



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ESTUDIO COMPUTACIONAL DE DOS NUEVOS TETRAPÉPTIDOS Y
ANÁLISIS DE SU ACTIVIDAD SOBRE CITOCINAS INFLAMATORIAS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
BECERRIL SÁNCHEZ DULCE PATRICIA**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. CATALINA SORIANO CORREA
ASESORA: DRA. CAROLINA BARRIENTOS SALCEDO**



MÉXICO, D.F. 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- Al Área de Química Computacional y Modelado Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por los recursos brindados durante el desarrollo de este trabajo.
- A DGAPA-UNAM por el financiamiento del proyecto: PAPIIT-IN117311 otorgado al Área de Química Computacional y Modelado Molecular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- A la Dirección General de Cómputo y de Tecnología de Información y Comunicación (DGTIC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la asignación de tiempo de cómputo para la realización de este trabajo de tesis en la supercomputadora Miztli.
- Al Laboratorio de Química Médica y Quimiogenómica de la Facultad de Bionálisis Campus Veracruz de la Universidad Veracruzana, por los recursos brindados durante el desarrollo de esta investigación.

A mi abuelo, padres y hermanos

ÍNDICE

1.	Resumen	1
2.	Introducción	2
3.	Marco teórico	4
3.1.	Péptidos	4
3.1.1.	Péptidos terapéuticos	11
3.1.2.	Antecedentes de péptidos antiinflamatorios	12
3.2.	Inflamación	14
3.2.1.	Moléculas involucradas en la inflamación	16
3.3.	Citocinas	18
3.3.1.	Citocinas proinflamatorias	18
3.3.2.	Citocinas antiinflamatorias	20
3.4.	Receptores tipo toll	20
3.5.	Fármacos antiinflamatorios inhibidores de citocinas	22
3.5.1.	Dexametasona	23
3.6.	Química computacional	24
3.6.1.	Métodos de estructura electrónica	24
3.6.2.	Métodos <i>ab initio</i>	25
3.6.3.	Hartree – Fock (HF)	25
3.6.4.	Teoría de funcionales de la densidad	26
3.6.5.	Cálculos semiempíricos	29
3.6.6.	Conjunto base	29
3.7.	Descriptores químico cuánticos	32
3.7.1.	Momento dipolar μ	32
3.7.2.	Potencial químico electrónico μ	33
3.7.3.	Dureza η	33
3.7.4.	Índice de electrofilia ω	35
3.7.5.	Cargas atómicas	36
3.7.6.	Polarizabilidad α	37

3.8.	Fundamento de técnicas experimentales	37
3.8.1.	Separación de células con ficoll	37
3.8.2.	Técnica de ELISA	38
4.	Planteamiento del problema	41
5.	Hipótesis	42
6.	Objetivo general	43
6.1.	Objetivos específicos	43
7.	Material y método	44
7.1.	Diseño de estudio	44
7.4.	Metodología	47
7.4.1.	Metodología computacional	47
7.4.2.	Metodología experimental	49
8.	Resultados y discusión	52
8.1.	Sección teórica	52
8.2.	Sección experimental	83
9.	Conclusiones	90
10.	Perspectivas	91
11.	Referencias	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de los aminoácidos	4
Figura 2. Isómeros del aminoácido alanina	5
Figura 3. Confórmeros de la alanina durante su titulación	6
Figura 4. Enlace peptídico	7
Figura 5. Formación de enlace amida	8
Figura 6. Gráfico de Ramachandran	8
Figura 7. Dexametasona	24
Figura 8. Tipos de ELISA	40
Figura 9. Tripéptido CNS sustituido en el extremo carboxilo	52
Figura 10. Tripéptido CNS sustituido en el extremo amino	53
Figura 11. Representación de ángulos ϕ y ψ	55
Figura 12. Naproxeno	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Ejemplos de puentes de hidrógeno	10
Tabla II. Mediadores inflamatorios y células que los liberan	17
Tabla III. Conjuntos base	31
Tabla IV. Geometrías optimizadas de los tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y M06-2X/6-311+G(d,p)	54
Tabla V. Ángulos diedros ϕ y ψ de los tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y M06-2X/6-311+G(d,p)	56
Tabla VI. Parámetros geométricos de los tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311+G(d,p)	60
Tabla VII. Parámetros geométricos de los tetrapéptidos a nivel M06-2X/6-311+G(d,p)	62
Tabla VIII. Descriptores químico cuánticos de los tetrapéptidos y antiinflamatorios a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)	64
Tabla IX. Valor del momento dipolar y sus componentes a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)	73
Tabla X. Cargas atómicas de átomos y grupos de tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p)	75
Tabla XI. Cargas atómicas de átomos y grupos de tetrapéptidos a nivel M06-2X/6-311++G(2d,2p)	75
Tabla XII. Isosuperficies de los orbitales moleculares HOMO-LUMO de los péptidos y los antiinflamatorios a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p)	79
Tabla XIII. Isosuperficies del potencial electrostático de los péptidos y los antiinflamatorios a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p)	82

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Diagrama de ϕ y ψ a nivel B3LYP/6-311+G(d,p)	57
Gráfica 2. Diagrama de ϕ y ψ a nivel M06-2X/6-311+G(d,p)	57
Gráfica 3. η vs tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)	66
Gráfica 4. ω vs tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)	68
Gráfica 5. l vs tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)	70
Gráfica 6. α vs tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)	71
Gráfica 7. Concentración de IL-1 β en PBMC	85
Gráfica 8. Concentración de IL-6 en PBMC	86
Gráfica 9. Concentración de IL-10 en PBMC	88

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
AINES	antiinflamatorios no esteroideos
AP	proteína activadora
DAMP	patrón molecular asociado a daño
DFT	teoría de funcionales de la densidad
COX	ciclooxigenasa
CpG	citósina y guanina unidas por un grupo fosfato
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
FILM	factor inhibitorio de la locomoción de monocitos
GLP-1	péptido similar al glucagón
GRs	receptores glucocorticoides
HF	Hartree-Fock
HOMO	orbital molecular más alto ocupado
HSP	proteína de choque térmico
I κ B	proteína inhibidora del factor nuclear kappa B
IL	interleucina
LPS	lipopolisacárido
LUMO	orbital molecular más bajo desocupado
MEP	potencial electrostático molecular
M-CSF	factor estimulante de colonias monocíticas
NF- κ B	factor nuclear kappa B
NLR	receptores tipo Nod
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógeno
PBMC	células mononucleares de sangre periférica
pH	potencial de hidrógeno
pI	punto isoeléctrico
pKa	constante de acidez
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
RPMI	medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute
TGF β	factor de crecimiento transformante beta
TLR	receptores tipo toll
TNF	factor de necrosis tumoral

1. RESUMEN

Como resultado de la respuesta inflamatoria, se induce la liberación de citocinas tales como IL-1 β , IL-6 e IL-10. En nuestro grupo se han realizado estudios teóricos de la estructura electrónica de péptidos pequeños y se ha mostrado que el tripéptido (CNS) es el grupo farmacóforo de un oligopéptido con actividad antiinflamatoria. Los péptidos y las proteínas están constituidos por aminoácidos, cuya estructura y propiedades fisicoquímicas están determinadas por la distribución de carga a lo largo de su esqueleto principal, así como de su cadena lateral; en ésta última se centra un papel significativo en las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los péptidos y las proteínas. La modificación de la cadena lateral afecta a sus propiedades fisicoquímicas y de reactividad química, y por tanto a su funcionalidad biológica. De acuerdo a lo anterior, el objetivo del presente trabajo es caracterizar la estructura electrónica, las propiedades fisicoquímicas y la reactividad química de nuevos tetrapéptidos potencialmente antiinflamatorios y analizar su efecto sobre algunas citocinas inflamatorias. Mediante métodos de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT-M06-2X, B3LYP), evaluando algunos descriptores mecánico-cuánticos, como son: dureza, índice de electrofilia, polarizabilidad y cargas atómicas. Los resultados mostraron que la sustitución de un aminoácido en el carboxilo terminal, modifica la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, lo que influye de manera significativa en las propiedades fisicoquímicas y en la estabilidad estructural de estos péptidos derivados del CNS. El análisis de los descriptores químico cuánticos permitió identificar sitios reactivos importantes que podrían asociarse con la actividad pro y antiinflamatoria de estos nuevos péptidos.

2. INTRODUCCIÓN

Los péptidos son cadenas pequeñas de aminoácidos, que presentan una estructura secundaria favorecida por las propiedades fisicoquímicas de los grupos sustituidos en la cadena lateral, tales como la polaridad, la aromaticidad, la presencia o ausencia de carga y la hidrofobicidad [1,2].

Existen péptidos bioactivos que se consideran agentes terapéuticos eficaces, debido a que poseen una alta especificidad y baja toxicidad [3]. Los péptidos bioactivos pueden actuar como potentes agonistas o antagonistas de varios receptores implicados en la progresión de diversas patologías, ejemplo de ellos son: los análogos del péptido similar al glucagón (GLP-1) como la exenatida o la liraglutida, que se emplean para el control de la diabetes y la grelina empleada para la obesidad, entre otros [2].

Por otra parte, en el área de investigación y desarrollo (I + D) de la industria farmacéutica, se busca generar moléculas activas con la finalidad de evitar los fracasos más comunes que se presentan, como la falta de eficacia y la presencia de toxicidad durante su diseño [4]; por lo que hoy en día, es indispensable que se combinen los métodos computacionales con los experimentales en el diseño de nuevos fármacos. El enfoque computacional cubre un amplio campo, que va desde obtener las propiedades fisicoquímicas y de estructura electrónicas hasta sugerir estructuras posiblemente bioactivas, lo que permite tener una aproximación más confiable en la selección de

moléculas terapéuticas, cuya acción se comprueba por medio de estudios experimentales, lo que se conoce en el desarrollo de un nuevo fármaco como fase preclínica [5].

Considerando las características favorables que presentan los péptidos bioactivos y la necesidad de buscar nuevas moléculas con actividad terapéutica y menos efectos adversos; en el área de química computacional de la FES Zaragoza, se han diseñado moléculas peptídicas con posible actividad biológica; por lo que en este trabajo se realizó el estudio computacional de la estructura electrónica y de las propiedades fisicoquímicas de dos nuevos tetrapéptidos a través de métodos teóricos y en la Facultad de Bioanálisis de la Universidad Veracruzana se realizó el análisis de su efecto *in vitro* sobre citocinas inflamatorias.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. PÉPTIDOS

Los péptidos son cadenas de aminoácidos de menos de 50 residuos o de un peso molecular de 5000 Da [4]. Los aminoácidos esenciales aislados son sólidos cristalinos blancos que se consideran moléculas orgánicas. Estas moléculas pequeñas son consideradas quirales excepto la glicina, debido a que contienen un grupo amino (NH_2), un grupo carboxilo (COOH), un hidrógeno (H), así como una cadena lateral variable (R). Todos estos grupos se encuentran unidos al carbono llamado carbono alfa (C_α) que constituye un centro asimétrico, como se representa en la Figura 1.

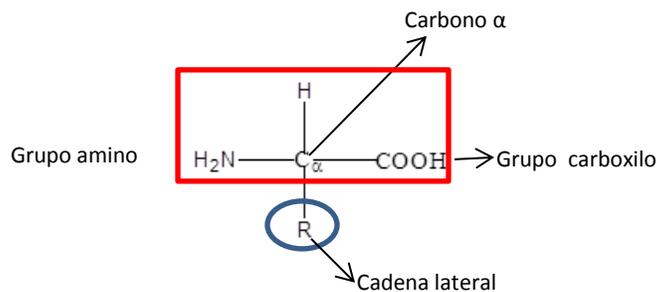


Figura 1. Estructura básica de los aminoácidos (aa). El cuadro rojo indica a los átomos involucrados en el esqueleto o "backbone" y que son comunes a todos los aa; el círculo azul señala a la cadena lateral [6].

Los aminoácidos esenciales pueden existir como isómero L y D como se observa en la Figura 2, pero un hecho importante es que todos los aminoácidos (aa) incorporados por organismos a las proteínas son de forma L [6].

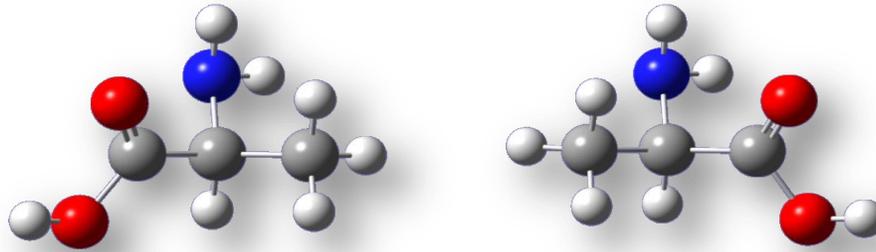


Figura 2. Dos isómeros L y D del aminoácido alanina. Cada molécula es una imagen especular de la otra [6].

Existen 20 aminoácidos esenciales y estos difieren entre sí por las características fisicoquímicas de su cadena lateral (R) (Figura 1), lo cual permite clasificarlos en hidrofóbicos, polares, no polares y con carga [6].

Las características ácido-base de las cadenas laterales de los aminoácidos son de gran importancia, ya que influyen en las propiedades de las proteínas, permite identificarlas y dicta su reactividad y funcionalidad biológica. A pH fisiológico (alrededor de 7.4), sus grupos amino y carboxilo de los aa están cargados y esta especie se denomina zwitterion; pero sobre el intervalo de 1 a 14, estos grupos pueden unir o disociar un protón produciendo la neutralización de carga de uno de los grupos, lo que favorece a la especie con carga positiva o negativa, como se muestra en la Figura 3 [6].

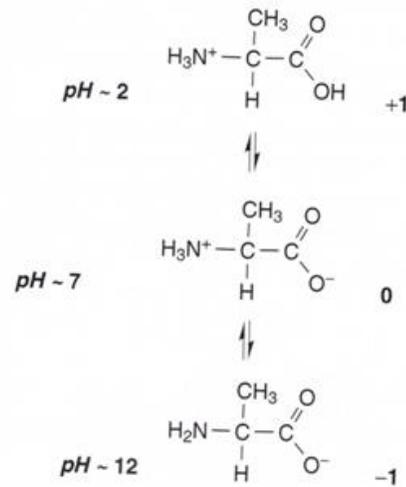


Figura 3. Las tres principales formas de la alanina, durante la titulación en el intervalo de pH 1 a 14 [6].

Es muy importante tomar en cuenta las propiedades ácido-base de los aminoácidos que conforman péptidos o proteínas con potencial farmacológico, ya que el paso de los fármacos a través de las membranas por difusión pasiva, dependen del tamaño o peso molecular, el área de absorción, la lipofilidad y la ionización. La lipofilidad se favorece cuando las moléculas no tienen carga, en general las moléculas cargadas no son permeables y por lo tanto no pueden absorberse vía difusión pasiva, ya que las barreras celulares constituidas por las membranas de naturaleza lipídica e hidrofóbica, son permeables a las formas no ionizadas [7].

Los péptidos y proteínas se forman a partir de la unión de aminoácidos a través de enlaces amida o también llamados enlaces peptídicos, como se muestra en la Figura 4. El enlace peptídico es el resultado de una reacción de condensación [8] entre el grupo carboxilo de

un aminoácido y el grupo amino de otro, esta reacción es esquematizada en la Figura 5; el enlace amida se caracteriza por ser plano y rígido, debido a su carácter de doble enlace parcial observado en la Figura 4 A) [9].

La conformación de péptidos y proteínas está definida por los ángulos ϕ (phi) y ψ (psi), que describen la rotación alrededor del enlace peptídico y se encuentran repetidos en la cadena principal; sin embargo, la rotación de estos ángulos es restringida por el impedimento estérico entre los átomos de las cadenas laterales de los aminoácidos y la cadena principal del péptido, en consecuencia, se limitan las conformaciones de las cadenas polipeptídicas.

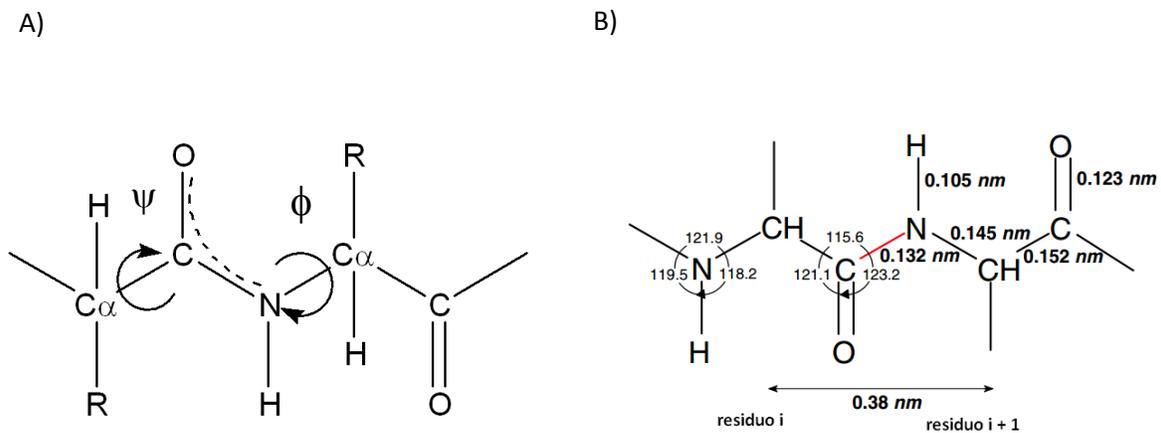


Figura 4. Enlace peptídico. A) Átomos involucrados en los ángulos de torsión ψ y ϕ . B) Longitudes de enlace detalladas entre los átomos involucrados [6].

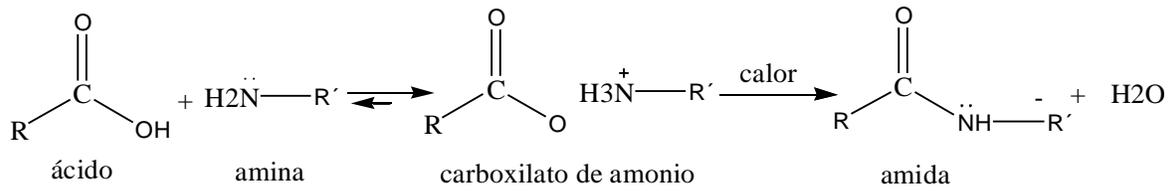


Figura 5. Esquematación de la reacción de condensación entre un ácido carboxílico y una amina [8].

Debido a la restricción en la conformación que presentan los péptidos y proteínas se desarrolló el gráfico Ramachandran, que es un mapa de todo el espacio conformacional de un polipéptido donde se observan las regiones permitidas y no permitidas como se muestra en la Figura 6, éste gráfico lo desarrollo G. N. Ramachandran a finales de 1960 con el estudio de combinaciones de ángulos estéricamente permitidos basados en los criterios de contacto entre dos átomos no enlazados, lo que permite predecir si las conformaciones péptidicas son permitidas [9, 10].

