



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“ESTUDIO COMPUTACIONAL DE PÉPTIDOS
ANTIINFLAMATORIOS Y ENSAYOS DE SU EFECTO *IN
VITRO*”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JUAN ANDRES ALVARADO SALAZAR

DIRECTORA:

DRA. CATALINA SORIANO CORREA



México, DF, Abril, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos Institucionales

- Al Área de Química Computacional y Modelado Molecular de la Carrera de QFB, Laboratorio A-508B, FES Zaragoza UNAM. 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 FES 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 las supercomputadoras KanBalam y Miztli.
- Laboratorio de Química Médica y Quimiogenómica, Facultad de Bioanálisis Campus Veracruz-Boca del Río, Universidad Veracruzana.
- Laboratorio de Biología Celular, Molecular, Genética e Inmunología Molecular del Instituto de Investigaciones Médico-Biológicas, Universidad Veracruzana.

Agradecimientos

Esta parte es, sin duda, la que está resultando ser la más difícil de escribir. Tal vez sea, porque son tantas las personas a las que debo estar agradecido que cuesta saber por dónde empezar y que orden seguir sin desmeritar a cada uno de ellos.

En primer lugar doy gracias Dios por haberme permitido vivir hasta este día, haberme guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi apoyo, mi luz y mi camino. Por haberme dado la fuerza para seguir adelante en aquellos momentos de debilidad y por haberme brindado una vida llena de aprendizajes, experiencias, tristezas y felicidad.

A mi directora de tesis, Dra. Catalina Soriano Correa, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado este trabajo, por su paciencia en mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino y llegar a la conclusión del mismo. Cuya experiencia y educación ha sido mi motivación para seguir todo este tiempo y en especial por sus consejos y amistad; mi respeto y admiración.

A la Dra. Carolina Barrientos Salcedo, un especial agradecimiento por haberme recibido en su grupo de investigación en la Universidad Veracruzana. Por sus consejos, sabiduría, apoyo y ánimo que me brindo durante mi estancia donde he tenido la oportunidad de aprender y realizar una parte de este trabajo.

Mis agradecimientos para mis sinodales, quienes con sus acertados consejos, profesionalismo y tiempo enriquecieron este trabajo y de quienes me quedo grandes aprendizajes. Gracias: QFB. Thalía Nova Torres Nava, Dr. Ángel Rojas Zamorano y Dr. Arturo Valle Mendiola.

Un especial agradecimiento a la Mtra. Tere, de quien recibí un total e incondicional apoyo desde mí llegada a la FES Zaragoza, quien hizo que me sintiera en esta facultad como en mi casa. Por su gran sabiduría, confianza, profesionalismo y consejos; y sin duda, es una de las personas que hicieron posibles culminar esta etapa de mi vida, gracias.

A todos mis maestros. Gracias por todo el apoyo brindado a lo largo de la carrera, por su tiempo, amistad y por los conocimientos que me transmitieron.

Te doy las infinitas gracias mi hermosa y bella esposa “Blanquis”, porque sin ti y sin tu ayuda no habría acabado la Tesis. Gracias por hacerme reír, por consolarme, por alegrarte conmigo, por los viajes hechos y los que aún estamos por hacer, por aguantarme en mi pesadez y mal humor, por aceptarme como soy, por levantarme el ánimo cuando lo tengo por los suelos “ponte chingón, dices”, por platicar y caminar tomados de la mano, por cuidarme con tu cariño, por ser la sal que condimenta mi vida, por tu amor...

Tantas son las razones que no acabaría. Por todas ellas gracias Blanca Estela Torres Cabrera. “Te amo mi vida hermosa, tu amado y valiente esposo”

Agradezco a mi familia que me haya apoyado tanto y sin contemplaciones durante todo este tiempo, y que me hayan aguantado en mis horas más bajas, cuando más irritable e insoportable estaba. A mi tía Guadalupe Alvarado Salazar que ha sido y siempre será como mi madre, por estar aquí siempre, por su cariño, su apoyo, su comprensión, sus consejos, sus regaños y su amor. Gracias, por dejarme tan sólo la responsabilidad de estudiar y ser un hombre de bien, este triunfo quiero que sepas que es tuyo también.

A mí hermano Humberto Alvarado Salazar por dialogar, por pelear, por no estar de acuerdo, pero al final aprender a entender otros puntos de vista. Sobre todo, que aparte de ser mi hermano eres mi amigo, mi cómplice, mi confidente y por acompañarnos siempre...”tú eres el único que puedes entender el significado de este “siempre”, te amo mi gordito”. A Yair Alvarado Salazar, por aprender de él el significado de volar, el coraje y valentía que se requieren para navegar en esta vida. Espero ser un buen hermano y un buen ejemplo para ustedes mi gordito y en especial para ti chino. Siempre recuerden que Dios da las grandes pruebas de la vida, a las grandes personas. Los amo... Lupita, Beto y Yair.

A toda mi familia, quienes han sido como mi padre y madre, gracias por su apoyo incondicional moral y económico ya que sin él esto no hubiera sido posible, por sus alientos a seguir adelante, este logro es de todos nosotros.

Les agradezco de todo corazón a mis suegros Miguel Torres y Clara Cabrera, porque gracias a ustedes compartiré mi vida con el ser más maravillo que es su hija. También gracias por abrirme las puertas de su casa y en especial por aceptarme como un miembro más de la familia, por todos los consejos, por los gestos de amabilidad y cariño que siempre tienen para mí, por soportarme en mi pesadez. Miguelón y Clarita, son el ejemplo de que el barco de la vida se navega hacia delante y no en círculos. Los quiero mucho.

Dedicatoria

Dedicado a ustedes, quienes son parte fundamental de mi vida y que hoy no se encuentran físicamente, pero que toda mi vida estarán en espíritu...

A ti mami Estela, por tu valentía, por tu coraje, por tus sacrificios, por darme esta gran vida, por ser mi madre y padre, porque tienes algo de Dios por la inmensidad de tu amor y mucho de ángel por ser mi guarda. Porque si hay alguien que está detrás de todo este trabajo, eres tú, que has sido, eres y serás el pilar de mi vida. Siempre te llevo en mi corazón. Espero estés orgullosa de mi. Te amo, mami.

Gracias papá Chon y mamá Tilita, porque son mis abuelitos pero más mis padres, mi fortaleza. Mi ejemplo de un gran hombre y de una gran mujer, de que siempre se puede ir hacia adelante. Gracias por todo lo que nos apoyaron y dieron sin contemplaciones, tanto a mi mamá, a mis hermanos y a mí. Muchas gracias mamá tilita, por haberme comprado mi computadora cuando entre a la universidad para poder realizar mis trabajos, tareas, por confiar en mí y siempre estar segura de que este momento llegaría. Hoy 13 de Abril de 2015, llegó el día. ¡ya soy químico!

Papá Alejo, si hay alguien en esta vida a quien se le pueda decir padre eres tú. Tú eres quien me ha dado la mayor lección de amor, comprensión, entrega y fortaleza. Gracias por cambiar mi vida, por todo lo que significas para mí, siempre serás un gran hombre y un ejemplo de que el amor existe.

Julio, más que mi tío siempre serás mi hermano, esa persona que supo darme una palabra de aliento cuando más la necesite en mi vida, por enseñarme a crecer, a ser valiente, por inculcarme a querer y cuidar de mis hermanos, a nunca rendirme y sobre todo a nunca tener miedo.

Mamá mimi, gracias por todo el amor que nos diste, por jugar con nosotros, por cuidarnos y estar para mis hermanos y para mí.

Índice de Figuras

Figura 1	Reacción de condensación del enlace peptídico	6
Figura 2	Esquema de la cadena polipeptídica	7
Figura 3	Mecanismo de acción teórico del FILM sobre FN- κ B	10
Figura 4	Isosuperficie del potencial electrostático de MQCNS	11
Figura 5	Modelo murino de isquemia tratado con CNS y análogos	11
Figura 6	Visión general del proceso inflamatorio	17
Figura 7	Morfología de las formas de neutrófilos	23
Figura 8	Esquema general de las citocinas sobre la respuesta inmune	24
Figura 9	Actividades funcionales de las citocinas	25
Figura 10	Esquema del puente de hidrógeno	28
Figura 11	Puentes de hidrógeno en biomoléculas	29
Figura 12	Puentes de hidrógeno de los aminoácidos	31
Figura 13	Enlace peptídico, mostrando los ángulos diedros ψ y ϕ	32
Figura 14	Diagrama de Ramachandran	33
Figura 15	Geometría de mínima energía de CNS	51
Figura 16	Geometría de mínima energía, mostrando el ángulo diedro δ_2	52
Figura 17	Confórmeros de mínima y máxima energía del tripéptido CNS	54
Figura 18	Geometría de mínima energía de CDS, mostrando el ángulo δ_2	55
Figura 19	Confórmeros de mínima y máxima energía del tripéptido CDS	57
Figura 20	Tripéptido CNS esquematizando los ángulos diedros ψ y ϕ	59

Figura 21	Tripéptido CDS esquematizando los ángulos diedros ϕ y ψ	61
Figura 22	Puentes de hidrógeno en conformeros de CNS	64
Figura 23	Puentes de hidrógeno en conformeros de CDS	66
Figura 24	Estructura genérica de tripéptidos, parámetros geométricos	67
Figura 25	Estructura genérica de tripéptidos, cargas atómicas	71
Figura 26	Orbitales HOMO del tripéptido CNS	74
Figura 27	Orbitales LUMO del tripéptido CNS	75
Figura 28	Orbitales HOMO del tripéptido CDS	76
Figura 29	Orbitales LUMO del tripéptido CDS	76
Figura 30	Isosuperficies de la densidad electrónica del tripéptido CNS	77
Figura 31	Isosuperficies de la densidad electrónica del tripéptido CDS	78
Figura 32	TLR de mamíferos	91

Índice de Tablas

Tabla 1	Características diferenciales de COX1 y la COX2	13
Tabla 2	Componentes de los gránulos de los neutrófilos	18
Tabla 3	Mediadores de la inflamación	13
Tabla 4	Estructuras secundarias del plegamiento de polipéptidos	33
Tabla 5	Conjuntos base	38
Tabla 6	Energías de optimización de conformeros de CNS	53
Tabla 7	Energías de optimización de conformeros de CDS	56
Tabla 8	Valores de ángulos diedros ψ_1 y ϕ_2 de CNS	60
Tabla 9	Valores de ángulos diedros ψ_1 y ϕ_2 de CDS	62
Tabla 10	Parámetros geométricos de los conformeros de CNS	67
Tabla 11	Parámetros geométricos de los conformeros de CDS	68
Tabla 12	Descriptores químico-cuánticos de los conformeros de CNS	69
Tabla 13	Descriptores químico-cuánticos de los conformeros de CDS	70
Tabla 14	Cargas atómicas de los conformeros de CNS	72
Tabla 15	Cargas atómicas de los conformeros de CDS	73

Índice de Gráficas

Gráfica 1	Trayectoria energética de los confórmers de CNS	52
Gráfica 2	Trayectoria energética de los confórmers de CDS	56
Gráfica 3	Diagrama de Ramachandran para CNS con los ángulos ψ_1 y ϕ_2	60
Gráfica 4	Diagrama de Ramachandran para CDS con los ángulos ψ_1 y ϕ_2	62
Gráfica 5	Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre TNF- α en CMN	79
Gráfica 6	Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre IL-6 en CMN	80
Gráfica 7	Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre IL-10 en CMN	81
Gráfica 8	Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre TNF- α en CD	83
Gráfica 9	Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre IL-6 en CD	84
Gráfica 10	Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre IL-10 CD	85

Índice

Abreviaturas	1
1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Marco teórico	5
3.1 Péptidos	6
3.2 Péptidos antiinflamatorios	9
3.3 Antiinflamatorios no esteroideos	12
3.4 Inflamación	14
3.5 Citocinas	24
3.6 Puentes de hidrógeno	28
3.7 Diagrama de Ramachandran	32
3.8 Química Computacional	34
4. Planteamiento del problema	44
5. Objetivos	45
5.1 General	45
5.2 Particulares	45
6. Hipótesis del trabajo	46
7. Material	47
7.1 Hardware	47
7.2 Software	47

8. Metodología	48
8.1 Sección teórica	48
8.2 Sección experimental	49
9. Análisis y discusión de resultados	51
9.1 Optimización geométrica de las estructuras de los tripéptidos CNS y CDS	51
9.2 Análisis de diagramas de Ramachandran	58
9.3 Interacciones intramoleculares: puentes de hidrógeno	62
9.4 Parámetros geométricos de los tripéptidos: CNS y CDS	67
9.5 Descriptores químico-cuánticos de reactividad	69
9.6 Cargas atómicas	71
9.7 Orbitales moleculares frontera: HOMO y LUMO	74
9.8 Isosuperficies del potencial electrostático: densidad electrónica	77
9.9 Ensayos <i>in vitro</i> de los tripéptidos Cys-Asn-Ser y Cys-Asp-Ser	79
10. Conclusiones	86
11. Perspectivas	87
12. Apéndice	89
13. Bibliografía	92

Abreviaturas

aa	aminoácido
AINES	antiinflamatorios no esteroideos
APR	respuesta de fase aguda
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CDS	cisteína, ácido aspártico, serina
CNS	cisteína, asparagina, serina
FNTC	factor neurotrópico ciliar
COX	ciclooxigenasa
CD	células dendríticas
CMN	células mononucleadas
CTSP	células totales de sangre periférica
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FILM	factor inhibitorio de la locomoción de monocitos
GM-CSF	factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HEPES	buffer biológico ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-pireracini-etanosulfónico]
HOMO	orbital molecular más alto ocupado
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulina
IL	interleucina
LH	hormona luteinizante
LIF	factor inhibitorio leucémico
LPS	lipopolisacárido
LUMO	orbital molecular más bajo desocupado

M-CSF	factor estimulante de colonias monocíticas
NF-κB	factor nuclear kappa B, por sus siglas en ingles.
NK	células asesinas naturales
NO	óxido nítrico
PAF	factor activador de plaquetas
PG	prostaglandinas
pH	potencial de hidrógeno
pI	punto isoelectrico
pKa	constante de acidez
RPMI	medio de cultivo celular Roswell Park Memorial Institute
SNC	sistema nervioso central
TGF	factor de transformación de tejidos
TGF β	factor de crecimiento transformante beta
TGI	tracto gastrointestinal
TNF	factor de necrosis tumoral

1. Resumen

El proceso inflamatorio es un mecanismo de protección ante diversos daños tisulares al organismo, pero estos pueden exacerbarse y ser clave en la progresión de diversas patologías, por lo que es importante el diseño de nuevos fármacos antiinflamatorios con mayor especificidad y menor toxicidad. El pentapéptido MQCNS presenta efectos antiinflamatorios *in vivo* e *in vitro* [1]. Estudios teóricos de la estructura electrónica mostraron al tripéptido CNS [2, 3], como grupo farmacóforo del pentapéptido MQCNS. Ensayos *in vitro* e *in vivo* confirmaron que el CNS mantiene las mismas propiedades biológicas que el pentapéptido MQCNS. El objetivo de este trabajo de tesis es un estudio teórico de la estructura electrónica de dos familias de conformeros derivadas de los tripéptidos Cys-Asn-Ser (CNS) y Cys-Asp-ser (CDS) a nivel de la Teoría de funcionales de la densidad, utilizando el funcional híbrido B3LYP y el conjunto base 6-311G+(d,p), con la finalidad de explorar sus propiedades electrónicas, fisicoquímicas y de reactividad química, asociadas a su funcionalidad biológica. También, se evaluó su efecto sobre las citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α y la antiinflamatoria IL-10, en células mononucleadas totales y células dendríticas estimuladas con LPS de origen bacteriano. Los resultados del análisis geométrico, así como el cálculo de los descriptores de la reactividad química, indicaron que las interacciones intramoleculares de tipo puentes de hidrógeno estabilizan a las estructuras. El grupo funcional de la cadena lateral en el aminoácido central (asparagina en CNS y ácido aspártico para CDS), tiene gran influencia sobre las propiedades fisicoquímicas, de reactividad química y consecuentemente en su funcionalidad biológica. Lo cual se corroboró experimentalmente en células mononucleadas y dendríticas; el estudio dosis-efecto mostró que a una dosis de 100 ng del péptido CNS presenta el mayor efecto antiinflamatorio en ambas estirpes celulares, inhibiendo la producción de citocinas, tales como IL-6 y TNF- α por arriba del control positivo FILM, lo cual nos proporciona datos farmacológicos innovadores.

2. Introducción

La línea de investigación “*Estructura electrónica de sistemas de interés biológico*” que se desarrolla en el Área de Química Computacional de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza se enfoca al estudio de las propiedades electrónicas, estructurales y fisicoquímicas en sistemas de interés biológico; es decir, al estudio de moléculas con actividad biológica para su posterior evaluación en modelos *in vitro* e *in vivo*.

En nuestro grupo se ha llevado a cabo el estudio teórico detallado de la estructura electrónica y de las propiedades fisicoquímicas del pentapéptido Met-Gln-Cys-Asn-Ser (MQCNS) [1] aislado por Kretschmer y colaboradores [2], a partir de un oligopéptido antiinflamatorio producido por *Entamoeba histolytica*. El análisis teórico del pentapéptido y de sus análogos: Met-Pro-Cys-Asn-Ser y Met-Lys-Cys-Asn-Ser, realizado a nivel *ab initio* y de la teoría de funcionales de la densidad (TFD) mostró una relación entre las propiedades electrónicas, fisicoquímicas y geométricas con la actividad antiinflamatoria [1]. Con base en dichos resultados, se propuso un grupo farmacóforo (Cys-Asn-Ser) como responsable de la actividad antiinflamatoria. Más tarde, dicho tripéptido se caracterizó a través de estudios teóricos en fase gas y en solución [5].

