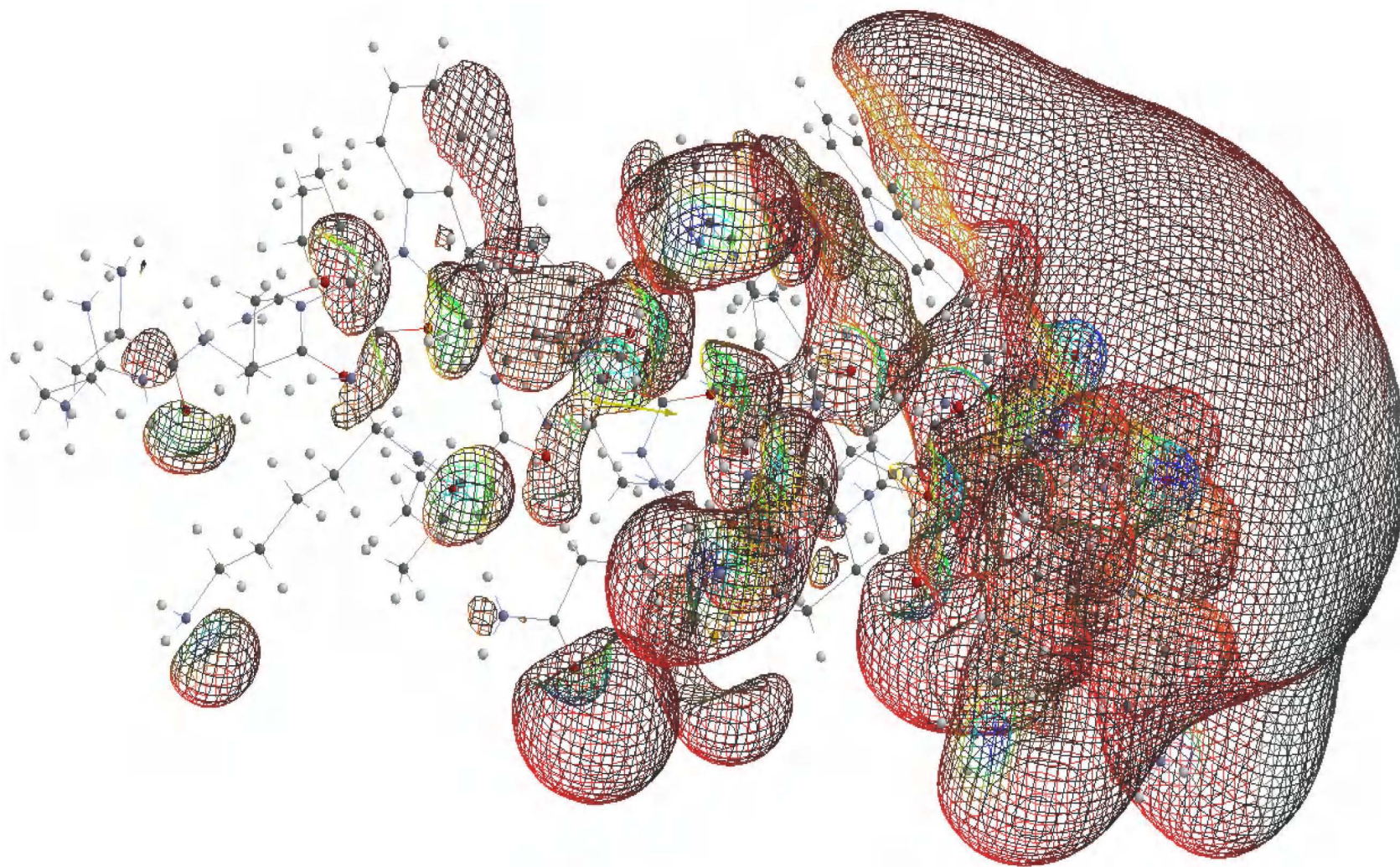


Figura 20. Isosuperficie del potencial electrostático de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).





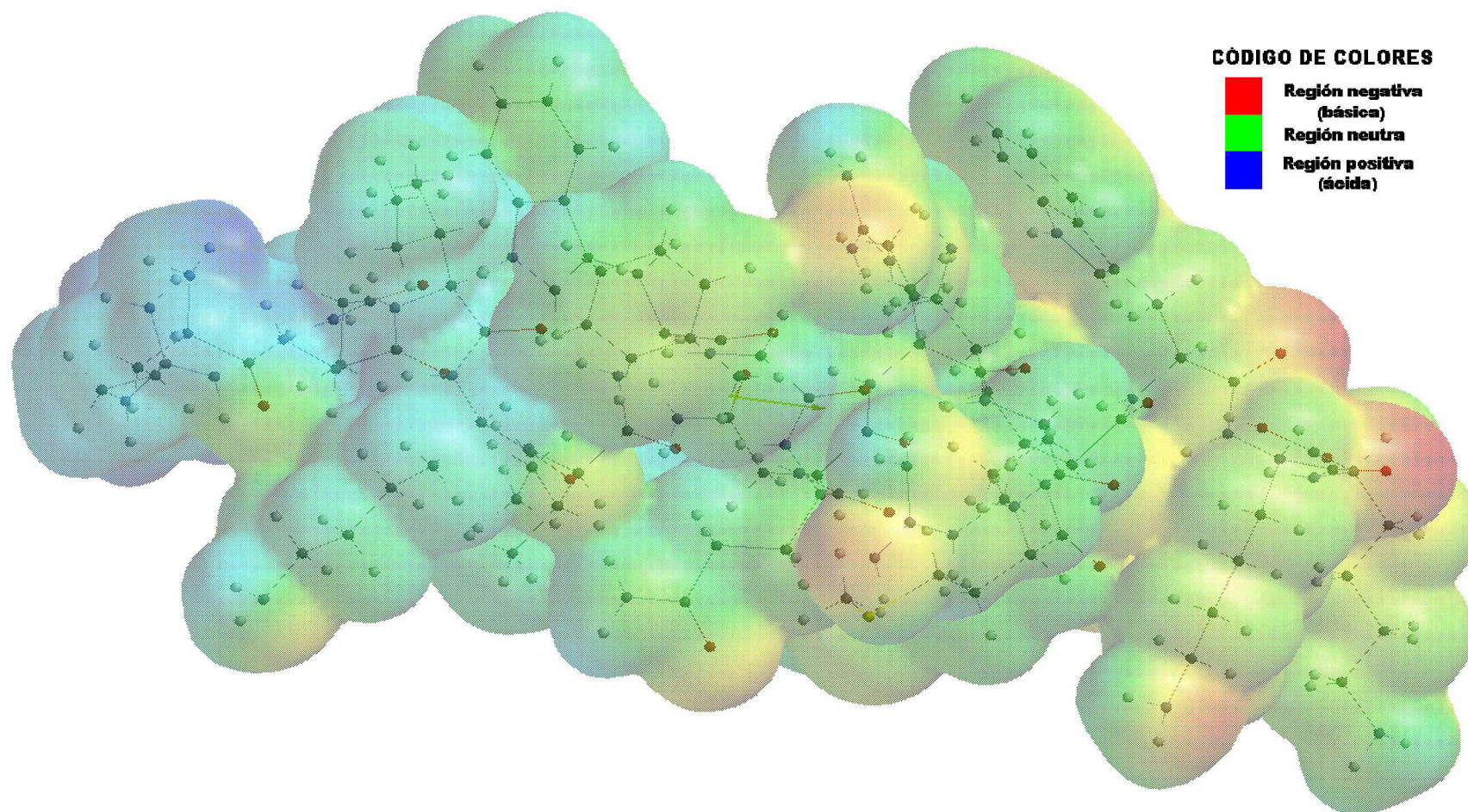


Figura 21. Densidad electrónica de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).





### Fragmento 1

Los orbitales moleculares frontera del fragmento 1, HOMO (Figura 22) y LUMO (Figura 23) se encuentran localizados en los 4 residuos de la molécula pero la lisina es la que aporta mayor cantidad de cargas negativas con 4 átomos, de los cuales los primeros tres son los más negativos; la isoleucina solo un átomo al igual que la arginina y la glutamina 2 átomos.

El potencial electrostático (Figura 24) muestra que las cargas negativas tienen tendencia hacia el extremo amino y que los átomos de oxígeno son los que presentan mayor superficie, esto quiere decir que tan atractores de cargas positivas o nucleófilos son.

La densidad electrónica (Figura 25) resalta el último hidrógeno del lado carboxilo el cual hace un aporte importante a la molécula con carga positiva como electroattractora.



### Cálculos Puntuales del Fragmento 3

A continuación se muestran las cargas atómicas del fragmento 3 NRRM correspondientes al tercer tetrapéptido penúltimo de la parte carboxilo terminal de penetratina, en esta molécula el aporte negativo más significativo lo efectúa la metionina como posible sitio de ataques nucleofílicos, es decir, que ataca a otra molécula en los electrones del más alto orbital ocupado en el punto de más alta densidad electrónica, mientras que los otros residuos al tener cargas positivas son susceptibles a ataques electrofílicos, los cuales tenderán a colocar electrones en el orbital de más baja energía dentro de la molécula con la que reaccione, en especial la arginina 2 que es la más cargada positivamente resaltándola por ser un residuo básico, el cual se pensaría que debería tener una carga parcial positiva, por otro lado la asparragina que se encuentra del lado amino es un residuo hidrofílico, mientras que la metionina localizada del lado carboxilo es un residuo hidrofóbico. Puntualmente las cargas negativas que destacan son las de los átomos N1, N14, N33 N45 N46 N68 que al estar distribuidas en toda la molécula tiende a tener una gran deslocalización de cargas como lo ejemplifica el potencial electrostático, así mismo las cargas positivas son aportadas por los átomos C11; C38; C61 y C58 (Tabla 5).

Tabla 5. Cargas de algunos átomos seleccionados y de sus aminoácidos del fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

Asparagina		Arginina		Arginina		Metionina	
<b>Cargas Totales</b>							
0.0258		0.0491		0.0660		-0.1410	
<b>Cargas Significativas</b>							
C 5	0.5778	N 12	-0.3944	N 26	-0.3060	N 44	-0.4126
O 8	-0.6069	C 19	0.5160	C 35	0.5276	C 58	0.7388
N 1	-0.9003	O 22	-0.5639	O 40	-0.5523	O 63	-0.584
C 7	-0.2326	C 21	-0.3105	C 37	-0.1001	O 64	-0.6456
C 11	0.8795	N 33	-0.8212	N 56	-0.7677		
O 13	-0.6017	C 38	0.8779	C 61	0.7974		
N 14	-1.0328	N 45	-0.9279	N 68	-0.9050		
		N 46	-0.8885	N 69	-0.7134		



Cálculos Puntuales del Fragmento 4

Las cargas puntuales del fragmento 4 KWKK correspondientes ultimo tetrapéptido de la parte carboxilo terminal de penetratina indican que los residuos lisina son básicos, pero es el último residuo el que tiene un aporte negativo a la carga total de la molécula mientras las otras dos tienen un aporte positivo en las cargas, siendo la tercera la más positiva y un sitio de posibles ataques nucleofílicos, mientras que el triptófano tiene un aporte negativo, este residuo es hidrofóbico y aquí se localizan los orbitales moleculares frontera, los átomos con mayor aporte electrónico son N1, N26 N71 N88 presuntos sitios propensos a ataques nucleofílicos, mientras los átomos C66, C21 C42 e H61 son posibles sitios propensos a ataques electrofílicos (Tabla 6).