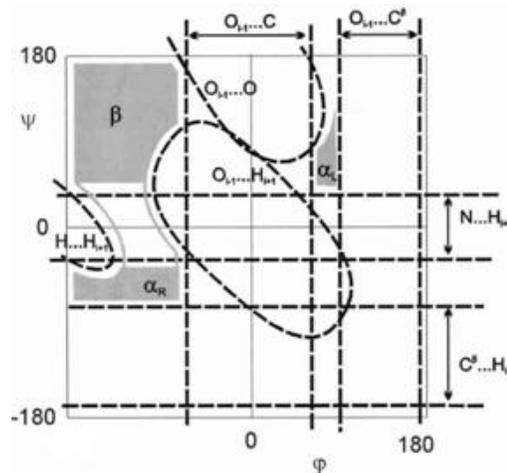
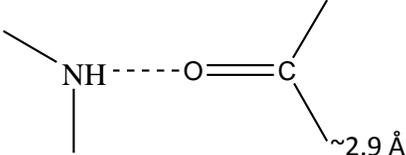
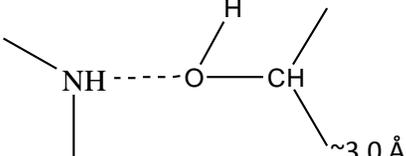
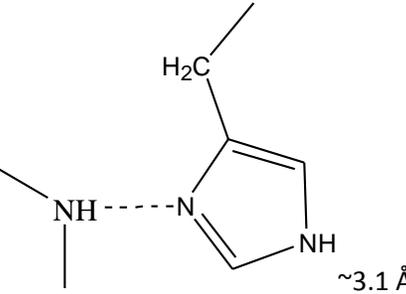
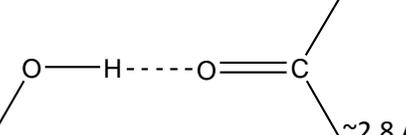
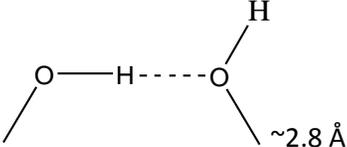
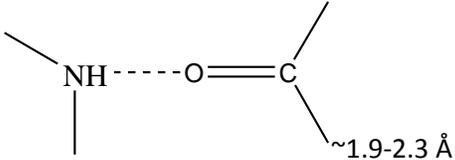


Figura 6. Gráfico de Ramachandran. Las líneas discontinuas especifican las zonas de repulsión y el color gris representan las regiones permitidas [11].

Los péptidos y proteínas forman entre sus átomos interacciones no covalentes, como los puentes de hidrógeno y las fuerzas electrostáticas entre las cuales se encuentran las interacciones iónicas, fuerzas de van der Waals y fuerzas de dispersión de London, estas interacciones a pesar de presentar una fuerza de unión débil estabilizan las estructuras peptídicas, debido al gran número de interacciones no covalentes formadas y en los polipéptidos favorecen también el plegamiento [12].

Los puentes de hidrógeno pueden formarse entre cadenas laterales de los aminoácidos o entre la cadena principal, en los puentes de hidrógeno se involucra un átomo que cede un hidrógeno y un átomo que acepta un hidrógeno y varían en longitud de 2.6 Å a 3.4 Å (esta es la distancia entre átomos pesados, es decir entre N y O en un puente de hidrógeno) y puede desviarse en linealidad por $\pm 40^\circ$. En la Tabla I se muestran algunos ejemplos de puentes de hidrógeno entre grupos funcionales presentes en los péptidos y proteínas [6].

Tabla I. Ejemplos de puentes de hidrógeno entre grupos funcionales encontrados en proteínas [6].

Residuos involucrados en puentes de hidrógeno	Naturaleza de la interacción y distancia típica entre átomo donador y receptor (Å)
Amida-carbonilo Gln/Asn-cadena principal	 <p style="text-align: right;">~2.9 Å</p>
Amida-hidroxilo Cadena principal-Ser Asn/Gln-Ser	 <p style="text-align: right;">~3.0 Å</p>
Amida-imidazol Asn/Gln-His Cadena principal-His	 <p style="text-align: right;">~3.1 Å</p>
Hidroxilo-carbonilo Ser/Thr/Tyr-cadena principal Ser-Asn/Gln Thr-Asn/Gln Tyr-Asn/Gln	 <p style="text-align: right;">~2.8 Å</p>
Hidroxilo-hidroxilo Thr, Ser y Tyr Tyr-Ser	 <p style="text-align: right;">~2.8 Å</p>
Amino terminal-carboxilo terminal[13]	 <p style="text-align: right;">~1.9-2.3 Å</p>

3.1.1. PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS

Los péptidos terapéuticos forman parte del desarrollo e investigación de nuevas moléculas, son atractivos como agentes farmacológicos debido a sus características; por ejemplo, el tamaño proporciona mayor afinidad y especificidad al blanco terapéutico, además presentan mayor facilidad para penetrar los tejidos, otra de las ventajas es que los productos de degradación de los péptidos son los aminoácidos, por lo tanto presentan bajos perfiles de toxicidad [2, 4, 14]. En la actualidad los péptidos terapéuticos se utilizan en el tratamiento de diferentes patologías, como las enfermedades cardiovasculares, la artritis y la diabetes, entre otras [14, 4].

Por otra parte, los péptidos como agentes terapéuticos cuentan con limitaciones, presentan problemas en la biodisponibilidad y biodistribución, un ejemplo de estos inconvenientes es una vida media corta, debido a su rápida eliminación del plasma por unidad de tiempo, además de la falta de estabilidad *in vivo* a causa de la degradación por proteasas; sin embargo, esto no es una limitante puesto que se han desarrollado alternativas para evitar la rápida degradación y eliminación del péptido en el organismo, tales como, pequeñas modificaciones químicas, vehículos para el transporte del péptido dentro del organismo, así como también las diferentes formas farmacéuticas [2,4].

3.1.2. ANTECEDENTES DE PÉPTIDOS ANTIINFLAMATORIOS

El grupo de investigación de Kreschmer [15] llevó a cabo una serie de estudios sobre los factores antiinflamatorios producidos por el parásito *Entamoeba histolytica*, encontraron en el fluido de un cultivo axénico de este parásito un oligopéptido termoestable, que inhibe la locomoción de monocitos humanos *in vitro*, por lo que lo denominó factor de inhibición de locomoción de monocitos (FILM). El mismo grupo demostró que el FILM *in vivo*, retrasa la llegada de monocitos a las ventanas de Rebeck e inhibe las reacciones de hipersensibilidad cutánea, provocadas por el 1-cloro-2,4-dinitrobenzénico en cobayos y jerbos, así como también la inhibición del estallido respiratorio en monocitos y neutrófilos [15].

Más tarde dicho grupo sintetizó el FILM (Met-Gln-Cys-Asn-Ser) con 96% de pureza el cual mantuvo la función del péptido natural. Por otra parte, se construyeron y sintetizaron otros dos pentapéptidos (Gln-Cys-Met-Ser-Asn y Met-Pro-Cys-Asn-Ser), uno con la secuencia de aminoácidos al azar el cual no presentaba actividad, el segundo péptido mantenía una estructura parecida al FILM debido a que solo se modificó el aminoácido glutamina por prolina y al igual que el FILM conservó la actividad anti inflamatoria [16].

A raíz del estudio anterior, Soriano-Correa [16] y colaboradores, llevaron a cabo un estudio *ab initio* a nivel Hartree-Fock y de la Teoría de Funcionales de la Densidad, analizando la estructura electrónica y las propiedades fisicoquímicas de los pentapéptidos antes mencionados, encontraron que los péptidos que mantenían la secuencia final presentaban propiedades semejantes. Gracias a este análisis estructural y a la información

experimental, los autores propusieron la hipótesis acerca de la existencia de un posible grupo farmacóforo (Cys-Asn-Ser) [16].

Posteriormente Morales-Martínez y colaboradores [17], verificaron la hipótesis teórica de manera experimental en modelos *in vivo* e *in vitro*, analizando tres tripéptidos (Met-Gln-Cys, Gln-Cys-Asn y Cys-Asp-Ser) por estallido respiratorio y reacciones de hipersensibilidad cutánea, se observó que el tripéptido CNS, Cys-Asn-Ser mantuvo el 100% de sus propiedades antiinflamatorias y no así los péptidos restantes [17].

Barrientos-Salcedo y colaboradores [18], realizaron un estudio teórico del tripéptido CNS con el fin de caracterizar de manera detallada a la molécula; ellos encontraron sitios importantes de interacción, en dicho estudio también se mostró que la presencia de un puente de hidrógeno contribuye a la estabilidad geométrica del tripéptido [18].

Más tarde, se realizó un estudio acerca de la influencia electro-atractora y electro-donadora de los sustituyentes en la cadena lateral del aminoácido central, a través del análisis de la estructura electrónica y las propiedades fisicoquímicas del tripéptido CNS, identificándose algunos sitios reactivos que podrían asociarse a la actividad antiinflamatoria [19].

Recientemente, Soriano-Correa y colaboradores [20], investigaron las interacciones intra e intermoleculares de los puentes de hidrógeno en solución y en fase gas del tripéptido CNS, con la finalidad de estudiar la estabilidad de dicho tripéptido; los estudios mostraron que algunas interacciones de puentes de hidrógeno se favorecen en solución y otros en

fase gas. Esta investigación mostró que la estabilidad de los péptidos en fase gas se invertía en fase líquida debido a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares en solución; no obstante, las estructuras más estables en fase gas se mantenían en solución, asimismo con el estudio de los ángulos diedros se demostró de acuerdo a los gráficos de Ramachandran que las moléculas estables tanto en fase gas como en solución forman parte de los péptidos permitidos [20].

3.2. INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta biológica compleja [21, 22], que tiene como fin la protección y restauración del tejido dañado, así como también la eliminación de microorganismos [23, 24], esta respuesta se origina por diferentes eventos tales como, la invasión de un agente patógeno, una lesión provocada por causas físicas o químicas [25]. De manera sencilla la inflamación puede describirse por cuatro signos cardinales: enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor, estos signos reflejan los efectos de las citocinas y otros mediadores químicos involucrados en esta respuesta [22].

La inflamación producida por una infección o daño de tejido es detectado inicialmente por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los receptores tipo toll (TLRs) o los receptores tipo NOD (NLRs), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), así como a patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), tras la unión de patrones moleculares a receptores, las vías de señalización dependientes de

factores de transcripción se activan y en conjunto con las células específicas, los factores de transcripción inducen la expresión de genes, como el TNF- α , la IL-1 β y la COX-2 que inician la respuesta inflamatoria. A nivel celular la respuesta inflamatoria se caracteriza por cambios temporales en la cantidad de células inmunes y características de los tejidos [26].

La inflamación puede ser local o sistémica y a su vez se puede clasificar como aguda o crónica [21]. La inflamación aguda es la respuesta inmediata a un agente nocivo, su duración es relativamente corta, permanece hasta que la amenaza al anfitrión se elimina, mientras que la inflamación se considera crónica cuando persiste más de dos semanas [25]; la inflamación aguda se compone principalmente de tres eventos, el primero de ellos consiste en la alteración de los vasos sanguíneos, generalmente es una vasodilatación lo que provoca el aumento del flujo sanguíneo al sitio dañado, el segundo radica en los cambios estructurales de la microvasculatura, lo que permite el paso de proteínas plasmáticas y leucocitos, el tercero consiste en la liberación de mediadores químicos de la inflamación, que acumulan y activan leucocitos en el sitio de la lesión [23, 25]. Aunque la inflamación se origina por diferentes causas, en general comparte características básicas comunes antes mencionadas [21]; este tipo de respuesta puede tener varias consecuencias, la deseada es la completa restauración del tejido, pero también se puede presentar una fibrosis o la progresión a la inflamación crónica [25].

La inflamación aguda puede progresar a una forma crónica, caracterizada por la reducción de leucocitos, la proliferación de fibroblastos con producción de colágeno. Comúnmente

la inflamación crónica puede ser primaria, lo que significa que no existió una previa inflamación aguda [25]. La inflamación crónica se caracteriza por una proliferación fibroblástica (fibrosis), formación de nuevos vasos (angiogénesis) y al igual que en la inflamación aguda se encuentran presentes células plasmáticas, linfocitos y macrófagos, además de la permeabilidad vascular anormal [25]. Este tipo de inflamación se ha vinculado como base fisiopatológica de diversas enfermedades del tipo cardiovascular, neurodegenerativas, obesidad y cáncer [23, 27].

3.2.1. MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA INFLAMACIÓN

La inflamación es un componente esencial de la respuesta inmune y para que se desarrolle se requiere la presencia de diversas moléculas liberadas por la activación del receptor en respuesta a un estímulo, estas moléculas actúan en diferentes sitios y células, como en los vasos sanguíneos para modificar su permeabilidad o directamente en algunas células para atraerlas al sitio de la inflamación, incluso actúan en la activación para la producción de nuevas moléculas, un ejemplo de estos mediadores pueden ser las citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento entre otras [21,28].

En la Tabla II se indican algunos mediadores inflamatorios y las células que los producen:

Tabla II. Mediadores inflamatorios y células que los liberan [29].

Sustancia	Origen	Función
Histamina	Mastocitos y plaquetas	Dilatación arteriolar, aumento de la permeabilidad venular, vasoconstricción de grandes arterias
Serotonina		
Sistema de complemento C3a C5a	Plasma y macrófagos	Contracción de musculo liso y aumento de la permeabilidad vascular
Sistema de cininas Bradicininas	Quininógenos plasmáticos	Contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular
Sistema de coagulación Trombina	Plasma	Aumento de la adhesión leucocitaria y proliferación fibroblástica
Leucotrienos	Leucocitos	Quimiotaxis, adhesión leucocitaria
Prostaglandinas	Mastocitos	Vasodilatación
Citocinas y quimiocinas	Principalmente leucocitos, pero se pueden generar por muchas células	Activan macrófagos durante la inmunidad mediada por células. Las quimiocinas tienen actividad quimiotáctica
Óxido nítrico	Endotelio, macrófagos, neuronas	Vasodilatación, reduce agregación

3.3. CITOCINAS

Las citocinas son un grupo diverso de proteínas solubles, de glicoproteínas y péptidos de acción corta, producidas por células inmunes y no inmunes, pueden actuar de manera única, sinérgica o antagónica [30], sobre las células que las secretan (acción autocrina), en células cercanas (acción paracrina) o en algunos casos en células distantes (acción endocrina); diferentes tipos de células pueden producir la misma citocina y una misma citocina puede actuar sobre varios tipos de células (pleiotropía). Las citocinas son redundantes en su actividad, esto indica que funciones similares se pueden inducir por diferentes citocinas; además de que se producen en cascada, una citocina estimula a su célula diana para producir citocinas adicionales [30,31]. La actividad de las citocinas se ejerce a través de la unión a receptores específicos en la superficie de las células diana, lo que modula diversas funciones de células y tejidos. Las citocinas pueden clasificarse en proinflamatorias, las que están implicadas en el desarrollo de la enfermedad o antiinflamatorias las cuales protegen de la enfermedad [30].

3.3.1. CITOCINAS PROINFLAMATORIAS

Las citocinas proinflamatorias, se producen en varias células, pero predominantemente por la activación de macrófagos involucrados en la regulación de la reacción inflamatoria, ejemplo de estos mediadores químicos son el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-32; cada una de estas citocinas presentan diversas funciones entre las cuales se encuentran, la

promoción de mediadores químicos, activación de células inmunes, inducción de fiebre, entre otras [30, 32].

IL-1 β

La interleucina-1 β es una potente citocina proinflamatoria, implicada en un gran número de enfermedades inflamatorias infecciosas y no infecciosas [32]. Se produce principalmente por monocitos y macrófagos, así como por células no inmunes tales como fibroblastos y células endoteliales en respuesta a un estímulo invasivo, infeccioso o inflamatorio [31, 32]. Las principales funciones de la IL-1 β son la inducción de fiebre, coagulación, hematopoyesis y promueve la extravasación de células inflamatorias [32].

TNF- α

Al igual que la IL-1 β , el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), es una potente citocina proinflamatoria, producida por fibroblastos y células del sistema inmune innato y adaptativo pero principalmente por macrófagos y linfocitos. La liberación de TNF- α conduce a la activación de células inmunes y a la liberación de mediadores inmunoreguladores, así como también, induce la fiebre, la coagulación, la caquexia y la apoptosis [32].

3.3.2. CITOCINAS ANTIINFLAMATORIAS

Las citocinas antiinflamatorias tienen un papel importante en la resolución de la inflamación, entre ellas se encuentran la IL-4, IL-10, IL-13, INF- α y TGF- β , su principal función es inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias además, de actuar de forma antagónica a las acciones de la mismas citocinas que inhiben [21, 30].

IL-10

Entre todas las citocinas antiinflamatorias, la IL-10 es una citocina con potentes propiedades antiinflamatorias, se produce por muchos tipos de células inmunes; tales como, los monocitos, los macrófagos y los linfocitos T y B. La IL-10 suprime la expresión del TNF- α , la IL-6 y la IL-1 β ; además, la IL-10 disminuye la producción de receptores para IL-1 (IL-1R) y TNF (TNFR) con el fin de neutralizar su acción [31, 32].

3.4. RECEPTORES TIPO TOLL

La respuesta inmune innata se caracteriza por ser inmediata, esto es posible debido a los receptores de membrana evolutivamente conservados llamados receptores tipo toll (TLR) [33], estos receptores presentan una estructura básica de glucoproteína transmembrana tipo 1 y se localizan tanto en la membrana celular (TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10) como en el endosoma, indicando que se encuentran de manera intracelular (TLRs 3, 7, 8, 9) [34].

Los humanos poseemos una familia de receptores TLR que se expresan en una gran variedad de células inmunes y no inmunes, entre ellas se encuentran las células dendríticas, los neutrófilos y los macrófagos que expresan casi por completo la familia de receptores, a diferencia de otras células que solo presentan un repertorio limitado [34]. Cada uno de los receptores tipo toll reconoce específicamente patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), como la molécula HMGB1 (caja 1 del grupo de alta movilidad) que es una proteína nuclear liberada por células necróticas al igual que las proteínas de choque térmico (HSPs), los TLR también reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), ejemplo de ellos son los lipopolisacáridos (LPS), el RNA de doble cadena, y la flagelina entre otros [35].

El primer TLR descrito y el mejor caracterizado es el TLR4, que identifica a lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas en el caso de existir patrones moleculares asociados a patógenos, pero también reconoce a proteínas de choque térmico (HSPs) que pertenecen a las alarminas. El TLR9 es otro ejemplo de esta familia de receptores, que reconoce secuencias de DNA CpG no metilada y proteínas nucleares de alta movilidad electroforética. La interacción de los TLRs y las moléculas asociadas a daño, activan distintas vías de señalización dependiendo de la naturaleza del daño, que culminan con la expresión de genes relacionados con la inflamación [33, 36].

3.5. FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS INHIBIDORES DE CITOCINAS

La importancia de varias citocinas en diversas enfermedades crónicas, ha inducido el estudio de diversos fármacos antiinflamatorios, que están involucrados en la producción, acción positiva o negativa de citocinas [37].