De acuerdo a lo anterior, este trabajo de tesis se enfoca al estudio teórico de las propiedades físico-químicas, estructurales y de reactividad de los tripéptidos Cys-Asn-Ser y Cys-Asp-Ser, así como la evaluación de su respuesta biológica a diferentes dosis de concentración de dichos péptidos, mediante ensayos *in vitro* en células mononucleadas y células dendríticas estimuladas con LPS de origen bacteriano.

3. Marco teórico

La respuesta inflamatoria es clave en el desarrollo y en la progresión de muchas enfermedades y en procesos celulares como el envejecimiento. Por lo que es importante crear nuevas estrategias para el diseño y modificación de moléculas antiinflamatorias [7-12].

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares y celulares en respuesta a embates físicos, químicos o biológicos. El proceso inflamatorio se activa en diversas patologías tales como artritis reumatoide, Alzheimer, Parkinson, cáncer, diabetes y obesidad, entre otros [13-15]. Es una reacción compleja que se lleva a cabo en el tejido conjuntivo vascularizado, por lo que puede ocurrir prácticamente en cualquier órgano [16-18]. Debido a la importante participación de fenómenos inflamatorios en diversas patologías tan graves y disímiles, se han desarrollado una gran cantidad de fármacos desinflamatorios, de ellos destacan los no esteroideos que actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas. La desventaja de estos fármacos son los efectos secundarios tóxicos que suelen presentar los pacientes que los consumen. Ante este panorama, los péptidos antes mencionados, son una alternativa en la búsqueda de nuevas moléculas antiinflamatorias. Soriano-Correa y colaboradores [1], realizaron un estudio teórico detallado de la estructura electrónica y de las propiedades fisicoquímicas a nivel *ab initio* y de la teoría de funcionales de la densidad (TFD) del pentapéptido derivado de *E. histolytica*, así como de sus análogos; evaluando diversos descriptores químico-cuánticos, tales como sus propiedades físico-químicas de acidez, cargas atómicas, ordenes de enlaces, orbitales moleculares, momento dipolar, isosuperficies del potencial electrostático, orbitales moleculares frontera (HOMO-LUMO) y sus parámetros geométricos, demostrando una relación entre sus propiedades electrónicas, fisicoquímicas y geométricas con la actividad antiinflamatoria. Con base en estos resultados, se propuso un grupo farmacóforo que correspondió a un tripéptido con carboxilo terminal del

pentapéptido nativo (Cys-Asn-Ser) [1]. Posteriormente, ensayos experimentales confirmaron la actividad antiinflamatoria del farmacóforo en modelos *in vivo* e *in vitro* [3].

Dichos resultados permitieron proponer al grupo farmacóforo como un tripéptido modelo, el cual fue caracterizado a través de estudios teóricos [4]. Recientemente, Soriano-Correa y colaboradores [5], realizaron un estudio teórico del tripéptido (Cys-Asn-Ser) en fase gas y en fase acuosa, estos estudios han permitido diseñar una familia de nuevos péptidos pequeños sustituyendo la cadena lateral [6], al igual que nuevas familias de confórmeros de los péptidos que son el objeto de estudio del presente trabajo de tesis.

3.1 Péptidos

Llamados polímeros de aminoácidos, los péptidos son la unión de dos o más aminoácidos (aa) mediante enlaces amida; estos enlaces son el resultado de la reacción entre el grupo carboxilo de un aa y el grupo amina de otro, con la eliminación de una molécula de agua. En los péptidos y en las proteínas, estos enlaces amida reciben el nombre de enlaces peptídicos [22], tal como se muestra en la Figura 1.

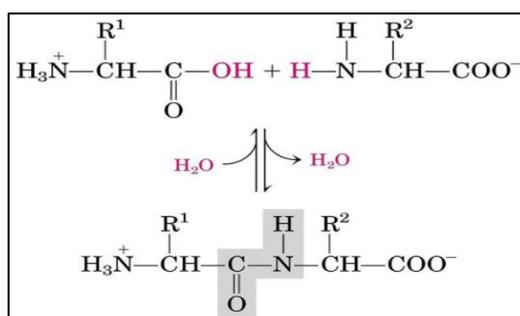


Figura 1. Reacción de condensación para la formación del enlace peptídico [22].

Cuando son pocos los aa que forman el péptido (menos de 10), se trata de un oligopéptido. Cuando el número de aa está comprendido entre 10 y 100 es un polipéptido mientras que si el número es mayor de 100 aa, se habla de una proteína.

En un péptido o una proteína pueden distinguirse dos regiones [22]:

- La cadena principal o esqueleto
- Las cadenas laterales (que son las responsables de las propiedades físico-químicas del péptido)

Independientemente de la longitud de la cadena polipeptídica, en un extremo habrá un grupo amino libre y en el otro extremo un grupo carboxilo terminal como se muestra a continuación.

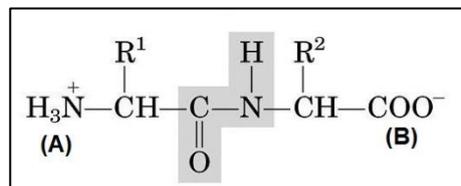


Figura 2. Esquema de la cadena polipeptídica, donde en los extremos (A) es el grupo amino terminal y (B) el grupo carboxilo terminal [22].

3.1.1 Propiedades de los péptidos

Los péptidos son estructuras intermedias entre los aminoácidos y las proteínas. Sus propiedades físicas y químicas suelen reflejar en mayor o menor medida las de los aminoácidos que los conforman.

Al perderse los grupos hidrofílicos (amino y carboxilo), implicados en la formación de los enlaces peptídicos, el carácter polar o apolar de los péptidos depende de la naturaleza de los grupos presentes en las cadenas laterales.

Los valores de los pKa de los grupos ionizables a menudo se ven alterados por la proximidad de otros grupos polares [23].

Los péptidos presentan a menudo ciertas peculiaridades estructurales que no aparecen en las proteínas:

- Los grupos -NH_2 y -COOH terminales pueden encontrarse bloqueados. Por ejemplo, como grupos amino terminales que están acetilados o en forma de ácido piroglutámico y grupos carboxilo terminales en forma de amidas o de metil-ésteres.
- El pH del medio en el que se encuentre el péptido es esencial para determinar las propiedades ácido-base de los aminoácidos que los conforman, este es un aspecto importante, pues de esto dependen las propiedades químicas y la funcionalidad biológica. Las propiedades ácido-base están determinadas por los grupos protonables que poseen los aminoácidos que forman al péptido, ya que cada aminoácido terminal puede actuar como ácido o base. Existe un pH en el cual la carga neta del péptido será cero y recibe el nombre de punto isoeléctrico (pI), donde el péptido se encuentra en su forma de zwitterión.

3.1.2 Funciones de los péptidos

Los péptidos se forman generalmente a partir de proteínas precursoras. Estas proteínas se sintetizan en los ribosomas y suelen ser inactivas, el péptido activo se produce por mecanismos de hidrólisis de la proteína precursora. Entre las funciones biológicas más importantes que realizan los péptidos se enlistan las siguientes [23]:

- Agentes vasoactivos: el hipotensor más potente que se conoce es la angiotensina II, que es un octapéptido; otro agente hipotensor conocido es el nonapéptido bradiquinina.
- Hormonas: son moléculas químicas que ejercen su acción sobre células, órganos y tejidos. Y como ejemplo de hormonas peptídicas están la oxitocina, la vasopresina, la somatostatina, la insulina, el glucagón, etc.
- Neurotransmisores: son moléculas químicas producidas en una terminal nerviosa pre-sináptica, que a través de un receptor específico ejercen su acción sobre la neurona post-sináptica.

sináptica. Algunos neurotransmisores peptídicos son las encefalinas, la β endorfina y la sustancia P.

- Antibióticos: la valinomicina y la gramicidina S, son dos péptidos cíclicos con acción antibiótica.
- Cofactores enzimáticos: el glutatión un tripéptido que actúa como cofactor enzimático en algunas reacciones redox y se comporta como un importante oxidante celular.

3.2 Péptidos antiinflamatorios

En los estudios del absceso hepático amibiano avanzado causa asombro la escasez de elementos inflamatorios. Para explicar este acontecimiento se plantearon dos hipótesis: la citolítica y la anti-migratoria. En la primera, el parásito destruye los leucocitos conforme éstos arriban a la zona infectada. Pérez-Tamayo y colaboradores [24], propusieron la segunda hipótesis, la cual sugiere que la *Entamoeba histolytica* produce y libera factores que son capaces de inhibir la llegada de los leucocitos al foco de infección. Kretschmer y colaboradores [25], demostraron que en el sobrenadante de cultivos axénicos de *E. histolytica* se encuentra un factor capaz de inhibir *in vitro* la locomoción de los fagocitos mononucleares humanos, y no los polimorfos nucleares humanos, por lo cual se le nombra factor inhibitorio de la locomoción de monocitos (FILM).

Dicho factor es un pentapéptido (Met-Gln-Cys-Asn-Ser) termoestable, que posee diversas propiedades antiinflamatorias *in vitro* e *in vivo* como el de la inhibición de la locomoción de monocitos, inhibición del estallido respiratorio de monocitos y de neutrófilos, así como inhibición de la hipersensibilidad retardada cutánea al dinitroclorobenceno en cobayos y jerbos, al igual que el retraso de leucocitos mononucleares en ventanas de Rebeck en humanos con abatimiento de las moléculas de adhesión VLA-4 y VCAM en el endotelio post capilar y en monocitos [26].

Por lo tanto la multiplicidad de sus efectos hace considerar su mecanismo de acción sobre la red de citocinas inflamatorias del huésped. El FILM inhibe la expresión inducida de las CC-quimiocinas (denominadas CC ya que en su estructura tienen dos cisteínas adyacentes al extremo amino terminal), MIP-1 α , MIP-1 β , I-309 y del receptor CCR1.

De acuerdo a lo anterior se piensa que el FILM tiene su principal efecto en la matriz NF- κ B, al aumentar la translocación del homodímero p50/p50 el cual actúa como inhibidor, y se altera la dinámica del heterodímero p65/p50. Lo cual se origina al inhibirse la proteína MyD88 y se altera su translocación membranal, dicho mecanismo de acción se esquematiza en la Figura 3 [27].

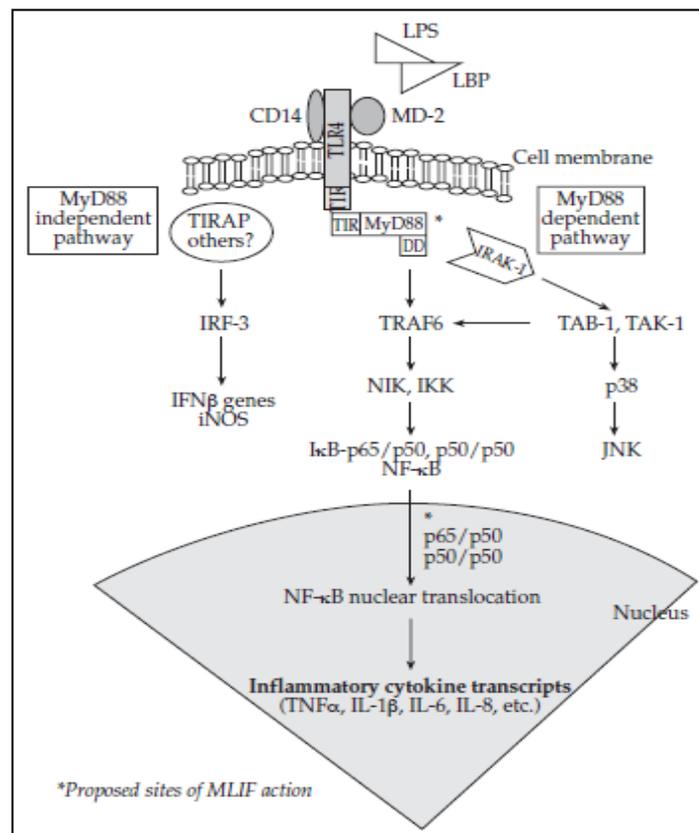


Figura 3. Mecanismo de acción teórico del FILM sobre NF- κ B, donde puede afectar la síntesis de MyD88 y la translocación membranal nuclear [27].

Con base en la caracterización tanto teórica y experimental del pentapéptido (Met-Gln-Cys-Asn-Ser) y del tripéptido (Cys-Asn-Ser), diversos grupos se han dado a la tarea de diseñar nuevos péptidos, buscando mayor estabilidad y mayor potencia biológica [1, 3, 6, 28].

Tal como, Soriano-Correa y colaboradores demostraron que el tripéptido CNS es el grupo farmacóforo del pentapéptido MQCNS, como se muestra en la Figura 4.

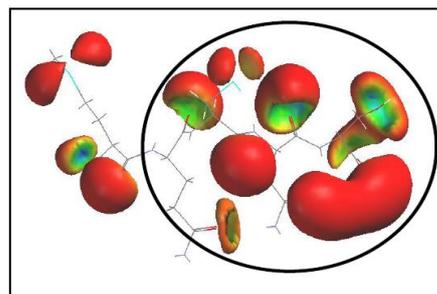


Figura 4. Isosuperficie del potencial electrostático, donde se observa una mayor densidad electrónica en los aminoácidos que conforman el grupo farmacóforo [4].

Algunos análogos de CNS se han aplicado en patologías que presentan un proceso inflamatorio; como por ejemplo Jia Yao y colaboradores [28], utilizaron el tripéptido modelo (Cys-Asn-Ser), para sintetizar dos tetrapéptidos análogos (Tyr-Cys-Asn-Ser) y (His-Cys-Asn-Ser); los cuales se probaron en un modelo murino de isquemia cerebral y concluyeron que tanto el tripéptido modelo como sus dos análogos presentan efectos neuroprotectores, ya que a los grupos que se les aplicaron los péptidos presentaron el menor número de infarto al realizar la reperfusión y su tejido presentó mayor irrigación sanguínea en comparación con el grupo con isquemia y sin tratamiento, tal como se muestra en la Figura 5.

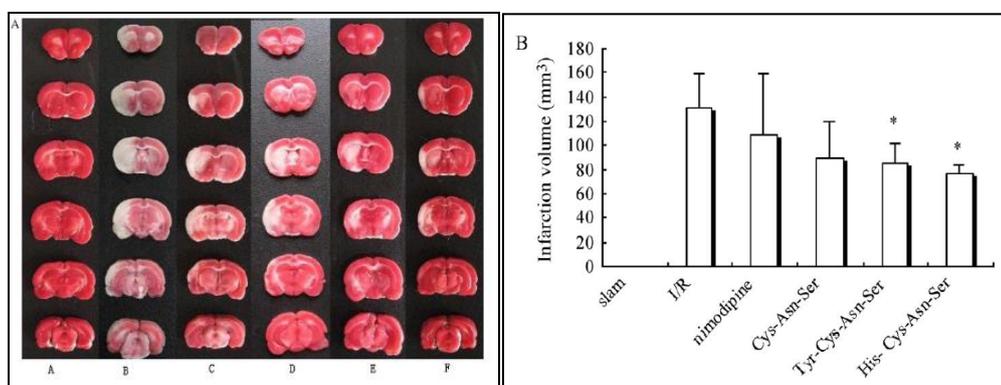


Figura 5. A) reperfusión donde a: grupo sano, b y c: grupos sin péptidos, d: Cys-Asn-Ser, e: Tyr-Cys-Asn-Ser, f: His-Cys-Asn-Ser y B) Gráfica de volumen de infarto [28].

3.3 Antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), constituyen un grupo farmacológico, químicamente heterogéneo y ampliamente utilizado, no solo en el tratamiento de patologías del aparato locomotor (artrosis, artritis reumatoide, etc.), sino también en otras indicaciones terapéuticas (fiebre, cólicos nefróticos y biliares, cefalea, traumatismos, y otras) [29,30].

Los AINES también presentan una elevada capacidad de provocar reacciones adversas, siendo las complicaciones gastrointestinales el principal problema de su consumo.

Entre el 1-2% de los consumidores habituales presentan una complicación grave, y la incidencia de úlceras es elevada (15-30%). Dichos antiinflamatorios son los responsables del 40% de los ingresos hospitalarios por sangrado gastroduodenal y la dispepsia (trastorno de la secreción, motilidad o sensibilidad gástrica que perturba la digestión), que es la principal causa de abandono del tratamiento [30].

Existen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa a la cual están dirigidos los AINES. La COX1 se expresa en la mayoría de los tejidos (mucosa gástrica, plaquetas y riñones), y es responsable de la síntesis de prostaglandinas (PG), con función protectora de la mucosa gástrica, que regula la función renal y actividad plaquetaria. La COX2 (principal enzima asociada a la inflamación), que se expresa en menos tejidos en condiciones normales (sistema nervioso central, riñón y aparato reproductor), pero es inducida en respuesta a estímulos inflamatorios en macrófagos, monocitos y células endoteliales, donde se generan PG (particularmente PGE2 y PGI2), que son mediadores del dolor y la inflamación. Se postula que la inhibición de la COX1 sería la responsable de los efectos adversos de los AINES clásicos, sobre la mucosa gastrointestinal, mientras que sus beneficios terapéuticos dependerían de la inhibición de la COX2 [29]. Algunas características de ambas isoformas pueden apreciarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Características diferenciales básicas de la COX1 y la COX2 [29]

Características	COX1	COX2
Gen responsable	PTGS1[31]	PTGS2[32]
Localización Cromosómica	Cromosoma 9q32-33,3	Cromosoma 1q25,2-25,3
No de aminoácidos	599[31]	604[32]
Tejido donde se expresa	Constitutiva en la mayoría de tejidos. Plaquetas, TGI, plaquetas, riñón.	Constitutiva: SNC, riñón Inducida: células endoteliales, fibroblastos, FML miometrial y monocitos, macrófagos.
Localización intracelular	Retículo endoplásmico	Retículo endoplásmico y membrana nuclear.
Inductores	Desconocido	Inespecíficos: IL-1 (a y b), TNF α , endotoxinas, FCE. Específicos: lipoproteínas HDL, en FML lisas, LH en ovario.