Tabla 6. Cargas de algunos átomos seleccionados y de sus aminoácidos del fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

Lisina		triptófano		Lisina		Lisina	
<b>Cargas Totales</b>							
0.0143		-0.0842		0.2281		-0.1583	
<b>Cargas Significativas</b>							
O 8	-0.5084	N 12	-0.1591	N 31	-0.4747	N 53	-0.7592
N 1	-0.9690	C 21	0.5962	C 42	0.6596	C 66	0.7276
C 11	-0.0259	O 27	-0.5454	O 49	-0.5122	O 72	-0.5759
N 26	-0.6607	C 16	-0.1655	C 44	-0.0791	O 73	-0.6468
		C 28	-0.1754	C 55	-0.0854	C 81	-0.1470
		C 34	-0.0814	C 59	-0.0774	N 88	-1.0513
		C 41	-0.2024	N 71	-1.0242		
		C 46	-0.2766				
		C 47	-0.1317				



### Cálculos Puntuales de la secuencia completa de penetratina

A continuación las cargas puntuales de la secuencia completa de penetratina RQIKIWFQNRRMKWKK en donde resalta la lisina 2 como el aminoácido que aporta la mayor parte de carga negativa a la molécula; ya que este residuo es de naturaleza básica, este residuo se espera que tenga una actividad nucleofílica es decir atractora de cargas positivas; por otro lado el triptófano 1 es el residuo que aporta la mayor carga negativa, este residuo es hidrofóbico y como ya lo han señalado Binder y Lindblom (2004) se piensa estos residuos son esenciales para llevar a cabo interacción con la membrana ya que su reconocimiento de cargas y sus cualidades electroattractoras lo hacen muy afin a los residuos superficiales de la membrana.

Puntualmente el aporte de los sitios nucleofílicos a la molécula son los átomos: N1, N31, N32, N42, N85, N162, N174, N205, N206, N263, N308 y N325, aquí se resaltan los átomos de nitrógeno ya que sus cargas parciales son negativas; en estos sitios se llevan a cabo enlaces a cargas positivas dentro de la membrana celular como lo menciona Binder creando una estructura de tipo horquilla; por otro lado las cargas parciales positivas más destacadas dentro de la molécula son los átomos: C24, C21, C35, C158, C171, C198, C218, C221 y C303, estos sitios son esenciales para llevar a cabo interacciones electrofílicas dentro de la molécula al atraer cargas parciales negativas.

Comparando estos datos con los fragmentos sobresalen los valores de las lisinas en el fragmento 4; en donde dos residuos tienen valores positivos aunque son residuos básicos, caracterizados por tener un aporte total negativo y en la secuencia completa mantiene esta tendencia al tener todas cargas parciales negativas, esto se debe a que son cargas parciales y al tener mayor número de residuos disminuye la deslocalización de cargas que aporta cada aminoácido a la molécula.

Los orbitales moleculares frontera se localizan preferentemente en los residuos triptófano tanto en la secuencia completa como en los fragmentos que contienen a estos residuos, estos son sitios importantes para llevar a cabo las interacciones moleculares y como mencionan los autores antes citados son sitios importantes para el reconocimiento de la membrana celular. Además cuando se mutan estos residuos baja su actividad como acarreador (Lindbergh *et al.*, 2003) (Tabla 7).



Tabla 7. Cargas de átomos seleccionados y aminoácidos de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

NH-Arginina	Glutamina	Isoleucina	Lisina	Isoleucina	Triptófano	Fenilalanina	Glutamina
<b>Cargas Totales</b>							
-0.0090	0.2014	-0.1303	-0.0606	0.0660	0.2393	-0.1209	-0.0249
<b>Cargas Significativas</b>							
O8 -0.4910	N12 -0.0438	N30 -0.5230	N52 -0.3874	N71 -0.0734	N90 -0.1903	N11 -0.8641	N131 -0.5676
N1 -1.0164	C21 0.7508	C43 0.5198	C64 0.4673	C80 0.4393	C104 0.6660	C120 0.5363	C144 0.6664
C2 0.4692	O26 -0.5999	O48 -0.5532	O67 -0.5814	O86 -0.4770	O107 -0.5008	O127 -0.5920	O150 -0.6684
N19 -0.7858	C29 -0.4104	C45 0.3253	C78 0.4855	C82 0.2499	N117 -0.5763	C114 0.5772	C137 0.3621
C24 0.9068	C35 0.9277	C49 -0.4047	N85 -1.0773	C87 -0.3241	C118 0.3039	C122 -0.5263	C158 0.8086
N31 -0.9542	O41 -0.6630		H91 0.3792	C95 -0.2883	H123 0.4554	C128 0.3492	N162 -1.0230
N32 -0.9337	N42 -1.0725		H92 0.3827			C135 -0.2743	H166 0.4401
H40 0.4173	H46 0.5058						H167 0.4226
	H47 0.4306						



Asparragina	Arginina	Arginina	Metionina	Lisina	Triptófano	Lisina	Lisina-COOH
<b>Cargas Totales</b>							
-0.0471	-0.1023	0.0692	0.2099	-0.1605	-0.0326	-0.0731	-0.0243
<b>Cargas Significativas</b>							
N154 -0.6767	N172 -0.6094	N186 -0.4531	N204 -0.5704	O245 -0.6172	N249 -0.3952	N268 -0.1982	N290 -0.2228
C163 0.5477	C179 0.4864	C195 0.5272	C218 0.8120	N227 -0.7431	O264 -0.5233	C279 0.5758	C303 0.6861
O168 -0.5779	O182 -0.6417	O200 -0.5347	O223 -0.5931	C239 0.5298	N276 -0.4702	O286 -0.5782	O309 -0.5418
C159 0.5552	C175 0.6973	C190 0.4722	C220 -0.3413	C256 0.3997	C277 0.3248	C301 0.4392	O310 -0.5916
C165 -0.6895	C181 -0.5044	C197 -0.5067	O223 -0.5931	N263 -0.8681		N308 -1.0910	H319 0.4456
C171 0.9112	C185 0.2847	C209 0.3440	S232 -0.3049	H269 0.3072		H314 0.3779	C321 0.5367
O173 -0.5984	N193 -0.7286	N216 -0.8317		H270 0.3275		H315 0.3781	N325 -1.0769
N174 -0.9753	C198 1.0162	C221 1.0083					H326 0.3659
H177 0.4173	N205 -1.0270	H222 0.3483					H327 0.3772
H178 0.4048	N206 -1.0479	H228 -0.9853					
	H213 0.4385	N229 -0.9890					
	H214 0.4205	H236 0.4237					



### 7.3 Descriptores Químico Cuánticos Globales

A partir de la optimización de las estructuras del péptido acarreador penetratina RQIKIWFQNRRMKWKK y sus cuatro fragmentos RQIK, IWFQ, NRRM y KWKK con el nivel de cálculo HF/6-31gd y con base en el Teorema de Koopmans y la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) que conforman el modelo químico B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d) se realizaron los cálculos puntuales para la secuencia completa así como para los fragmentos y se obtuvieron los siguientes descriptores químico-cuánticos globales seleccionados: Orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO), energía, dureza ( $\eta$ ), índice de electrofilicidad ( $\omega$ ), potencial de ionización (I) y potencial químico.

Tabla 8. Descriptores globales de reactividad para los péptidos en estudio con una base B3LYP/6-311Gd//HF/6-31G(d).

	HOMO	LUMO	HF	Dureza ( $\eta$ )	Ind. Electr. ( $\omega$ )	I(eV)
<b>frag1</b>	-0.3797	0.1612	-1836.4855	0.2705	1.1999	10.3329
<b>frag2</b>	-0.2976	0.1135	-1973.2043	0.2056	1.1211	8.1002
<b>frag3</b>	-0.3268	0.1697	-2264.8419	0.2483	0.6763	8.8943
<b>frag4</b>	-0.2726	0.1377	-1936.1052	0.2051	0.6041	7.4202
<b>Cplt</b>	-0.2566	0.1217	-7782.6374	0.1891	0.0001	6.9824

En el caso de la dureza ( $\eta$ ) nos indica que las moléculas más estables son menos reactivas y poseen valores mayores de dureza. La molécula más blanda fue la secuencia completa y KWKK, aunque la molécula geoméricamente más relajada fue el fragmento 1 al tener una energía más baja (Tabla 8).

En cuanto al índice de electrofilicidad fueron la secuencia completa y el fragmento 3 y 4 los que presentaron los valores más bajos dichas moléculas necesitan menor energía para despojar electrones a otra molécula al enlazarse con ella (Tabla 8).

Para el potencial de ionización la molécula con menor valor fue la secuencia completa y el fragmento 4 lo cual nos indica que son moléculas muy reactivas en cuanto a donadoras de electrones se trata (Tabla 8).



#### 7.4 Coeficiente de partición Octanol/Agua (Log P)

La capacidad de una sustancia para atravesar membranas biológicas es uno de los aspectos fundamentales dentro de las características farmacocinéticas de una droga, ya que le permite acceder al sitio de acción y así, generar el efecto biológico (terapéutico o tóxico).

Existen numerosas propiedades fisicoquímicas que pueden afectar esta facultad. Entre ellas, la lipofilicidad es la de mayor interés para el desarrollo de drogas, debido a la relación directa que presenta con la habilidad para atravesar membranas biológicas por difusión pasiva, como así también, por contribuir en forma entrópica a la unión entre ligando y receptor.

La lipofilicidad suele expresarse como coeficiente de partición (P) de un compuesto entre dos fases inmiscibles entre sí, una fase polar (acuosa) y una no polar (orgánica) en equilibrio, cuyo valor es comúnmente expresado en su forma logarítmica (log P).

Tabla 9. Valores de Log P de los fragmentos y secuencia completa de penetratina.

	fragmento 1	fragmento 2	fragmento 3	fragmento 4	Completa
Log P	0.7	1.03	1.44	3.63	11.3

Los resultados de Log P se destaca el fragmento 4 con el valor más alto y como se muestra en los anteriores descriptores es la secuencia señalada como mejor acarreador dentro de los fragmentos. Log P nos indica que tiene una mayor lipofilicidad, junto a estos resultados también resalta la secuencia completa de penetratina que comparada con los demás valores tiene un valor alto, esto reafirma su uso como péptido acarreador capaz de atravesar las membranas biológicas, por otro lado el residuo con menor lipofilicidad fue el primero (Tabla 9).