Entre los fármacos antiinflamatorios inhibidores de citocinas encontramos a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs); tales como, los salicilatos (aspirina) que presentan actividad en concentraciones altas sobre el factor nuclear kappa B (NF- κ B), bloqueando su translocación al núcleo, así como esta molécula, el ibuprofeno y el acetaminofén (paracetamol) también actúan inhibiendo la activación del factor de transcripción NF- κ B, que es uno de los factores de transcripción más importante en la regulación de la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria [38].

En células no estimuladas, el factor de transcripción NF- κ B se encuentra en el citoplasma como heterodímero asociado a una proteína inhibidora I κ B, la cual, se fosforila en respuesta a señales de activación, permitiendo la entrada al núcleo del NF- κ B para la transcripción de genes [38,39].

Otro tipo de fármacos antiinflamatorios involucrados en la inhibición de citocinas son los glucocorticoides, la base de su acción consiste en la inhibición de genes implicados en la respuesta inflamatoria, entre los que se encuentran los que codifican a citocinas, quimiocinas, receptores de superficie, moléculas de adhesión, proteínas degradantes, enzimas como la cicloxigenasa-2 y la sintetasa de óxido nítrico inducido [40]. Cabe

mencionar, que los glucocorticoides también actúan de manera positiva en la transcripción de genes antiinflamatorios como I κ B e Interleucina 10 (IL-10), que son supresores importantes de la activación transcripcional en distintos puntos de la cascada de señalización [41].

Los glucocorticoides, actúan a través de los receptores glucocorticoides (GR), en la transcripción estos no se unen directamente al DNA, en cambio si se une con otros factores de transcripción como la proteína activadora 1 (AP-1) y el NF- κ B, ya que ambos juegan un papel importante en la expresión de citocinas, se cree que esta interacción inhibe la activación transcripcional [40, 42].

3.5.1. DEXAMETASONA

La dexametasona (Figura 7) es un fármaco antiinflamatorio perteneciente a la familia de los glucocorticoesteroides, se ha utilizado ampliamente en patologías como la artritis reumatoide, sepsis y asma, entre otras [41, 43]. Este fármaco al igual que otros antiinflamatorios tiene la propiedad de inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias, a través del bloqueo de factores de transcripción, además tiene la capacidad de aumentar la expresión de proteínas antiinflamatorias, incluyendo la IL-10 que inhibe la producción de citocinas inflamatorias y promueve la resolución de la inflamación [41].

La dexametasona, es un ligando lipofílico que presenta la capacidad de difundirse a través de la membrana celular, para unirse finalmente a los receptores glucocorticoides en el

citoplasma y a su vez promueve la liberación de un complejo proteico para su posterior translocación al núcleo [42].

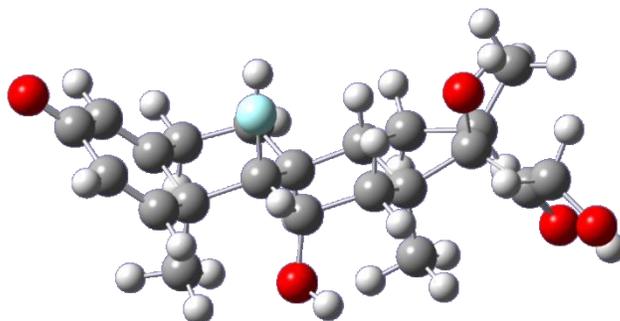


Figura 7. Dexametasona

3.6. QUÍMICA COMPUTACIONAL

La química computacional es una rama de la química teórica que permite estudiar los fenómenos químicos, mediante cálculos de la estructura electrónica basados de manera parcial o total en leyes fundamentales de la física realizados en computadoras. Por tanto, la química computacional es a la vez un área de investigación independiente y un complemento fundamental en los estudios experimentales [44].

3.6.1. MÉTODOS DE ESTRUCTURA ELECTRÓNICA

Los métodos de estructura electrónica utilizan como base para su cálculo las leyes de la mecánica cuántica en lugar de la mecánica clásica. La mecánica cuántica establece que la energía y otras propiedades relacionadas de una molécula, se pueden obtener de la

resolución de la ecuación de Schrödinger; sin embargo, la solución de esta ecuación para sistemas con gran cantidad de electrones es muy compleja, por esta razón, se requiere el uso de métodos de estructura electrónica, caracterizados por sus diversas aproximaciones matemáticas para la solución de la ecuación de Schrödinger [44], que se muestra a continuación.

$$-\frac{\hbar}{2m} \frac{d^2\psi(x)}{dx^2} + V(x)\psi(x) = E\psi(x)$$

3.6.2. MÉTODOS *Ab Initio*

Métodos *ab initio* (primeros principios), a diferencia de cualquier método de la mecánica molecular o semiempírico, no utiliza parámetros experimentales en sus cálculos. Se basan únicamente en las leyes de la mecánica cuántica y en los valores de constantes físicas como: la velocidad de la luz, la constante de Planck, la masa y carga de los electrones, así como también de los núcleos [44].

3.6.3. HARTREE – FOCK (HF)

El tipo de cálculo *ab initio* más común es el método Hartree-Fock, el cual genera soluciones a la ecuación Schrödinger, donde la interacción real electrón-electrón se reemplaza por una interacción promedio con una base lo suficientemente grande, la

función de onda HF es capaz de representar el ~ 99 % de la energía total, pero el ~ 1 % restante es a menudo importante para describir el fenómeno químico [45].

3.6.4. TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD

Es un método *ab initio* (primeros principios) alternativo, en el cual la energía total se expresa en términos de la densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental, en vez de la función de onda. La teoría de funcionales de la densidad se basa en el teorema de Hohenberg-Kohn que establece: que las propiedades electrónicas del estado fundamental de un átomo o molécula se definen por su función de la densidad electrónica [46, 47].

Se dice que la energía electrónica del estado fundamental E_0 es un funcional de la densidad de probabilidad electrónica del estado fundamental ρ_0 y se escribe $E_0 = E_0[\rho_0]$, donde los corchetes denotan la relación funcional (un funcional $F[f]$ es una regla que asocia un número a cada f) [48].

Debido a que el teorema de Hohenberg-Kohn no dice cómo calcular E_0 a partir de ρ_0 , ni cómo obtener ρ_0 sin obtener primeramente la función de onda, Kohn y Sham en 1965 [49] idearon un método práctico para obtener ρ_0 y E_0 ; su método es capaz en principio de obtener resultados exactos, pero debido a que la ecuación Kohn-Sham (KS) contiene un funcional desconocido que debe aproximarse a la formulación KS del DFT, los resultados obtenidos son aproximados [44, 48].

Tras el trabajo de Kohn y Sham, los funcionales aproximados empleados por los actuales métodos DFT, desglosan la energía electrónica en varios términos como se muestra en la siguiente ecuación [44].

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC}$$

Donde E^T es la energía cinética, E^V es la energía potencial de la atracción núcleo-electrón y la repulsión entre pares de núcleos, E^J es la repulsión electrón-electrón y E^{XC} es el término de intercambio-correlación e incluye la parte restante de la interacción electrón-electrón [44].

Para el cálculo de E^{XC} se pueden utilizar funcionales de gradiente generalizado E^{GGA} , que usualmente se desglosan en un funcional de intercambio y un funcional de correlación, que se modelan por separado:

$$E_{xc}^{GGA} = E_x^{GGA} + E_c^{GGA}$$

Ejemplos de funcionales de intercambio de gradiente generalizado utilizados son: el funcional de Perdew y Wang (PW86 o PWx86) [50], el funcional Becke denotado como B88 [51], entre otros. En el caso de los funcionales de correlación, se utiliza el funcional de Lee-Yang-Parr (LYP) [51] y el funcional de correlación de Perdew por mencionar algunos [53, 48].

Otro tipo de funcionales que actualmente se emplean son los funcionales híbridos de correlación e intercambio, que mezclan la fórmula de la energía de intercambio Hartree Fock E_x^{HF} o también denotada E_x^{exacto} con las fórmulas para la energía de intercambio E_x y

correlación E_c del gradiente corregido, ejemplo de este tipo de funcionales es el M06-2X y el B3LYP, este último es la combinación del funcional de correlación Becke y el funcional de intercambio LYP, donde el número 3 indica un funcional de tres parámetros. El funcional B3LYP se define como [48]:

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1 - a_0 - a_i) E_x^{LSDA} + a_0 E_x^{exacto} + a_1 E_x^{B88} + (1 - a_c) E_c^{VWN} + a_c E_c^{LYP}$$

Donde E_x^{exacto} es la energía de intercambio Hartree Fock, E_x^{LSDA} y E_c^{VWN} son respectivamente la energía de intercambio y correlación de gradiente corregido, E_x^{B88} es la energía de intercambio Beck 88, E_c^{LYP} es la energía de correlación LYP y $a_0 = 0.20$ $a_i = 0.72$ y $a_c = 0.81$ son los valores de los parámetros que se eligieron de forma que se obtuviera un buen ajuste a las energías de atomización molecular experimental.

El funcional M06-2X es un funcional de intercambio y correlación meta híbrido, desarrollado por Zhao y Truhlar, que está parametrizado sólo para no metales y es utilizado en aplicaciones que impliquen interacciones no covalentes, cinética y energías de excitación electrónica [54].

3.6.5. CÁLCULOS SEMIEMPÍRICOS

Los cálculos semiempíricos poseen la misma estructura general de los cálculos Hartree-Fock. En este contexto, ciertas piezas de la información; tales como, las integrales de dos electrones son aproximadas o completamente omitidas. Con el propósito de corregir el error causado por omitir parte del cálculo, los métodos se parametrizan, mediante una curva de ajuste con algunos parámetros o números con la finalidad de dar el mejor acuerdo posible con los datos experimentales. Si la molécula que se calcula es similar a las moléculas en la base de datos para parametrizar el método, entonces los resultados pueden ser muy buenos, si la molécula no es significativamente parecida a los datos de la parametrización, los resultados no son muy buenos, lo que representa una desventaja del método. El mérito de los cálculos semiempíricos es que son mucho más rápidos; es decir, los costos computacionales son muy bajos comparados con los cálculos *ab initio* y en muchos casos dan resultados confiables [44, 55].

3.6.6. CONJUNTO BASE

El conjunto de base mínimo, es la descripción matemática de los orbitales moleculares dentro de un sistema utilizado para realizar cálculos teóricos. Las bases grandes establecen la aproximación de los orbitales con mayor precisión, mediante la restricción del espacio para los electrones [44].

El conjunto base mínimo, contiene el número mínimo de bases necesarias para cada átomo, utiliza orbitales de tipo atómico de tamaño fijo. El conjunto base STO-3G, es un conjunto de base mínimo, utiliza tres gaussianas primitivas por función, lo que se

representa por 3G en su nombre y STO significa “orbitales tipo Slater”, este conjunto base aproxima orbitales tipo Slater con funciones gaussianas [44].

Las funciones de bases usadas para representar la región de valencia son sumas de funciones base para cada subcapa. Por ejemplo la base 3-21G, usa tres funciones Gaussianas agrupadas en dos gaussianas, la primera es la suma de dos funciones y la restante es una función directa [44].

En la siguiente página se muestra la Tabla III con algunos de los conjuntos base más utilizados.

Tabla III. Conjuntos base [44].

Conjunto base		Características
STO-3G	[H-Xe]	Conjunto de base mínima: es más usada para resultados cualitativos, para sistemas muy grandes, cuando no es posible utilizar la base 3-21G.
3-21G	[H-Xe]	Valencia separada: dos conjuntos de funciones en la región de valencia, dan una mayor exactitud en la representación de los orbitales moleculares: se utiliza para moléculas muy grandes.
6-31G(d)	[H-Cl]	Añade funciones de polarización para átomos pesados; se utiliza normalmente para sistemas medios/grandes, este conjunto de base utiliza funciones de tipo "d".
6-31G(d,p)	[H-Cl]	Añade funciones de polarización a los átomos de hidrógeno: se utilizan cuando el sitio de interés son los hidrógenos (Energías de enlace) y para cálculos exactos de energía.
6-31+G(d)	[H-Cl]	Adiciona funciones difusas: importante para sistemas con pares libres, aniones, cationes y estados excitados.
6-31+G(d,p)	[H-Cl]	Adicionan funciones p para los hidrógenos: en caso de querer utilizar 6-31G(d,p), cuando se tienen pares libres de electrones en la molécula es necesario la presencia de funciones difusas
6-311+G(d,p)	[H-Br]	Triple zeta: adiciona funciones de valencia extra (3 tamaños de funciones s y p) a 6-31+G(d). Funciones difusas pueden ser adicionadas a átomos de hidrógeno vía un segundo +.
6-311+G(2df,2p)	[H-Br]	Coloca 2 funciones d y 1 función f en átomos pesados (más funciones difusas), y 2 funciones p a los átomos de hidrógeno.
6-311 ++G(3df,2pd)	[H-Br]	Coloca 3 funciones d y una función f en átomos pesados, y 2 funciones p y una función d a los átomos de hidrógeno, así como funciones difusas en ambos.

3.7. DESCRIPTORES QUÍMICO CUÁNTICOS

3.7.1. MOMENTO DIPOLAR $\vec{\mu}$

El momento dipolar ($\vec{\mu}$) es la primera derivada de la energía respecto al campo eléctrico aplicado. Es una medida de la asimetría de la distribución de carga molecular, y está dada como vector de tres dimensiones [44].

Dos cargas eléctricas +Q y -Q separadas por una pequeña distancia b , constituye un dipolo eléctrico. El momento dipolar eléctrico se define como el vector de módulo Qb que va desde +Q hasta -Q [47].

$$\vec{\mu} = Qb$$

Los momentos dipolares moleculares se calculan a partir de las funciones de onda. La expresión clásica para el momento eléctrico dipolar μ_{el} de un conjunto de cargas discretas Q_i es

$$\vec{\mu}_{el} = \sum_i Q_i r_i$$

donde r_i es el vector posición, desde el origen a la carga i -ésima [47].

3.7.2. POTENCIAL QUÍMICO ELECTRÓNICO μ

Dentro de la teoría de funcionales de la densidad, Parr y sus colaboradores establecieron la importancia del potencial químico electrónico definiéndolo formalmente como:

$$\mu = \left[\frac{\partial E}{\partial N} \right]_{v(\vec{r})} = \left[\frac{-\delta E}{\delta \rho(\vec{r})} \right]_{v(\vec{r})}$$

donde E es la energía electrónica, N es el número de electrones del sistema, $v(\vec{r})$ es el potencial externo debido a los núcleos y $\rho(\vec{r})$ es la densidad electrónica. Este potencial químico electrónico tiene prácticamente el mismo significado para la nube electrónica que el potencial químico dentro de la termodinámica clásica [55, 56].

3.7.3. DUREZA η

Parr y Pearson [57, 58] proponen que la dureza (η) puede definirse

$$\eta = \frac{1}{2} \left[\frac{\partial \mu}{\partial N} \right]_{v(\vec{r})} = \frac{1}{2} \left[\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right]_{v(\vec{r})}$$

Si analizamos ésta ecuación observamos que, la dureza se interpreta como la resistencia al cambio del potencial químico μ , cuando se varía el número de electrones N, del sistema.

Definiendo la dureza en función de la densidad de carga

$$\eta = \left[\frac{\delta\mu}{\delta\rho(r)} \right]_{v(\vec{r})}$$

Se obtiene la dependencia funcional del potencial químico μ con la densidad de carga $\rho(\vec{r})$, lo cual es equivalente a medir la resistencia al cambio o a la deformación de la nube electrónica. Aunado a esto, y bajo la aproximación por diferencias finitas, la dureza (η) y el potencial químico (μ) se aproximan como

$$\eta \approx \frac{1}{2}(I - A)$$

$$\mu \approx -\frac{1}{2}(I + A)$$

donde I es el potencial de ionización y A es la afinidad electrónica. En la literatura [50] se ha aplicado ampliamente el concepto de dureza y electrofilia de ahí que

$$I \approx -\varepsilon_H$$

$$A \approx -\varepsilon_L$$

donde ε_H y ε_L corresponden al valor de la energía del orbital molecular más alto ocupado (HOMO) y el orbital más bajo desocupado (LUMO) respectivamente, se obtiene que la definición operacional de la dureza está directamente relacionada con la diferencia de energía entre el HOMO y el LUMO, es una propiedad importante de cualquier molécula

con la cual se puede determinar la reactividad química, debido a los cambios de densidad electrónica y permite predecir la estructura molecular, ya que la geometría más favorable será la que maximice la diferencia entre el HOMO y el LUMO.

En el contexto de la teoría de orbitales moleculares, la dureza global puede definirse [55, 57, 58]

$$\eta = \frac{1}{2}(\varepsilon_L - \varepsilon_H)$$

3.7.4. ÍNDICE DE ELECTROFILIA ω

Robert G. Parr [56, 59] junto con otros investigadores proponen que el índice de electrofilia (ω) puede definirse como,

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta}$$

donde el cuadrado del potencial químico (μ) dividido por dos veces su dureza (η) indica el poder electrofílico de un ligando para obtener electrones [60, 61].

El índice de electrofilia está relacionado con la afinidad electrónica ya que ambos miden la capacidad de una especie química para aceptar electrones; sin embargo, la afinidad electrónica refleja la capacidad de aceptar un electrón del ambiente mientras que el

índice de electrofilia mide la disminución de energía de un ligando debido a un flujo máximo de electrones entre un donador y un aceptor [59].

3.7.5. CARGAS ATÓMICAS

Para la obtención de cargas atómicas (Q_α), se realiza el ajuste del potencial electrostático molecular MEP (ϕ). Este ajuste consta de calcular los valores del potencial electrostático molecular, empleando la función de onda molecular en una malla de muchos puntos en la región fuera de la superficie de van der Waals de la molécula, situando la carga Q_α en cada núcleo α y calculando en cada punto de la parrilla la cantidad del potencial electrostático molecular $\phi^{\text{aprox}} \equiv \sum_\alpha Q_\alpha e / 4\pi\epsilon_0 r_{i\alpha}$. Se deben variar los valores de Q_α tomando en cuenta que la suma de la molécula neutra resulte cero, de modo que se minimice la suma de los cuadrados de las desviaciones $\phi_i^{\text{aprox}} - \phi_i$ en los puntos de la malla [48].

Existen diferentes esquemas propuestos para la determinación de carga entre ellos se encuentran CHELP, CHELPG y el sistema Merz-Singh-Kollman, todos estos métodos toman los puntos fuera de los radios de van der Waals de los átomos que constituyen la molécula. En el esquema CHELPG selecciona los puntos en una malla cúbica donde la molécula se encuentra en el centro [62].

3.7.6. POLARIZABILIDAD α

La polarizabilidad es la respuesta lineal de la nube electrónica de una especie química debido a un campo eléctrico externo, se mide en términos de dipolo eléctrico estático [56].

$$\alpha = \frac{1}{3}(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz})$$

3.8. FUNDAMENTO DE TÉCNICAS EXPERIMENTALES

3.8.1. SEPARACIÓN DE CÉLULAS CON FICOLL

El polisacárido Ficoll, es un copolímero de sucrosa y epícloridrina. Genera gradientes de densidad, muy soluble en agua, forma soluciones de baja viscosidad de partículas no cargadas, de peso molecular relativamente alto (con características de baja osmolaridad). Por lo tanto, el uso de soluciones gradientes de ficoll en la separación de biopartículas es preferible a aquellas de sucrosa, cloruro de cesio o metil celulosa [63].