El mecanismo de los AINES clásicos consiste en la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), de manera que impiden la síntesis de distintos eicosanoides a partir del ácido araquidónico. Estos eicosanoides son los responsables en diversos grados de los mecanismos patogénicos de la inflamación, del dolor y de la fiebre, entre otros procesos fisiológicos [29].

Los AINES clásicos inhiben tanto la COX1 como la COX2, por lo cual es de suma importancia la selectividad de inhibidores de COX2. Sin embargo, la principal consecuencia de los fármacos que actúen selectivamente inhibiendo la COX2 sería que consiguiendo la misma eficacia antiinflamatoria se reducirían los efectos secundarios derivados de inhibir la COX1.

No obstante, la COX2 juega un papel importante en diversos órganos, por lo que su inhibición puede producir efectos secundarios típicos de AINES clásicos como alteraciones de la función renal y del metabolismo hidroelectrolítico [29,30].

3.4 Inflamación

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora, un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica. Dicha respuesta reparadora en ocasiones transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa [33].

La respuesta inflamatoria está formada por plasma, células circulantes, vasos sanguíneos y constituyentes celulares y extracelulares del tejido conectivo. Entre las células circulantes se incluyen los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son los mastocitos, que rodean los vasos sanguíneos y los fibroblastos.

La matriz extracelular consiste en proteínas con estructuras fibrosas (colágeno, elastina), glicoproteínas adherentes (fibronectina, laminina, entactina, tenascina, entre otras) y proteoglicanos. La membrana basal es un componente especializado de la matriz extracelular que consiste en glicoproteínas adhesivas y proteoglicanos [33].

Tras un proceso inflamatorio puede ocurrir lo siguiente:

1. Resolución con retorno a una estructura y función normales.
2. Supuración con formación de absceso.
3. Hinchazón con regeneración de tejido especializado o fibroso formando una cicatriz.
4. Persistencia del agente causante, haciéndose el proceso crónico.

3.4.1 Factores que dan origen a la inflamación

3.4.1.1 Factores exógenos

La inflamación puede ser originada por factores exógenos, como lesiones por agentes mecánicos (corte, etc), físicos (quemaduras), químicos (corrosivos), biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad) [34].

3.4.1.2 Factores endógenos

- Necrosis tisular: las células necróticas liberan moléculas que activan la respuesta inflamatoria.
- Traumatismos o rotura ósea, que inducen inflamación por que dañan a los tejidos (necrosis) o aportan microbios.

3.4.2 Tipos de inflamación

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica. La aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos. La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo [35].

3.4.2.1 Inflamación aguda

Los cambios que se producen tras la lesión tisular se deben a tres procesos:

1. Cambios en el flujo y calibre vascular que hacen que aumente el flujo sanguíneo.

2. Cambios estructurales en los vasos sanguíneos que aumenta la permeabilidad vascular e inducen la formación de exudado inflamatorio.
3. Paso de leucocitos del espacio vascular al extravascular alcanzando así el foco de las lesiones.

El resultado de todo ello es la acumulación de un fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos. En los primeros 10-15 minutos se produce una hiperemia (aumento de la irrigación sanguínea intravascular de un órgano, segmento de órgano o tejido vascularizado), por dilatación de arteriolas, vénulas y apertura de los vasos de pequeño calibre.

Tras esta fase aumenta la viscosidad de la sangre, lo que reduce la velocidad del flujo sanguíneo. Al disminuir la presión hidrostática en los capilares, la presión osmótica del plasma aumenta y en consecuencia un líquido rico en proteínas sale de los vasos sanguíneos originando el exudado inflamatorio.

3.4.2.2 Inflamación crónica

Si la inflamación perdura semanas o meses se considera crónica, y tiene dos características importantes:

1. El infiltrado celular está compuesto sobre todo por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.
2. En este tipo de reacción inflamatoria existe mayor formación de tejido fibroso que la cantidad de exudado de líquidos.

La inflamación crónica puede producirse por diversas causas:

- a) progresión de una inflamación aguda
- b) sucesos recurrentes de inflamación aguda
- c) inflamación crónica desde el comienzo, asociada frecuentemente a infecciones intracelulares.

3.4.3 Mecanismos que intervienen en la inflamación

3.4.3.1 Migración leucocitaria

Inicialmente, en la inflamación aguda se acumulan predominantemente los leucocitos, neutrófilos polimorfos nucleares y en las fases tardías, los monocitos y macrófagos. Hay tres fases para el reclutamiento de las células en la región dañada; es decir, la salida de las células desde la luz del vaso al espacio intersticial [36,37]. Normalmente las células ocupan la parte central del torrente sanguíneo teniendo muy poco contacto con el endotelio. Al aumentar la permeabilidad vascular, el flujo sanguíneo disminuye, lo que permite a los leucocitos acercarse al endotelio vascular. Este proceso se denomina marginación y se debe a los cambios hemodinámicos producidos en la inflamación, como se observa en la Figura 6 [37].

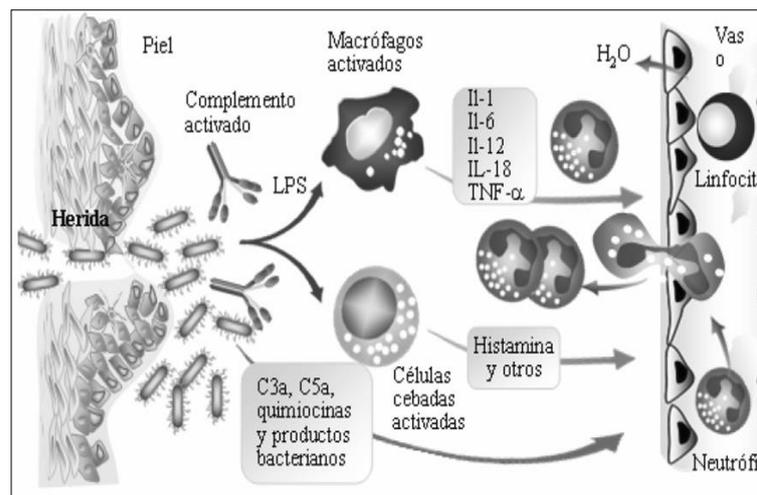


Figura 6. Visión general del proceso inflamatorio como consecuencia de una herida, donde las bacterias consiguen sobrepasar el epitelio activando a los macrófagos y otras células [37].

Los leucocitos escapan del torrente circulatorio mediante un movimiento ameboide activo.

Cuando los leucocitos entran en contacto con la célula endotelial, proyectan pseudópodos y migran por la superficie hasta que detectan una unión celular inter-endotelial.

Durante su paso desde la luz vascular al tejido extravascular, el leucocito rompe las uniones inter-endoteliales y la membrana basal probablemente a través de la secreción de colagenasa.

La estirpe de leucocito que migra depende mucho del tiempo que dura la inflamación y del tipo de estímulo. En la mayoría de los casos, en la inflamación aguda los neutrófilos son las células predominantes durante las primeras 24 horas, cuyos componentes de sus gránulos se describen en la Tabla 2. Estas células empiezan a acumularse en los primeros minutos tras la lesión, mientras que los monocitos y macrófagos se acumulan más tarde, después de 24 horas de ocurrida esta. Después de la extravasación, los leucocitos migran en los tejidos a los lugares donde se ha producido la lesión mediante el proceso de quimiotaxis [37].

Tabla 2. Componentes de los gránulos de los neutrófilos

Primarios	Secundarios
Lisozima	Lisozima
Mieloperoxidasa	Fosfolipasa A2
Fosfolipasa A2	Colagenasa
Elastasa	Lactoferrina
Catepsinas	Fosfatasa alcalina
Hidrolasas	
Proteína catiónica	
Terciarios: catepsinas y gelatinasa.	

3.4.4 Células que intervienen en la inflamación

En la inflamación intervienen una multitud de células pero entre ellas destacan los granulocitos neutrófilos y los fagocitos mononucleares. La vida de los neutrófilos es muy corta, sólo de 3 a 4 días. Algunos de los productos de los gránulos son bactericidas, mientras que otros son capaces de degradar la matriz proteica extracelular. Muchos de los neutrófilos mueren en los lugares de inflamación liberando enzimas que pueden dañar las células o las proteínas de la matriz extracelular. Los fagocitos mononucleares se diferencian en prácticamente todos los tejidos del organismo de distinta manera según el tejido que ocupan, dando lugar a macrófagos.

Los macrófagos tienen una producción autocrina de factores de crecimiento tales como GM-CSF o el M-CSF que hacen que proliferen localmente en los tejidos. Para llevar a cabo sus funciones, los macrófagos necesitan ser activados por $IFN\gamma$ [38].

3.4.5 Moléculas que intervienen en la inflamación

Además de las células directamente implicadas en la inflamación, como lo son los neutrófilos, macrófagos y linfocitos, los basófilos, mastocitos, plaquetas y células endoteliales también producen mediadores químicos. Hay dos tipos, los mediadores tisulares y los plasmáticos en la inflamación, de los cuales se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Mediadores de la inflamación [39]

Origen	Mediador
Mastocitos y basófilos	Histamina y serotonina
Kininógeno	Bradikinina
Fibrinógeno	Fibrinopéptidos
Complemento	C3a
Complemento	C5a
Membrana celular	Prostaglandinas
Leucocitos	Leucotrieno B4
Leucocitos, mastocitos	Leucotrieno C4, D4, E4
Leucocitos	Prot. catiónicas lisosómicas
Leucocitos	Proteasas neutras lisosómica
Leucocitos	Metabolitos de oxígeno
Leucocitos y otras	Factor activador de plaquetas
Macrófagos y otras	IL1, IL6, $TNF\alpha$, NO

3.4.5.1 Mediadores tisulares de la inflamación

La activación de los mastocitos, basófilos y plaquetas, estimula el metabolismo del ácido araquidónico con la consiguiente síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. De la misma forma son sintetizadas citocinas tales como: IL-1, IL-6, IL-8 y TNF. Se denomina entramado citocínico, a las interacciones complejas de las citocinas por las que inducen o suprimen su propia síntesis o la de otras citocinas o sus receptores, y antagonizan o sinergizan entre ellas de maneras diferentes y a menudo redundantes. Tales interacciones involucran, en ocasiones, cascadas citocínicas en las que una citocina inicial desencadena la expresión de ella y de muchas otras, creando complejos circuitos de retroalimentación. Se denominan citocinas proinflamatorias aquellas que favorecen la inflamación, siendo prototípicas las citocinas ya mencionadas. Actúan como pirógenos endógenos, inducen la síntesis de mediadores secundarios y de citocinas proinflamatorias por macrófagos y por células mesenquimales, estimulan la producción de proteínas de fase aguda y atraen células inflamatorias. El efecto neto de una respuesta inflamatoria está determinada por el balance entre citocinas pro y antiinflamatorias.

La histamina y serotonina segregada por mastocitos, basófilos y plaquetas, producen vasodilatación y aumentan la permeabilidad vascular. El PAF (factor activador de plaquetas) es un complejo lisofosfolípido-acetilado que induce la agregación plaquetaria y la degranulación. Además, aumenta la permeabilidad vascular, induce la adhesión leucocitaria y estimula la síntesis de derivados del ácido araquidónico. Estos derivados incluyen las prostaglandinas y los leucotrienos.

El ácido araquidónico se encuentra en la membrana celular y bajo estimulación puede ser liberado al exterior de la célula por una fosfolipasa. El óxido nítrico es producido por las células endoteliales, macrófagos y neuronas del cerebro.

3.4.5.2 Mediadores plasmáticos de la inflamación

Los mediadores derivados del plasma están presentes en el plasma en forma de precursores que deben ser activados y pertenecen a sistemas de proteínas que interactúan entre sí. El factor XII de la coagulación (Factor Hageman), se activa por superficies extrañas cargadas negativamente, tales como la membrana basal, enzimas proteolíticos o lipopolisacáridos. Una vez activado, el factor XII puede participar por numerosas vías en el proceso inflamatorio, como activar el sistema de la coagulación, el de la fibrinólisis, el complemento y el de las kininas-kalicleína

3.4.6 Manifestaciones sistémicas de la inflamación

Las manifestaciones sistémicas se conocen como respuesta de la fase aguda (“acute phase response”, APR). Estos acontecimientos fisiológicos, se inician inmediatamente después de que haya tenido lugar una infección o cualquier otro tipo de agresión al organismo. La APR se caracteriza por fiebre, cambios en la permeabilidad vascular y cambios en los perfiles metabólicos de varios órganos [37, 40, 41].

La respuesta se inicia y coordina por diversos mediadores inflamatorios, especialmente citocinas y hormonas, fundamentalmente glucocorticoides. Las primeras son liberadas precozmente desde el foco inflamatorio por fagocitos mononucleares, linfocitos y otros tipos de células diferenciadas activadas que tienen potentes efectos locales y sistémicos [36].

La cascada de mediadores induce la activación, proliferación, cambios del comportamiento y cambios metabólicos de una serie de células y de tejidos; todo ello con el objetivo de neutralizar al agente agresor, controlar el proceso inflamatorio y promover el proceso de reparación y así, iniciar el retorno a la normalidad fisiológica [33, 36].

Un aspecto importante de la APR es que altera perfil hepático. En condiciones normales el hígado produce un espectro característico de proteínas plasmáticas [37]. Muchas de ellas tienen importantes funciones, requiriéndose elevadas concentraciones de tales proteínas ante situaciones de un estímulo inflamatorio. Aunque la mayoría de las proteínas o reactantes de fase aguda son sintetizadas por los hepatocitos, algunas lo son por otros tipos celulares, que incluyen monocitos, células endoteliales, fibroblastos y adipocitos. Se denominan proteínas negativas de fase aguda a aquellas cuya concentración plasmática decrece; ello para incrementar la capacidad hepática para sintetizar proteínas en la fase aguda.

Por lo tanto cuando se produce una lesión hay un ajuste en la composición de las proteínas plasmáticas; como el aumento de la proteína C reactiva, que funciona como opsonina de bacterias, la α -2-macroglobulina y otras antiproteinasas, el fibrinógeno del sistema de coagulación y el amiloide sérico A cuya función se desconoce, dichos cambios se deben a alteraciones en la síntesis de estas proteínas por los hepatocitos [37, 40].

De los muchos factores solubles que inician y mantienen una respuesta inflamatoria, varios de ellos regulan específicamente la transcripción de proteínas APR, como por ejemplo: IL-1, IL-6, IL-11, TNF α , factor inhibidor leucémico (LIF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor neurotrópico ciliar (CNTF), IFN γ , oncostatina M, ácido retinoico o glucocorticoides como factores positivos, y ácido okadaico o insulina como factores negativos.

La inflamación produce fiebre a través de pirógenos externos que estimulan la producción de pirógenos endógenos como la IL-1 o TNF. Estas citocinas actúan sobre el hipotálamo anterior e inducen la producción de PGE2 que aumenta la temperatura.

Además en la sangre periférica se puede observar una leucocitosis; es decir, el aumento del número de leucocitos.

Este aumento se debe a los neutrófilos, entre los que aparecen formas inmaduras (en banda o cayados), que presentan diferentes características morfológicas respecto a los neutrófilos maduros o segmentados [42], como se muestra en la Figura 7.

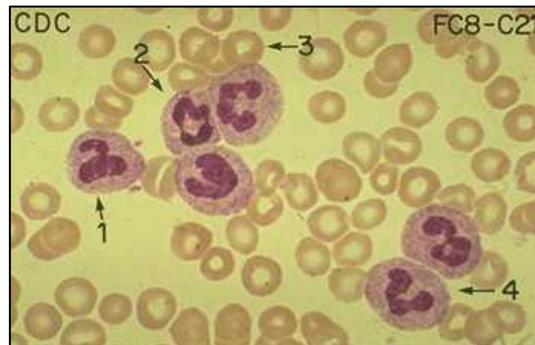


Figura 7. Leucocitos: 1) neutrófilo en banda o cayado, 2) neutrófilo segmentado, 3) eritrocito y 4) neutrófilo en segmentación [42].

3.4.7 Reparación de la inflamación

En la inflamación se produce una destrucción de las células del parénquima y de las del estroma. El tejido lesionado se repara mediante tejido conectivo que va a producir la fibrosis y la escarificación. En este proceso intervienen los siguientes componentes:

1. Formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis)
2. Migración y proliferación de fibroblastos
3. Depósito de la matriz extracelular
4. Maduración y organización del tejido fibroso (remodelación)

El proceso de reparación empieza a las 24 horas tras la lesión. Los fibroblastos y las células del endotelio vascular comienzan a proliferar formando el tejido de granulación en el cual se forman nuevos vasos [33].

3.5 Citocinas

Son moléculas de bajo peso molecular entre 15-30 kDa, constituidas por fragmentos de 120-180 aminoácidos. En general están producidas por leucocitos, pero determinadas citocinas pueden también ser secretadas por otras estirpes celulares. Originariamente se estableció el término linfocina para los productos biológicos producidos por linfocitos en respuesta al antígeno. Posteriormente, se amplió a moléculas de características similares secretadas por otros tipos celulares, por lo que se utilizó el término más de citocina.