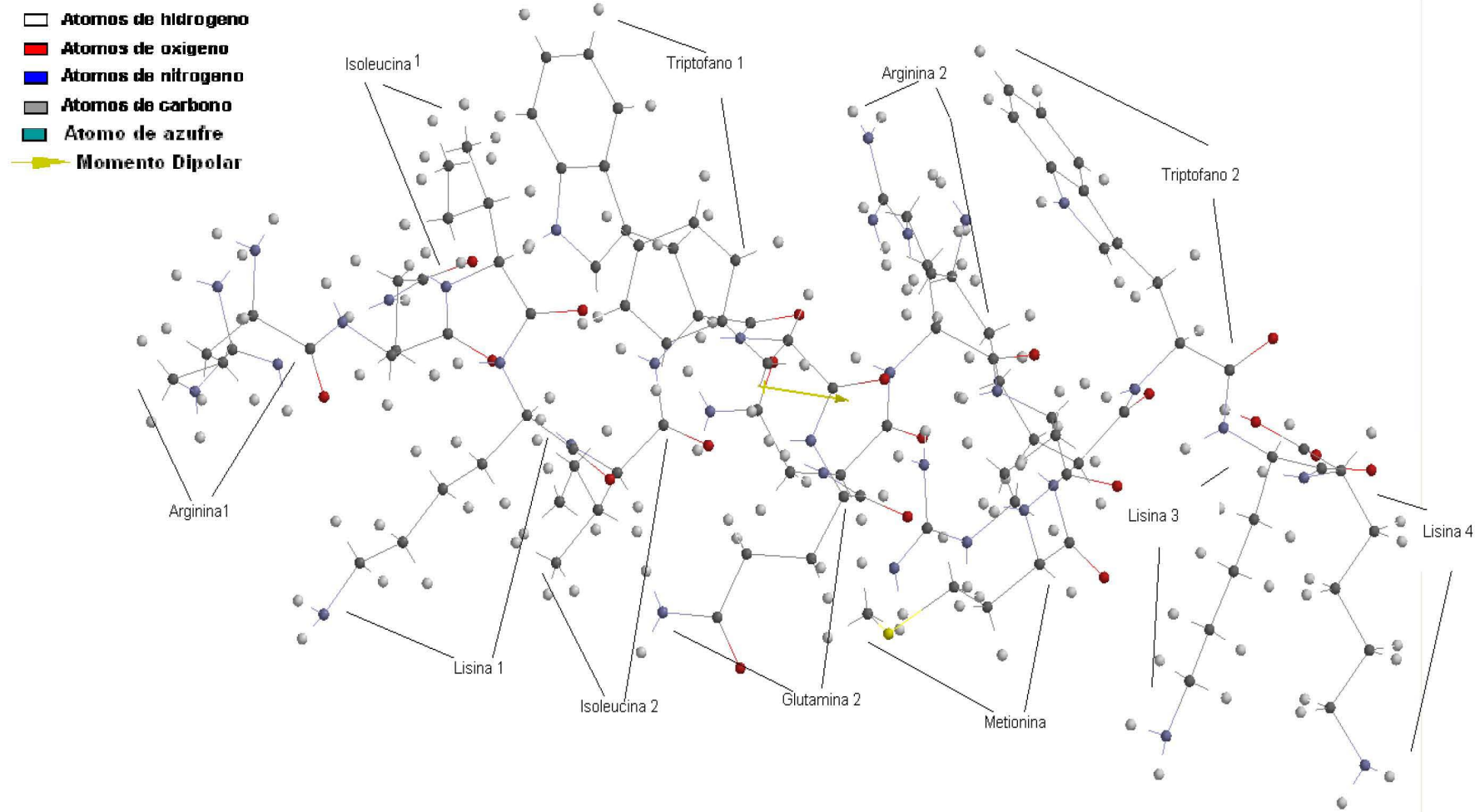


Figura 13. Estructura optimizada de la secuencia completa de penetratina RQIKIWFQNRRMKWKK con el conjunto base HF/6-31gd.



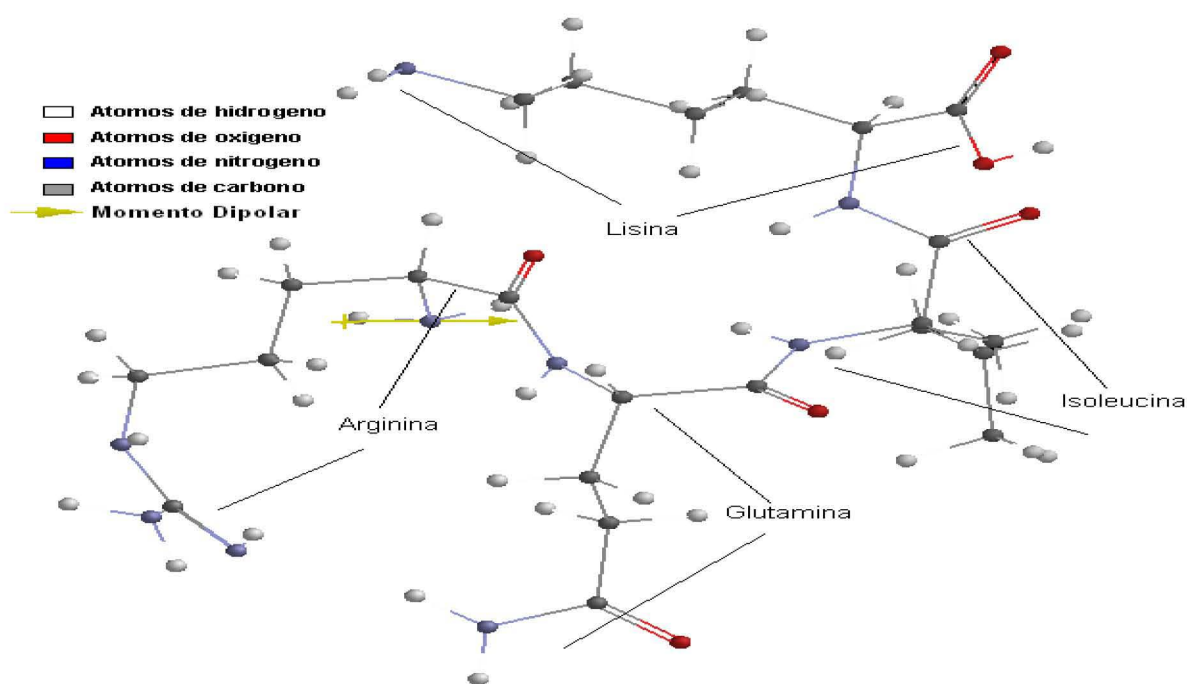


Figura 14. Estructura optimizada del primer tetrapéptido RQIK con el conjunto base HF/6-31gd.

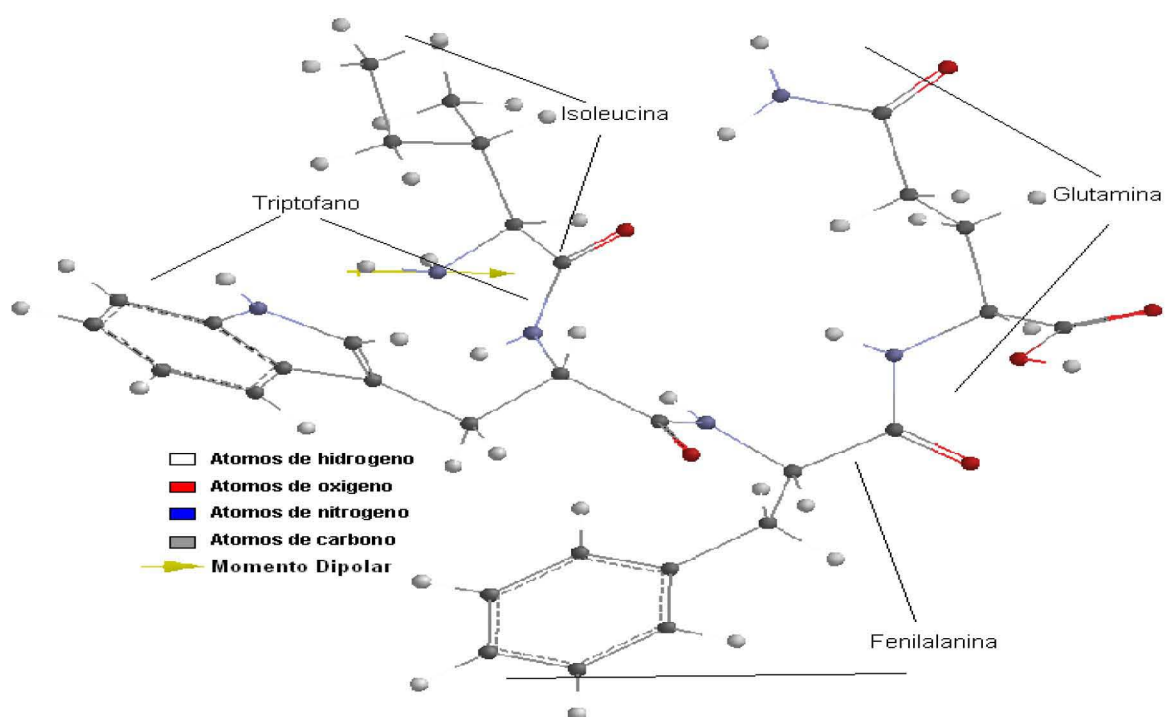


Figura 15. Estructura optimizada del segundo tetrapéptido IWFQ con el conjunto base HF/6-31gd.



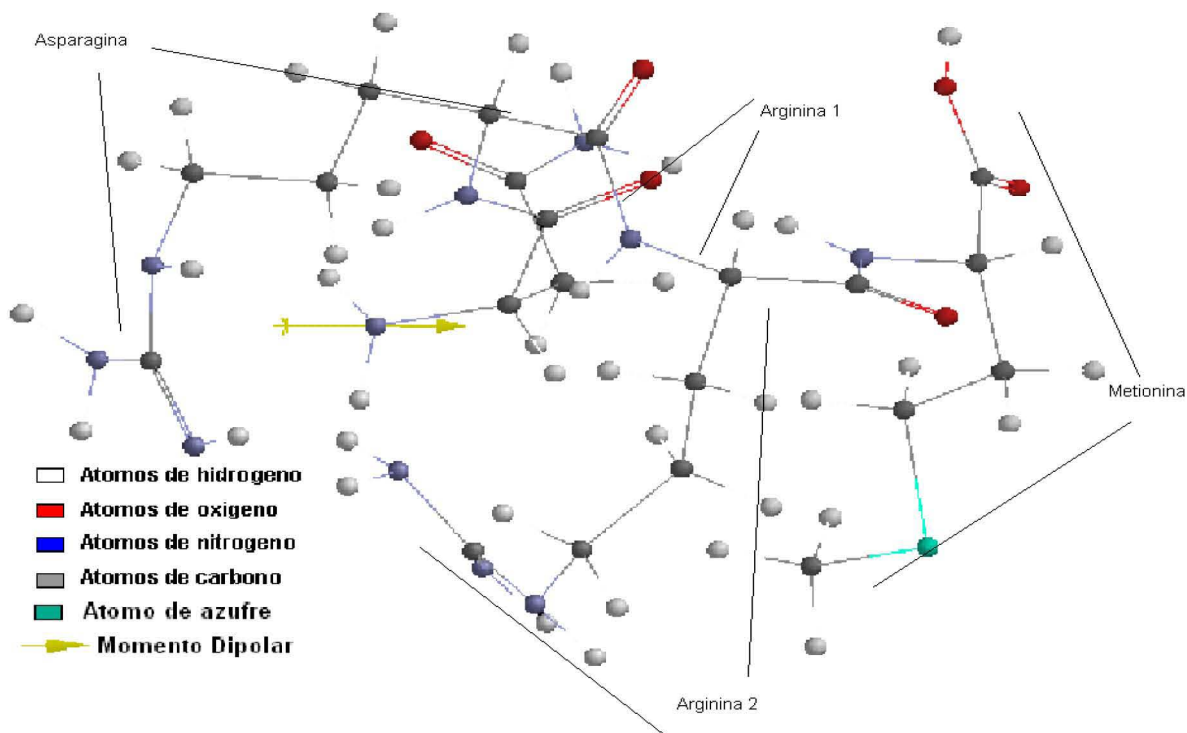


Figura 16. Estructura optimizada del tercer tetrapéptido NRRM con el conjunto base HF/6-31gd