La eficiencia de las soluciones gradientes de Ficoll en separaciones biofísicas depende de las propiedades físicas de las soluciones, como su viscosidad y su densidad [63].

La separación de la sangre se realiza colocándola en el medio Ficoll-Hypaque u otro medio similar de densidad conocida, posteriormente se centrifuga a 800 X g [64] por 30 minutos. Después del tiempo de centrifugación se toma la capa de células mononucleares formada principalmente por linfocitos T y B [64].

3.8.2. TÉCNICA DE ELISA

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) es una prueba analítica versátil y sensible; además, es uno de los ensayos inmunológicos más utilizados para determinar anticuerpos o cualquier otro tipo de molécula antigénica activa. ELISA puede variar en formato, implica un sistema de captura inmovilizado en un soporte sólido, el analito y el sistema de detección, en el que se utiliza una enzima ligada a un anticuerpo secundario o anticuerpo antiinmunoglobulina, que se une específicamente proporcionando una señal de la reacción antígeno-anticuerpo, la cual cambia de color por la adición del sustrato cromógeno de forma proporcional a la intensidad de la reacción [65, 66].

En un ELISA la cuantificación del analito se realiza por el uso de un espectrofotómetro de placas a la longitud de onda apropiada para el color producido, la concentración se obtiene normalmente mediante la comparación con muestras estándar de concentración conocida del analito [65, 66]. Existen tres pruebas principales como base de los ELISAs:

- A) ELISA directa. El antígeno se une a la fase sólida mediante adsorción pasiva y este reacciona con anticuerpos unidos a enzimas, el color es generado después de adicionar al sistema el sustrato, para cuantificar el antígeno presente en la muestra por medio de un espectrofotómetro [66], este tipo de ELISA se esquematiza en la Figura 7.
- B) ELISA indirecta. Los anticuerpos de una especie en particular reaccionan con el antígeno unido a la fase sólida. Cualquier unión de anticuerpos se detecta mediante la adición de un anticuerpo anti- especie marcado con enzima como se observa en la Figura 7 [66].
- C) ELISA sándwich. Existen la forma ELISA sándwich directa y ELISA sándwich indirecta; sin embargo, el principio es el mismo para ambos, en lugar de la adición de un antígeno directamente a la fase sólida, se añade un anticuerpo como sistema de captura para el antígeno. Para el ELISA sándwich directo el segundo anticuerpo está unido a la enzima y el antígeno debe tener al menos dos sitios antigénicos diferentes. En el caso de ELISA sándwich indirecto, el anticuerpo de detección es de una especie diferente al anticuerpo de captura, el anticuerpo anti- especie marcado con la enzima se une al anticuerpo de detección y no al anticuerpo de captura, lo anterior se visualiza en la Figura 7 [66].

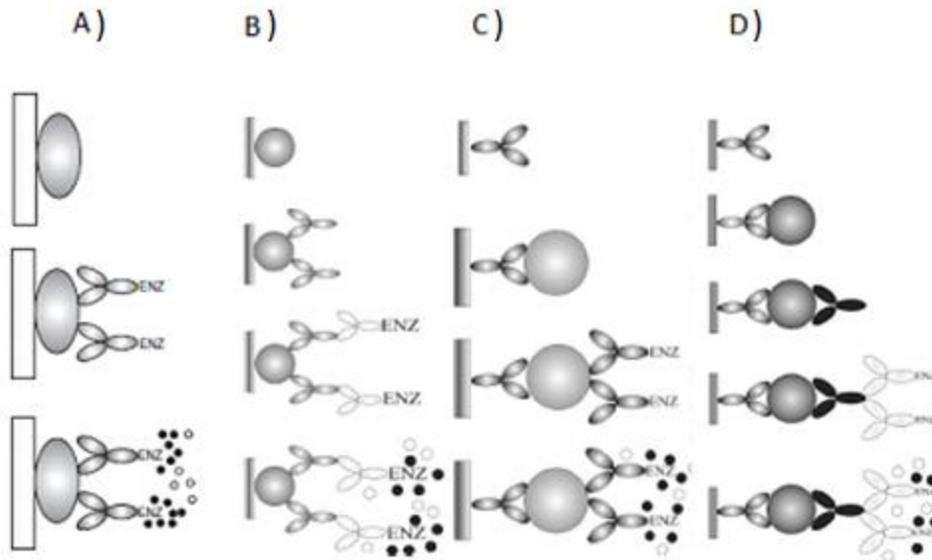


Figura 8. Tipos de ELISA: A) ELISA directa, B) ELISA indirecta, C) ELISA sándwich directa, D) ELISA sándwich indirecto [66].

El ELISA se utiliza en laboratorios médicos e investigaciones biomédicas, para la detección y cuantificación de biomarcadores en una variedad de muestras biológicas. En el campo de la inmunología, el ELISA tiene una gran variedad de aplicaciones, entre ellas la cuantificación de citocinas secretadas por células o animales de laboratorio en respuesta a un agente patógeno [67].

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inflamación crónica se vincula a la génesis de diversas patologías, en las que se observa la presencia y persistencia de citocinas proinflamatorias [23, 27]. En las últimas décadas, se han desarrollado distintos fármacos para la terapéutica de los procesos inflamatorios, sin embargo, los efectos secundarios que generan promueven la búsqueda de moléculas con la capacidad de dirigirse a las vías de señalización en células específicas. Este abordaje en el diseño de fármacos disminuye el riesgo de los efectos secundarios asociados a cada tipo de antiinflamatorio.

El diseño racional de fármacos guiado por computadora representa una alternativa útil, que cuando se acopla al análisis de la estructura electrónica a través de métodos computacionales, da como resultado moléculas con alto potencial terapéutico y mayor especificidad. Por lo que en este trabajo de tesis se presenta el estudio computacional de la estructura electrónica, la reactividad química y las propiedades fisicoquímicas de dos nuevos tetrapéptidos; así como la evaluación de su actividad *in vitro* sobre citocinas inflamatorias.

5. HIPÓTESIS

El estudio computacional de la estructura electrónica, los índices de reactividad química y las propiedades fisicoquímicas permitirán generar y probar nuevos tetrapéptidos, los cuales modificarán la expresión de las citocinas: IL-1 β , IL-6 e IL-10.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar computacionalmente las propiedades estructurales, electrónicas, de reactividad química y fisicoquímicas de dos nuevos tetrapéptidos potencialmente antiinflamatorios y analizar su efecto sobre algunas citocinas inflamatorias.

6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar y analizar la geometría de mínima energía de las moléculas en estudio, en fase gas.
- Determinar a través de cálculos puntuales las propiedades de la estructura electrónica, fisicoquímicas y los índices de reactividad química.
- Analizar las características electrónicas, las propiedades fisicoquímicas y los descriptores de reactividad química.
- Evaluar la actividad de los tetrapéptidos sobre la producción de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 en un modelo *in vitro* de células mononucleares totales de sangre periférica humana, estimuladas con LPS.
- Relacionar la estructura electrónica, la reactividad química y las propiedades fisicoquímicas de los nuevos tetrapéptidos, con la actividad anti o proinflamatoria observada en el modelo experimental empleado.

7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1. DISEÑO DE ESTUDIO

TIPO DE ESTUDIO

- Prospectivo
- Transversal
- Experimental
- Analítico

POBLACIÓN DE ESTUDIO

- Tetrapéptidos
- Moléculas antiinflamatorias con actividad conocida

VARIABLES

INDEPENDIENTE

- Geometría
- Método teórico
- Conjunto base
- Concentración de tetrapéptidos y moléculas antiinflamatorias

- Cantidad de células

DEPENDIENTE

- Estructura electrónica
- Propiedades fisicoquímicas
- Índices de reactividad química
- Liberación de citocinas

7.2. MATERIAL COMPUTACIONAL

HARDWARE

Una estación de trabajo con procesadores Intel Xeon de dos núcleos, 2 GB en memoria RAM, con sistema operativo Linux, para realizar cálculos de estructura electrónica.

Una estación de trabajo que cuenta con dos procesadores Xeon de 6 núcleos, 6 GB de memoria, modelo Mac Pro 12 Core y con sistema operativo Lion, que permite el cálculo y la visualización de la estructura electrónica de las moléculas bajo estudio.

Conexión remota a el sistema HP Cluster Platform 3000SL, "Miztli" es una supercomputadora con una capacidad de procesamiento de 118 TFlop/s (118 billones de operaciones aritméticas por segundo). Cuenta con 5,312 núcleos de procesamiento Intel

E5-2670, 16 tarjetas NVIDIA m2090, una memoria RAM total de 15,000 Gbytes y un sistema de almacenamiento masivo de 750 Terabytes.

SOFTWARE

- Gaussian 03 y 09 utilizado para el cálculo de propiedades moleculares y de la estructura electrónica.
- Spartan versión 08 y 10 usado para la visualización gráfica y cálculos de la estructura electrónica.
- GaussView 5.0 y Moldraw para visualización gráfica.

7.3. MATERIAL EXPERIMENTAL

- Cajas de cultivo
- Tubos cónicos de 15 ml
- Centrifuga
- Gabinete de bioseguridad
- Pipetas para cultivo
- Micropipetas

- Tubos tipo eppendorf
- Cámara de Neubauer
- Kits de ELISA para citocinas humanas IL-1 β , IL-6 e IL-10 (Thermo Scientific Inc. USA)
- Lector de microplacas
- Incubadora a 37°C con 5% de CO₂
- Microscopio invertido
- Microscopio óptico

7.4. METODOLOGÍA

7.4.1. METODOLOGÍA COMPUTACIONAL

- A partir de la matriz-Z realizada con ayuda del software GaussView 5.0., se construyó la geometría de cada una de las moléculas planteadas en el estudio.
- Se realizó un barrido conformacional de las moléculas en estudio para obtener la mejor estructura; es decir, el conformero de mínima energía de manera preliminar. Posteriormente se optimizó la geometría a nivel DFT con los funcionales B3LYP y M06-2X, con la base 6-311+G(d,p); al mismo tiempo se realizaron cálculos de frecuencia al mismo nivel de teoría para verificar que las estructuras se localizaron en un mínimo global.

- Para corroborar que las geometrías de mínima energía se encontraban dentro de las geometrías permitidas, se tomaron los ángulos diedros centrales de cada tetrapéptido y se graficaron en un mapa Ramachandran.
- A partir de las optimizaciones realizadas, se eligieron los confórmeros de mínima energía para realizar el análisis de los parámetros geométricos como son: longitud de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros.
- Para la caracterización de la estructura electrónica se efectuaron cálculos puntuales a las estructuras geométricas de mínima energía a nivel M06-2X/6-311++G(2d,2p), B3LYP/6-311++G(2d,2p) para la obtención de los descriptores químico cuánticos: cargas atómicas, isosuperficies de potencial electrostático, dureza, índice de electrofilia, potencial de ionización.
- Finalmente se recopilaron y analizaron los parámetros electrónicos, índice de reactividad y las propiedades fisicoquímicas.

7.4.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

EXTRACCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

La sangre total o completa se obtuvo de un donador sano en tubos con EDTA al 10 %; se separó colocándola cuidadosamente sobre el medio Ficoll-Hypaque de densidad conocida en tubos de polipropileno transparente con fondo cónico, se centrifugó a 2500 rpm por 30 minutos. Después de la centrifugación se tomó la capa de células mononucleares y se transfirieron en un tubo estéril con medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), las células mononucleares se lavaron tres veces con PBS (1:1) centrifugando a 1800 rpm durante 10 minutos. Se prosiguió a homogenizar las células con medio de cultivo RPMI 1640 y se transfirieron a una caja para cultivo celular con un área de 25 cm² con filtro en el tapón y se incubó por 24 hrs a 37 °C y 5 % de CO₂.

ESTÍMULO DE TLR Y TRATAMIENTO CON TETRAPÉPTIDOS Y MOLÉCULAS ANTIINFLAMATORIAS

Una vez que se obtuvo la cantidad de células necesarias, se llevó a cabo el conteo de células y se colocaron en cada uno de los 18 pozos 1 x 10⁶ células en 3 mL de medio RPMI 1640 en una caja de multipozos. Los experimentos se realizaron de acuerdo al siguiente diseño experimental: en un pozo se colocó medio de cultivo RPMI 1640 como blanco y en otro solo 1 x 10⁶ células para la concentración basal de citocinas, en los otros pozos la misma cantidad de células se incubaron con LPS (*E. coli*, serotipo O111:B4, Sigma) a una

concentración final por pozo de 10 ng/ml para simular un proceso inflamatorio por 24 horas a 37 °C y con 5 % de CO₂.

Después de 24 horas, las células se trataron con los dos nuevos tetrapéptidos a una concentración final de 100 ng/ml y el fármaco antiinflamatorio dexametasona como referencia a una concentración final de 10 µM, la placa se incubó durante 24 horas a 37 °C con 5 % de CO₂, el control positivo para inflamación llevo la misma incubación pero sin fármaco o péptido. Una vez concluido el tiempo de tratamiento, el sobrenadante del cultivo se recolectó en criotubos y se almacenaron a -70 °C hasta el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para la cuantificación de citocinas inflamatorias.

CUANTIFICACIÓN DE CITOCINAS

En el sobrenadante libre de células se cuantificaron las citocinas IL-1β, IL-6 e IL-10, utilizando Kits de ELISA (Thermo Scientific Inc. USA) para medir IL-1β, IL6 e IL-10 humanas. El procedimiento del ELISA se realizó adicionando 50 µL de la muestra a cada pozo por duplicado y enseguida se añadieron 50 µL de anticuerpo biotinilado para la IL-1β, IL-6 e IL-10, las placas se taparon e incubaron a temperatura ambiente por 2 horas para IL-10 e IL6 y para IL-1β por 3 horas, pasado el tiempo de incubación se lavó 3 veces y se agregaron 100 µL por cada pozo del reactivo estreptavidina-HPRT, las placas se taparon e incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos, después de la incubación se lavó 3 veces y se adicionaron 100 µL por cada pozo del cromógeno TMB, las placas se incubaron por 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, terminado el tiempo de incubación se

adicionaron 100 μL por pozo de solución de paro (ácido sulfúrico 0.16 M) y se midieron las absorbancias a 450 nm.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. SECCIÓN TEÓRICA

A continuación se presentan las estructuras optimizadas de mínima energía de los tetrapéptidos calculados a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y M06-2X/6-311+G(d,p), así como la energía de optimización de cada una de ellas, el análisis del mapa Ramachandran y los parámetros geométricos. En la parte final de la sección se discuten los descriptores químico cuánticos: la dureza, el índice de electrofilia, el potencial de ionización, la polarizabilidad, las cargas atómicas de átomos y de grupos, las isosuperficies de los orbitales frontera y las isosuperficies del potencial electrostático.

Con la finalidad de facilitar el análisis de los parámetros geométricos y electrónicos de los péptidos, en las Figuras 8 y 9 se muestran la numeración y los sitios sustituidos de la estructura genérica (tripéptido CNS) utilizada en el diseño de las nuevas moléculas.

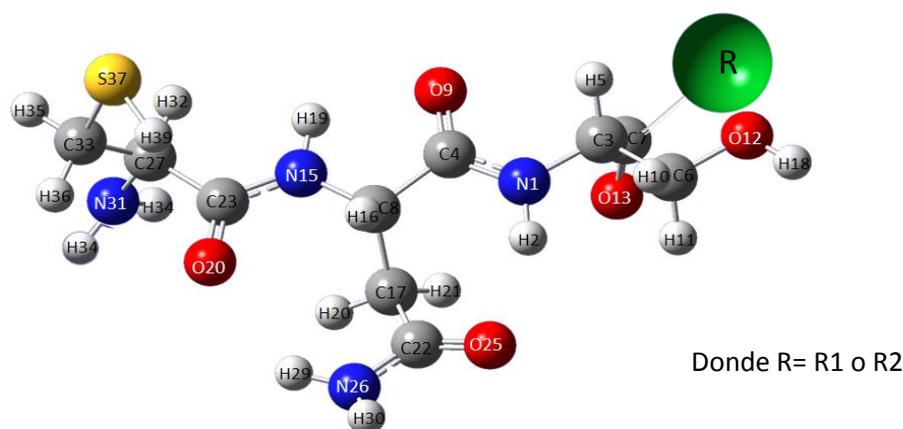


Figura 9. Estructura genérica y numeración de los átomos del tripéptido CNS-R sustituido en el extremo carboxilo terminal.

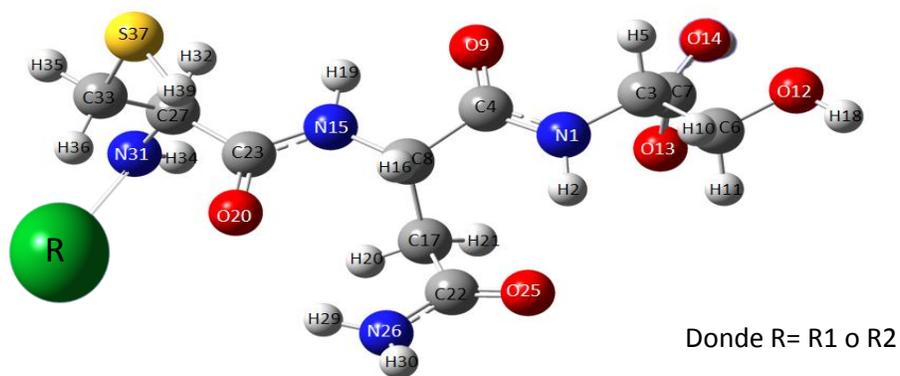
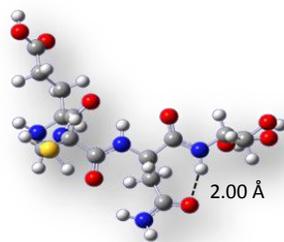
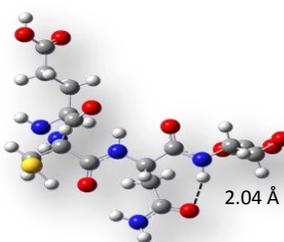
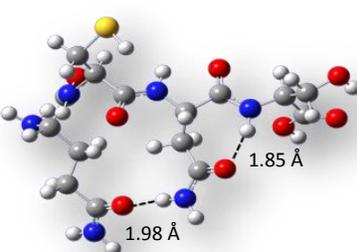
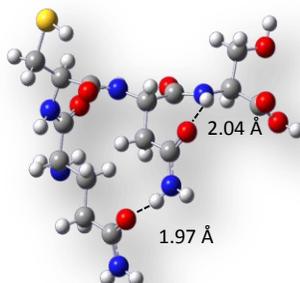
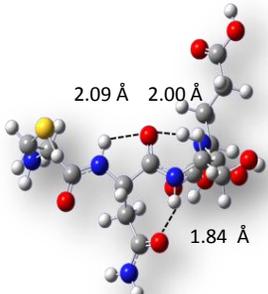
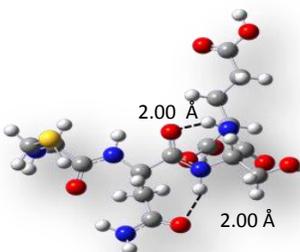
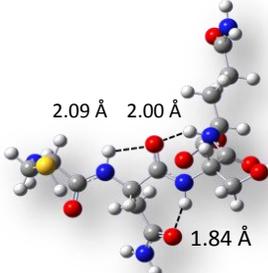
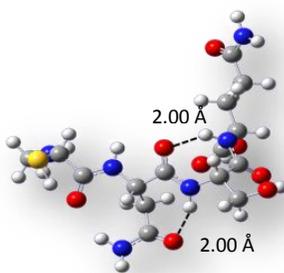


Figura 10. Estructura genérica y numeración de los átomos del tripéptido R-CNS sustituido en el extremo amino terminal.