El término interleucina (IL), se aplicó a moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose a medida que se descubrían. Algunas de estas, aún conservan su denominación de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como el TNF (factor de necrosis tumoral) y el TGF (factor transformador de tejidos) [41].

La expresión de la mayoría de las citocinas está estrictamente regulada; no se detecta una producción significativa, siendo necesaria la activación celular para que se produzcan en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos. A modo de ejemplo el esquema de acción de algunas citocinas en la respuesta inmunológica, tal como se muestran en la Figura 8. La mayoría de las citocinas son secretadas al espacio extracelular, muchas de ellas en forma glicosilada que incrementan su estabilidad y solubilidad [35,40].

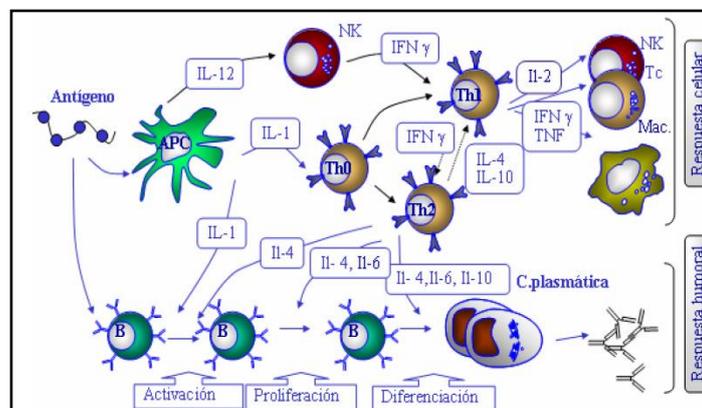


Figura 8. Esquema general de acción de las citocinas sobre la respuesta inmune [35].

En general, las citocinas poseen una vida media muy corta y actúan a concentraciones muy bajas del orden de picogramos, mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora o en otras estirpes celulares [35]. Dos importantes características funcionales de las citocinas son su pleiotropismo, una misma citocina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares y su redundancia; es decir, que varias citocinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular, tales efectos se visualizan en la Figura 9 [35, 41].

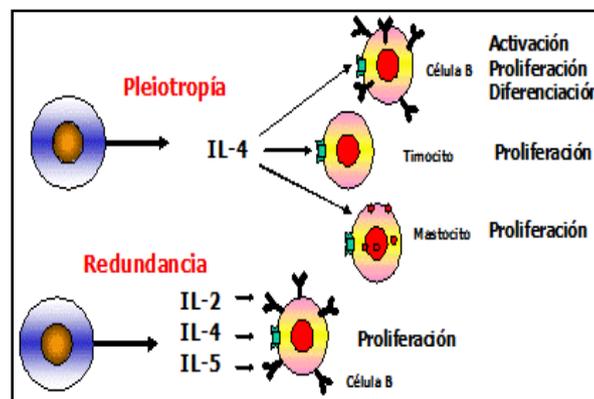


Figura 9. Actividades funcionales de las citocinas [35]

3.5.1 Citocinas proinflamatorias

En general, estas citocinas, promueven la migración de los fagocitos hacia el foco del daño ocurrido, aumentan la expresión de moléculas de adhesión, inducen una elevación de la temperatura (fiebre), así como la síntesis de las proteínas de fase aguda y estimulan la migración de células dendríticas.

Las principales citocinas que actúan en la respuesta inespecífica o inflamatoria son: interleucina 1, factor de necrosis tumoral, interleucina 8, interleucina 12, interleucina 16 e interferones [35,40]. A continuación, se mencionan las citocinas cuantificadas en este trabajo de tesis:

- **IL-1 α , IL-1 β**

Son producidas por macrófagos, células dendríticas, células NK, linfocitos B y por el endotelio. Función efectora: coestimula la activación de células T al aumentar la producción de citocinas, entre las que se incluyen IL-2 y su receptor; aumenta la proliferación y maduración de las células B; aumentan la citotoxicidad por NK; inducen IL-1, IL-6, IL-8, TNF, GM-CSF y PGE₂ por los macrófagos, efecto pro-inflamatorio al inducir citocinas e ICAM-1 y VCAM-1 en el endotelio; inducen fiebre, proteínas de fase aguda y resorción por los osteoclastos.

- **Factores de necrosis tumoral**

TNF α

Producidos por células Th, monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, células NK y linfocitos B. Como efecto producen citotoxicidad tumoral, caquexia (pérdida de peso), induce secreción de citocinas, induce la E-selectina sobre el endotelio, activa macrófagos y antiviral.

TNF β (linfotóxina)

De origen en células Th1 y Tc. Efecto citotóxico tumoral; aumenta la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos: involucrada en el desarrollo de órganos linfoides, antiviral.

3.5.2 Citocinas antiinflamatorias

Las citocinas antiinflamatorias reconocidas son: IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (FEC-GM), factor beta transformante del crecimiento (F β TC) y el interferón alfa (IFN α), los cuales tiene la capacidad de inhibir la liberación de las citocinas proinflamatorias y de inducir la producción del antagonistas de la IL-1 y la liberación del receptor de TNF, los cuales limitan algunas de las actividades de las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF α [40].

- IL-6

Las originan células Th2, monocitos, macrófagos, células dendríticas y el estroma de la médula ósea. Citocina con propiedades proinflamatorias y alcanza altos niveles en sangre. Sin embargo, es considerada como citocina antiinflamatoria ya que tiene una potente capacidad para inducir la liberación de proteínas de fase aguda.

- IL-10

Inicialmente se le identificó como un producto de las células T cooperadoras del tipo 2 de los ratones, las cuales inhiben la producción de las citocinas proinflamatorias por las células T auxiliaadoras del tipo 1 tanto en ratones como en humanos. Producida por macrófagos activados, monocitos, células Tc y linfocitos B. Su principal acción es inhibitoria de los macrófagos y células dendríticas. También inhibe la expresión de moléculas del CMH de clase 2. La deficiencia de esta citocina provoca un aumento del proceso inflamatorio y una elevación de la liberación de óxido nítrico, con mayor infiltrado celular; por lo tanto esta citocina es clave en la regulación del proceso inflamatorio [40].

Cada una de las proteínas descritas anteriormente tales como las citocinas, interleucinas, etc. llevan a cabo sus funciones en los organismos en ambientes acuosos, por lo que su estructura es estabilizada a través de diversas interacciones inter e intramoleculares. De estas, los enlaces de hidrógeno destacan porque estabilizan las estructuras secundarias en las proteínas.

A continuación se hace una descripción detallada de las interacciones de tipo puente de hidrógeno, debido a que en este trabajo de tesis se evaluaron en las estructuras peptídicas en estudio (CNS y CDS).

3.6 Puentes de hidrógeno

El puente de hidrógeno fue reconocido como un “enlace” por vez primera por Latimer y Rodebush en 1920 [39]. Un puente de hidrógeno (PH), implica la interacción estabilizante entre dos moléculas AH y B, ambas generalmente de capa cerrada y en su estado electrónico fundamental. Comúnmente se asume que para la formación del enlace, el átomo A(X), unido covalentemente al hidrógeno en la molécula AH, sea bastante electronegativo (ej. Oxígeno, Flúor). El átomo (Y) en la molécula B, que forma el PH con el hidrógeno debe ser también un átomo electronegativo y con un par de electrones no enlazantes disponibles, como se muestra en la Figura 10 [44].

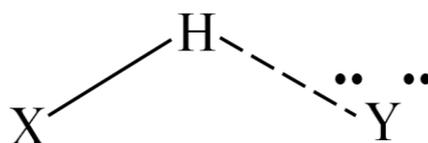


Figura 10. Esquema de la formación del puente de hidrógeno, donde X es el aceptor de electrones e Y el dador de electrones [44]

A medida que las moléculas AH y B se acercan una hacia la otra, las estructuras electrónicas de cada una se modifican muy poco en comparación con los cambios que acompañan la formación de un enlace covalente. Los puentes de hidrógeno intramoleculares se diferencian sólo en que los átomos XH e Y son parte de la misma molécula.

3.6.1 Propiedades del puente de hidrógeno

La distancia interatómica entre el hidrógeno y el aceptor es menor que la suma de sus radios de van der Waals (0.27 nm, aprox. para un oxígeno-hidrógeno), aunque están más separados que si estuvieran unidos por un enlace covalente puro [44].

La energía del puente de hidrógeno depende del ángulo de enlace; es máxima cuando los tres átomos (dador-hidrógeno-aceptor) están alineados (en cuyo caso la interacción alcanza la máxima estabilidad), y disminuye cuando se disponen en ángulo. Es un enlace muy direccional, se estima que una desviación de 20° produce una disminución de la energía de enlace del 10%, para valores de 90° o menores no se forman puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno poseen una longitud de enlace características, entre 2.5Å a 4.0Å [44], que depende de la geometría y de la estructura electrónica de los grupos moleculares implicados como se muestra en la Figura 11.

En todos los casos los enlaces son superiores a las longitudes características de los enlaces covalentes y más pequeñas que las que podemos calcular con los radios de van der Waals. En condiciones óptimas la energía de los puentes de hidrógeno oscila entre 4 kJ/mol a 25 kJ/mol, es decir, son más débiles que los enlaces covalentes, pero son mayores que las interacciones dipolo-dipolo o las fuerzas de dispersión.

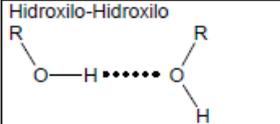
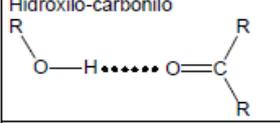
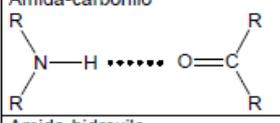
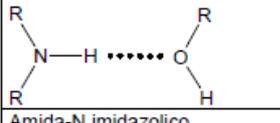
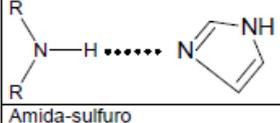
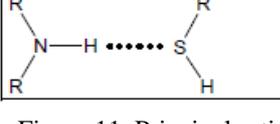
Tipo	Distancia Donor-Aceptor (Å)	Reducción respecto a radios de van der Waals.
Hidroxi-Hidroxi 	2.8 ± 0.1	25%
Hidroxi-carbonilo 	2.8 ± 0.1	20%
Amida-carbonilo 	2.9 ± 0.1	20%
Amida-hidroxi 	2.9 ± 0.1	20%
Amida-N imidazolico 	3.1 ± 0.2	15%
Amida-sulfuro 	3.7	10%

Figura 11. Principales tipos de puentes de hidrógeno en biomoléculas

Los puentes de hidrógeno pueden ser inter e intramoleculares. Los puentes de hidrógeno intramoleculares es una de las fuerzas no covalentes que juegan un papel muy importante en las estructuras de las proteínas, especialmente a nivel de la estructura secundaria en donde siguen un patrón periódico bien definido [45].

La periodicidad de este tipo de enlaces en las moléculas de estructura secundaria radica en la repetición del grupo peptídico a lo largo de la cadena y el de doble carácter de aceptor y donador de este grupo. Así en las hélices α se forman puentes de hidrógeno en los que el oxígeno del grupo carbonilo de un residuo actúa de aceptor, y el nitrógeno amida de otro residuo actúa como donador.

El otro elemento de estructura donde los puentes de hidrógeno aparecen con una distribución repetitiva o periódica es la lámina β , paralela o antiparalela. En la lámina paralela los puentes de hidrógeno, aunque no son la única fuerza en juego, mantienen unidas las diferentes hebras de la lámina, formándose el puente de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo (aceptor) de una hebra y en el nitrógeno amídico (donador) de la hebra vecina. Un esquema de puentes de hidrógeno análogo se produce en las láminas β antiparalelas, con los puentes de hidrógeno más paralelos entre sí y más perpendiculares a la dirección de la hebra.

Además de los puentes de hidrógeno asociados al grupo peptídico, tan importantes para la formación y estabilidad de los elementos de estructura secundaria, un buen número de cadenas laterales de los aminoácidos tienen capacidad de formar enlaces de hidrógeno, tal como se muestra en la Figura 12, en donde podemos observar que 11 de los 20 aminoácidos proteicos tienen cadenas laterales con grupos donadores y aceptores [45, 47].

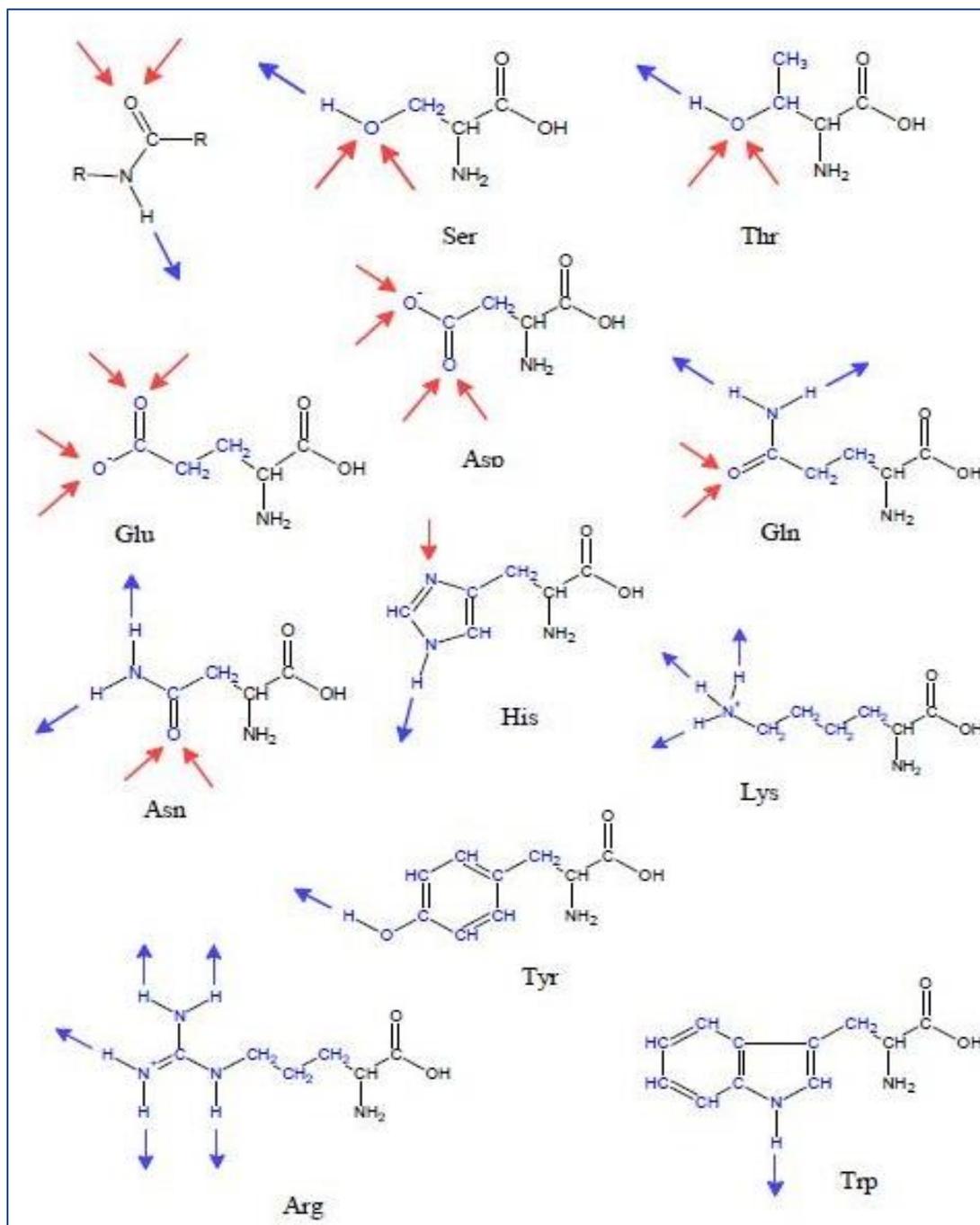


Figura 12. Grupos donadores (flechas azules) y aceptores (flechas rojas) para puentes de hidrógeno en el grupo peptídico y en las cadenas laterales de los aminoácidos [45].

Como en este trabajo de tesis se llevó a cabo un análisis conformacional detallado de los péptidos en estudio (CNS y CDS), fue necesario cotejar que las estructuras secundarias propuestas teóricamente existieran en los sistemas biológicos. Para hacer este tipo de predicción, se hizo uso del gráfico o diagrama de Ramachandran, que se describe a continuación.

3.7 Diagrama de Ramachandran

En un enlace peptídico se definen dos enlaces capaces de rotar, uno es el enlace entre el nitrógeno y el C_{α} , y el otro el enlace entre el C_{α} y el C del carbonilo. Ambos definen dos ángulos de rotación [22,45]:

- El ángulo diedro de rotación ϕ , definido por los cuatro átomos sucesivos del esqueleto CO-NH- C_{α} -CO.
- El ángulo diedro de rotación ψ , definido por los cuatro átomos sucesivos del esqueleto: NH- C_{α} -CO-NH.

La orientación del eje de giro es considerada positiva por convención como se muestra en la Figura 13 [22,47].

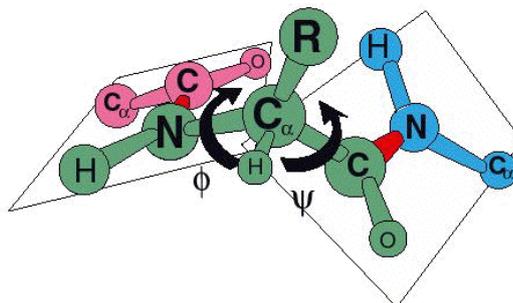


Figura 13. Enlace peptídico donde se muestran los dos ángulos de torsión ϕ y ψ .