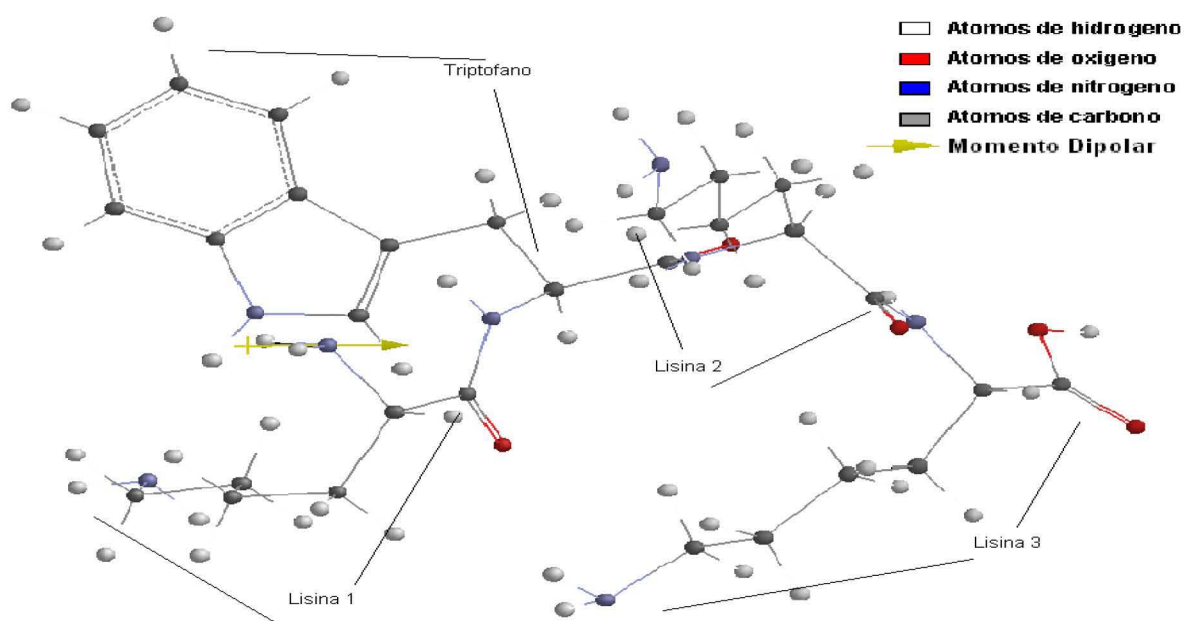


Figura 17. Estructura optimizada del cuarto tetrapéptido KWKK con el conjunto base HF/6-31gd.



## 7.2 Análisis de las Cargas

Para comprender la actividad biológica de una molécula es muy importante analizar la distribución electrónica de los átomos de toda molécula biológica, sea o no de interés farmacológico ya que indica sus propiedades fisicoquímicas.

Debido a que el objetivo de este trabajo es diseñar un nuevo péptido acarreador de moléculas de interés biológico partiendo del análisis de la estructura electrónica de un acarreador conocido, se realizó la caracterización del péptido acarreador penetratina conocido por su facilidad de atravesar membranas celulares (Derrosi *et al.*, 1994).

Con los cálculos *ab initio* utilizados en este trabajo obtuvimos las estructuras optimizadas de los péptidos en estudio, a su vez los cálculos de frecuencia nos aseguraron tener un mínimo de energía sólo para los fragmentos. Ya que la secuencia completa tiene un mayor número de átomos resultó poco factible hacerle este cálculo.

Seguido de esto se efectuaron los cálculos puntuales de cada uno de los péptidos con el nivel de estudio B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d). Se ocuparon las cargas derivadas del potencial electrostático de cada uno de los átomos de los aminoácidos que conforman a los péptidos estudiados para el análisis de las cargas totales de las moléculas por aminoácido y cargas puntuales por átomo.



Cálculos Puntuales del Fragmento 1

Las cargas significativas de cada aminoácido del fragmento1 RQIK es la primera parte de la secuencia de penetratina del lado amino; la lisina es el residuo que aporta la mayor cantidad de carga negativa a la molécula, los átomos N81 y N42 tiene las cargas negativas más altas seguido de los oxígenos 67 y 68; este tipo de residuos son nucleofílicos ya que al enlazarse con otra molécula tenderán a atraer cargas positivas ó a ceder electrones de su última capa de energía hacia otra molécula; por otro lado la glutamina es la que aporta la carga positiva a la molécula a diferencia de la lisina que es un residuo básico; destacan los átomos C24; C35 y C64, estos sitios dentro de la molécula tienden a tener ataques electrofílicos ya que son atrayentes de electrones, es decir, que al unirse a otra molécula ellos atraen electrones de la capa mas externa de otra molécula; los orbitales moleculares frontera se localizan en estos fragmentos; aunque la arginina tiene mayor cantidad de átomos cargados negativamente el aporte total a la molécula es menor que con la lisina además de que la arginina también es un residuo básico, la isoleucina es el segundo residuo cargado (Tabla 3).

Tabla 3. Cargas de algunos átomos seleccionados y de cada uno de los aminoácidos de RQIK con el nivel B3LYP/6-311Gd//HF/3-21G(d).

Arginina		Glutamina		Isoleucina		Lisina	
<b>Cargas Totales</b>							
-0.0148		0.1230		-0.0168		-0.0912	
<b>Cargas Significativas</b>							
C 5	0.4034	N 12	-0.0842	N 30	-0.3749	N 52	-0.5550
O 8	-0.5154	C 21	0.6717	C 43	0.6478	C 64	0.7750
N 1	-0.9659	O 26	-0.5595	O 48	-0.5744	O 67	-0.5866
C 7	-0.2520	C 16	-0.2146	C 36	-0.0603	O 68	-0.6594
N 19	-0.8104	C 35	0.8689	C 49	-0.3482	N 81	-1.0361
C 24	0.8907	O 41	-0.5954	C 55	-0.2689		
N 31	-0.9277	N 42	-1.1097				
N 32	-0.9084						



Cálculos Puntuales del Fragmento 2

Las cargas puntuales del fragmento 2 IWFG correspondientes al segundo tetrapéptido de la parte amino terminal de penetratina; se observa que los aminoácidos de los extremos tienen carga negativa donde la glutamina es el más negativo, esto sugiere que dichos residuos son susceptibles a ataques nucleofílicos cuando reaccionan con otras moléculas, con la diferencia de que la isoleucina es un residuo hidrofóbico y la glutamina un residuo hidrofílico; los residuos triptófano y fenilalanina son residuos hidrofóbicos y ambos aportan cargas positivas a la molécula, los cuales están expuestos a recibir ataques electrofílicos siendo el residuo triptófano el más vulnerable al tener mayor aporte positivo a la molécula además de que aquí se presentan ambos orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO; puntualmente los átomos N81 presente en la glutamina y N1 presente en la isoleucina son los que tienen una carga significativamente negativa y por lo tanto los sitios más susceptibles a ataques electrofílicos; resaltan también las cargas de los átomos de oxígeno de la glutamina O70, O71 y O80 por su alto aporte electrónico; en el caso de las cargas positivas las cargas puntuales significativas son por parte de los átomos C24, C40, C64 y C78 siendo este último el más positivo dentro de la molécula y un sitio preferentemente receptor de ataques electrofílicos (Tabla 4).

Tabla 4. Cargas de algunos átomos seleccionados y de cada uno de los aminoácidos del fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311Gd//HF/6-31G(d).

Isoleucina		Triptófano		Fenilalanina		Glutamina	
<b>Cargas Totales</b>							
-0.0945		0.1150		0.0798		-0.1002	
<b>Cargas Significativas</b>							
C 5	0.4143	N 12	-0.2411	N 31	-0.4385	N 51	-0.63132
O 8	-0.5529	C 24	0.4650	C 40	0.553395	C 64	0.674701
N 1	-0.9118	O 27	-0.5127	O 47	-0.53834	C 66	-0.0716
C 9	-0.2565	C 28	-0.1606	C 42	-0.21816	O 70	-0.55221
C 15	-0.2162	C 32	-0.0464	C 55	-0.17776	O 71	-0.59477
		C 39	-0.1202	C 56	-0.20537	C 74	-0.05417
		C 44	-0.2456	C 60	-0.03075	C 78	0.731627
		C 45	-0.1619	C 61	-0.05094	O 80	-0.56904
		C 53	-0.0505	C 67	-0.12214	N 81	-0.96845



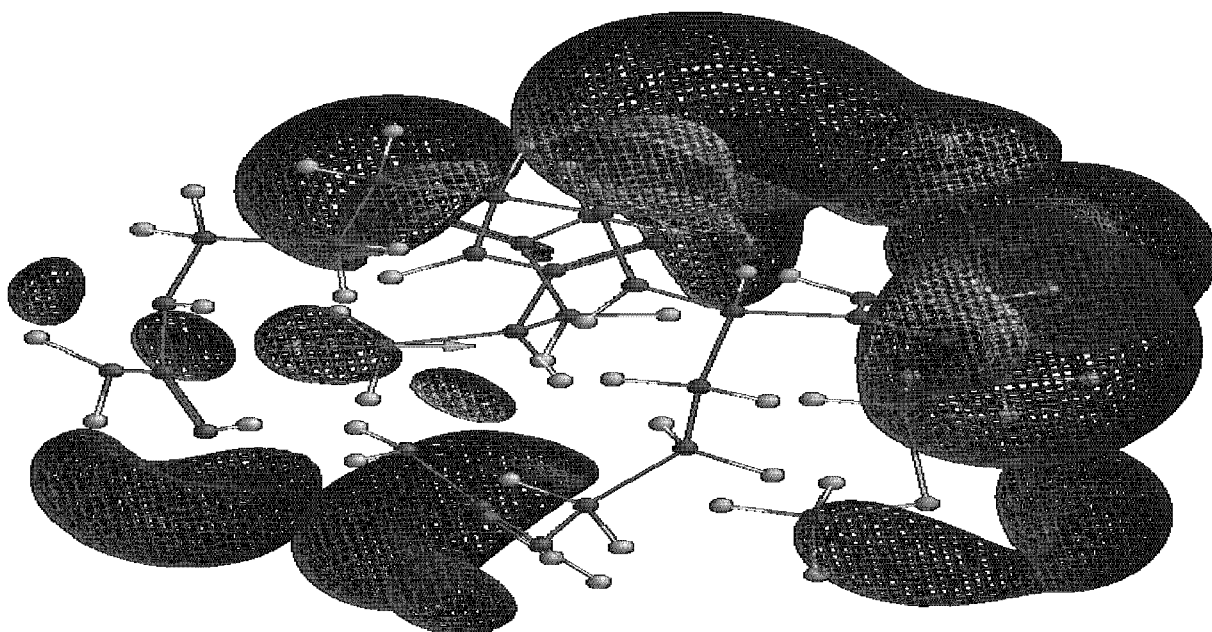


Figura 32. Isosuperficie del potencial electrostático del fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

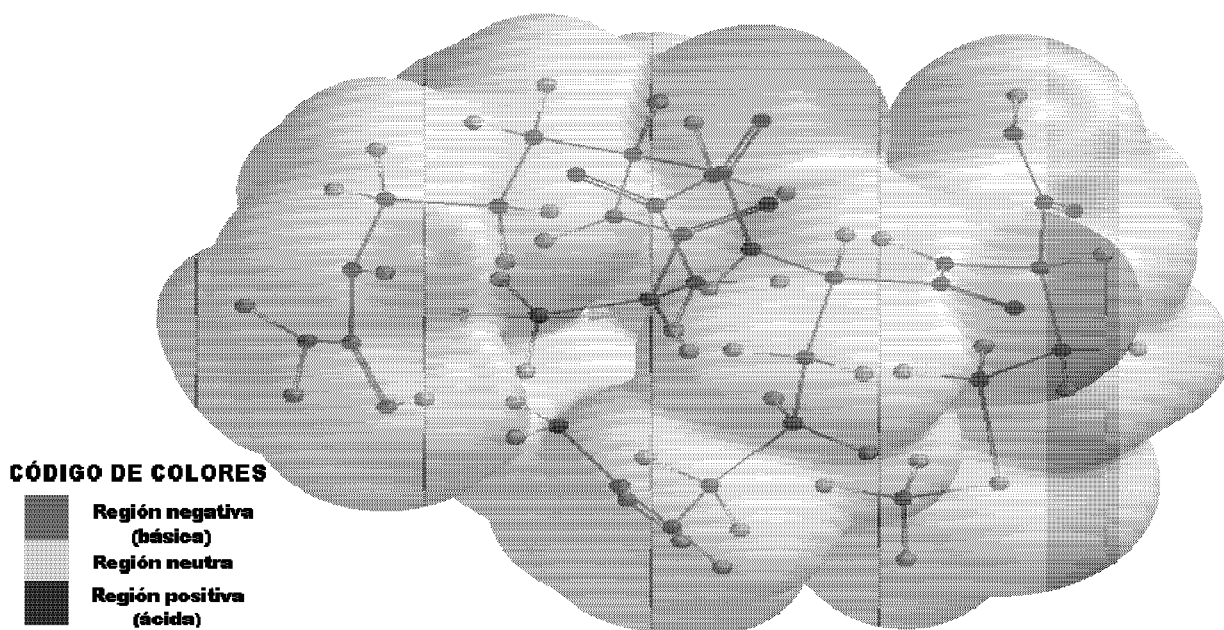


Figura 33. Densidad electrónica del fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).