GEOMETRÍAS OPTIMIZADAS DE MÍNIMA ENERGÍA

En la Tabla IV se muestran las estructuras optimizadas de los tetrapéptidos de mínima energía, a los niveles de teoría B3LYP/6-311+G(d,p) y M06-2X/6-311+G(d,p).

Tabla IV. Geometrías optimizadas de mínima energía de los tetrapéptidos R2-CNS, CNS-R2, R1-CNS y CNS-R1 a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y M06-2X/6-311+G(d,p)

Geometrías optimizadas de mínima energía		
Péptido	B3LYP	M06-2X
R1-CNS		
R2-CNS		
CNS-R1		
CNS-R2		

En las geometrías mostradas en la Tabla IV, se observó que las cuatro moléculas calculadas con el funcional B3LYP mantuvieron una estructura similar en la parte central del esqueleto principal; además, estos péptidos exhibieron geometrías extendidas, indicando que el extremo terminal en donde se encuentre el aminoácido R1 o R2 no proporciona un efecto considerable en la conformación de los aminoácidos centrales del esqueleto principal de los tetrapéptidos.

Al igual que los péptidos optimizados con el funcional B3LYP, las moléculas optimizadas con el funcional M06-2X mostraron una estructura similar en la parte central del esqueleto principal y geometrías extendidas, además dichas geometrías son estabilizadas por puentes de hidrógeno intramoleculares.

ÁNGULOS DE TORSIÓN

Con la finalidad de corroborar que las estructuras optimizadas eran las permitidas, se graficaron los ángulos de torsión ϕ ($C_{23}N_{15}C_8C_4$) y ψ ($N_{15}C_8C_4N_1$) como se observa en la Figura 10 y se analizaron de acuerdo a los mapas de Ramachandran

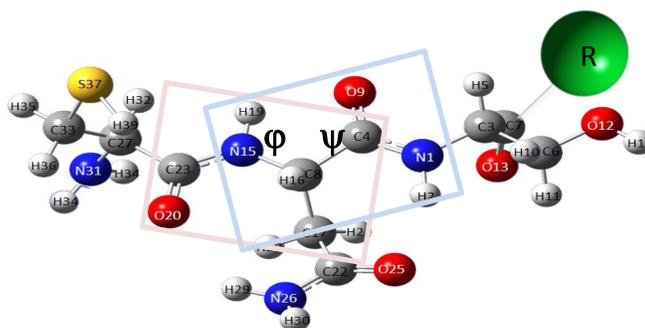


Figura 11. Representación de los ángulos ϕ y ψ .

En la Tabla V, se presentan los ángulos de torsión ϕ ($C_{23}N_{15}C_8C_4$) y ψ ($N_{15}C_8C_4N_1$) centrales del esqueleto principal y la energía de optimización de los péptidos: R1-CNS, CNS-R1, R2-CNS y CNS-R2 optimizados a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y M06-2X/6-311+G(d,p).

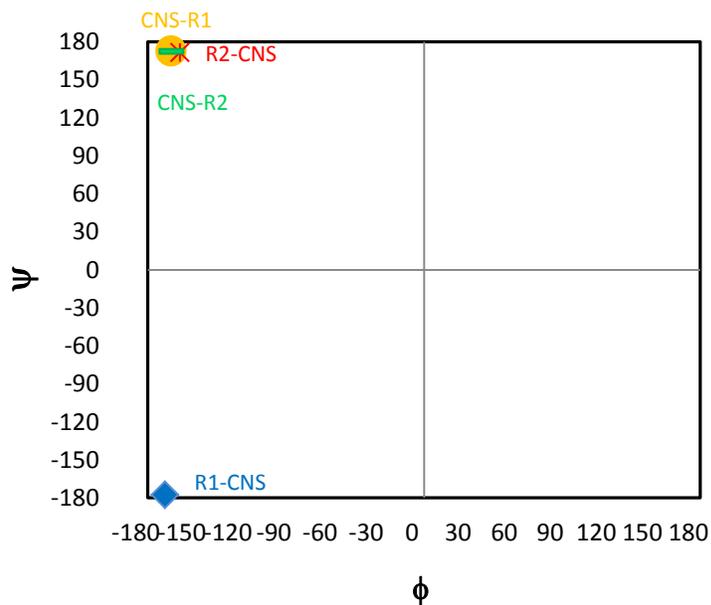
Tabla V. Ángulos diedros ϕ y ψ y energías de optimización de los tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y M06-2x/6-311+G(d,p)

Péptido	B3LYP			M06-2X		
	ϕ (C23N15C8C4)	ψ (N15C8C4N1)	E_{opt}	Φ (C23N15C8C4)	Ψ (N15C8C4N1)	E_{opt}
R1-CNS	-168.70	-177.57	-1936.23240	-173.01	178.72	-1935.60619
CNS-R1	-164.71	172.83	-1936.23797	-169.58	-175.22	-1935.61207
R2-CNS	-159.03	171.51	-1916.36416	-167.54	-164.08	-1915.73309
CNS-R2	-164.42	172.31	-1916.36269	-169.58	-175.23	-1915.73772

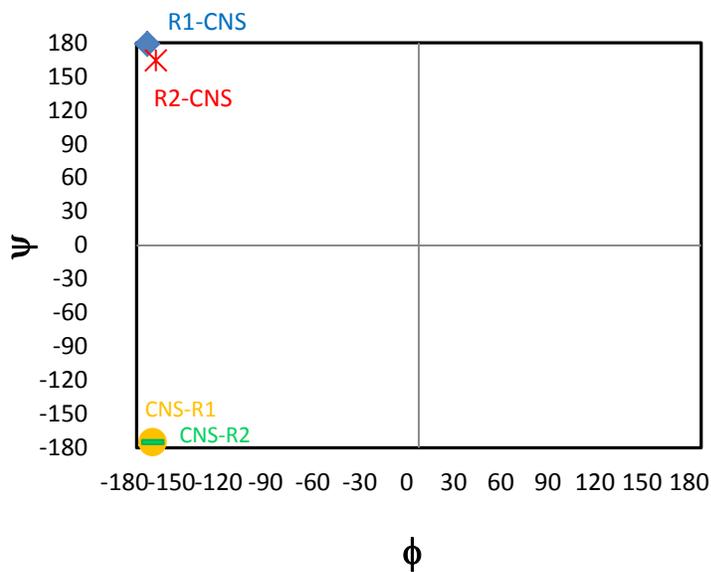
Los valores de los ángulos ϕ y ψ están en grados (°)

Los valores de los ángulos ϕ y ψ centrales de los cuatro péptidos mostrados en la Tabla V, corroboraron lo antes analizado en las geometrías optimizadas en los dos niveles de cálculo; debido a que presentaron valores cercanos a $\pm 180^\circ$ y fueron similares entre cada molécula, lo que concuerda con la geometría extendida y la similitud de las estructuras en la parte central de los péptidos

Los ángulos de torsión ϕ ($C_{23}N_{15}C_8C_4$) y ψ ($N_{15}C_8C_4N_1$) de las moléculas de mínima energía a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y M06-2X/6-311+G(d,p) se muestra en las Gráficas 1 y 2



Gráfica 1. Diagrama de Ramachandran de ϕ (C_{23}, N_{15}, C_8, C_4) y ψ (N_{15}, C_8, C_4, N_1) a nivel B3LYP/6-311+G(d,p), azul R1-CNS, amarillo CNS-R1, rojo R2-CNS y verde CNS-R2.



Gráfica 2. Diagrama de Ramachandran de ϕ (C_{23}, N_{15}, C_8, C_4) y ψ (N_{15}, C_8, C_4, N_1) a nivel M06-2X/6-311+G(d,p), azul R1-CNS, amarillo CNS-R1, rojo R2-CNS y verde CNS-R2.

La comparación visual entre las regiones permitidas para conformaciones peptídicas del mapa de Ramachandran y la posición obtenida de ϕ y ψ para cada molécula, indica de forma cualitativa cuál de las conformaciones de los péptidos analizados son posibles en la naturaleza; debido a que las combinaciones de estos valores se ubican en las regiones permitidas propuestas por G. N. Ramachandran [68], de acuerdo a su estudio de combinaciones de ángulos diedros estéricamente permitidos.

Los resultados obtenidos de nuestro análisis como se observa en los gráficos 1 y 2, mostraron que los tetrapéptidos se localizan en regiones permitidas donde se espera una estructura extendida, lo cual está de acuerdo con lo mostrado en las geometrías (Tabla IV), las cuales son estabilizadas por la formación de puentes de hidrógeno.

PARÁMETROS GEOMÉTRICOS

En la Tabla VI, se presentan los parámetros geométricos: distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros de los tetrapéptidos R1-CNS, CNS-R1, R2-CNS y CNS-R2, optimizados a nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y algunos datos de rayos X de los aminoácidos cisteína, asparagina y serina [69-72].

De acuerdo a los resultados obtenidos de las distancias de enlace N_1-H_2 , C_3-N_1 , C_8-N_{15} , $C_{22}-O_{25}$, $C_{33}-S_{37}$, $C_{27}-N_{31}$, $S_{37}-H_{39}$, $N_{31}-R_{38N}$ y C_7-R_{38C} , se observó una variación no mayor a 0.02 Å de dichas distancias de enlace entre los cuatro tetrapéptidos, asimismo con respecto a los valores de rayos X [69-72] y a los valores del tripéptido CNS [18]; es decir, la variación de estas longitudes de enlace es mínima. Cabe mencionar que en las distancias de enlace N_1-H_2 , C_3-N_1 y $C_{27}-N_{31}$, se observó que los valores de los péptidos sustituidos en el extremo carboxilo terminal, son mayores independientemente del tipo de aminoácido que fue sustituido.

Los valores de los ángulos de enlace: $N_1C_3C_6$, $H_2N_1C_4$, $N_1C_3C_7$, $O_{13}C_7O_{14}$, $N_{26}C_{22}O_{25}$, $C_{27}N_{31}R_{38N}$ y $C_3C_7R_{38C}$ mostrados en la Tabla VI, no presentaron una variación mayor a 1.00° entre los péptidos sustituidos en el mismo extremo, además dichos ángulos de enlace exhibieron valores cercanos a los de rayos X. Por otra parte, al comparar los péptidos sustituidos en los diferentes extremos con el mismo aminoácido, se observó que los ángulos $N_1C_3C_6$, $H_2N_1C_4$, $N_1C_3C_7$ y $N_{26}C_{22}O_{25}$ presentaron valores más grandes cuando el aminoácido se encuentra sustituido en el extremo amino terminal, en comparación con los sustituidos en el carboxilo terminal.

Tabla VI. Parámetros geométricos (distancia de enlace, ángulo de enlace y ángulo diedro) de los tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311+G(d,p)

Parámetro	R1-CNS	R2-CNS	CNS-R1	CNS-R2	CNS	Rayos-X
N₁-H₂	1.02	1.02	1.03	1.03	1.01 ^e	0.94 ^a
C₃-N₁	1.45	1.45	1.46	1.46	1.45 ^e	1.485 ^a
C₈-N₁₅	1.45	1.45	1.45	1.45	1.43 ^e	1.479 ^b
C₂₂-O₂₅	1.23	1.23	1.23	1.23	1.22 ^e	1.259 ^b
C₃₃-S₃₇	1.84	1.84	1.84	1.84	1.83 ^e	1.811 ^c
C₂₇-N₃₁	1.46	1.47	1.47	1.47	1.45 ^e	1.493 ^c
S₃₇-H₃₉	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35 ^e	
N₃₁-R_{38N}	1.36	1.37				
C₇-R_{38C}			1.36	1.36		
N₁C₃C₆	111.41	111.27	109.30	109.37	107.85 ^e	109.7 ^a
H₂N₁C₄	118.89	116.65	116.97	116.92	118.50 ^e	117.0 ^a
N₁C₃C₇	112.49	112.61	110.88	110.90	110.86 ^e	110.8 ^a
O₁₃C₇O₁₄	122.50	122.39			123.80 ^e	125.2 ^a
N₂₆C₂₂O₂₅	123.33	122.40	121.44	121.41	123.40 ^e	125.6 ^b
C₂₇N₃₁R_{38N}	122.14	122.58				
C₃C₇R_{38C}			114.44	114.43		
H₂N₁C₄C₈	6.64	6.51	7.33	7.34	10.72 ^e	
O₂₈C₂₃C₈N₁₅	-3.09	0.99	-5.26	-5.14	-4.99 ^e	
O₂₅C₂₂C₁₇C₈	-81.57	-28.07	-37.64	-35.31	-81.08 ^e	3.4 ^d
C₂₃C₂₇N₃₁R_{38N}	-88.13	-103.31				
N₁C₃C₇R_{38C}			67.36	67.18		

^a Ref. [69], ^b Ref. [70], ^c Ref. [71], ^d Ref. [72], ^e Ref. [18] tripéptido CNS, tripéptido Cys-Asn-Ser. Los valores de la longitud de enlace están dados en Angstrom (Å) y los ángulos de enlace y diedros en grados (°).

Los ángulos diedros $H_2N_1C_4C_8$ y $O_{28}C_{23}C_8N_{15}$ indicaron que los átomos H_2 y O_{28} son coplanares con respecto al esqueleto principal, debido a que los valores son cercanos a 0° [17]. Los ángulos diedros $C_{23}C_{27}N_{31}R_{38N}$ y $N_1C_3C_7R_{38C}$, que representan la unión en los extremos amino terminal y carboxilo terminal respectivamente de los residuos R1 o R2, mostraron valores similares en los péptidos sustituidos en el extremo carboxilo terminal, sin tener algún efecto notable por el tipo de aminoácido sustituido. Los ángulos diedros $C_{23}C_{27}N_{31}R_{38N}$ y $N_1C_3C_7R_{38C}$, de los péptidos R1-CNS y el R2-CNS presentaron una desviación mayor, posiblemente causada por la falta de una interacción no covalente como los puentes de hidrógeno que, de acuerdo con el mapa de Ramachandran el péptido R1-CNS cae en una región permitida de una conformación extendida y solo presenta un puente de hidrógeno a diferencia del péptido R2-CNS que cae en una región permitida de hoja β y en su estructura forma dos puentes de hidrógeno, sugiriendo que la formación de puentes de hidrógeno en las estructuras peptídicas favorecen la formación de una estructura menos extendida, posiblemente de tipo hoja β .

Las distancias de enlace de los cuatro tetrapéptidos presentaron una variación no mayor a 0.01 \AA con respecto a los valores reportados para el tripéptido CNS [18]. En cuanto a los valores de los ángulo de enlace $N_1C_3C_6$ y el $N_1C_3C_7$, se observó que los tetrapéptidos presentan valores más grandes en comparación con los valores del tripéptido CNS, esto sucede en mayor medida para los péptidos sustituidos en el extremo amino. En general, el tetrapéptido R1-CNS y los péptidos restantes presentan parámetros geométricos similares a los del tripéptido CNS.

En la Tabla VII, se presentan los parámetros geométricos de: distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros de los tetrapéptidos a nivel M06-2X/6-311+G(d,p) y algunos datos de rayos X [69-72].

Tabla VII. Parámetros geométricos (distancia de enlace, ángulo de enlace y ángulo diedro) de los tetrapéptidos a nivel M06-2X/6-311+G(d,p)

Parámetro	R1-CNS	R2-CNS	CNS-R1	CNS-R2	Rayos-X
N₁-H₂	1.02	1.02	1.02	1.02	0.94 ^a
C₃-N₁	1.44	1.45	1.46	1.46	1.485 ^a
C₈-N₁₅	1.44	1.45	1.44	1.44	1.479 ^b
C₂₂-O₂₅	1.22	1.22	1.22	1.22	1.259 ^b
C₃₃-S₃₇	1.82	1.82	1.82	1.82	1.811 ^c
C₂₇-N₃₁	1.46	1.46	1.46	1.46	1.493 ^c
S₃₇-H₃₉	1.34	1.34	1.34	1.34	
N₃₁-R_{38N}	1.35	1.36			
C₇-R_{38C}			1.36	1.36	
N₁C₃C₆	111.52	110.11	109.06	109.09	109.7 ^a
H₂N₁C₄	118.21	119.82	118.92	118.92	117.0 ^a
N₁C₃C₇	111.67	108.50	108.99	109.03	110.8 ^a
O₁₃C₇O₁₄	122.60	123.80			125.2 ^a
N₂₆C₂₂O₂₅	123.69	123.13	123.68	123.67	125.6 ^b
C₂₇N₃₁R_{38N}	121.30	120.45			
C₃C₇R_{38C}			114.70	114.77	
H₂N₁C₄C₈	10.13	-0.61	8.32	8.45	
O₂₈C₂₃C₈N₁₅	-0.50	2.70	-4.77	-4.74	
O₂₅C₂₂C₁₇C₈	-86.57	10.24	-84.20	-84.14	3.4 ^d
C₂₃C₂₇N₃₁R_{38N}	-84.79	-83.86			
N₁C₃C₇R_{38C}			75.37	75.15	

^a Ref. [69], ^b Ref. [70], ^c Ref. [71], ^d Ref. [72] tripéptido CNS, tripéptido Cys-Asn-Ser. Los valores de longitud de enlace están dados en Angstrom (Å) y los ángulos de enlace y diedros en grados (°).

Las distancias de enlace N_1-H_2 , C_3-N_1 , C_8-N_{15} , $C_{22}-O_{25}$, $C_{33}-S_{37}$, $C_{27}-N_{31}$, $S_{37}-H_{39}$, $N_{31}-R_{38N}$, C_7-R_{38C} , presentan una variación menor a 0.02 \AA entre los cuatro tetrapéptidos; además, estos datos son cercanos a los valores de rayos X [69-72]. En la distancia de enlace C_3-N_1 de los péptidos que contienen al sustituyente R1, en el extremo carboxilo terminal presenta un valor mayor comparado con el péptido sustituido en el extremo amino, esta tendencia también se observó en las distancias de enlace N_1-H_2 , C_3-N_1 y $C_{27}-N_{31}$ de los péptidos sustituidos con el sustituyente R2.

Por otra parte, en las distancias de enlace C_8-N_{15} , $C_{33}-S_{37}$, $S_{37}-H_{39}$, de los tetrapéptidos que contienen al R2, exhiben valores más grandes en los péptidos sustituidos en el extremo amino en comparación con los sustituidos en el extremo carboxilo terminal.