Existen dos excepciones en los aminoácidos que se representan en estos diagramas, la glicina carente de un sustituyente en su cadena R y con un C- α no quiral, y la prolina que es cíclica debido a la tendencia de una estructura tipo pirrol, no cumplen los requisitos requeridos para una representación convencional [22]. El diagrama de Ramachandran fue creado por el bioquímico hindú Gopalasamudram Narayana Ramachandran junto con Viswanathan Sasisekharan [45, 47].

En él se pueden visualizar todas las combinaciones posibles de ángulos diedros ψ (psi) contra ϕ (phi) en los aminoácidos de un polipéptido, y que contribuyen a la conformación de la estructura permitida de las proteínas. Este gráfico permite, aproximar a priori cual será la estructura secundaria del péptido, ya que existen combinaciones de ángulos típicas para cada estructura α -hélice y hoja- β , entre otras. La conformación de los péptidos se define mediante la asignación de valores para cada par de ángulos ϕ_i , ψ_i para cada aminoácido. En el segundo cuadrante se hallan las combinaciones de la hoja- β , en el tercer cuadrante se hallan la hélice α derecha y los giros o bucles (loops); en el primer cuadrante las combinaciones de la hélice α izquierda [47], que son las más características, como se muestra en la Figura 14 y en la Tabla 4.

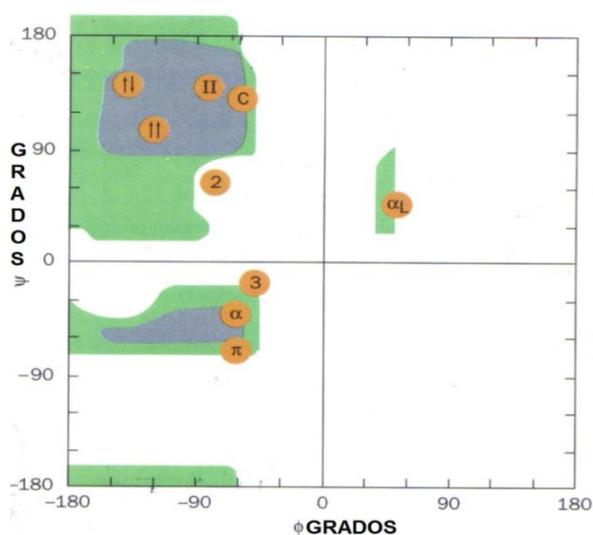


Figura 14. Representación del Diagrama de Ramachandran, donde se muestran los 4 cuadrantes de estructuras secundarias permitidas para polipéptidos, las cuales se describen en la Tabla 4 [42].

Tabla 4. Estructuras secundarias del plegamiento de polipéptidos

Estructura secundaria	Indicación
Hélice α giro a la derecha	α
Hoja β paralela	$\uparrow\uparrow$
Hoja β antiparalela	$\uparrow\downarrow$
Hélice 3_{10} giro a la derecha	3
Hélice π giro a la derecha	π
Listón 2.2 ₇	2
Hélices de poliglicina y poli-L-prolina giro a la izquierda	II
Colágeno	C
Hélice α giro a la izquierda	α_L

En el diseño de nuevas moléculas con propiedades farmacológicas, se toman en cuenta los parámetros geométricos que forman y mantienen la estructura secundaria, como ya se describió anteriormente.

Para disminuir el tiempo que representan los estudios experimentales, se han empleado los métodos basados en la química computacional, cuyo propósito es el modelar un sistema químico para determinar sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Existen diversos abordajes que incluyen al modelado molecular, a los métodos basados en la estadística y a los métodos de estructura electrónica; los cuales aventajan a los demás, debido a que se hace un análisis detallado de la distribución electrónica de cada átomo del sistema.

3.8 Química Computacional

Los métodos de estructura electrónica son caracterizados por sus aproximaciones matemáticas a las soluciones de la ecuación de Schrödinger. Hay dos clases de métodos de estructura electrónica: los *ab initio* y semiempíricos [48, 49, 50].

a) Métodos *ab initio*: los métodos *ab initio* son ocupados para predecir las propiedades de sistemas atómicos y moleculares, utilizando un Hamiltoniano correcto. Estos se basan en leyes fundamentales de mecánica cuántica, usan una variedad de métodos matemáticos y valores de las constantes físicas para resolver la ecuación fundamental [48-51].

b) Métodos semiempíricos: se basan en un Hamiltoniano más simple que el Hamiltoniano molecular correcto, y emplean parámetros cuyos valores se ajustan para concordar con los datos experimentales o con los resultados de cálculos *ab initio*. Métodos tales como AM1, MINDO/3 y PM3, entre otros están implementados en programas tales como MOPAC, AMPAC, Jaguar, Gaussian, etc.

Estos métodos resuelven de una manera aproximada la ecuación de Schrödinger, la cual depende de parámetros apropiados disponibles para el tipo de sistema químico bajo investigación.

Los cálculos de estructura electrónica de átomos y moléculas de cualquier tipo, ya sea tipo *ab initio*, TFD o semiempíricos tienen gran aplicación ya que sirven para proporcionar información acerca de estructuras, parámetros geométricos, reactividad química, etc. Asimismo, estos cálculos están siendo utilizados por compañías farmacéuticas en el diseño y caracterización de biomoléculas con presunta actividad biológica [49-52].

3.8.1 Ecuación de Schrödinger

En 1925, Erwin Schrödinger y Werner Heisenberg independientemente descubrieron la nueva teoría cuántica [49]. El método de Schrödinger involucraba parcialmente ecuaciones diferenciales, sin embargo, años después los dos métodos demostraron ser matemáticamente equivalentes. La ecuación de Schrödinger parece tener una mejor interpretación física a través de la ecuación de onda clásica, ya que puede ser vista como una forma de la ecuación de onda aplicada a las ondas de la materia [49].

La mecánica cuántica explica como los electrones tienen características duales, esto es tanto de onda como de partícula. La ecuación de Schrödinger describe la función de onda de una partícula [50]:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi(x)}{dx^2} + \hat{V}(x)\psi(x) = \hat{E}\psi(x) \quad (1.0)$$

En esta ecuación ψ es la función de onda, m es la masa de la partícula, \hbar es la constante de Planck y V es el potencial del campo donde la partícula se mueve. El operador Laplaciano es el operador diferencial que es el equivalente a las derivadas parciales con respecto a las coordenadas x, y, z :

$$\hat{\nabla}^2 \equiv \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \quad (1.1)$$

del producto de ψ resulta su complejo conjugado ($\psi^*\psi$, el cual se escribe $[\psi]^2$) que es interpretado como la probabilidad de distribución de una partícula.

La ecuación de Schrödinger es muy similar tanto para una partícula (molécula) como para un conjunto de estas. En este caso, ψ es una función de las coordenadas de todas las partículas del sistema.

La energía y muchas otras propiedades de las partículas se pueden obtener con la solución de la ecuación de Schrödinger para Ψ , siempre y cuando las condiciones de frontera sean las apropiadas. Son muchas las diferentes soluciones para la función de onda, correspondientes a diferentes estados estacionarios del sistema. Cabe hacer la aclaración que el estado estacionario no significa que la partícula este en reposo, si no que la ecuación no depende del tiempo.

3.8.2 Conjuntos base

Un conjunto base es la descripción matemática de los orbitales moleculares dentro de un sistema (los cuales en determinado momento se combinan para aproximar la función de onda electrónica total), empleado para realizar el cálculo teórico. Los grupos de bases grandes se aproximan con mayor exactitud a los orbitales moleculares, debido a que tienen menos restricciones en la localización de los electrones en el espacio. Los conjuntos base estándar para cálculos de estructura electrónica, usan combinaciones lineales de funciones gaussianas para formar los orbitales moleculares [51].

3.8.2.1 Bases polarizadas

La división de valencia permite cambiar el tamaño de los orbitales pero no su forma. Las bases con polarización evitan esta limitación, al adicionar orbitales con mayor momento angular respecto al requerido para la descripción del estado basal de cada átomo.

Por ejemplo, las bases polarizadas adicionan funciones d a átomos de carbono y funciones f a metales de transición y algunas de ellas adicionan funciones p a átomos de hidrógeno. La función de onda para el átomo de hidrógeno es un orbital de tipo $1s$. Si dicho átomo de hidrógeno es expuesto a la acción de un campo eléctrico externo, la densidad de carga se polariza y la distribución de carga alrededor del núcleo se hará asimétrica. Si el campo eléctrico aplicado es uniforme, la función de onda, en primer orden de aproximación, se convierte en una mezcla del orbital original $1s$ con una función de tipo p . Cuando el átomo de hidrógeno forma parte de una molécula, el resto de los átomos producen sobre él un campo eléctrico no uniforme y por tanto la adición de funciones del tipo p a la base utilizada para describir al hidrógeno en el entorno molecular [48, 51].

3.8.2.2 Bases difusas

Las funciones difusas permiten a los orbitales ocupar un espacio mayor. Son importantes porque al describir mejor la parte final de la función de onda también describen mejor a los electrones que se encuentran distantes del núcleo. Por ejemplo, estas funciones son básicas para representar apropiadamente aniones, moléculas con pares electrónicos no compartidos, estados excitados, moléculas con elevada carga negativa, sistemas con potenciales de ionización bajos, etc. La base 6-31+G(d, p) adiciona funciones p a los hidrógenos y funciones difusas cuando sean necesarias [48,51]. A continuación se presenta la Tabla 5 en la que se muestran los diferentes conjuntos base.

Tabla 5. Conjuntos base [50]

Conjunto base [átomos aplicables]	Descripción
STO-3G [H-Xe]	Conjunto base mínimo, utilizado para resultados cualitativos en los sistemas muy grandes cuando no se puede utilizar ni siquiera 3-21G.
3-21G [H-Xe]	División de valencia, 2 juegos de las funciones en la región de valencia proporcionan una representación más precisa de los orbitales. El uso para moléculas más grandes con la base 6-31G (d) es demasiado caro.
6-31G(d) 6-31G* [H-Cl]	Este conjunto base añade las funciones de la polarización de átomos pesados, se usa en la mayoría de los sistemas de tamaño medio/grande. (Este conjunto base emplea funciones de 6 componentes tipo d)
6-31G(d,p) 6-31G** [H-Cl]	Añade funciones de polarización para los hidrógenos, se utiliza cuando los hidrógenos son un sitio de interés (por ejemplo, la energía de enlace) y para cálculos de energía más precisos.
6-31+G(d) [H-Cl]	Añade funciones difusas lo cual es importante para sistemas con pares libres, aniones y estados excitados.
6-31+G(d,p) [H-Cl]	Añade funciones p para hidrógenos, se utiliza cuando se ha empleado la base 6-31G(d,p) y cuando las funciones difusas son necesarias.
6-311+G(d,p) [H-Br]	Triple z, añade funciones extra de valencia a la base 6-31+G(d), también se puede añadir a los átomos de hidrógeno mediante el segundo tipo de función predeterminada.
6-311+G(2d,p) [H-Br]	Pone 2 funciones d sobre átomos pesados (más funciones difusas) y 1 función p sobre hidrógenos.
6-311+G(2df,2p) [H-Br]	Coloca 2 funciones d y 1 función f sobre átomos pesados (más funciones difusas) y 2 funciones p sobre átomos de hidrógeno.
6-311++G(3df,2pd) [H-Br]	Pone 3 funciones d sobre y 1 función f átomos pesados, 2 función p y 1 función d sobre hidrógenos, así como funciones difusas.

3.8.3 Descriptores químico-cuánticos

Los métodos químico-cuánticos y las técnicas de modelado molecular permiten la obtención de diversos descriptores de la densidad de carga para analizar sus propiedades tales como: reactividad química y propiedades físico-químicas de una molécula, así como el efecto de sus respectivos sustituyentes [48, 50, 51]. A continuación se describen los descriptores utilizados en el presente trabajo.

3.8.3.1 Dureza

La dureza y blandura son conceptos que han estado en la literatura química por varias décadas. Sus nombres fueron propuestos a partir de una correlación empírica, y ello permitió una clasificación de ácidos y bases de Lewis en especies duras y blandas. La gran utilidad de estos conceptos en química está relacionada con el principio de ácidos duros y blandos (HSAB), el cual establece que los ácidos duros de Lewis prefieren interactuar con las bases duras de Lewis, de manera semejante los ácidos blandos interactúan con bases blandas. El principio de ácidos duros y blandos, HSAB y el principio de igualación de electronegatividades, junto con la teoría de orbitales frontera, han sido útiles para explicar la estabilidad y el comportamiento de moléculas, sitios reactivos y posibles mecanismos de reacción [50,51].

Los conceptos de ácidos y bases duras y blandas, se han utilizado para clasificar a los elementos y a las moléculas y, basándose en evidencias experimentales poder explicar cómo y por qué reaccionan. Sin embargo, este principio ha sido fuertemente criticado debido a que la dureza y la blandura eran cantidades que no podían ser medidas y a las cuales no se les podía asignar un valor numérico. El problema fue resuelto por Parr y Pearson en 1983 [50, 51]. Dentro de la teoría de funcionales de la densidad, Parr y sus colaboradores establecieron la importancia del potencial químico electrónico definiéndolo formalmente como:

$$\mu = \left[\frac{\partial E}{\partial N} \right]_{\overline{v}(\mathbf{r})} = \left[\frac{-\partial E}{\partial \rho(\mathbf{r})} \right]_{\overline{v}(\mathbf{r})} \quad (2)$$

donde E es la energía electrónica, N es el número de electrones del sistema, $\overline{v}(\mathbf{r})$ es el potencial externo debido a los núcleos y $\rho(\mathbf{r})$ 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. Parr y colaboradores [52], mostraron que para cada sistema químico, ya sea átomo, molécula ión, radical o varias de estas partículas interactuando, existe un potencial químico electrónico, y éste debe ser constante en cualquier

punto del sistema. Esto conlleva necesariamente al principio de igualdad de electronegatividades dada la ecuación 3 [51]. Cuando dos sistemas químicos interactúan, para alcanzar esta igualdad, ocurre una transferencia de carga. Parr y Pearson, propusieron que la dureza puede definirse como:

$$\eta = \frac{1}{2} \left[\frac{\partial \mu}{\partial N} \right]_{\vec{v}(\vec{r})} = \frac{1}{2} \left[\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right]_{\vec{v}(\vec{r})} \quad (3)$$

Si analizamos esta 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.

Aunado a esto, y bajo la aproximación por diferencias finitas, la dureza se aproxima [50, 51]:

$$\eta \approx \frac{1}{2} (I - A) \quad (4)$$

donde I es el potencial de ionización y A es la afinidad electrónica. Considerando el Teorema de Koopmans, el cual establece que [50,51]:

$$\begin{aligned} I &\approx \epsilon_H \\ A &\approx -\epsilon_L \end{aligned} \quad (5)$$

donde ϵ_H y ϵ_L corresponden al valor de la energía del último orbital ocupado (HOMO) y del último orbital molecular desocupado (LUMO) respectivamente, se obtiene que la definición de dureza está directamente relacionada con la diferencia de la energía entre el HOMO y el LUMO, importante propiedad de cualquier molécula con la cual se determina la reactividad química debido a cambios en la densidad electrónica [49-51].

$$\eta = \frac{1}{2} (E_H - E_L) \quad (6)$$

3.8.3.2 Cargas atómicas

Una forma de obtener cargas atómicas razonables Q_α es ajustando el potencial electrostático molecular (MEP) Φ . Primeramente, se emplea una función de onda molecular para calcular los valores de Φ en una malla de muchos puntos en la región fuera de la superficie de van der Waals de la molécula.

A continuación se sitúa la carga Q_α en cada núcleo α , y se calcula en cada punto de la malla la cantidad $\Phi^{\text{approx}} \equiv \sum_\alpha Q_\alpha e / 4\pi\epsilon_0 r_{i\alpha}$. Entonces se varían los valores de Q_α de forma que se minimice la suma de los cuadrados de las desviaciones $\Phi_i^{\text{approx}} - \Phi_i$ en los puntos de la malla. Diferentes formas de elegir los puntos y de incluir otros refinamientos dan lugar a diferentes esquemas para obtener las cargas atómicas Q_α que se llaman cargas ESP (potencial electrostático) [49-51].

3.8.3.3 Índice de electrofilicidad

El índice de electrofilicidad es definido por Parr y colaboradores [52], como una medida de la minimización de energía debido al flujo máximo del electrón entre el donador y aceptor,

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (7)$$

donde ω es el índice de electrofilicidad, que es igual al potencial químico al cuadrado dividido entre dos veces la dureza. Esta medida de índice de reactividad estabiliza la energía, cuando el sistema adquiere una carga electrónica adicional. La electrofilicidad es un descriptor de la reactividad química que permite una clasificación cuantitativa del carácter electrofílico global de una molécula dentro de una escala relativa.

3.8.4 Teoría de funcionales de la densidad

La función de onda electrónica de una molécula de n -electrones depende de $3n$ coordenadas espaciales y n coordenadas de espín. Ya que el operador Hamiltoniano contiene solamente términos espaciales de uno y dos electrones, la energía molecular se puede describir en términos de integrales de uno y dos electrones, y puede escribirse en términos de integrales que implican solamente seis coordenadas espaciales. En este sentido, la función de onda de una molécula poli-electrónica contiene más información que la que es necesaria, y falta un significado físico directo. Esto ha incitado a la búsqueda de funciones que impliquen menos variables que la función de onda y que se puedan utilizar para calcular la energía y otras propiedades [49-51].