#### Fragmento 4

En el Fragmento 4 los orbitales moleculares frontera HOMO (Figura 34) y LUMO (Figura 35) se localizan en el triptófano y la distribución de la mayor parte de las cargas negativas se sitúan en la Lisina 3; la segunda en importancia es la Lisina 1 cabe señalar que en el triptófano no se encontraron cargas negativas altas mientras que en las cargas positivas se encuentra la Lisina 2, 3 y el triptófano.

En la isosuperficie del potencial electrostático (Figura 36) notamos que no solo los oxígenos aportan cargas significativas negativas a la molécula también algunos nitrógenos e hidrógenos aportan cargas.

En la densidad electrónica (Figura 37) las cargas tienden hacia el extremo amino haciéndolo una región básica susceptible a ataques nucleofílicos.





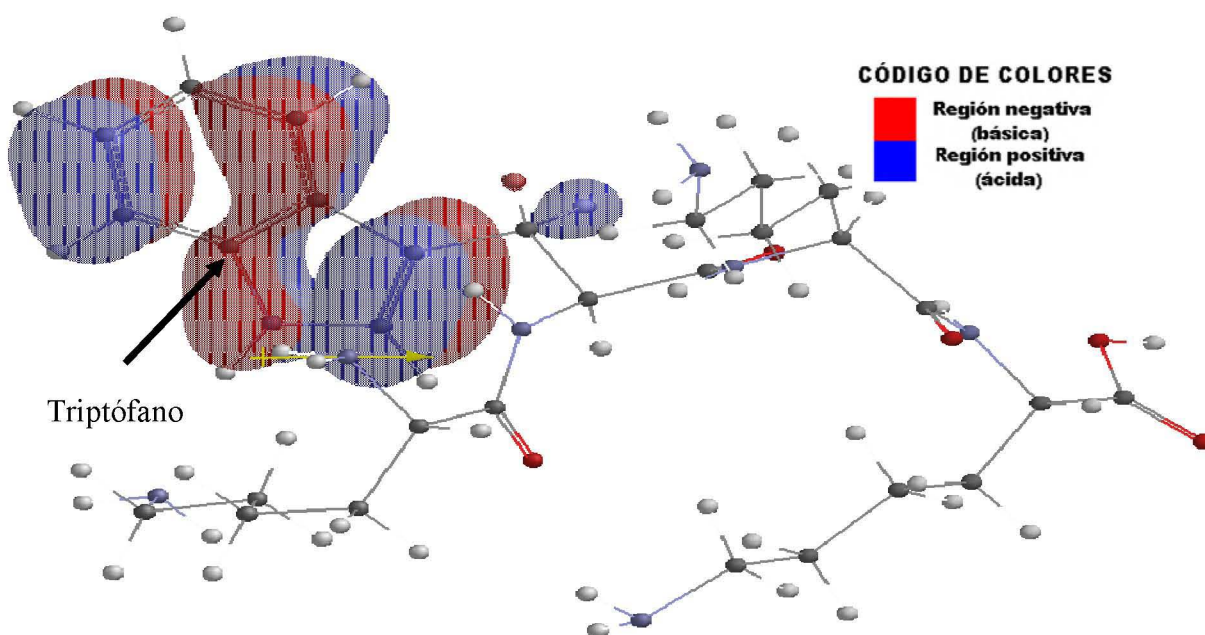


Figura 34. Orbital Molecular HOMO del Fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/-31G(d).

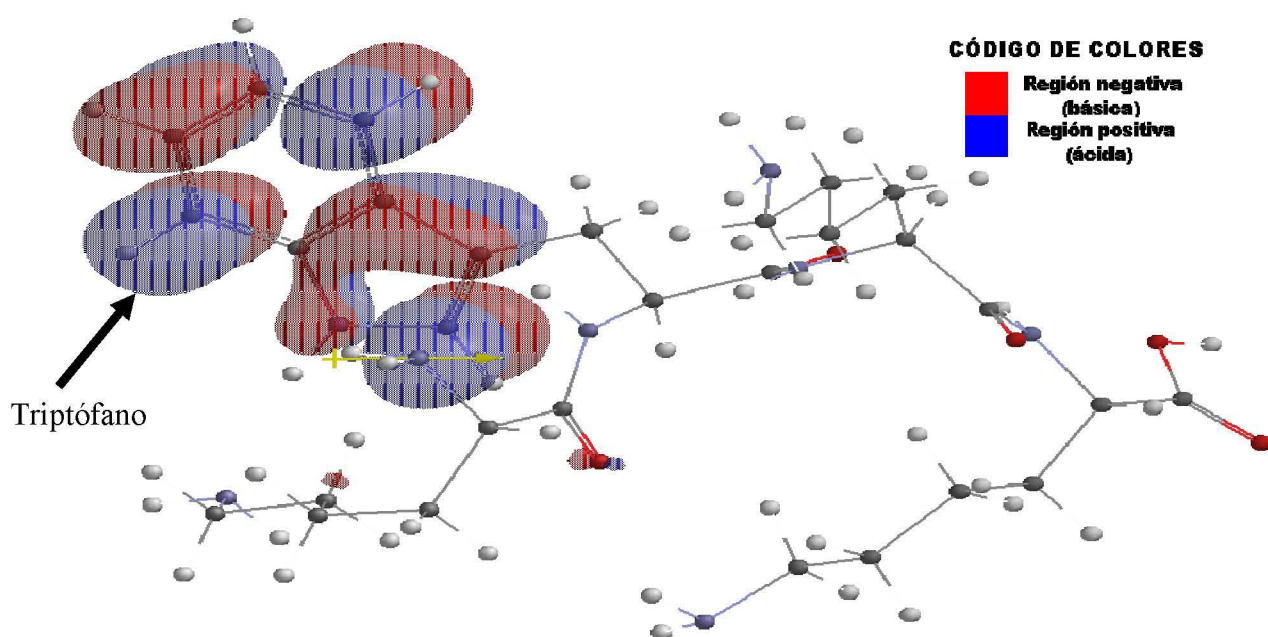


Figura 35. Orbital Molecular LUMO del Fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).





Figura 36. Isosuperficie del potencial electrostático del Fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

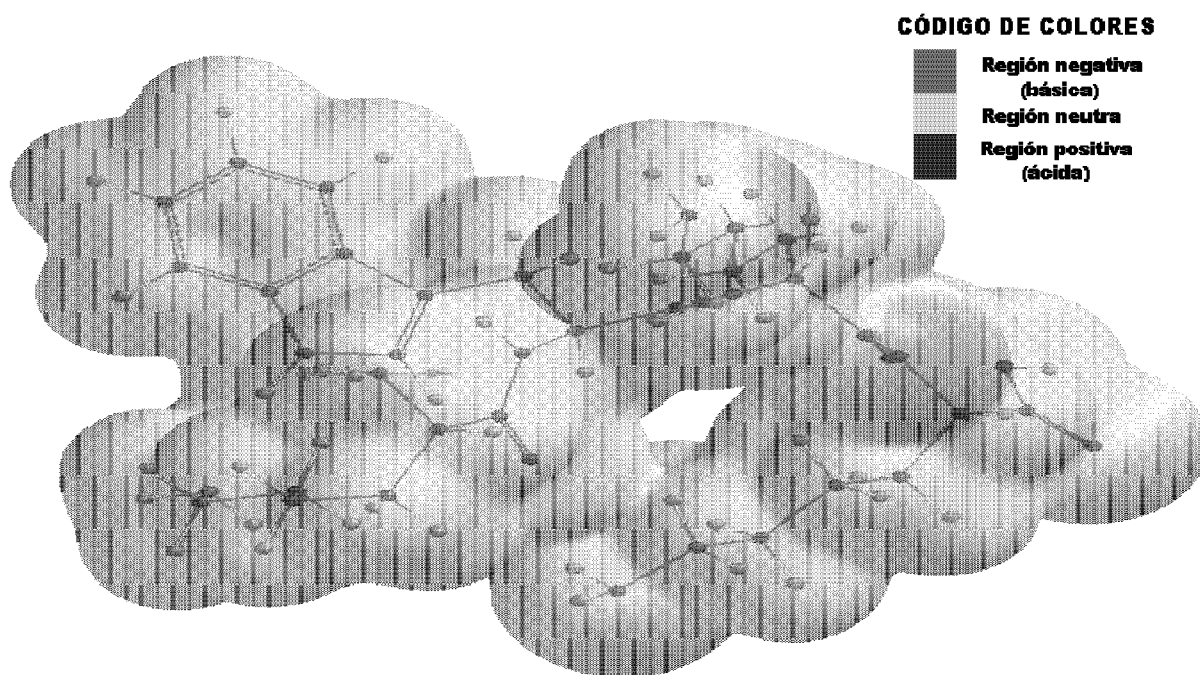


Figura 37. Densidad electrónica del Fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).



Si consideramos que la función de esta molécula es de acarreador que es capaz de atravesar la membrana celular de manera independiente de energía, es importante hacer notar que la arginina, glutamina y triptófanos son los probables residuos que interaccionan con los fosfolípidos de membrana.

El diseño de proteínas se ha enfocado en obtener complejos pequeños y bien plegados, con el objeto de entender los mecanismos que producen la estabilidad de las proteínas como también para conferir propiedades y actividades específicas; este diseño se basa en el conocimiento detallado de la estructura y función de una proteína conocida para proponer nuevas variantes (Robertson y William, 2007)

La molécula penetratina resultó ser la mejor candidata para sustraer sitios reactivos y diseñar un nuevo péptido ya que teóricamente es la molécula óptima para acarrear moléculas y servir de vector de entrega.

Con base en los resultados y la revisión bibliográfica se proponen las siguientes secuencias: "GKWRRRMWG (Figura 38); RRWRWMG (Figura 39); GWRKMWG (Figura 40)" con posible acción acarreadora de moléculas.

La tendencia de este tipo de moléculas acarreadoras ha ido hacia secuencias cada vez más cortas como demostró Fischer (2000) con los últimos siete residuos de penetratina; además en el presente estudio el fragmento 4 fue un candidato óptimo, a su vez las colas de polilisinas y los derivados del tat cada vez son más cortos; por otra parte Andaloussi y colaboradores mencionan que van desde 5 residuos hasta 40 y por último esta característica proporciona una ventaja al reducir el costo en este tipo de terapias.