Los ángulos de enlace $N_1C_3C_6$, $H_2N_1C_4$, $N_1C_3C_7$, $O_{13}C_7O_{14}$, $N_{26}C_{22}O_{25}$, $C_{27}N_{31}R_{38N}$, $C_3C_7R_{38C}$, de los cuatro péptidos presentan valores cercanos a los valores de rayos X [69-72], asimismo, la variación de estos ángulos entre cada molécula es menor a 2.00° . En los ángulos de enlace $N_1C_3C_6$ y $N_1C_3C_7$ tanto para los péptidos sustituidos con R1 como con R2, se observa que los péptidos sustituidos en el extremo amino terminal presentan valores mayores con respecto a los sustituidos en extremo carboxilo terminal.

Los ángulos diedros $H_2N_1C_4C_8$ y $O_{28}C_{23}C_8N_{15}$ indican que los átomos H2 y O28 son coplanares con respecto al esqueleto principal [18], debido a que los valores son cercanos a 0° y 180° .

En los ángulos diedros que representan la unión de los sustituyentes R1 o R2 en los extremos del amino terminal ($C_{23}C_{27}N_{31}R_{38N}$) y carboxilo terminal ($N_1C_3C_7R_{38C}$), presentan

valores similares sin dependencia al tipo de aminoácido sustituido en el extremo terminal.

DESCRIPTORES QUÍMICO CUÁNTICOS

Con el propósito de conocer la reactividad química de las moléculas bajo estudio, en la Tabla VIII se muestran algunos descriptores químico cuánticos como la dureza (η), el índice de electrofilia (ω), el potencial de ionización (I), el momento dipolar (μ) y la polarizabilidad (α) de los tetrapéptidos R1-CNS, CNS-R1, R2-CNS, CNS-R2 y de los fármacos dexametasona y naproxen calculados a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p).

Tabla VIII. Descriptores químico cuánticos de los tetrapéptidos y los antiinflamatorios a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)

Péptido	B3LYP						M06-2X					
	η	ω	I	μ_{TOTAL}	α	Δ	η	ω	I	μ_{TOTAL}	α	Δ
	(e.V)	(e.V)	(e.V)	Debyes	u.a	(e.V)	(e.V)	(e.V)	Debyes	u.a	(e.V)	
R1-CNS	5.88	1.31	1.73	8.13	305.68	-	7.66	1.31	2.54	8.13	288.49	-
CNS-R1	5.80	1.21	1.62	5.52	291.83	-	7.79	1.22	2.51	3.40	285.69	-
R2-CNS	5.84	1.26	1.68	11.30	326.30	-	7.40	1.26	2.37	8.66	281.90	-
CNS-R2	5.84	1.18	1.62	3.27	293.60	-	7.80	1.21	2.49	1.74	288.61	-
Naproxeno	4.35	1.50	1.23	1.43	275.29	0.85	6.44	1.11	1.80	1.33	259.59	0.93
Dexametasona	4.87	1.87	1.65	5.34	336.39	-	7.86	1.36	2.69	5.38	316.17	-

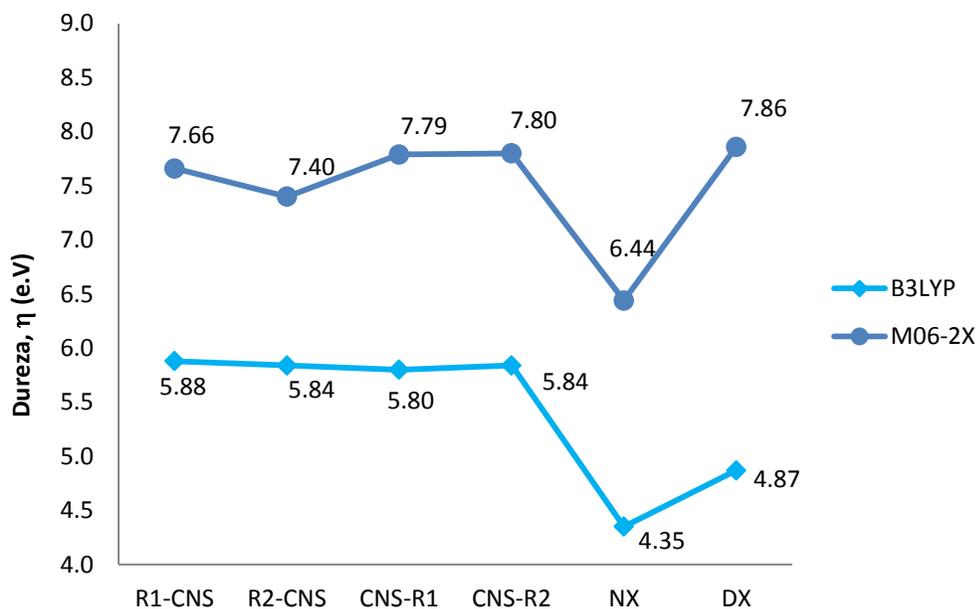
Los antiinflamatorios naproxeno y dexametasona se han analizado como referencia, para comparar la estructura electrónica y la reactividad, así como su efecto sobre citocinas inflamatorias a nivel *in vitro* con respecto a los tetrapéptidos.

DUREZA (η)

De acuerdo al principio de máxima dureza [73] un valor grande de dureza en comparación con otro, sugiere mayor resistencia al cambio en el número de electrones de un sistema, lo que indica que es una molécula más estable y menos reactiva.

Para facilitar el análisis de los resultados, los valores de dureza (η) se muestran en la Tabla VIII y en la Gráfica 3.

El péptido R1-CNS calculado a nivel B3LYP, presentó una mayor dureza con respecto a la molécula CNS-R1 que tiene el mismo aminoácido sustituido en el extremo carboxilo terminal, lo que sugiere que el tetrapéptido CNS-R1 es más reactivo y menos estable en comparación con la molécula R1-CNS; en contraste, a nivel M06-2X el péptido CNS-R1 mostró un valor mayor de dureza con respecto al tetrapéptido R1-CNS, por lo tanto la reactividad y la estabilidad se invierten dependiendo de la sustitución.



Gráfica 3. η vs tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)

Los péptidos R2-CNS y CNS-R2, sustituidos tanto en el extremo amino terminal como en el carboxilo terminal con el aminoácido R2, mostraron a nivel B3LYP un valor semejante de dureza y por lo tanto, la misma reactividad, lo que sugiere que en estas moléculas el sitio donde se sustituye el aminoácido R2 no modifica su reactividad; es decir, presenta un valor semejante de dureza; sin embargo, a nivel M06-2X la molécula CNS-R2 presenta una mayor de dureza en comparación con el péptido R2-CNS, con una menor reactividad para el tetrapéptido sustituido por el aminoácido R2 en el extremo carboxilo terminal.

Comparando los tetrapéptidos sustituidos en el mismo extremo terminal pero con diferente aminoácido, a nivel B3LYP se observó que la molécula R2-CNS sustituida por el aminoácido R2 en el extremo amino terminal es más reactiva, por lo tanto es menos

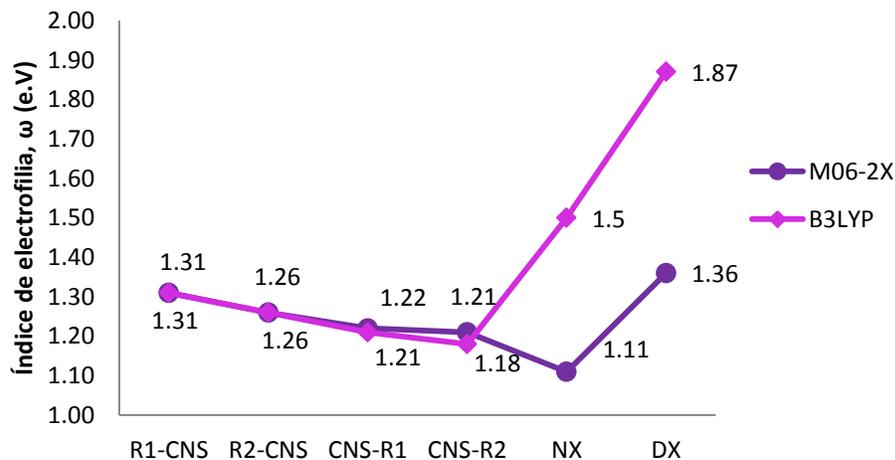
estable que el péptido R1-CNS sustituido por el aminoácido R1 en el mismo extremo, el cual presentó un valor ligeramente mayor de dureza; de igual forma, a nivel M06-2X el péptido más reactivo y menos estable es el R2-CNS. Los valores de dureza a nivel B3LYP y M06-2X de los péptidos CNS-R1 y CNS-R2 sustituidos en extremo carboxilo terminal sugieren que la molécula que contiene el aminoácido R1 es más reactiva en comparación con el péptido que contiene al sustituyente R2.

En general, a nivel B3LYP el péptido R1-CNS es el menos reactivo y el más estable, de las cuatro moléculas analizadas; de forma contraria esta estabilidad y reactividad a nivel M06-2X se observó en el tetrapéptido CNS-R2 debido a que reveló el valor más alto de dureza de los cuatro péptidos estudiados.

En el caso de las moléculas de naproxeno y de dexametasona (Tabla VIII y Gráfica 3), a diferencia de los péptidos, los valores de dureza entre funcionales mantienen una tendencia similar; no obstante el funcional B3LYP subestima los valores de dureza con respecto al funcional M06-2X.

ÍNDICE DE ELECTROFILIA

La Gráfica 4 muestra los valores del índice de electrofilia de los tetrapéptidos R1-CNS, CNS-R1, R2-CNS y CNS-R2 calculados a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)



Gráfica 4. ω vs tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)

El poder electrofílico global de los tetrapéptidos cuantificado por el índice de electrofilia (ω), indica que en los dos niveles de cálculo las moléculas peptídicas con mayor capacidad de aceptar carga adicional electrónica son las sustituidas en extremo amino terminal (R1-CNS y R2-CNS), mientras que los péptidos sustituidos en el extremo carboxilo terminal por los aminoácidos (R1 o R2) presentan valores de índice de electrofilia menores.

Al comparar los tetrapéptidos de acuerdo con el tipo de aminoácido sustituido en el mismo extremo terminal, se encontró que tanto a nivel B3LYP como a nivel M06-2X los péptidos con mayor poder electrofílico son el R1-CNS y el CNS-R1 comparados respectivamente con las péptidos R2-CNS y CNS-R2, este resultado sugiere que el aminoácido R1 posiblemente mejora la capacidad de aceptar carga electrónica adicional y por tanto, presenta afinidad por moléculas nucleofílicas [8].

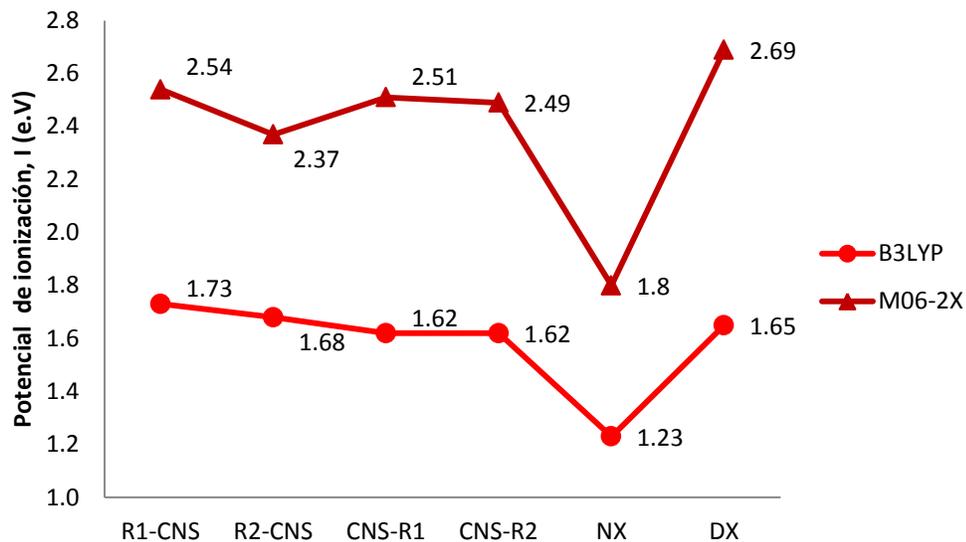
Cabe destacar que los tetrapéptidos presentan una tendencia similar en ambos funcionales, además de valores muy cercanos entre ellos; en contraste las moléculas de naproxeno y dexametasona no muestran el mismo comportamiento ni la similitud en los valores, por lo tanto el índice de electrofilia para moléculas de este tipo no se describe de la misma forma entre los funcionales B3LYP y M06-2X, debido a que presentan una estructura química diferente.

POTENCIAL DE IONIZACIÓN

El potencial de ionización es un descriptor químico global puede relacionarse con la reactividad química de las moléculas, debido a que valores grandes de potencial de ionización en comparación con otros indican un menor efecto oxidativo.

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla VIII y en la Gráfica 5, el péptido R1-CNS presentó en los dos niveles de cálculo valores grandes de potencial de ionización, lo que indica un menor efecto oxidativo comparado con la molécula sustituida en el extremo carboxilo terminal, por lo tanto la molécula CNS-R1 tiene mayor capacidad de perder carga y por consecuencia una mayor reactividad.

Por otra parte el antiinflamatorio naproxeno es la molécula con mayor capacidad de perder carga en comparación con los tetrapéptidos y la dexametasona, lo que sugiere que es una molécula ácida con afinidad por especies con características nucleofílicas [8].

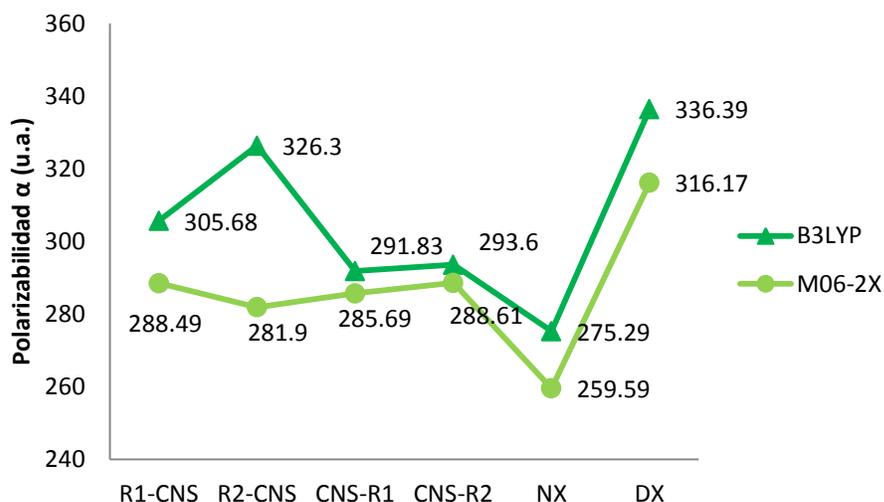


Gráfica 5. I vs tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)

El potencial de ionización presentó el mismo comportamiento en los funcionales B3LYP y M06-2X, indicando que la descripción de la capacidad de perder carga para los péptidos y las moléculas como dexametasona y naproxeno es similar en los dos funcionales, pero cabe mencionar que el funcional B3LYP subestima los valores de este descriptor, lo que significa que proporciona datos pequeños en comparación con los datos proporcionados por el funcional M06-2X, debido a la diferente parametrización entre funcionales [48, 54, 74].

POLARIZABILIDAD

En la Gráfica 6 se presentan los valores de polarizabilidad de los tetrapéptidos R1-CNS, CNS-R1, R2-CNS y CNS-R2 calculados, a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p).



Gráfica 6. α vs tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p)

La polarizabilidad mide la deformación de la densidad electrónica de una especie química debido a un campo externo en términos de un dipolo eléctrico. Los valores de polarizabilidad a nivel B3LYP, indicaron que la molécula peptídica que presentó una deslocalización mayor de los electrones es el péptido R2-CNS, mientras que los tres tetrapéptidos restantes mostraron una menor formación del dipolo eléctrico; en contraste, el mismo tetrapéptido a nivel M06-2X es la molécula con menor polarizabilidad, esto se puede asociar a que el tetrapéptido R2-CNS a nivel B3LYP exhibió una estructura

más extendida permitiendo una mayor deslocalización de electrones en comparación con el mismo péptido calculado a nivel M06-2X que mostró una estructura menos extendida.

A excepción del péptido antes mencionado, los valores de polarizabilidad entre los funcionales B3LYP y M06-2X siguen una misma tendencia y presentaron valores cercanos entre ambos, por otra parte se destaca que el funcional B3LYP sobrestima los valores del funcional M06-2X, lo cual se asocia a una mejor descripción de interacciones no covalentes por este último funcional [74].

AROMATICIDAD

De acuerdo al valor de aromaticidad presentado por el antiinflamatorio naproxeno y tomando en cuenta las reglas de Baron [75], que indican que si una molécula presenta una aromaticidad $\Delta > 0.15\beta$, (donde β es la energía de resonancia de Hückel con un valor de 2.4 e.V.) que equivale aproximadamente a 0.36 e.V, se considera una molécula que tiene una actividad carcinogénica de moderada a fuerte.

El valor de índice de aromaticidad del naproxeno (0.93 e.V.), indica la posibilidad de que esta molécula presente actividad carcinogénica, debido a que presenta un valor mayor a 0.36 e.V. indicado como el límite de aromaticidad para moléculas que no presentan efecto carcinogénico [74]

Es importante resaltar que este descriptor no se calculó para los tetrapéptidos porque no contienen grupos relacionados con la aromaticidad; por lo tanto, los péptidos como

agentes terapéuticos en comparación con la molécula naproxeno (Figura 12), posiblemente proporcionen menor toxicidad debido a que carecen de la actividad carcinogénica.

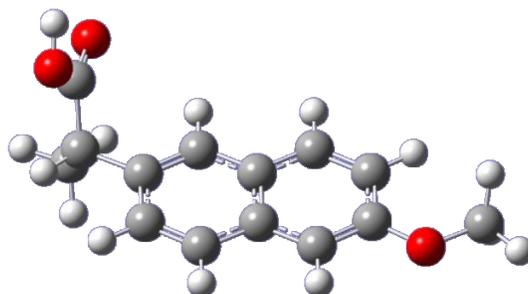


Figura 12. Naproxeno

MOMENTO DIPOLAR TOTAL

En la Tabla IX se muestran los valores de momento dipolar total y de sus componentes de los péptidos R1-CNS, CNS-R1, R2-CNS y CNS-R2 calculados a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p).

Tabla IX. Valor del momento dipolar total y sus componentes de los tetrapéptidos R1-CNS, CNS-R1, R2-CNS y CNS-R2 calculado a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p).

Péptido	B3LYP				M06-2X			
	$\mu(x)$	$\mu(y)$	$\mu(z)$	μ_{TOTAL}	$\mu(x)$	$\mu(y)$	$\mu(z)$	μ_{TOTAL}
	Debyes	Debyes	Debyes	Debyes	Debyes	Debyes	Debyes	Debyes
R1-CNS	-5.02	3.33	5.46	8.13	-5.53	3.17	5.05	8.13
R2-CNS	8.39	-7.52	-0.91	11.30	4.22	-5.42	-2.67	7.37
CNS-R1	-0.49	-0.38	5.49	5.52	-0.55	-2.15	2.58	3.40
CNS-R2	-0.33	-0.36	3.23	3.27	0.53	-1.63	0.72	1.74

El momento dipolar a nivel B3LYP del péptido R1-CNS en el eje-x posee el valor más negativo, este eje involucra átomos de la cadena principal de los aminoácidos asparagina y serina, pero en el caso del péptido CNS-R1, el valor negativo de este eje disminuye, lo que sugiere que el sitio en el que se encuentre el aminoácido R1 influye en la distribución de carga del péptido. De acuerdo con el momento dipolar total a nivel B3LYP y M06-2X, el tetrapéptido R1-CNS presenta mayor cantidad de sitios reactivos respecto a la molécula CNS-R1 debido a que un valor de momento dipolar total alto indica que la molécula posee sitios específicos cargados de forma positiva y/o negativa [44, 47].