En 1964, Pierre Hohenberg y Walter Khon [50, 51], probaron que para moléculas con un estado fundamental no degenerado, la energía molecular del estado fundamental, la función de onda y todas las demás propiedades electrónicas, están determinadas unívocamente por la densidad de la probabilidad electrónica del estado fundamental $\rho_0(x, y, z)$, una función de tres variables. Se dice que la energía electrónica del estado fundamental E_0 es una función de ρ_0 y se escribe $E_0 = E_0[\rho_0]$, donde los corchetes denotan la relación funcional. La teoría del funcional de la densidad (TFD) intenta calcular E_0 y otras propiedades moleculares del estado fundamental a partir de la densidad electrónica del estado fundamental ρ_0 [51].

3.8.5 Funcionales del gradiente corregido e híbridos

Los funcionales de correlación de gradiente corregido comúnmente usados, E_c , son entre otros el funcional de Lee-Yang-Parr (LYP), el funcional de correlación de Perdew 1986 (P86 o Pc86), el funcional de correlación libre de parámetros Perdew-Wang 1991 (PW91 o PWc91), y el funcional de correlación de Becke llamado Bc95 o B96 [50,51].

Uno de los funcionales híbridos más comunes de manera frecuente y que utilizamos en este trabajo de tesis, es el funcional híbrido B3LYP (funcional de correlación Becke y el funcional de intercambio Lee-Parr), donde el 3 indica un funcional de tres parámetros [51], definido como:

$$E_{ci}^{B3LYP} = (1-a_0-a_i)E_i^{LSDA} + a_0E_i^{exacto} + a_iE_i^{B88} + (1-a_c)E_c^{VWN} + a_cE_c^{LYP} \quad (8)$$

donde los valores de los parámetros $a_0=0.20$, $a_i=0.72$ y $a_c=0.81$, se eligieron de forma que se obtuviera un buen ajuste a las energías de atomización molecular experimental [51].

4. Planteamiento del problema

La inflamación es un proceso generado por la inmunidad innata, frente a la agresión microbiana o al daño del tejido, lo cual es benéfico; sin embargo, cuando se alteran sus mecanismos de control, se puede convertir en una patología en forma de inflamación aguda exacerbada o una inflamación crónica. Debido a la toxicidad de los actuales fármacos antiinflamatorios, es de interés generar nuevas moléculas con mayor actividad antiinflamatoria y menor toxicidad. En este sentido, la química cuántica, la química computacional y el modelado molecular, entre otras metodologías aplicadas a sistemas de interés biológico, son herramientas fundamentales que nos proporcionan el conocimiento detallado de la estructura electrónica, de los parámetros geométricos y de las propiedades fisicoquímicas que están asociados a la reactividad química de las moléculas que intervienen en los procesos inflamatorios; lo que permite diseñar nuevas moléculas con características químico-biológicas específicas; es decir con menor toxicidad y una mayor especificidad.

La importancia de este trabajo de tesis es que a partir de los tripéptidos CNS y CDS, se generaron dos familias de confórmeros, con la finalidad de analizar de manera detallada la estructura electrónica, las propiedades fisicoquímicas y su reactividad química asociado a la funcionalidad biológica de los tripéptidos mencionados; y la evaluación experimental de la inhibición de citocinas proinflamatorias y estimulación de citocinas antiinflamatorias en un sistema "*in vitro*" conocido, de células mononucleadas totales y células dendríticas estimuladas con LPS.

5. Objetivos

5.1 General

Realizar un estudio computacional a través de métodos teóricos a nivel de la teoría de funcionales de la densidad para caracterizar la estructura electrónica, los parámetros geométricos, las propiedades fisicoquímicas y la reactividad química de péptidos con actividad antiinflamatoria, y comprobar experimentalmente su efecto de las interleucinas proinflamatorias inhibitorio en un modelo *in vitro* de células dendríticas.

5.2 Particulares

- A partir de la geometría de mínima energía de los tripéptidos Cys-Asn-Ser y Cys-Asp-Ser en fase gas, se generarán dos familias de confórmeros
- Obtener la geometría de mínima energía de cada uno de los confórmeros.
- Analizar los parámetros geométricos de los confórmeros seleccionados de mínima y máxima energía de cada una de las familias.
- A partir de cálculos puntuales, se determinarán las propiedades electrónicas, fisicoquímicas y de reactividad química mediante el estudio de algunos descriptores químico-cuánticos
- Evaluar la actividad antiinflamatoria dosis-efecto de los tripéptidos CNS y CDS *in vitro*, en un modelo de células mononucleadas y dendríticas estimuladas con LPS.

6. Hipótesis del trabajo

1.- El análisis teórico de la estructura electrónica, los parámetros geométricos y las propiedades fisicoquímicas permitirá conocer los sitios de interacción y de reactividad química más importantes de los conformeros seleccionados de mínima y máxima energía.

2.- Los tripéptidos que se analizarán a partir del estudio de la estructura electrónica, reprimirán la expresión de mediadores inflamatorios en un modelo *in vitro* para el estudio de la inflamación.

7. Material

7.1 Hardware

- Dos computadoras personales, una con plataforma Windows XP y otra con linux, las cuales permiten la visualización de estructuras moleculares, el tratamiento matemático de datos y la realización de cálculos de algunas propiedades moleculares.
- Dos estaciones de trabajo, con dos procesadores Intel xeon de doble núcleo, 2 gigas en RAM, sistema operativo linux que permiten la realización de los cálculos básicos (iniciales) de la estructura electrónica.
- Conexión a control remoto a las Super Computadoras Kan Balam y Miztli, tiempo de computo conseguido a través de proyectos avalados por el comité científico de la DGCTIC-UNAM, permitiendo la aplicación –con gran precisión- de diversas metodologías teóricas basadas en los principios y conceptos de la química cuántica.

7.2 Software

- Paquetes computacionales para el cálculo de la estructura electrónica y de las propiedades moleculares, Gaussian versiones 03 y 09 (KanBalam y Miztli).
- Programas de estructura electrónica con interface para visualización de estructuras moleculares y cálculo de propiedades moleculares, Spartan para Windows´8, Hyperchem V.7.5, GaussView, v-5.1 y Moleken, Moldraw, entre otros.

8. Metodología

8.1 Sección teórica

- A partir de las estructuras optimizadas de CNS y de CDS se diseñaron 36 conformeros de cada familia. Se optimizaron las geometrías para cada uno de los 36 conformeros de cada una de las familias de los tripéptidos. Los parámetros geométricos fueron verificados con los datos teóricos previamente reportados en nuestro grupo y con las estructuras de rayos-X [1-4].
- Se realizaron cálculos puntuales de las frecuencias para corroborar que las geometrías determinadas fueran permitidas.
- A partir de las geometrías optimizadas, se llevaron a cabo los cálculos puntuales de las isosuperficies de los orbitales frontera HOMO y LUMO, así como la estimación de los sitios reactivos de cada estructura.
- A partir de los cálculos puntuales efectuados a un nivel de teoría B3LYP/6-311++G(2d,2p) se realizó la estimación de los descriptores de reactividad química: dureza, potencial químico, electrofilicidad y potencial químico; también se evaluaron las cargas atómicas obtenidas a partir del potencial electrostático.
- Se solicitó a una casa comercial (American Peptide Co., Sunnyvale, CA, USA), la síntesis de los tripéptidos analizados teóricamente y se realizaron las pruebas experimentales correspondientes en un modelo *in vitro* de células mononucleadas y dendríticas, como se describe a continuación.

8.2 Sección experimental

- **Preparación de medio de cultivo y reactivos**

Se suplementó medio RPMI 1640 con 2 mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales, 1000 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomina, 0.25 µg/mL de anfotericina B, 24 mM de bicarbonato de sodio, 25 mM de HEPES. Se emplearon GM-CSF e IL-4 para la diferenciación de monocitos a células dendríticas.

- **Obtención de células mononucleadas totales y células dendríticas a partir de sangre periférica humana.**

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana mediante el gradiente de densidad empleando Ficoll-hypaque. Las células se lavaron con medio RPMI-1640, para posteriormente incubarlas con un cóctel de anticuerpos (anti-CD19, anti-CD3 y anti-CD56) acoplados a perlas magnéticas y posteriormente se pasaron a través de columnas Miltenyi. La pureza de monocitos obtenidos se confirmó por análisis de citometría de flujo empleando anticuerpos anti-CD14 para monocitos, CD19 para linfocitos B y CD3 para Linfocitos T. Las células dendríticas inmaduras se obtuvieron cultivando los monocitos humanos purificados, en presencia de GM-CSF 200 ng/mL y 50 ng/mL de IL-4 durante 7 días a 37 °C y con 20 mL de medio RPMI suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 mcg/mL de estreptomina y suero fetal bovino al 10%. La diferenciación hacia células dendríticas fue confirmada por la expresión de CD1a, MHCII, CD14, mediante citometría de flujo, así como por visualización morfológica.

Las CD se analizaron para marcadores de maduración celular asociados al ambiente inflamatorio; usando anticuerpos monoclonales se realizó la determinación de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 por citometría de flujo, así como anticuerpos para valorar la expresión de las moléculas del MHC clase I y II.

Determinación del efecto antiinflamatorio de péptidos sintéticos en células mononucleadas totales y células dendríticas

Las células mononucleadas y células dendríticas se ajustaron y sembraron 500000 células/pozo en placas de 24 pozos estériles y libres de pirógenos. Se estimularon con 250 ng de LPS y al mismo tiempo fueron tratadas con diferentes dosis de los péptidos sintéticos 1, 10, 25, 50 y 100 ng. Al término de 24 horas post-estimulación se determinó la concentración de los mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-6 e IL-10 del sobrenadante de los cultivos por la técnica de inmunoabsorción ELISA. En otro esquema, las CD se estimularon con 250 ng de LPS durante 3 horas. A continuación, se adicionaron diferentes concentraciones de péptidos sintéticos, se incubaron durante 6 y 24 horas; al término de este tiempo se evaluó la concentración de las citocinas ya mencionadas por el ensayo de inmunoabsorción ligando enzima (ELISA).

9. Análisis y discusión de resultados

9.1 Optimización geométrica de las estructuras de los tripéptidos Cys-Asn-Ser (CNS) y Cys-Asp-Ser (CDS)

› Tripéptido Cys-Asn-Ser (CNS)

Los cálculos de la estructura electrónica se realizaron con el programa Gaussian 03 y 09, para los tripéptidos Cys-Asn-Ser y Cys-Asp-Ser. La optimización de las geometrías de cada uno de los tripéptidos se realizó mediante el método de la teoría del funcional de la densidad (TFD), utilizando el funcional híbrido B3LYP (3 parámetros de Becke y Lee-Yang Parr) y con el conjunto base 6-311+G(d,p). Es importante mencionar que se realizaron cálculos de frecuencia al mismo nivel de teoría para realizar la corrección de la energía al punto cero (ZPVE). En la Figura 15, se muestra la estructura optimizada de mínima energía del tripéptido Cys-Asn-Ser (CNS), el cual es denominado en este trabajo de tesis como el confórmero 0.

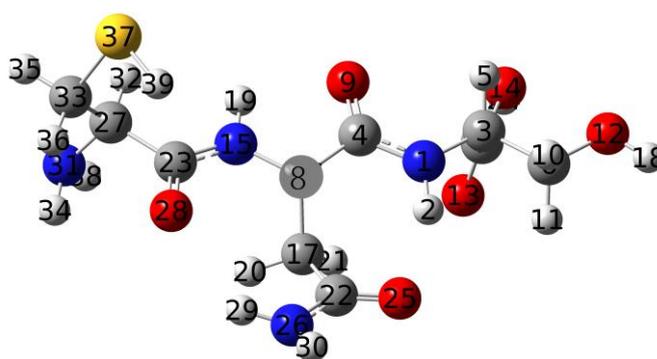


Figura 15. Estructura optimizada de mínima energía del tripéptido CNS

A partir de la estructura de mínima energía del tripéptido CNS y tomando como referencia dicha estructura, se modificó el ángulo diedro d25 en pasos de 10^0 grados, como se muestra en la Figura 16; para generar una familia de 36 confórmeros.

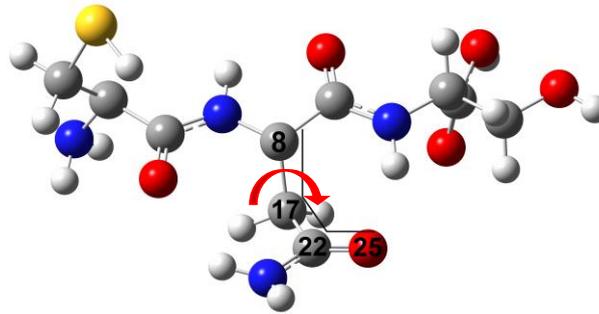
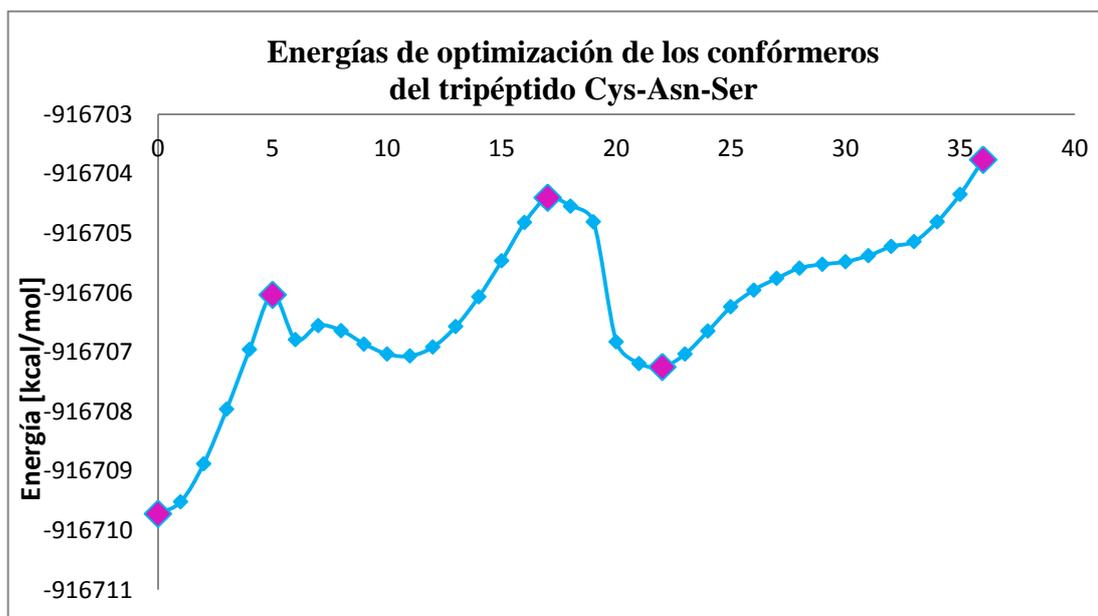


Figura 16. Estructura optimizada de mínima energía, donde se señala el ángulo diedro d25, modificado para generar la familia de conformeros

Cada uno de los 36 conformeros generados, fueron optimizados al mismo nivel de cálculo que la estructura de referencia, como se muestra en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Trayectoria energética de los 36 conformeros del tripeptido CNS.

En la Gráfica 1, se muestra la trayectoria energética de la optimización de la familia de los 36 conformeros, incluyendo el conformero 0, del tripeptido CNS. De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos observar en el gráfico los conformero de máxima y mínima energía; siendo el conformero 0 el de mínima energía global y el conformero 22 la estructura de mínima energía local.

También se observan estructuras geométricas de máxima energía local y una global que corresponden a los conformeros 5, 17 y 36, respectivamente (Gráfica 1 y Tabla 6). Es importante mencionar que la discusión del presente trabajo se enfocará principalmente a los conformeros de máxima y mínima energía, debido a que es en estas estructuras geométricas donde se encontraron las principales similitudes y/o diferencias de las propiedades fisicoquímicas, electrónicas y de reactividad química de los péptidos en estudio.

Tabla 6. Energías de optimización de conformeros de mínima y máxima energía del tripéptido CNS a nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p.)

Conformero	Energía (a.u.)	ZPVE	Energía (a.u.)	Energía (kcal/mol)	ΔE (kcal/mol)
conf-0	-1460.86870	0.3079	-1460.56079	-916516.50	0.0
conf-5	-1460.86283	0.3073	-1460.5555	-916513.19	3.30
conf-17	-1460.86023	0.3066	-1460.5536	-916511.96	4.54
conf-22	-1460.86476	0.3073	-1460.55745	-916514.40	2.10
conf-36	-1460.85921	0.3071	-1460.55208	-916511.03	5.47

En la Tabla 6 se observa que al modificar el ángulo del conformero, la diferencia energética aumenta. Como se puede ver en el conformero 5 aumenta en 3.30 kcal/mol respecto al conformero 0, mientras que en el conformero 36 el aumento es de 5.47 kcal/mol; sin embargo, el conformero 22 es el que presenta la mínima energía local. En contraste en el conformero 17 se observa una energía local de 4.54 kcal/mol siendo la segunda mayor, después del conformero 36 que es el conformero de máxima energía global. No obstante, la geometría del conformero 17 no es estabilizada por puentes de hidrógeno intramoleculares como el conformero 36, tal como se muestra en la Figura 17.