Por otro lado aunque según Derossi (1998) se mantiene una conformación en hélice alfa la cual favorece las interacciones electrostáticas con la membrana y el paso de un ambiente extracelular traspasando la membrana; esto a su vez manteniendo cierto grado de anfipaticidad.

Para el diseño de estos acarreadores se tomaron en cuenta los residuos triptófano ya que en el péptidos estudiado fueron los que mantuvieron los orbitales moleculares frontera los cuales son los sitios más activos dentro de la molécula, tanto en fragmentos como en la molécula completa además de que Lindbergh y colaboradores en un estudio biofísico demostraron que este tipo de residuos interaccionan con la membrana celular además



Binder y colaboradores reportan que inducen cierto rearrreglo de la arquitectura de la membrana para ayudar a pasar a penetratina por un mecanismo de tipo electroporación;

Así mismo se tomaron en cuenta residuos positivos como argininas y lisinas debido a que se menciona su importancia en este tipo de mecanismos de entrega además de que existen acarreadores que cuentan con residuos de un solo tipo como las polilisinas; además con fines estratégicos se mantiene un residuo metionina ya que con este se puede llevar a cabo la reacción de puentes de disulfuro para unir el acarreador a la carga.

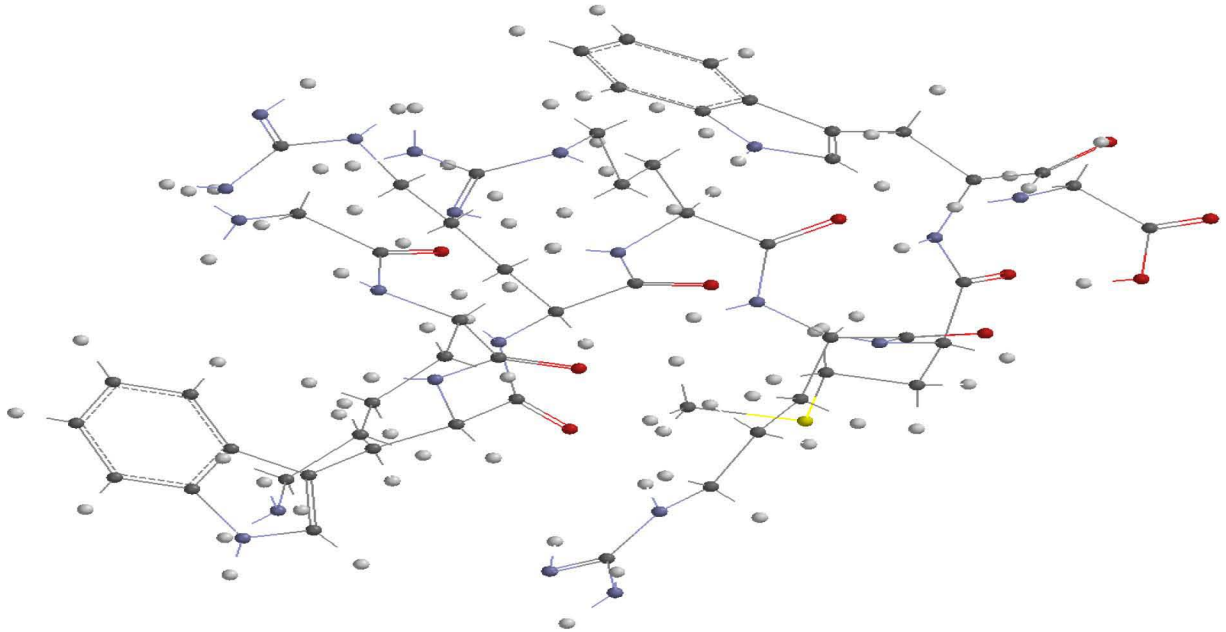


Figura 38. Propuesta de nueva secuencia acarreadora GKWRRRMWG



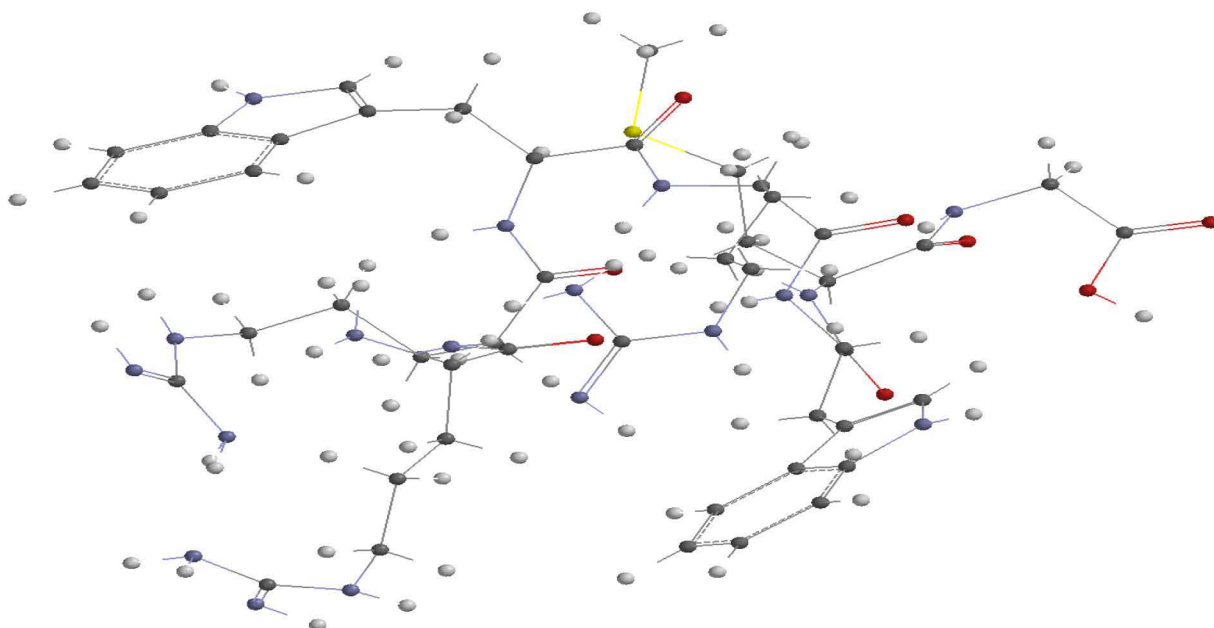


Figura 39. Propuesta de nueva secuencia acarreadora RRWRWVG

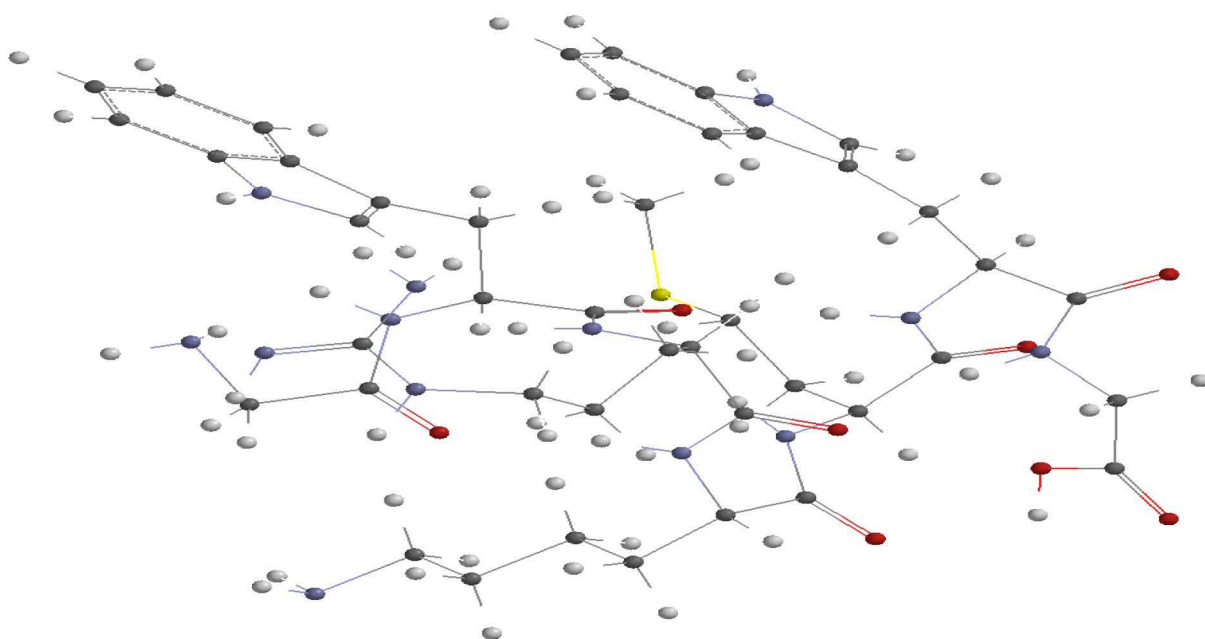


Figura 40. Propuesta de nueva secuencia acarreadora GWRKMVG



## **1. CONCLUSIONES**

- 1) La molécula más reactiva es la secuencia completa seguida del fragmento 4 debido a que presentan valores muy bajos para dureza, potencial de ionización e índice de electrofilicidad y en geometría.
- 2) Los residuos W, M, R, Q presentan mayor reactividad dentro de la secuencia completa.
- 3) Las cargas del potencial electrostático así como los orbitales moleculares frontera señalan a la arginina y al triptófano como sitios importantes de interacción; estos residuos tienen carga negativa.
- 4) El fragmento 4 presenta mayor reactividad química y presumiblemente puede tener mayor actividad biológica por lo que en el diseño de un nuevo péptido debemos considerar este tipo de residuos
- 5) En cuanto al momento dipolar la molécula mostró una gran carga negativa hacia los extremos carboxilo en los cuales se encontraban los residuos triptófano, por lo que se debe mantener estas variables y cargar la molécula negativamente hacia el extremo carboxilo con este tipo de residuos.
- 6) Los residuos de aminoácidos glutamina, fenilalanina, lisina y triptófano son los que presentan mayor reactividad en todos los péptidos analizados, además de ser fundamentales en la estructura secundaria de la molécula, por lo que al diseñar un nuevo péptido acarreador, es necesario conservar estos residuos.
- 7) De acuerdo a los orbitales moleculares frontera, los aminoácidos con mayor reactividad son los triptófanos que están más cerca del extremo carboxilo y estos son más susceptibles a ataques electrofílicos.
- 8) Estos estudios constituyen un puente entre el conocimiento generado por la Biología Celular y las aplicaciones de la Química Computacional que pueden repercutir en protocolos médicos.



## **BIBLIOGRAFIA**

Alberts B. *et al.*, (2004). "Biología Molecular de la Célula". 4a ed. Editorial Omega. España. 1463.

Alsenoy V. *et al.*, (1998). "Ab initio geometry determination of proteins. I. Crambin". *J Phys Chem A* 102, 2246–2251.

Apostolopoulos V. *et al.*, (2006). "Delivery of tumor associated antigens to antigen presenting cells using penetrating induces potent immune responses". *Vaccine* 24 3191–3202.

Berlose J.P. *et al.*, (1996) "Conformational and associative behaviors of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments". *Eur J Biochem* 242, 372-386.

Binder H. y Lindblom G. (2003). "Charge-Dependent Translocation of the Trojan Peptide Penetratin across Lipid Membranes". *Biophys J* 85 982–995.

Binder H. y Lindblom G. (2004). "A Molecular View on the Interaction of the Trojan Peptide Penetratin with the Polar Interface of Lipid Bilayers". *Biophys J* 87 332–343.

Boyer R. (2000). "Conceptos en bioquímica." Internacional Thomson. Mexico, Mexico. 375.