El péptido R2-CNS sustituido en el extremo amino terminal con el aminoácido R2, presentó a nivel B3LYP y M06-2X el valor más grande de momento dipolar con respecto al péptido CNS-R2 sustituido en el extremo carboxilo, lo que indica que probablemente la molécula R2-CNS probablemente tiene mayor reactividad que el tetrapéptido CNS-R2; los momentos dipolares pequeños se pueden originar por la conformación de cada péptido, debido a la presencia o ausencia de interacciones entre los átomos, lo que puede provocar que los sitios cargados tanto positivamente como negativamente se encuentren en el mismo eje y por lo tanto se anulen, disminuyendo así la polaridad de la molécula [44].

La variación de los valores del momento dipolar total en las moléculas, también se observó en los datos de $\vec{\mu}$ de los ejes x , y y z , debido a que los datos más negativos correspondientes a los péptidos sustituidos en el extremo amino terminal, se convierten en los menos negativos y se distribuyen en diferentes ejes modificando los posibles sitios activos en los péptidos sustituidos en el extremo carboxilo terminal, lo que sugiere un

cambio en la reactividad de los péptidos debido a que posiblemente los sitios modificados aumenten o disminuyan la afinidad por otra molécula [8, 44, 47].

CARGAS ATÓMICAS

En la Tabla X y XI se presentan las cargas atómicas de N1, H2, N15, O25, O28, N31, S37, H39, también se muestran las cargas de los aminoácidos Cys, Asn, Ser, R1 y R2 de los péptidos R1-CNS, CNS-R1, R2-CNS y CNS-R2 a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p) y M06-2X/6-311++G(2d,2p), respectivamente.

Tabla X. Cargas atómicas de átomos y grupos de tetrapéptidos a nivel B3LYP/6-311++g(2d,2p).

Péptido	N1	H2	N15	O25	O28	N31	S37	H39	Cys	Asn	Ser	R
R1-CNS	-0.844	0.323	-0.719	-0.606	-0.851	-0.534	-0.402	-0.270	0.085	0.056	-0.149	0.009
CNS-R1	-0.610	0.258	-0.785	-0.587	-0.919	-0.593	-0.968	-0.313	0.146	-0.055	-0.026	-0.065
R2-CNS	-0.897	0.352	-0.892	-0.605	-0.916	-0.599	-0.736	-0.266	0.089	-0.021	-0.170	0.102
CNS-R2	-0.623	0.273	-0.776	-0.591	-0.922	-0.590	-0.968	-0.313	0.143	-0.050	-0.030	-0.063

Cargas atómicas de grupos y átomos en u.a

Tabla XI. Cargas atómicas de átomos y grupos de tetrapéptidos a nivel M062X/6-311++g(2d,2p).

Péptido	N1	H2	N15	O25	O28	N31	S37	H39	Cys	Asn	Ser	R
R1-CNS	-0.875	0.329	-0.728	-0.600	-0.877	-0.518	-0.443	-0.259	0.074	0.078	-0.174	0.023
CNS-R1	-0.565	0.228	-0.763	-0.582	-0.863	-0.575	-0.958	-0.284	0.132	-0.051	0.042	-0.122
R2-CNS	-1.063	0.433	-0.898	-0.610	-1.002	-0.536	-0.726	-0.280	-0.008	0.031	-0.176	0.153
CNS-R2	-0.555	0.226	-0.761	-0.588	-0.867	-0.575	-0.954	-0.284	0.131	-0.060	0.044	-0.116

Cargas atómicas de grupos y átomos en u.a

En los resultados obtenidos de las cargas atómicas, se observó que la del N1 del aminoácido central asparagina se modifica en mayor medida cuando el sustituyente R1 o R2 se localiza en el extremo amino terminal, en contraste, la carga atómica del átomo S37 que pertenece al aminoácido cisteína, se afectó cuando el sustituyente se coloca en el extremo carboxilo terminal.

La variación del valor de las cargas atómicas depende del sitio de sustitución del cuarto aminoácido en los valores de carga de los átomos N1 y S37, se observó de igual forma aunque en menor medida en las cargas de los grupos Cys, Asn, Ser, R1 y R2.

Las cargas atómicas negativas de los átomos N1, N15, O25, O28, N31, S37, sugieren que los cuatro tetrapéptidos son susceptibles a un ataque electrofílico en estos átomos.

En algunos átomos y grupos dependen de la sustitución del grupo R, lo cual concuerda con la variación observada en los valores del momento dipolar total; cuando el aminoácido R1 o R2 se encuentra en el extremo amino terminal, el valor de momento dipolar total y los valores de carga de los átomos y grupos previamente mencionados son grandes en comparación con los valores de los péptidos sustituidos en el extremo carboxilo.

ISOSUPERFICIES DE LOS ORBITALES MOLECULARES HOMO-LUMO

En la Tabla XII se muestran las isosuperficies de los orbitales moleculares HOMO y LUMO de los tetrapéptidos CNS-R1, CNS- R2, R1-CNS, R2-CNS, dexametasona y naproxeno a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p).

Los sitios reactivos del orbital HOMO en los cuatro tetrapéptidos se ubican en el aminoácido cisteína, lo que sugiere que el extremo en el que se sustituye el aminoácido R1 o R2 no influye en la posición del orbital HOMO. Dicho orbital indica la presencia de densidad electrónica, por lo tanto el aminoácido cisteína en los cuatro péptidos es un sitio de interacción susceptible a un ataque electrofílico, esto concuerda con los valores de cargas atómicas negativos presentes en el átomo S₃₇ (Tabla X).

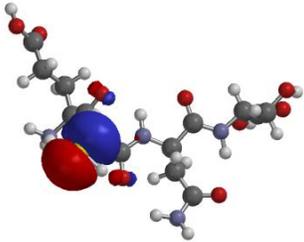
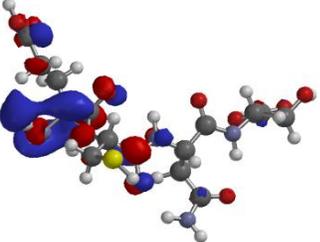
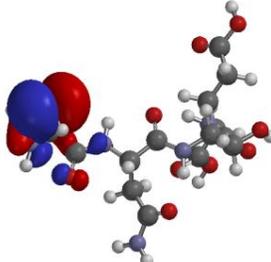
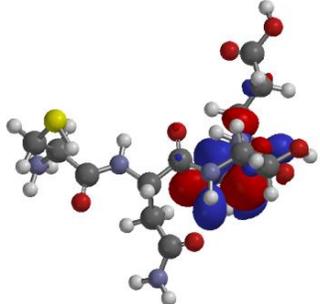
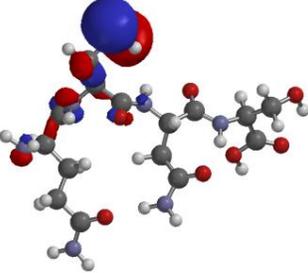
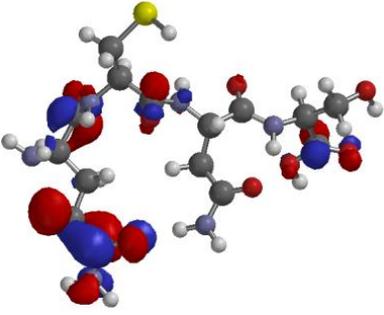
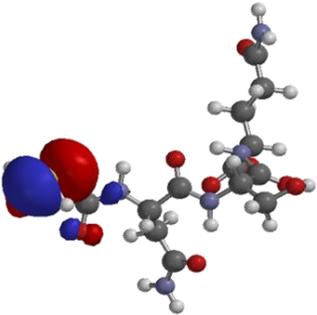
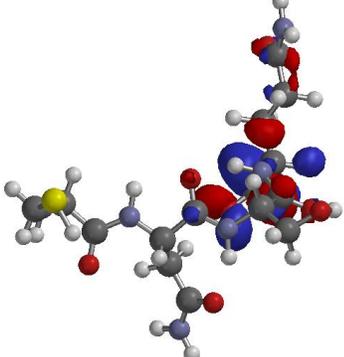
La isosuperficie del orbital LUMO de los péptidos sustituidos en el extremo amino terminal, se localiza en el esqueleto principal del aminoácido cisteína y en la cadena lateral del sustituyente; en contraste, los péptidos sustituidos en el extremo carboxilo terminal exhibieron la isosuperficie del orbital LUMO en el grupo carboxilo del aminoácido sustituido y en menor medida en la cadena lateral. El orbital LUMO indica deficiencia de densidad electrónica, por lo que los tetrapéptidos son propensos a un ataque nucleofílico en los sitios antes mencionados.

El orbital HOMO de la dexametasona se localiza en la parte de la estructura tipo quinona, probablemente se debe a la deslocalización electrónica de los dobles enlaces cercanos y a los pares libres de electrones del oxígeno. La isosuperficies del orbital LUMO de la dexametasona indica, que en el mismo lugar donde se localiza el orbital HOMO también existen sitios deficientes de electrones esto puede originar el carácter electronegativo del átomo de flúor que se encuentra cerca.

El naproxeno presenta la isosuperficie del orbital HOMO en los anillos aromáticos, posiblemente a causa de la deslocalización electrónica; sin embargo, la deficiencia de

electrones indicada por las isosuperfices del orbital LUMO se localizan también en los anillos aromáticos, lo que sugiere que probablemente los grupos unidos a los anillos producen sitios deficientes de densidad electrónica, por lo tanto, este sitio en la molécula podría presentar tanto ataques nucleofílicos como electrofílicos.

Tabla XII. Isosuperficies de los orbitales moleculares HOMO-LUMO a nivel B3LYP/6-311+G(d,p)

Molécula	HOMO	LUMO
R1-CNS		
CNS-R1		
R2-CNS		
CNS-R2		

Continuación de la Tabla XII. Isosuperficies de los orbitales moleculares HOMO-LUMO de los fármacos antiinflamatorios a nivel B3LYP/6-311+G(d,p)

Molécula	HOMO	LUMO
Dexametasona		
Naproxeno		

ISOSUPERFICIES DEL POTENCIAL ELECTROSTÁTICO

En la Tabla XIII se muestran las isosuperficies del potencial electrostático de los tetrapéptidos y los fármacos antiinflamatorios a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p).

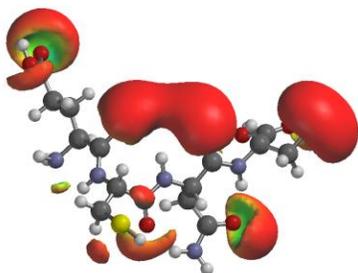
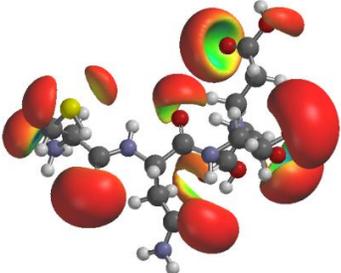
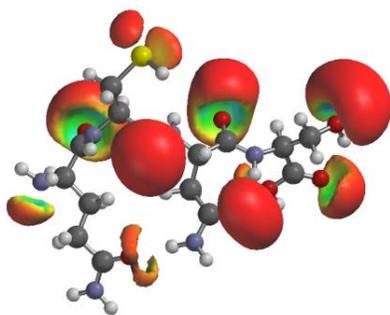
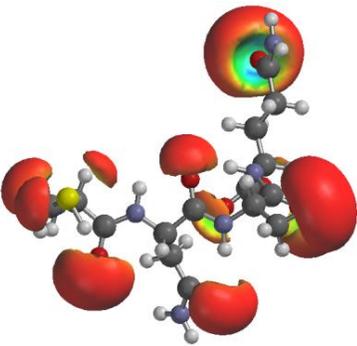
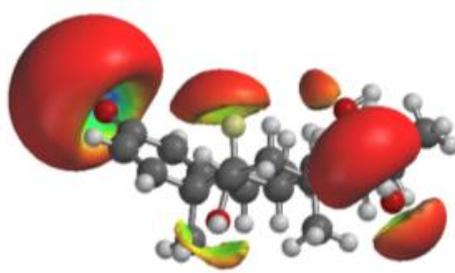
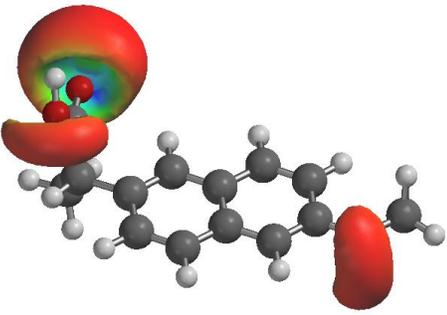
Las isosuperficies del potencial electrostático ilustraron la localización de la densidad electrónica; para las cuatro moléculas peptídicas, la densidad electrónica se observó en todos los átomos de oxígeno, en el átomo de azufre y en el átomo de nitrógeno que pertenece al grupo amino del aminoácido cisteína o del sustituyente en el extremo amino terminal.

Las isosuperficies del potencial electrostático del fármaco dexametasona mostrados en la Tabla XIII, se ubican especialmente en el oxígeno de la parte tipo quinolona, así como también en los demás átomos de oxígeno y en el flúor.

La isosuperficie del potencial electrostático del naproxeno indica que la densidad electrónica se deslocaliza en los átomos de oxígeno presentes en la molécula.

Relacionando la dureza con el potencial electrostático, se observó que las moléculas naproxeno y dexametasona muestran densidad electrónica solo en pocos átomos electronegativos y los valores de dureza son pequeños en comparación con los valores de los péptidos; en contraste, la densidad electrónica de los tetrapéptidos (Tabla XIII) está distribuida a lo largo de la estructura y los valores de dureza son altos respecto a los valores de los antiinflamatorios; por lo tanto, la distribución de la densidad electrónica a lo largo de la estructura favorece la estabilidad y disminuye la reactividad.

Tabla XIII. Isosuperficies del potencial electrostático de los tetrapéptidos y fármacos antiinflamatorios a nivel B3LYP/6-311+G(d,p).

Molécula	Isosuperficies	Molécula	Isosuperficies
R1-CNS		CNS-R1	
R2-CNS		CNS-R2	
Dexametasona		Naproxeno	

8.2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

El efecto sobre las citocinas inflamatorias de los péptidos CNS-R1 y el CNS-R2 se determinó a través de la medición de las concentraciones de algunas citocinas tales como: IL-1 β , IL-6 e IL-10 en cultivos celulares “*in vitro*”. Y se empleó la dexametasona como fármaco control con actividad antiinflamatoria conocida.

Las concentraciones empleadas en los tratamientos de las células con los péptidos en estudio, se establecieron previamente y correspondió a 100 ng/mL. Los péptidos tienen 96% de pureza y están libres de endotoxinas de acuerdo a los estándares de calidad del comerciante (American Peptide Co., Sunnyvale, CA, USA). Cada uno de los péptidos se disolvió en PBS y se le realizó la prueba de actividad de endotoxinas empleando el sistema comercial de detección de endotoxinas Endosafe®-MCS™ (Charles River Endosafe Inc., Charleston, SC, USA) y se estimó en ≤ 0.0625 UIEmL/endotoxina.

La cuantificación de citocinas se llevó a cabo utilizando un Kit comercial de ELISA (Thermo Fisher Scientific Inc. USA), en el sobrenadante de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) estimuladas con 10 ng/mL de lipopolisacárido *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 (SIGMA); posteriormente las células se trataron con los péptidos en estudio.

La nomenclatura de los gráficos, es la siguiente:

- La primera letra indica el tipo de estímulo, por lo tanto la letra L indica si las células se estimularon con lipopolisacáridos (L);
- Las células que no se estimularon se nombraron células control (C);
- Las abreviaturas elegidas para cada fármaco y péptido, son DX para dexametasona, R1 y R2 como los péptidos CNS-R1 y CNS-R2 respectivamente.

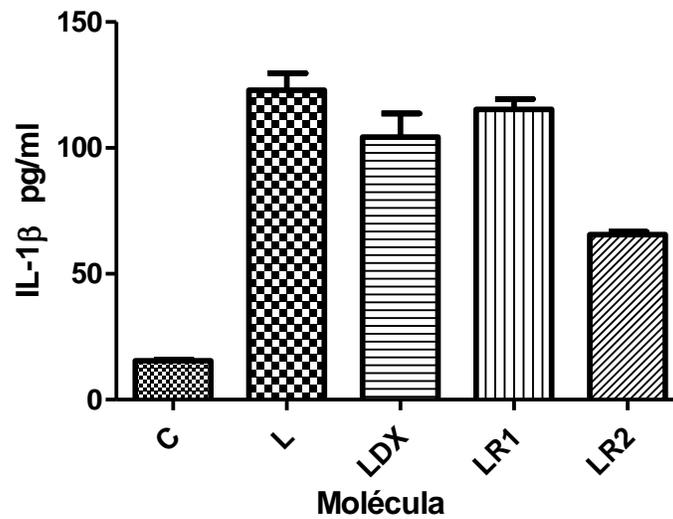
Análisis estadístico

Para evaluar los datos obtenidos con la técnica de ELISA, se utilizó el programa estadístico Graphpad prism 6.01, en el que se realizó regresión lineal, error estándar, media y t de Student para pruebas relacionadas.

Cada experimento se realizó por triplicado y la significancia estadística se determinó con la prueba t de Student. Los datos representan el valor promedio \pm error estándar. Todos los valores de p citados son de dos colas, y las diferencias se consideraron significativas para $p < 0.05$.

Resultados de las cuantificaciones de la ILs evaluadas

La Gráfica 7 muestra las concentraciones de IL-1 β , que es una citocina proinflamatoria arquetipo. La concentración de la citocina IL-1 β en las células control es menor, a la concentración de las células estimuladas con LPS; por lo que el modelo utilizado en este estudio es funcional.



Grafica 7. Concentración de IL-1 β en células mononucleares de sangre periférica. Células control (C), células estimuladas con lipopolisacáridos (L), células tratadas con dexametasona (LDX) y los nuevos péptidos (LR1, LR2).