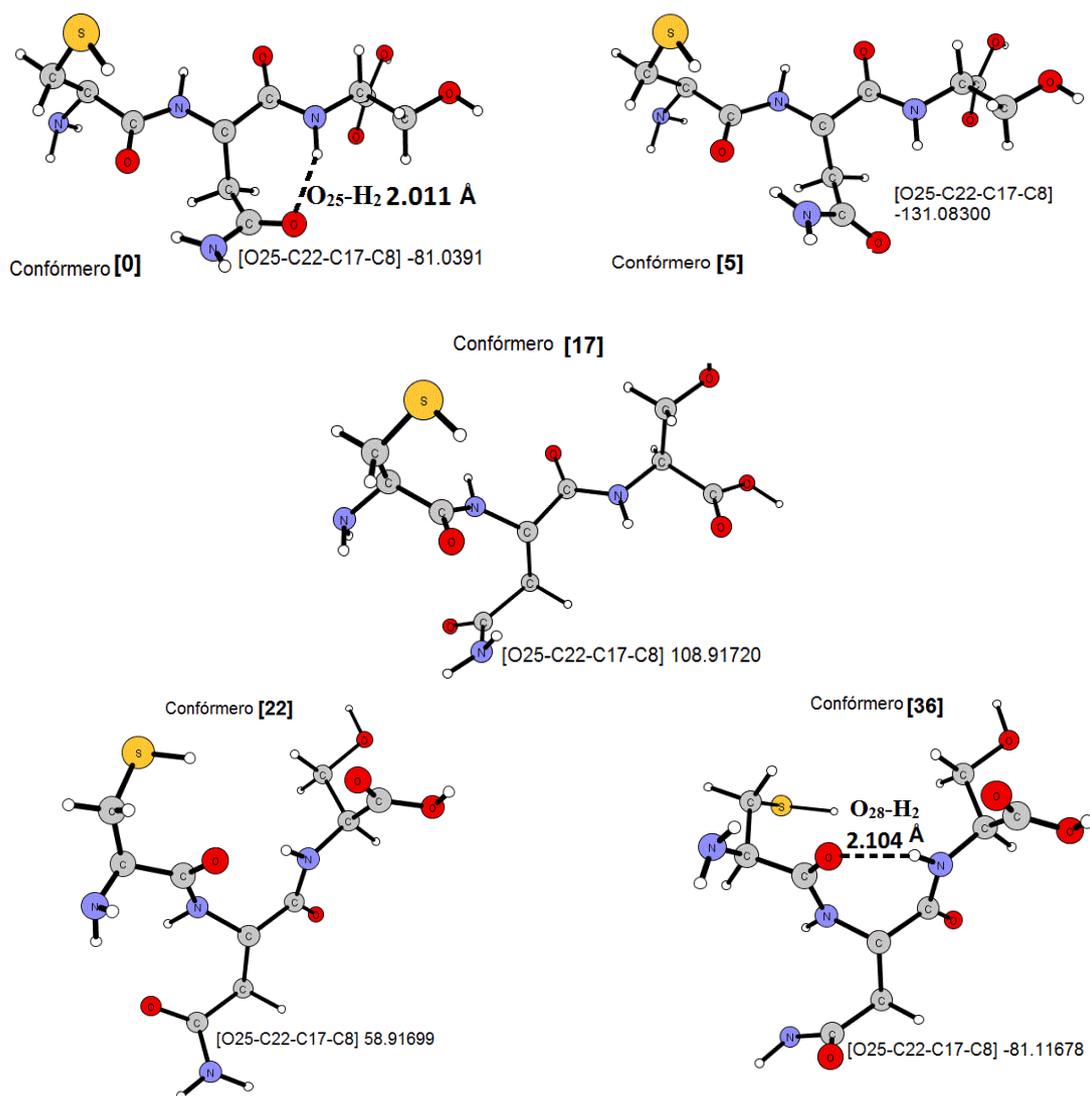


Figura 17. Estructuras optimizadas de los conformeros de mínima y máxima energía del tripeptido CNS.

Al analizar las estructuras conformacionales del tripeptido CNS, se observó que al modificar el valor del ángulo diedro d25, se presentan importantes modificaciones geométricas. Tal que, a medida que se rota el ángulo d25, se pierde el puente de hidrógeno intramolecular $O_{25}-H_2$ que posee el conformero 0 y al mismo tiempo se generan nuevos puentes de hidrógeno; observándose uno entre los átomos $O_{28}-H_2$ en el conformero36, ya que al rotar los 360° no regresemos a la estructura original, como se observa en el conformero 36 (Figura 17). Por lo anterior se asume que dicho puente de hidrógeno $O_{28}-H_2$ estabiliza la geometría de esta nueva estructura [5].

> **Tripéptido Cys-Asp-Ser (CDS)**

En la Figura 18 se muestra la estructura optimizada de mínima energía para el tripéptido Cys-Asp-Ser (CDS); a partir de esta estructura que se nombró conformero 0, se generó una familia de 36 conformeros cuya variación fue en el ángulo diedro $d_{25}=\text{O}_{25}-\text{C}_{22}-\text{C}_{17}-\text{C}_8$, modificando en 10° para cada conformero, dichas estructuras fueron optimizadas a nivel B3LYP/6-311+G(d, p).

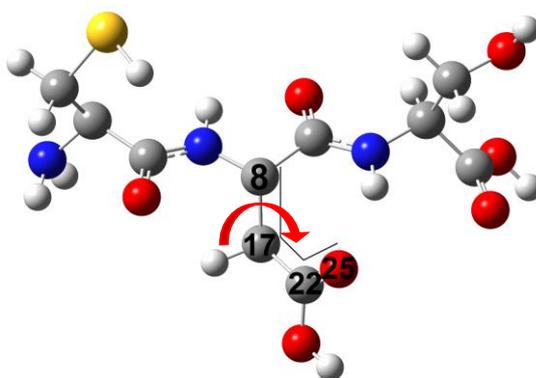
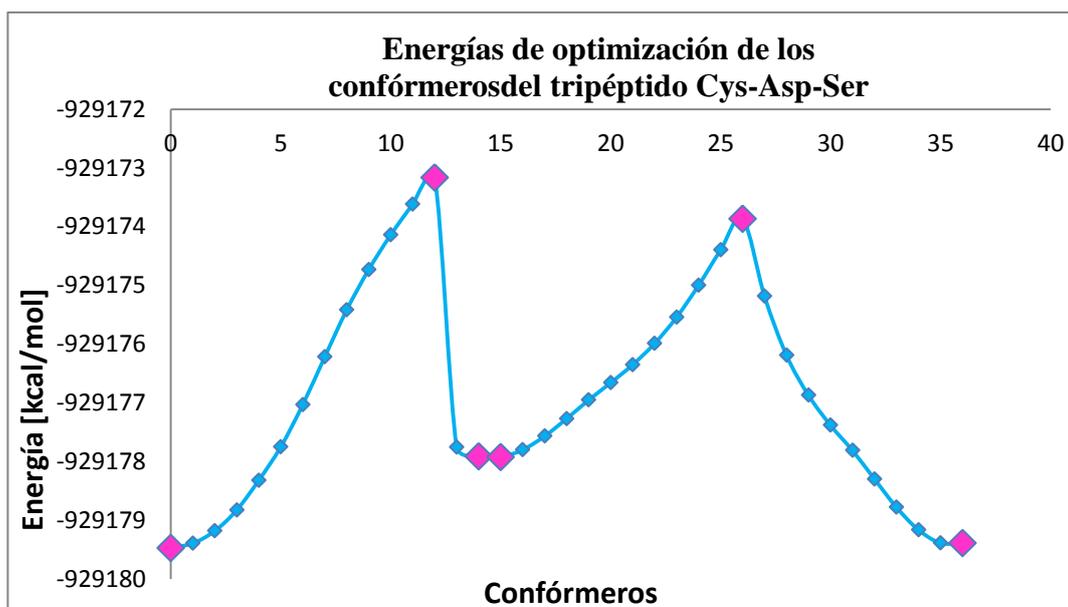


Figura 18. Estructura optimizada de mínima energía del tripéptido CDS, donde se señala el ángulo diedro d_{25} , modificado para generar la familia de conformeros

Los resultados obtenidos de las optimizaciones geométricas de cada uno de los 36 conformeros, corroboraron que la estructura que se muestra en la Figura 18, es la de mínima energía global (Gráfica 2). Cabe destacar que el conformero 0 y el conformero 36 ambos corresponden a estructuras de mínima energía global, debido a que presentan un valor similar del ángulo diedro d_{25} ; es decir, en este tripéptido regresamos a la estructura inicial, como se puede observar en la Gráfica 2, en donde se ilustra la trayectoria energética de las optimizaciones geométricas de cada uno de los 36 conformeros del tripéptido CDS.



Gráfica 2. Trayectoria energética de los 36 conformeros del tripéptido CDS.

Los conformeros 14 y 15 son estructuras de mínima energía locales; en contraste, observamos un conformero de máxima energía local que es el conformero 26 y el de mayor energía global que corresponde al conformero 12, como se muestra en la Gráfica 2 y Tabla 7.

Tabla 7. Energías de optimización de los conformeros de mínima y máxima energía del tripéptido CDS a nivel de teoría B3LYP/6-311+G (d.p.)

Conformero	Energía (a.u.)	ZPVE	Energía (a.u.)	ΔE (kcal/mol)
conf-0	-1480.74049	0.2948	-1480.44566	0
conf-12	-1480.73044	0.2947	-1480.43572	6.24
conf-14	-1480.73801	0.2948	-1480.44320	1.55
conf-15	-1480.73802	0.2947	-1480.44328	1.49
conf-26	-1480.73044	0.2944	-1480.43596	6.09
conf-36	-1480.74036	0.2949	-1480.44545	0.13

El conformero 12 presentó la mayor variación energética (6.24 kcal/mol), seguido por el conformero 26 (6.09 kcal/mol), siendo estos los conformeros de máxima energía global y local respectivamente. Los conformeros 14 y 15 son de mínima energía local, todos con respecto al conformero 0.

Es importante destacar que al analizar los valores de energía optimizada para los conforméromos 0 y 36, se observa una diferencia de 0.13 kcal/mol lo cual no es significativo ya que termodinámicamente valores menores a 0.5 kcal/mol se consideran fluctuaciones por lo que podemos decir que ambos conforméromos son isoenergéticos y de mínima energía.

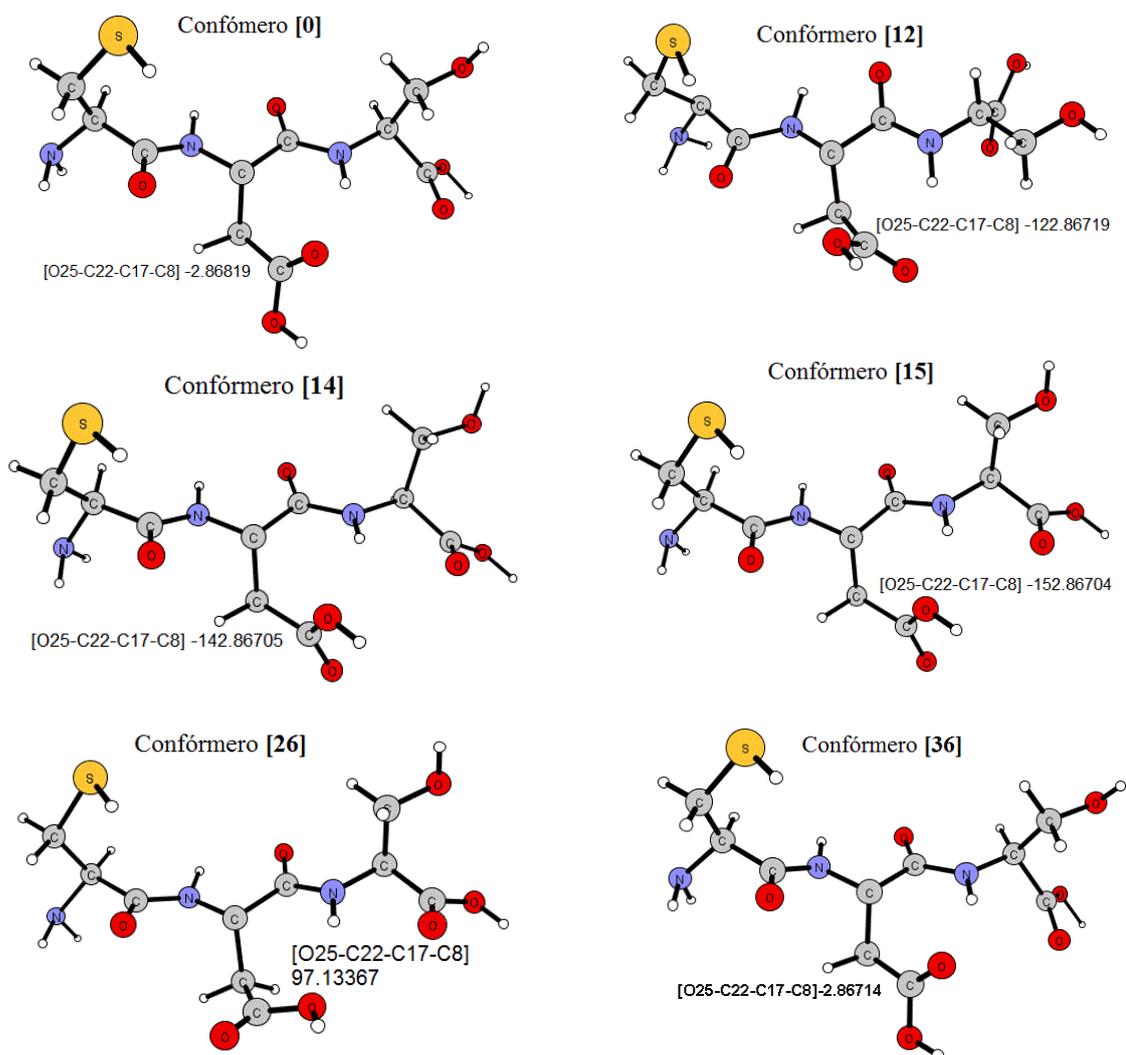


Figura 19. Estructuras optimizadas de los conforméromos de mínima y máxima energía del tripéptido CDS.

Cabe mencionar que al analizar estructuralmente ambas familias de conforméromos de mínima y máxima energía, observamos que en la familia del tripéptido CDS (Figura 19), el esqueleto principal es similar que para el tripéptido CNS (Figura 15), la diferencia radica en la cadena lateral del aminoácido central en ambos casos (asparagina CNS y ácido aspártico CDS).

En la cadena lateral del tripéptido CNS se encuentra un grupo funcional amida (-CONH₂), mientras que el tripéptido CDS el grupo funcional en su cadena lateral es un ácido carboxílico (-COOH).

En la familia de los conformeros del tripéptido CDS se favorecen menos las interacciones intramoleculares. No obstante, se observa que en el caso del tripéptido CNS hay formación de puentes de hidrógeno intramoleculares lo que le confiere una mayor estabilidad al tripéptido.

Es importante señalar que de acuerdo a los resultados obtenidos y para corroborar que estamos trabajando con estructuras permitidas, realizamos un análisis geométrico basado en los diagramas de Ramachandran, como se discuten en la siguiente sección.

9.2 Análisis de diagramas de Ramachandran

Las propiedades de una proteína o péptido están determinadas en su mayor parte por su estructura tridimensional ya sea secundaria o terciaria, las cuales conllevan a la información clave para determinar su función. Por ello es importante considerar las propiedades geométricas del enlace peptídico, debido a que su estudio es de suma prioridad para comprender cualquier estructura que lo contenga, como son las proteínas y péptidos ya que estas estructuras son secuencias de aminoácidos ligadas a través de enlaces peptídicos planos y rígidos.

Por esta razón, la conformación del esqueleto de una proteína o péptido se puede especificar por sus ángulos de torsión alrededor del enlace C_α-N (ϕ) y del enlace C_α-C (ψ) de cada uno de los aminoácidos que lo forman, de ahí que el diagrama de Ramachandran, es un método con resultados confiables y ampliamente utilizado, el cual nos proporciona información sobre las conformaciones espaciales permitidas de una proteína o péptido, y se obtiene calculándose todos los valores de los ángulos ϕ y ψ de la cadena polipeptídica [22].

De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se realizó el análisis de los péptidos en estudio, bajo los criterios de los diagramas de Ramachandran cuyos resultados se muestran a continuación.

- **Tripéptido Cys-Asn-Ser (CNS)**

En la Figura 20 se muestra los ángulos Φ (Phi) y Ψ (Psi) del tripéptido CNS, así como los átomos que los forman, en esta figura no se consideran los átomos de hidrógeno para una mejor visualización de la cadena principal donde se encuentran los enlaces peptídicos, en los cuales se basa el análisis de los diagramas de Ramachandran.

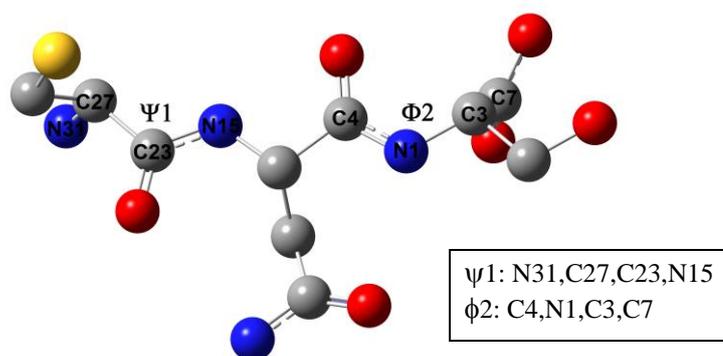


Figura 20. Ángulos diedros ψ y ϕ , de la estructura del tripéptido CNS

La Gráfica 3 ilustra el diagrama de Ramachandran realizado para el tripéptido CNS, donde se graficaron los valores de los ángulos ϕ 2 y ψ 1. Los valores de los ángulos mencionados se obtuvieron modificando 20° ambos ángulos diedros, partiendo de la estructura optimizada de mínima energía global (confórmero 0), con lo que graficamos 18 confórmeros cuyos valores de los ángulos de cada confórmero se reportan en la Tabla 8.