Björklund J. *et al.*, (2006). "Real-Time Transmembrane Translocation of Penetratin Driven by Light-Generated Proton Pumping". *Biophys J: Biophys Lett.*

Chan D. *et al.*, (2006). "Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action". *Biochem et Biophys Acta* 1758. 1184–1202.

Chattaraj P.K. *et al.*, (2006). "Electrophilicity Index". *Chem Rev* 106, 2065-2091.

Christiaens B. (2004). "Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides" *Eur J Biochem* 271, 1187–1197.



- Conner SD, Schmid SL. (2003). "Regulated portals of entry into the cell". *Nature*; 422: 37-44.
- Console S. *et al.*, (2003). "Antennapedia and HIV Transactivator of Transcription (TAT) "Protein Transduction Domains" Promote Endocytosis of High Molecular Weight Cargo upon Binding to Cell Surface Glycosaminoglycans". *J of Biol Chem* 278 37 35109–35114.
- Creighton E. T. (1992). "Proteins: Structures and Molecular Properties". W. H. Freeman; Second Edition edition.
- Czajlik A. y Percze. (2004). "Peptide models XXXII. Computed chemical shift análisis of penetratin fragments". *J of Mol Struct (Theochem)* 675 129–139.
- D'Ursi A. *et al.*, (2006). "A Membrane-Permeable Peptide Containing the Last 21 Residues of the G<sub>S</sub> Carboxyl Terminus Inhibits GS-Coupled Receptor Signaling in Intact Cells: Correlations between Peptide Structure and Biological Activity". *Mol Pharmacol* 69:727–736.
- Derossi D. *et al.*, (1994). "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes". *J of Biol Chem* 269, 10444–10450.
- Derossi D. *et al.*, (1998). "Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery". *Trends Cell Biol* 8: 84–87.
- Derossi, D. *et al.*, (1996). "Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent". *J of Biol Chem* 271, 18188–18193.
- Deshayes S. *et al.*, (2005), "Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics." *CMLS, Cell Mol Life Sci* 62 1839–1849.
- Dietz G. y Bähr M. (2005). "Peptide-enhanced cellular internalization of proteins in neuroscience". *Brain Research Bulletin* 68. 103–114.
- Drin G. *et al.*, (2001). "Translocation of the pAntp Peptide and Its Amphipathic Analogue AP-2AL". *Biochem*, 40, 1824-1834.





- Eyre T. A. *et al.*, (2004). "Analysis and prediction of membrane protein structure". Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Part 4. Bioinformatics. 4.6. Methods for Structure Analysis and Prediction. Specialist Review
- Fawell S. *et al.*, (1994). "Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells". Proc Natl Acad Sci USA 91: 664–668.
- Frisch, M. J. *et al.*, Gaussian 03 (Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 2003).
- Fischer P. M. *et al.*, (2000). "Structure–activity relationship of truncated and substituted analogues of the intracellular delivery vector Penetratin". J Pept Res 55, 163.
- Frankel, A.D. y Pabo, C. O. (1988). "Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus". Cell 55, 1189–1193.
- Gehring, W.J. *et al.*, (1994). "Homeodomain proteins". Annu Rev Biochem 3, 487–526.
- Genevieve D. *et al.*, (2003). "Cellular uptake of Antennapedia Penetratin peptides is a two-step process in which phase transfer precedes a tryptophan-dependent translocation". Nucleic Acids Research 31 2 556-561.
- Guex N. y Peitsch M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18, 2714-2723.
- Hällbrink, M. *et al.*, (2005). "Prediction of Cell-Penetrating Peptides". Int J of Pep Res and Therap 11, 4, 249–259.
- Haupt Y, *et al.*, (1997). "Mdm2 promotes de rapid degradation of p53". Nature 387:296-299.
- Heijne G.V. y Gavel Y. (1998). "Topogenic signals in integral membrane proteins". Eur J Biochem 174,671 -678.



Joliot, A. *et al.*, (1991). "Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88, 1864–1868.

Kabouridis P. S. (2003). "Biological applications of protein transduction technology" *TRENDS in Biotechnology* 21 11.

Kilk K. (2004). "Cell-penetrating peptides and bioactive cargoes. Strategies and mechanisms." Tesis de Doctorado. Department of Neurochemistry and Neurotoxicology Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, Stockholm University, 10691 Stockholm Sweden.

Kilk K. *et al.*, (2001). "Cellular Internalization of a Cargo Complex with a Novel Peptide Derived from the Third Helix of the Islet-1 Homeodomain. Comparison with the Penetratin Peptide". *Bioconjugate Chem* 12, 6, 911-916.

Kotz J., Treichel P. "Química y reactividad química". (5ª Ed) Thomson. (2003).

Lensink M. *et al.*, (2005). "Penetratin-Membrane Association: W48/R52/W56 Shield the Peptide from the Aqueous Phase". *Biophys J* 88. 939–952.

Letoha T. *et al.*, (2003). "Membrane translocation of penetratin and its derivatives in different cell lines". *J Mol Recog* 16: 272–279.

Levine I. N. (2001) "Química Cuántica", 5ª Ed., Prentice Hall, Madrid.

Lindberg M. *et al.*, (2003) "Structure and positioning comparison of two variants of penetratin in two different membrane mimicking systems by NMR". *Eur J Biochem* 270, 3055–3063.

Lindberg M. y Astrid Gräslund. (2001). "The position of the cell penetrating peptide penetratin in SDS micelles determined by NMR". *Fed of Eur Biochem Soc Lett* 497 39-44.

Lochmann D. (2004) "Drug delivery of oligonucleotides by peptides." *Eur J of Pharma and Biopharma.* 58 237–251.



- Mäe M. *et al.*, (2005). "Internalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts". *Biochem et Biophys Acta* 1669 101– 107.
- Magzoub M. y Gräslund A. (2004). "Cell-penetrating peptides: small from inception to application". *Quarterly Reviews of Biophysics* 37(2):147–195.
- Massodi I, (2005) "Evaluation of cell penetrating peptides fused to elastin-like polypeptide for drug delivery." *J of Cont Rel* 108 396–408.
- Matsuzaki K. (2001) "Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self defence?". *Biochem Soc Trans* 29, 4. 598-601.
- Mittelman J M. y Gudkov A V. (2000). "Generation of p53 Suppressor Peptide From the Fragment of p53 Protein". *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 25,3, 115–128.
- Mourik VT. (2004). "First-principles quantum chemistry in the life sciences". *Phil Trans R Soc Lond A* 362, 2653–2670.
- Nicolás V. M. I., *et al.*, (2006). "Algunos aspectos básicos de la química computacional". UNAM, FES-Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 39-48.
- Oldfiel E. (2005). "Quantum chemical studies of protein structure". *Phil Trans R Soc B* 360, 1347–1361.
- Peña A. (2007). "Las membranas de las células." 1ª reimposición. Fondo de Cultura Económica. 147.
- Persson D, *et al.*, (2001). "Penetratin-induced aggregation and subsequent dissociation of negatively charged phospholipid vesicles". *FEBS Letters* 505. 307-312.
- Plénat T. *et al.*, (2005). "Coexistence of a Two-States Organization for a Cell-Penetrating Peptide in Lipid Bilayer". *Biophys J* 89 4300–4309.
- Prochiantz A. (1996) "Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides." *Current Opinion in Neurobiology* 6:629-634.
- Robertson M. y William G. (2007). "Designer enzymes". *Nature*. 448. 757-758.



Hosotani, R. *et al.*, (2002). "Trojan p16 Peptide Suppresses Pancreatic Cancer Growth and Prolongs Survival in Mice" *Clinical Cancer Research*. 8, 1271–1276.

Ryser, H. J. y Hancock, R. (1965). "Histones and basic polyamino acids stimulate the uptake of albumin by tumor cells in culture". *Science* 150, 501–503.

S. El-Andaloussi, T. *et al.*, (2005). "Cell-Penetrating Peptides: Mechanisms and Applications." *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 11, 3597-3611 3597.

Sandberg M., *et al.*, (1998). "New Chemical Descriptors Relevant for the Design of Biologically Active Peptides. A Multivariate Characterization of 87 Amino Acids". *J Med Chem* 41, 2481-2491.

Schneuwly S., *et al.*, (1986) "Structural organization and sequence of the homeotic gene *Antennapedia* of *Drosophila melanogaster*". *The EMBO Journal* 5 4 733-739.

Snyder E. y Dowdy S. (2004). "Cell Penetrating Peptides in Drug Delivery" *Pharma Res* 21 3.

Spartan'06. Wavefunction, Inc. Irvine, CA. Except for molecular mechanics and semi-empirical models, the calculation methods used in Spartan have been documented in: Y. Shao, L.F. Molnar, Y. Jung, J. Kussmann, C. Ochsenfeld, S.T. Brown, A.T.B. Gilbert, L.V. Slipchenko, S.V. Levchenko, D.P. O'Neill, R.A. DiStasio Jr., R.C. Lochan, T. Wang, G.J.O. Beran, N.A. Besley, J.M. Herbert, C.Y. Lin, T. Van Voorhis, S.H. Chien, A. Sodt, R.P. Steele, V.A. Rassolov, P.E. Maslen, P.P. Korambath, R.D. Adamson, B. Austin, J. Baker, E.F.C. Byrd, H. Dachsel, R.J. Doerksen, A. Dreuw, B.D. Dunietz, A.D. Dutoi, T.R. Furlani, S.R. Gwaltney, A. Heyden, S. Hirata, C-P. Hsu, G. Kedziora, R.Z. Khalliulin, P. Klunzinger, A.M. Lee, M.S. Lee, W.Z. Liang, I. Lotan, N. Nair, B. Peters, E.I. Proynov, P.A. Pieniazek, Y.M. Rhee, J. Ritchie, E. Rosta, C.D. Sherrill, A.C. Simmonett, J.E. Subotnik, H.L. Woodcock III, W. Zhang, A.T. Bell, A.K. Chakraborty, D.M. Chipman, F.J. Keil, A. Warshel, W.J. Hehre, H.F. Schaefer, J. Kong, A.I. Krylov, P.M.W. Gill and M. Head-Gordon, *Phys Chem Chem Phys*, 8, 3172 (2006).



Villa JL. (2007). "Nuevos aspectos biofarmacéuticos en nanotecnología farmacéutica". *An R Acad Nac Farm* 73(4): 813-832.

Vives E. (2005). "Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: "Is the Trojan horse too wild to go only to Troy?"". *J of Controlled Release* 109. 77–85.

Wang S. *et al.*, (2006). "Synthesis and biological activity of conjugates between paclitaxel and the cell delivery vector penetratin Bioorg". *Med Chem Lett* 16 628–2631.

Yun-Long Tseng, *et al.*, (2002). "Translocation of Liposomes into Cancer Cells by Cell-Penetrating Peptides Penetratin and Tat: A Kinetic and Efficacy Study". *Mol Pharmacol* 62:864–872.

Zhang G y Musgrave Ch. (2006). "Comparison of DFT Methods for Molecular Orbital Eigenvalue Calculations". *J Phys Chem A*.