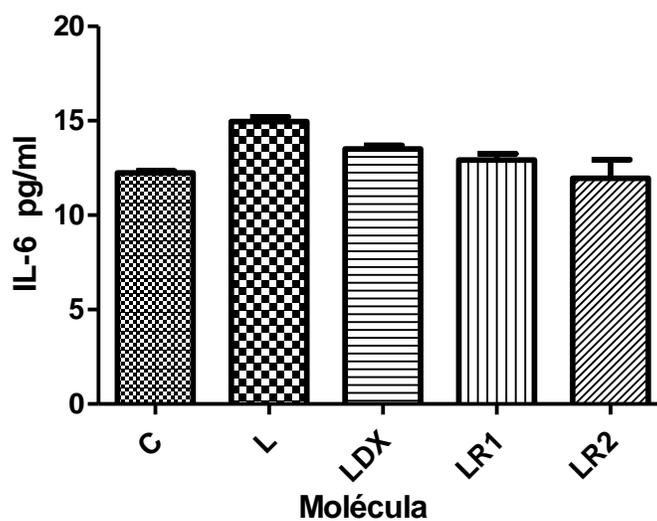
Al realizar el análisis del efecto producido por las moléculas en estudio sobre la citocina IL-1 β , se encontró que el glucocorticoide dexametasona presentó un efecto inhibitorio mínimo en la liberación de esta interleucina en las células estimuladas con LPS, este resultado difiere con lo reportado por D. Franchimont [76] ya que describió que la síntesis de IL-1 β se inhibió casi completamente con una concentración de dexametasona de 100 nM a 10 μ M; ello se puede deber al modelo empleado, ya que los autores antes referidos usaron un cultivo de células de sangre entera, además de que el fármaco se adicionó junto con el estímulo.

En lo referente al tetrapéptido CNS-R1, se observó una actividad inhibitoria no significativa sobre la liberación de IL-1 β con respecto a la del glucocorticoide

dexametasona, lo que sugiere que el tetrapéptido con el aminoácido R1 no inhibe la liberación de la IL-1 β en las células estimuladas con LPS.

El péptido CNS-R2 inhibió la síntesis de IL-1 β en comparación con la dexametasona y el tetrapéptido CNS-R1, lo que indica que el péptido CNS-R2 probablemente participe en la regulación de la síntesis de esta citocina en las células estimuladas con LPS.

En la Gráfica 8 se presenta el efecto producido por la dexametasona y los tetrapéptidos CNS-R1 y CNS-R2 sobre la concentración de IL-6 (citocina pro y antiinflamatoria).



Gráfica 8. Concentración de IL-6 en células mononucleares de sangre periférica. Células control (C), células estimuladas con lipopolisacáridos (L), células tratadas con dexametasona (LDX) y los nuevos péptidos (LR1, LR2).

El aumento de la concentración de la IL-6 en las células estimuladas con lipopolisacárido con respecto al control es mínimo; sin embargo, el aumento en los niveles de la interleucina fue significativo para la liberación de esta proteína.

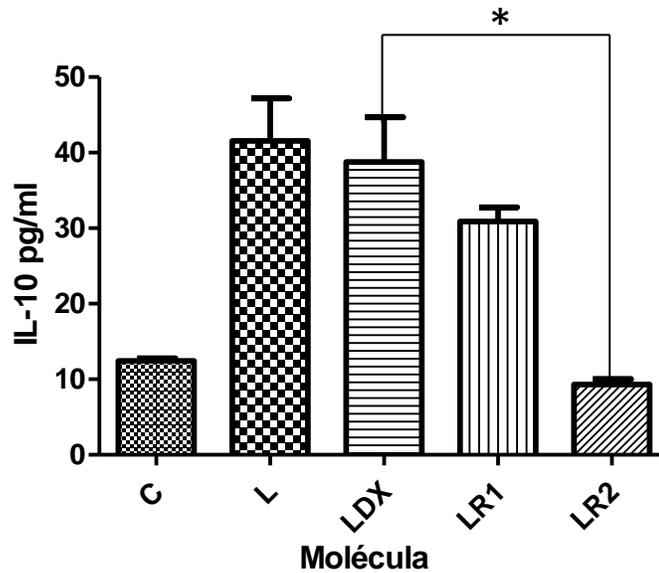
El glucocorticoide dexametasona inhibió la liberación de la IL-6, este resultado concuerda con lo descrito previamente [76] para este fármaco; cuyo efecto es dosis-dependiente para la regulación de las citocinas pro inflamatorias con diferentes estímulos [77].

Con el tetrapéptido CNS-R1 se observó mayor efecto inhibitorio en la producción de IL-6 en comparación con la dexametasona, lo que sugiere que el tetrapéptido CNS-R1 probablemente participa en la regulación de esta citocina vía TLR4.

El péptido CNS-R2 inhibió más la síntesis de IL-6 que el glucocorticoide y el péptido CNS-R1; lo que indica que el aminoácido R2 mejora la actividad inhibitoria de esta citocina en células estimuladas con LPS.

En la Gráfica 9 se muestra el efecto de la dexametasona y los tetrapéptidos CNS-R1 y CNS-R2 sobre la IL-10 en PBMC.

Como se muestra en la Gráfica 9 la dexametasona presentó un efecto inhibitorio mínimo de la liberación de IL-10 en células estimuladas con LPS.



Gráfica 9. Concentración de IL-10 en células mononucleares de sangre periférica. Células control (C), células estimuladas con lipopolisacáridos (L), células tratadas con dexametasona (LDX) y los nuevos péptidos (LR1, LR2). *Denota inhibición significativa comparada con la producida por la dexametasona.

El tetrapéptido CNS-R1 inhibió más la producción de IL-10 en comparación con la dexametasona, lo que sugiere que el péptido CNS-R1 podría actuar sobre la liberación de la citocina IL-10.

El péptido CNS-R2, inhibió significativamente la síntesis de IL-10 con respecto a la dexametasona y el tetrapéptido CNS-R1. De acuerdo con lo antes mencionado el aminoácido R2 colocado en el extremo carboxilo terminal posiblemente mejora la inhibición de la citocina antiinflamatoria en comparación con el péptido que contiene el aminoácido R1.

Relacionando los resultados computacionales con la actividad *in vitro*, se observó que la cadena lateral del aminoácido R2 hace más estable al péptido, de tal manera que un sustituyente con características electroattractoras, modificó las propiedades fisicoquímicas y de reactividad química en este tipo de péptidos y consecuentemente su funcionalidad biológica; de ahí que en los datos experimentales se observó que el péptido CNS-R2 es más eficiente en la inhibición de la síntesis de las citocinas evaluadas.

9. CONCLUSIONES

El estudio computacional de las propiedades estructurales, fisicoquímicas y electrónicas de los nuevos tetrapéptidos y su efecto sobre las citocinas inflamatorias *in vitro* permitieron concluir que:

- La posición y tipo de sustituyente modifica la estructura electrónica, las propiedades fisicoquímicas, la reactividad química y la funcionalidad biológica de los tetrapéptidos.
- Los descriptores químico cuánticos muestran la influencia de las propiedades electroattractoras del sustituyente.
- El péptido CNS-R2 es más eficiente en la inhibición de la síntesis de las citocinas evaluada con respecto al tetrapéptido CNS-R1.
- Los funcionales B3LYP y M06-2X muestran tendencias similares en algunas propiedades estructurales, electrónicas y de reactividad química de los péptidos.

10. PERSPECTIVAS

- Ampliar el estudio con otros sustituyentes de tipo electroattractor en el extremo carboxilo terminal, para potenciar el efecto.
- Incluir el efecto del solvente en los estudios teóricos.
- Es importante continuar con los pruebas *in vitro* empleando otros mediadores y modelos inflamatorios; además de modificar la concentración del péptido CNS-R2; asimismo, emplear otros controles farmacológicos tales como el naproxeno.
- Será útil también llevar a cabo la evaluación experimental del péptido con el sustituyente en el extremo amino terminal, para tener un panorama completo de la relación teórico-experimental.

11. REFERENCIAS

1. Pratt C, Cornely K. Bioquímica. 2^aed. México: El manual moderno; 2012.
2. Sato AK, Viswanathan M, Kent RB, Wood CR. Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Curr. Opin. Biotechnol* 2006; 6(17): 638-642.
3. Park D, Hou X, Sweedler JV, Taghert PH. Therapeutic peptide production in *Drosophila* peptides. 2012; 36(2): 251-256.
4. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* 2010; 1-2(15):40-56.
5. Jensen K. Peptide and protein design for biopharmaceutical applications. United Kingdom: John Wiley & sons Ltd; 2009.
6. Whitford D. Proteins: structure and function. England: John Wiley & Sons Ltd; 2005.
7. Delgado A, Minguillón C, Joglar J. Introducción a la química terapéutica. 2^a ed. España: Ediciones Díaz de Santos; 2003.
8. Wade L. Química Organica. 5^a ed. Madrid: Pearson Educación ; 2004.
9. Buorne PE, Weissing H. Structural Bioinformatics. John Wiley & Sons, inc. 2005.
Doi:10.100210471721204
10. Ganellin R, Stanley M, Jefferies R. Introduction to Biological and Small Molecule. Elsevier; 2013.

11. Ho B, Thomas A, Brasseur R. Revisiting the ramachandran plot: Hard-sphere repulsion, electrostatics, and H-bonding in the α -helix. *Protein Science*; 12: 2508-2522.
12. Voet D, Voet J. *Bioquímica*. 3^a ed. Buenos Aires: Panamericana; 2006.
13. C. H. Görbitz. Structures of dipeptides: the head-to-tail story. *Acta Cryst.* 2010; B66: 84-93.
14. Bryan A, Joseph L, Bennett JA, Jacobson HI, Andersen TT. Design and synthesis of biologically active peptides: A 'tail' of amino acids can modulate activity of synthetic cyclic peptides. *Peptides* 2011; 12(32): 2504-2510.
15. Kretschmer RR, Rico G, Giménez JA. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol* 2001; 2(112): 201-209.
16. Soriano-Correa C, Sánchez-Ruiz JF, Rico-Rosillo G, Giménez-Scherer JA, Velázquez JR, Kretschmer RR. Electronic structure and physicochemical properties of the anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica*: A theoretical study. *Theochem* 2006; 1-3(769): 91-95.
17. Morales-Martínez ME, Silva-García R, Soriano-Correa C, Giménez-Scherer JA, Rojas-Dotor S, Blanco-Favela F, et. al. The Cys-Asn-Ser carboxyl-terminal end group is the pharmacophore of the amebic anti-inflammatory monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF). *Mol. Biochem. Parasitol* 2008; 1(158): 46-51.
18. Barrientos-Salcedo C, Rico-Rosillo G, Giménez-Scherer JA, Soriano-Correa C. Computational study of the electronic structure characterization of a novel anti-

- inflammatory tripeptide derived from monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF)-pentapeptide. *Eur J Med Chem* 2009; 44(8):3114-3119.
19. Soriano-Correa C, Barrientos-Salcedo C, Raya A, Rubio Póo C, Esquivel R. The influence of electron donor and electron acceptor groups on the electronic structure of the anti-inflammatory tripeptide Cys-Asn-Ser. *Int J Quantum Chem* 2010; 110(13); 2398-2410.
 20. Soriano-Correa C, Olivares del Valle FJ, Muñoz Losa A, Fernandez Galval I, Martín ME, Aguilar MA. Theoretical study of the competition between intramolecular hydrogen bonds and solvation in the Cys-Asn-Ser Tripeptide. *J. Phys. Chem.* 2010; 27(114): 8961-8970.
 21. Das U. *Molecular Basis of health an disease*. India: Springer; 2011.
 22. Jankowski Janusz. *Inflammation and gastrointestinal cancer Vol. 185*. London: Springer; 2011.
 23. Serhan C, Ward P, Gilroy D. *Fundamentals of inflammation*. Unite States: Cambridge University Press; 2010.
 24. Ulbrich H, Eriksson E, Lindbom L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 12(24): 640-647.
 25. Elgazzar A. *The pathophysiologic basis of nuclear medicine*. 2^aed. Germany: Springer; 2006.

26. Ira Tabas, Christopher K. Glass. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*. 2013; 339: 166-172. Doi: 10.1126/science.1230720
27. Okin D, Medzhitov R. Evolution of Inflammatory Diseases. *CurrBiol* 2012; 17(22): R733-R740.
28. Barrero O, Martín P, González R, Sánchez F. Molecular cues guiding inflammatory responses Review. *Cardiovascular Research* 2010; 86(2): 174-182.
29. Méndez C, Hernán C. *Patología Humana Básica Aplicada a rehabilitación*. Colombia: Centro Editorial Universidad del Rosario; 2002.
30. Sprague A, Khalil R. Inflammatory Cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009; 78(6): 539-552.
31. Jun-Ming Zhang, Jianxiong An. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007; 45(2): 27-37. Doi: 10.1097/AIA.0b01e318034194e
32. Wibke Schulte, Jürgen Bernhagen, Richard Bucala. Cytokines in sepsis: Potent immunoregulators and potential therapeutic targets-An updated view. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 1-16. Doi: 10.1155/2013/165974
33. Tapping R. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors Review. *Semin. Immuno* 2009; 21: 175-184.
34. Caroline Ospelt, Steffen Gay. TlrS and Chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 42 (4): 495-505.
35. Aisling Dunne, Neil A. Marshall, Kingston H. G. Mills. TLR based therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11 (4): 404-411.

36. Domínguez A, Zentella A, Velázquez J. Control molecular de la inflamación: Regulación de los receptores tipo toll. *REB* 2009; 28(4): 125-131.
37. Harris R. Inflammation in the pathogenesis of chronic diseases. Unite States: Springer; 2007.
38. Gupta S, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal B. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy Review. *Acta Biochim Biophys* 2010; 1799: 775-787.
39. Xin W, Huang C, Zhang X, Zhang G, Ma X, Sun L, et al. Evaluation of the new anti-inflammatory compound ethyl salicylate 2-O- β -D-glucoside and its possible mechanism of action. *Int Immunopharmacol* 2013; 15: 303-308.
40. Saklatvala J. Glucocorticoids: do we know how they work?. *Arthritis Res* 2002; 4(3): 146-150.
41. Wang X, Nelin L, Kuhlman J, Meng X, Welty S, Liu Y. The role of MAP kinase phosphatase-1 in the protective mechanism of dexamethasone against endotoxemia. *Life Sci* 2008; 83(10-20): 671-680.
42. Joanny E, Ding Q, Gong L, Kong P, Saklatvala J, Clark A. Anti-inflammatory effects of selective glucocorticoid receptor modulators are partially dependent on up-regulation of dual specificity phosphatase 1. *Br J Pharmacol* 2012; 165(4b): 1124-1136.
43. Ana C. Liberman, Jimena Druker, Marcelo J. Perone, Eduardo Arzt. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18 (1-2): 45-56.

44. Foresman J, Frisch AE. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods. 2^aed. United States: Gaussian, Inc; 1996.
45. Jensen F. Introduction to computational chemistry. 2^aed. England: Wiley; 2007.
46. Ramachandran K., Deepa G., Namboori K. Computational Chemistry and Molecular Modeling. Germany: Springer; 2008.
47. Lewars E. Computational Chemistry. 2^aed. Canada: Springer; 2011.
48. Levine I. N. Química Cuántica. 5^a ed. España: Pearson; 2001.
49. W. Kohn, L. J. Sham. Phys. Rev. 1965; 140 (4A): A1133-A1138
50. John P. Perdew, Wang Yue. Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy: Generalized gradient approximation. Phys. Rev. 1986; 33 (12): 8800-8802.
51. A. D. Becke. Density-functional Exchange energy approximation with correct asymptotic-behavior. Phys. Rev. 1988; 38 (6): 3098-100.
52. Chengteh Lee, Weitao Yang, Robert G. Parr. Development of the Colle-Salvetti correlation energy formula into a functional of the electron density. Phys. Rev. 1988; 37 (2): 785-788.
53. John P. Perdew. Density-functional approximation for the correlation energy of the in homogeneous electron gas. Phys. Rev. 1986; 33 (12): 8822-8824.
54. Yan Zhao, Donald G. Truhlar. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states and transition elements: two new functionals and systematic testing of four

- M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor Chem. Account* 2008; 120: 215-241.
55. Soriano C. Theoretical study of anti-Lepra agents. Tesis de Maestría en Química, UAM-iztapalapa. 1997.
56. Chattara P, Ranjan D. Electrophilicity Index, Update 2. *Chem Rev* 2011; 111: 43-75.
57. Parr R, Yang W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Unite State: Oxford University Press, Inc; 1989.
58. Sen k, Jorgensen C. Collection: Structure and Bonding 66, Electronegativity. New York: Springer-Verlag; 1987.
59. Parr R, Szentpály L, Liu S. Electrophilicity Index. *J. Am. Chem. Soc.* 1999; 121: 1922-1924.
60. Haghi A. *Modern Trend in chemistry and chemical engineering*. Apple Academic Press Inc; 2012.
61. Carey F, Sundberg R. *Advanced Organic Chemistry*. 5^aed. Unite States: Springer; 2007.
62. James X. Mao. Atomic charges in molecules: A classical concept in modern computational chemistry. *PostDocJournal* 2014; 2 (2): 15-18.
63. Lavrenko P, Mikriukava O, Okatora O. On the separation ability of various ficoll gradient solutions in zone centrifugation. *Analitical Biochemistry* 1987; 166: 287-297.
64. Roitt B, Martin D. *Essential Immunology*. 12^aed. Unite Kingdom: John Wiley & Sons Ltd; 2011.

65. Paulie S, Perlmann H, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. *Els* 2006.DOI: 10.1038/npg.els.0004021
66. Crowther J. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). En: *Molecular Biomethods Handbook*. Unite State: Humana Press; 2008: 657-85.
67. Maltzan K, Pruett S. ELISA assays and alcohol: increasing carbon chain length can interfere with detection of cytokines. *Alcohol* 2011; 45: 1-9.
68. C. Ramakrishnan, G. N. Ramachandran. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformation: II allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys. J.* 1965; 5 (6): 909-933.
69. Thomas J. Kistenmacher, George A. Rand, Richard E. Marsh. Refinements of the crystal structures of DL-Serine and Anhydrous L-Serine. *Acta Cryst.* 1974; B30: 2573-2578.
70. M. Ramanadham, S.K. Sikka, R. Chidambaram. Structure of L-Asparagine Monohydrate by Neutron Diffraction. *Acta Cryst.* 1972; 3000-3005.
71. (a) K. Ann Kerr, J. Patrick Ashmore, *Acta Cryst.* 1973; B29: 2124-2127.
(b) K. Ann Kerr, J. Patrick Ashmore, *Acta Cryst.* 1975; 831: 2022-2026.
72. Jacques J. Verbist, Mogens S. Lehmann, Thomas F. Koetzles, Walter C. Hamilton. Precision neutron diffraction structure determination of protein and nucleic acid componets. VI. The crystal and molecular structure of the amino acid L-Asparagine Monohydrate. *Acta Cryst.* 1972; B28: 3006-3013.
73. Ralph G. Pearson. The principle of Maximun Hardness. *Acc. Chem. Res.* 1993; 26: 250-255.

74. Yan Zhao, Donald G. Truhlar. Density functionals with broad applicability in chemistry. *Acc. Chem. Res.* 2008; 41 (2): 157-167.
75. P. M. V. B. Barone, A. Camilo, Jr., D. S. Galvao. Theoretical approach to identify carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Phys Rev Lett* 1996; 77 (6): 1186-1189.
76. D. Franchimot, E. Louis, W Debe, H. Marlens. Effects of dexamethasone on the profile of cytokine secretion in human whole blood cell cultures. *Regulatory peptides* 1998; 73: 59-65.
77. Tom L. Rowland, Simon M. McHoug, John Deighton, Rebecca J. Dearman, Pamela W. Ewan, Ian Kimber. *Immunopharmacol* 1998; 40: 11-20.