Zhang G. *et al.*, (2003). "New Advance in Computational Chemistry: Full Quantum Mechanical *ab Initio* Computation of Streptavidin-Biotin Interaction Energy". *J Phys Chem B*, 107, 12039-12041



## 1. APENDICES

### 9.1 Abreviaturas

aa	Aminoácidos
AP-2AL	Péptido mutante de penetratina
BPrPp	Proteína de prion bovino
C26	Línea celular de carcinoma de colon
CPP	Péptido penetrante celular
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Acido Desoxirribonucleico
FGFs	Factor de crecimiento de fibroblastos
G $\alpha$	Proteína G
hCT	Calcitonina humana
HF	Hartree Fock
HIV-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
HMEC-1	Línea celular del endotelio microvascular
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de más Alta Energía
KALA	Péptido anfipático compuesto por lisina alanina leucina alanina
KDa	Kilodaltons
LUMO	Orbital Molecular Desocupado de más Baja Energía
Log P	Logaritmo base 10 del coeficiente de partición octanol/agua
MAP	Modelo de péptido anfipático
MFCC	Fragmentación molecular conjugada
MPG	Fusión de peptide gp41 y HIV1
mPrPp	Proteína de prion de ratón
NECA	5-N-ethylcarboxamidoadenosina
NRM	Resonancia nuclear magnética
pAntp	Penetratina- Antenapedia
pep-1	Péptido 1
pls1	Péptido derivado del factor de transcripción Islet-1
ppTG20	Péptido básico amfilíco
pVEC	Péptido derivado de la caderina del endotelio vascular
SDS	Dodecil sulfato sódico
SP	Sweet Peptide
SSHRs	Secuencias de señalamiento de regiones hidrofóbicas
SubP	Sustancia P
TAT	Proteína transactivadora de HIV
TP10	Análogo de Transportan primeros 10 residuos
Trojan P16	Péptido troyano con penetratina y gen de tumor supresor p16
VP22	Proteína de la envoltura del virus del herpes



9.1.2 Nomenclaturas de los aminoácidos

Tabla 10.- Nomenclaturas de los aminoácidos.

Abreviación		Aminoácido
A	<i>Ala</i>	Alanina
C	<i>Cys</i>	Cisteina
D	<i>Asp</i>	Ac. Aspartico
E	<i>Glu</i>	Ac. Glutamico
F	<i>Phe</i>	Fenilalanina
G	<i>Gly</i>	Glicina
H	<i>His</i>	Histi dina
I	<i>Ile</i>	Isoleucina
K	<i>Lys</i>	Lisina
L	<i>Leu</i>	Leucina
M	<i>Met</i>	Metionina
N	<i>Asn</i>	Asparragi na
P	<i>Pro</i>	Prolina
Q	<i>Gln</i>	Glutamina
R	<i>Arg</i>	Arginina
S	<i>Ser</i>	Serina
T	<i>Thr</i>	Treonina
V	<i>Val</i>	Valina
W	<i>Trp</i>	Triptofano
Y	<i>Tyr</i>	Tirosina



## 9.2 Criterios de elección de conjuntos base

Tabla 11.- Conjuntos base utilizados en los cálculos de la presente tesis.

STO-3G	Base mínima, se utiliza principalmente para obtener resultados cualitativos
3-21G	Dos conjuntos de funciones en la región de valencia provee una representación mas exacta de los orbitales
6-31G(d) 6-31G*	Añade funciones de polarización para átomos pesados; se utiliza normalmente para sistemas medianos





9.3 Péptidos Acarreadores Conocidos

Tabla 12.- Algunos péptidos acarreadores.

CPP	Secuencia	N. de Residuos	Origen
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK	16	homeodominio antenapedia de drosophila
Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	13	HIV
VP22	DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRRRRVD	33	proteína de la envoltura del virus del herpes simple
Pvec	LLIILRRRIRKQAHAAHSKamide	17	cadherina vascular endotelial
Pisl	RVIRVWFQNKRCCKDKKamide	16	factor de transcripción de la rata Islet-1
hCT(9-32) derived peptide	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	24	calcitonina humana
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	37	
Mouse PrP	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKamide	28	proteína de prion de ratón
Transportan (TP)	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIIamide	27	galanin(1-12)-Lys-Mastoparandesignado como GalR ligando
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIIamide	21	análogo truncado de transportan
Arg11	RRRRRRRRRRRR	11	péptido rico en argininas
MAP	KLALKLALKALKAALKLAamide	18	modelo de péptido anfipático
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	21	catiònico NLS+cola hidrofóbica
Pep-2	KETWFETWFTEWSQPKKKRKV	21	
MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKRKV	24	catiònico NLS+cola hidrofóbica
KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKACEA	30	
ppTG1	GLFKALLKLLKSLWKLLKA	20	
ppTG20	GLFRALLRLLRSLWRLLLR	20	
Buforin 2	TRSSRAGLQFPVGRVHLLLRK	21	



Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	23	
Bactenecin 7	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG	24	
GALA	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEAEALAA	32	artificial
KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKACEA	31	
JTS-1	GLFEALLELLESLWELLLEA	20	
FLUOS-peptide-NH2	KLALKLALKALKKAALKLA	18	
HA	GLFEAIAGFIENGWEGMIDG	20	
K5	GLFKAIKFIKGGWKGLIKG	20	
E5	GLFEAIAEFIEGGWEGLIEG	20	
H5WYG	GLFHAIAAHFIHGGWHGLIHGWYG	24	
E5CA	GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCA	22	
E5WYG	GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGWYG	23	
INF-1	GLFEAIAGFIENGWEGMIDGWYG	23	
INF-7	GLFEAIAGFIENGWEGMIDGGGC	23	Virus de la influenza
Influenza nucleoprotein	NSAAFEDLRVLS	12	
Adenoviral core peptide	MRRAHRRRRRASHRRMRGG	19	Adenovirus
MPM (membrane permeable motif)tambien conocido como			
IP/K-FGF	AAVALLPAVLLALLAP	16	Factor de crecimiento de fibroblasto de Kaposi
Melitin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	26	Veneno de apis mellifera
SV-40	PKKKRKV	7	Virus de simio T-antigeno 40 gp32
NLS de NFkB	VQRKRQKLM	9	Factor de transcripción NFkB
Syn B1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	18	
Syn B3	RRLSYSRRRF	10	
Syn B5	RGGRLAYLRRRWAVLGR	17	
APH-1(8598)	VFRFAYYKLLKKA	13	



APH-1(236-246)	LRSIQRSL LCK	11	
NCT(38-53)	RKIYIPLNKTAPCVR	15	
NCT(414-434)	RRPNQSQPLPPSSLQRFLRAR	21	
NCT(616-635)	RLPRCVRSTARLARALSPAF	20	
PS-1(97-109)	VATIKSVSFYTRK	13	
PL-1	VVLYKYRSYKVI	12	
PS-1(305-317)	AQRRVSKNSKYNA	13	
Hct	CGNLSTCMLGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	32	
W10-hCT(9-32)	LWTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP	24	
A-23-hCT(9-32)	LGTYTQDFNKFHTFAQTAIGVGAP	24	
W30-hCT(9-32)	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGWP	24	
hCT(18-32)	KFHTFPQTAIGVGAP	15	
hCT(21-32)	TFPQTAIGVGAP	12	
hCT random	FLTAGQNTIQIPVKTGGHF PFADY-NH2	24	
W2-pVEC	LWIILRRRIRKQAHASK	18	
PTD5	RRQRRTSKLMKR	12	
SAP	VRLPPP	6	
HIV-1 TAT (47-57)	YGRKKRRQRRR	11	
PTD-5	RRQRRTSKLMKR	12	
SP	MGLGLHLLVLAAALQGAWSQPKKKRKV	27	(Ig(v)-SV40)
SubP	RPKPQQFFGLM		Substance P
BD	YGGFLRRIRPKLKWDNQKRYGGFLRRQFKVVT		Big dynorphin



## 9.4 Índice de Imágenes

Figura 1. Estructura general de un péptido.....	3
Figura 2. Aplicaciones de los péptidos acarreadores.....	4
Figura 3. Modelos de entrada a la célula de los péptidos acarreadores.....	5
Figura 4. Representación de la recurrencia de estudios con péptidos acarreadores.....	7
Figura 5. Representación grafica de la penetratina.....	8
Figura 6. Inserción de penetratina a la bicapa celular.....	10
Figura 7. Topología de la membrana celular.....	16
Figura 8. Tipo de transporte del medio extracelular hacia el interior de la célula.....	18
Figura 9. Propuestas del mecanismo de paso a través de la célula de péptidos acarreadores.....	19
Figura 10. Representación de interacción de penetratina con fosfolípidos de membrana utilizando dinámica molecular.....	20
Figura 11. Puentes de disulfuro entre PNA y péptido.....	21
Figura 12. Síntesis de péptido y acarreador utilizando recombinación genética por medio de E.coli.....	22
Figura 13. Estructura optimizada de la secuencia completa de penetratina RQIKIWFQNRRMKWKK con el conjunto base HF/6-31g(d).....	32
Figura 14. Estructura optimizada del primer tetrapéptido RQIK con el conjunto base HF/6- 31g(d).....	33
Figura 15. Estructura optimizada del segundo tetrapéptido IWFQ con el conjunto base HF/6-31g(d).....	33
Figura 16. Estructura optimizada del tercer tetrapéptido NRRM con el conjunto base HF/6- 31gd.....	34
Figura 17. Estructura optimizada del cuarto tetrapéptido KWKK con el conjunto base HF/6- 31g(d).....	34
Figura 18. Orbital Molecular HOMO de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	46
Figura 19. Orbital Molecular LUMO de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	47



Figura 20. Isosuperficie del potencial electrostático de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	48
Figura 21. Densidad electrónica de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	49
Figura 22. Orbital Molecular LUMO del fragmento 1 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	50
Figura 23. Orbital Molecular HOMO del Fragmento 1 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	51
Figura 24. Isosuperficie del potencial electrostático del fragmento 1 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	51
Figura 25. Densidad electrónica del Fragmento 1 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	52
Figura 26. Orbital Molecular HOMO del Fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	53
Figura 27. Orbital Molecular LUMO del Fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	53
Figura 28. Isosuperficie del potencial electrostático del Fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	54
Figura 29. Densidad electrónica del Fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	54
Figura 30. Orbital molecular HOMO del Fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	55
Figura 31. Orbital molecular HOMO del Fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	56
Figura 32. Isosuperficie del potencial electrostático del fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	56
Figura 33. Densidad electrónica del fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	57
Figura 34. Orbital Molecular HOMO del Fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	58
Figura 35. Orbital Molecular LUMO del Fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	58
Figura 36. Isosuperficie del potencial electrostático del Fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	59
Figura 37. Densidad electrónica del Fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	59



Figura 38. Propuesta de nueva secuencia acarreadora GKWRRRMWG.....61  
Figura 39. Propuesta de nueva secuencia acarreadora RRWRWMG.....62  
Figura 40. Propuesta de nueva secuencia acarreadora GWRKMWG.....62



## 9.5 Índice de tablas

Tabla 1. Mutantes de Penetratina .....	5
Tabla 2. Secuencia completa del homeodominio Antennapedia de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
Tabla 3. Cargas de algunos átomos seleccionados y de cada uno de los aminoácidos de RQIK con el nivel B3LYP/6-311Gd//HF/3-21G(d).....	37
Tabla 4. Cargas de algunos átomos seleccionados y de cada uno de los aminoácidos del fragmento 2 con el nivel B3LYP/6-311Gd//HF/6-31G(d) .....	38
Tabla 5. Cargas de algunos átomos seleccionados y de sus aminoácidos del fragmento 3 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	39
Tabla 6. Cargas de algunos átomos seleccionados y de sus aminoácidos del fragmento 4 con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	40
Tabla 7. Cargas de átomos seleccionados y aminoácidos de la secuencia completa de penetratina con el nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).....	42
Tabla 8. Descriptores globales de reactividad para los péptidos en estudio con una base B3LYP/6-311Gd//HF/6-31G(d).....	44
Tabla 9. Valores de Log P de los fragmentos y secuencia completa de penetratina .....	45
Tabla 10. Abreviaturas de los aminoácidos .....	76
Tabla 11. Conjuntos base utilizados en los cálculos de la presente tesis .....	77
Tabla 12. Algunos péptidos acarreadores.....	78