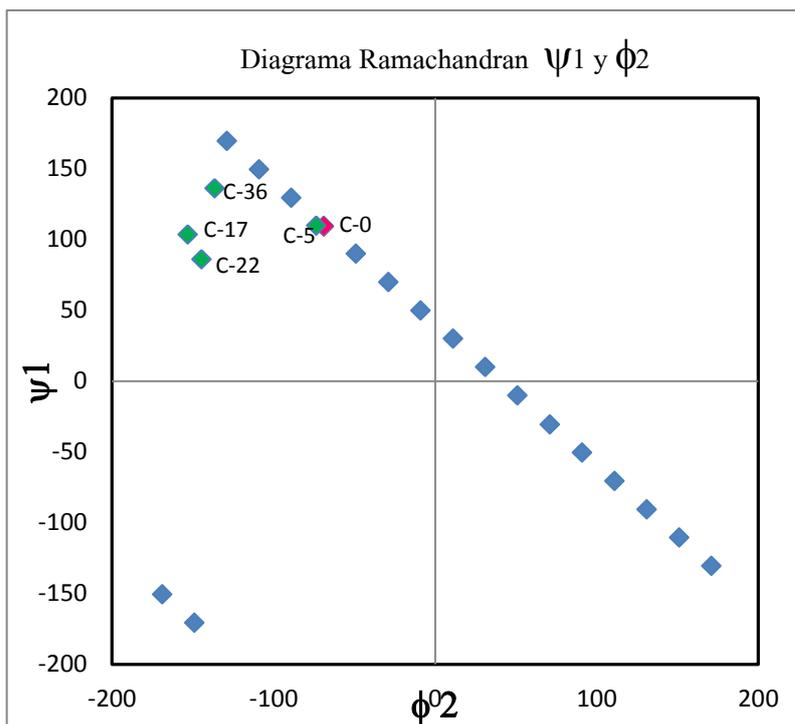


Tabla 8. Valores de ángulos diedros del tripéptido CNS

ψ_1	ϕ_2
109.38	-68.94
129.38	-88.94
149.38	-108.94
169.38	-128.94
-170.62	-148.94
-150.62	-168.94
-130.62	171.06
-110.62	151.06
-90.62	131.06
-70.62	111.06
-50.62	91.06
-30.62	71.06
-10.62	51.06
9.34	31.06
29.34	11.06
49.34	-8.94
69.34	-28.94
89.34	-48.94
109.34	-68.94

Gráfica 3. Diagrama de Ramachandran para el tripéptido CNS con los ángulos ψ_1 y ϕ_2

Al analizar la Gráfica 3 correspondiente al diagrama de Ramachandran del tripéptido CNS podemos observar que 7 de los 18 conformeros optimizados a nivel de teoría B3LYP/6-311+G(d,p), tienden a adoptar una conformación de loops, las cuales son estructuras no permitidas, mientras que 11 conformeros donde está incluido el conformero de mínima energía global se encuentran en regiones de estructuras permitidas.

Cabe mencionar que los cálculos teóricos concuerdan con los diagramas de Ramachandran. Ya que los conformeros tanto de mínima como máxima energía local y global obtenidos en la trayectoria energética (Gráfica 2), presentan estructuras permitidas; tal, como se muestran en la Gráfica 3. El conformero 0 se muestra en color rojo, mientras que los conformeros 5, 17, 22 y 36 se muestran en color verde.

- **Tripéptido Cys-Asp-Ser (CDS)**

A continuación se muestra la Figura 21 correspondiente a la estructura optimizada del tripéptido CDS, donde se observan los ángulos Ψ_1 y Φ_2 al igual que los átomos que conforman estos ángulos diedros en la estructura.

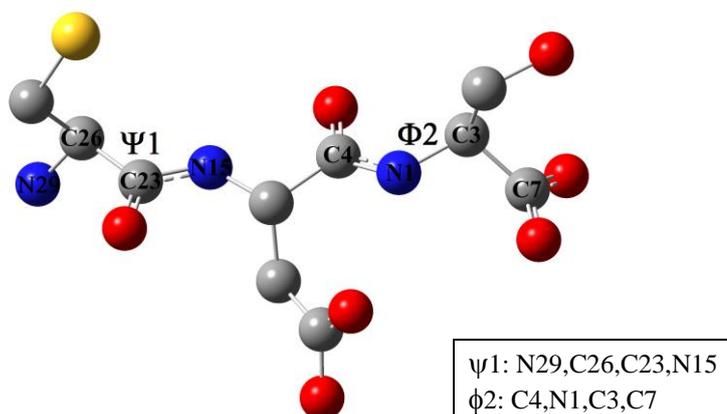


Figura 21. Estructura del tripéptido CDS esquematizando ángulos diedros ψ y ϕ

En la Gráfica 4 se analiza el diagrama de Ramachandran para el tripéptido CDS. A partir de la estructura de mínima energía global se obtuvieron 18 conformeros, de los cuales en la Tabla 9 se reportan los valores de sus ángulos diedros ψ_1 y ϕ_2 . Se observa que 12 conformeros incluido el conformero de mínima energía global se localizan en regiones de estructuras permitidas, mientras que 6 conformeros no.

A partir del diagrama de Ramachandran para el tripéptido CDS, se seleccionaron los conformeros de mínima y máxima energía local y global obtenidos en la trayectoria energética (Gráfica 2). En la Gráfica 4, se muestra al conformero 0 y 36 en color rojo y, los conformeros 12, 14, 15 y 26 en color verde. Los cuales se encuentran en una de las áreas del diagrama de Ramachandran que nos denota que presentan estructuras conformacionales permitidas.

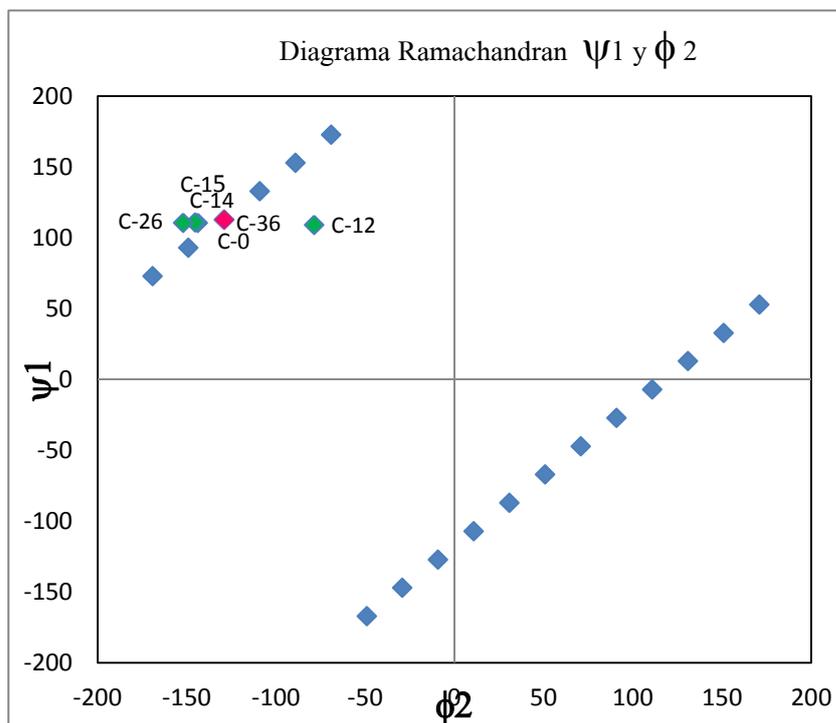


Tabla 9. Valores de ángulos diedros del tripeptido CDS

$\psi 1$	$\phi 2$
112.69	-128.99
132.69	-108.99
152.69	-88.99
172.69	-68.99
-167.31	-48.99
-147.31	-28.99
-127.31	-8.99
-107.31	11.01
-87.31	31.01
-67.31	51.01
-47.31	71.01
-27.31	91.01
-7.31	111.01
12.69	131.01
32.69	151.01
52.69	171.01
72.69	-168.99
92.69	-148.99
112.69	-128.99

Gráfica 4. Diagrama de Ramachandran para el tripeptido CDS con los ángulos $\psi 1$ y $\phi 2$

9.3 interacciones intramoleculares: puentes de hidrógeno

En esta sección se analizan las interacciones intramoleculares tipo puentes de hidrógeno, de los conformeros de mínima y máxima energía de los tripeptidos CNS y CDS. Dichas interacciones son de suma importancia en la estabilidad estructural y funcionalidad de las biomoléculas.

Las consideraciones que tomamos para determinar la formación de un puente de hidrógeno; son, la distancia de enlace, que debe ser igual o menor que la suma de los radios de van der Waals de los átomos que interactúan. Así como, la electronegatividad y la coplanaridad entre los átomos involucrados [44, 46].

- **Familia de conformeros del tripéptido Cys-Asn-Ser (CNS)**

En la Figura 22 se muestran los puentes de hidrógeno que se forman en los conformeros de mínima y máxima energía local y global del tripéptido CNS. En el conformero 0 se observan 2 puentes de hidrógeno, el enlace H₂-O₂₅ que es el de menor distancia [5], y O₂₈-H₂₉ que le confieren estabilidad a esta estructura.

En el conformero 5, se pierde el puente de hidrógeno H₂-O₂₅. La distancia del enlace O₂₈-H₂₉ disminuye, lo cual tiene sentido con las conformaciones que adquiere esta molécula conforme se modifica el ángulo diedro d25, ya que la estructura se cierra conforme este ángulo se rota. La estructura de máxima energía local corresponde al conformero 17, en el cual no se forman puentes de hidrógeno.

La estructura de mínima energía local corresponde al conformero 22, en esta estructura se localizaron 2 puentes de hidrógeno. Confiriéndole, importantes cambios estructurales. Se observa que el carboxilo y amino terminal se anclan hacia el interior, el átomo O₉ invierte su posición lo cual lo expone al exterior de la cadena principal del tripéptido y con ello deja de participar en las interacciones intramoleculares. El átomo O₂₅ forma el puente O₂₅-H₁₉, esta interacción se origina ya que el átomo H₁₉ invierte su posición al exterior de la cadena principal y el átomo O₂₅ también invierte su posición inicial. También, se forma el puente de hidrógeno O₂₈-H₂, lo cual propicia el anclaje de la estructura, siendo estas dos interacciones las responsables de los cambios conformacionales.

Respecto al conformero 36 el ángulo diedro d25 es el mismo que en el conformero 0; sin embargo, los conformeros son estructural y energéticamente distintos, -916516.50 kcal/mol para el conformero 0 y -916511.30 kcal/mol para el conformero 36, debido a la inversión en la posición original de los átomos H₂, O₉, H₁₉ y O₂₈, perdiéndose las interacciones iniciales y originándose nuevas conformaciones; es decir, el puente de hidrógeno que proporcionaba mayor estabilidad estructural era H₂-O₂₅, pero al invertir su posición el átomo H₂ esta

interacción se pierde, lo cual origina una nueva y la más importante entre H_2-O_{28} , en el conformero 36.

Las modificaciones estructurales en el tripéptido CNS al variar el ángulo diedro d_{25} , conllevan a un puente de hidrógeno de mayor importancia entre H_2-O_{28} , que ya no permite regresar a la estructura original, como se muestra en la Figura 22.

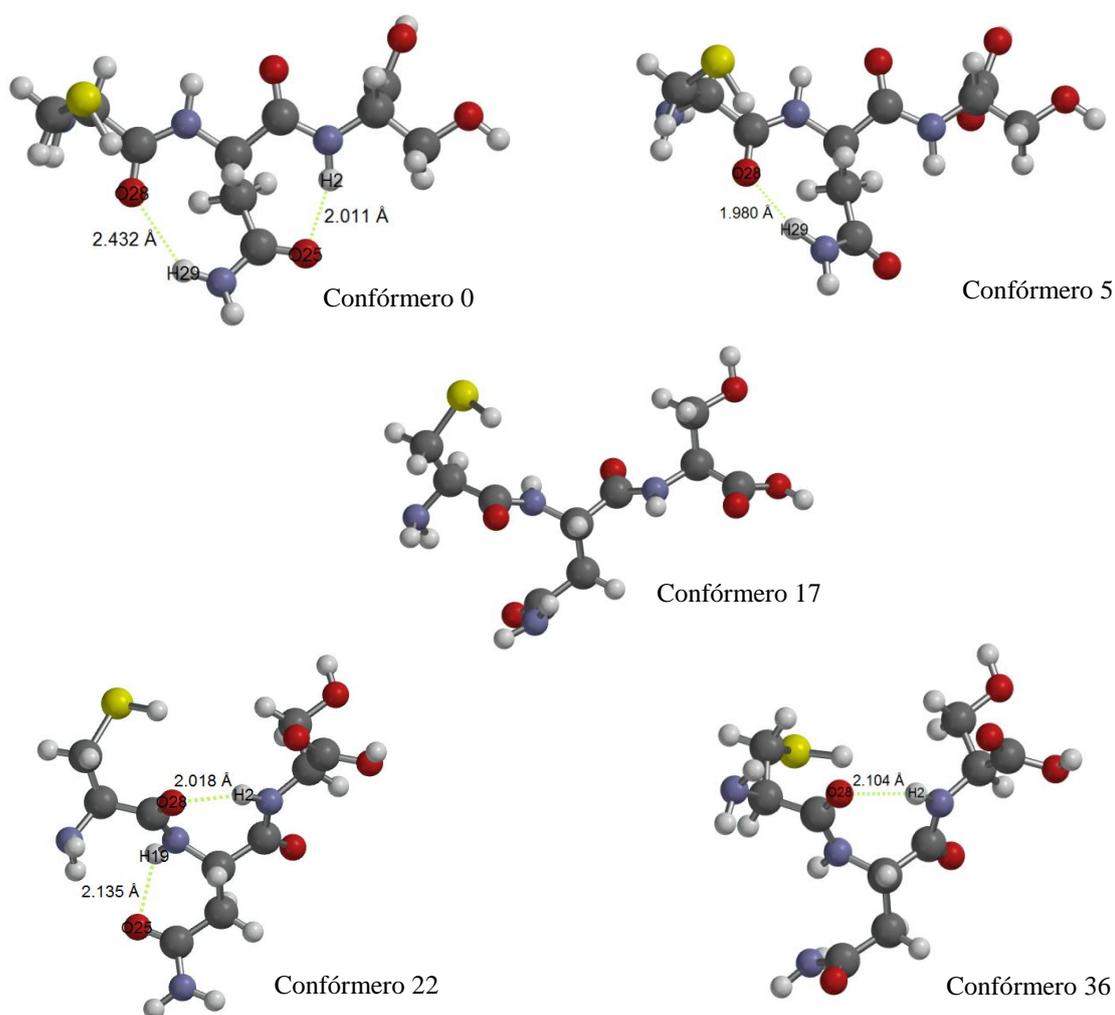


Figura 22. Puentes de hidrógeno en conformeros de mínima y máxima energía local y global del tripéptido CNS

- **Familia de confórmeros del tripéptido Cys-Asp-Ser (CDS)**

En la Figura 23 se muestran los puentes de hidrógeno de las estructuras de mínima y máxima energía local y global del tripéptido Cys-Asp-Ser respectivamente. El confórmero 0 corresponde a la estructura de mínima energía global, donde se observa el puente de hidrógeno entre O₂₅-H₂, dicha interacción es de gran importancia y le confieren estabilidad.

En el confórmero 12 no se observa la formación de puentes de hidrógeno, esto puede deberse a que energéticamente es el confórmero de mayor energía global (Tabla 7), Lo cual nos indica que es el confórmero menos estable.

Se obtuvieron dos estructuras de mínima energía local que corresponden a los confórmeros 14 y 15. En el confórmero 14 se observa un desdoblamiento del esqueleto principal lo cual se puede observar con la distancia entre los átomos H₂₄ y H₃₄ de los aminoácidos de los extremos, ya que conforme se rota el ángulo ϕ_{25} esta distancia aumenta y se pierde el puente de hidrógeno O₂₅-H₂. Sin embargo, el átomo O₂₅ cambia de posición al igual que el grupo hidroxilo del O₂₈, con lo que queda expuesto el átomo O₂₈ hacia la cadena principal y permite la interacción con el H₂, formándose el puente de hidrógeno O₂₈-H₂. Cabe señalar que la interacción que presenta el confórmero 15 es semejante a la observada en el confórmero 14.

El confórmero 26 es la estructura de máxima energía local, en el cual se observa la interacción entre O₂₈-H₂ al igual que en los confórmeros 14 y 15. Y aunque, las distancias de este puente de hidrógeno no presentan una gran variedad en los tres confórmeros, la diferencia es energética ya que el confórmero 26 es el más inestable (Tabla 7).

Al analizar el confórmero 36, este es energética y estructuralmente similar al confórmero 0, ya que ambos son confórmeros de mínima energía global, como se muestra en la Gráfica 2.

Una vez que se ha rotado 360° el ángulo diedro d25 se observa que la interacción intramolecular del conformero 36 es la misma que presenta el conformero 0 $O_{25}-H_2$, incluso los valores de este puente de hidrógeno son similares. Lo cual indica que este puente de hidrógeno es el que proporciona la mayor estabilidad estructural en el tripéptido CDS.

El estudio de los puentes de hidrógeno es de gran importancia debido a que dichas interacciones son las responsables de la estabilidad estructural, así como de las interacciones intra e intermoleculares en sistemas biológicos, como se ha observado en estudios previos [23, 44, 45].

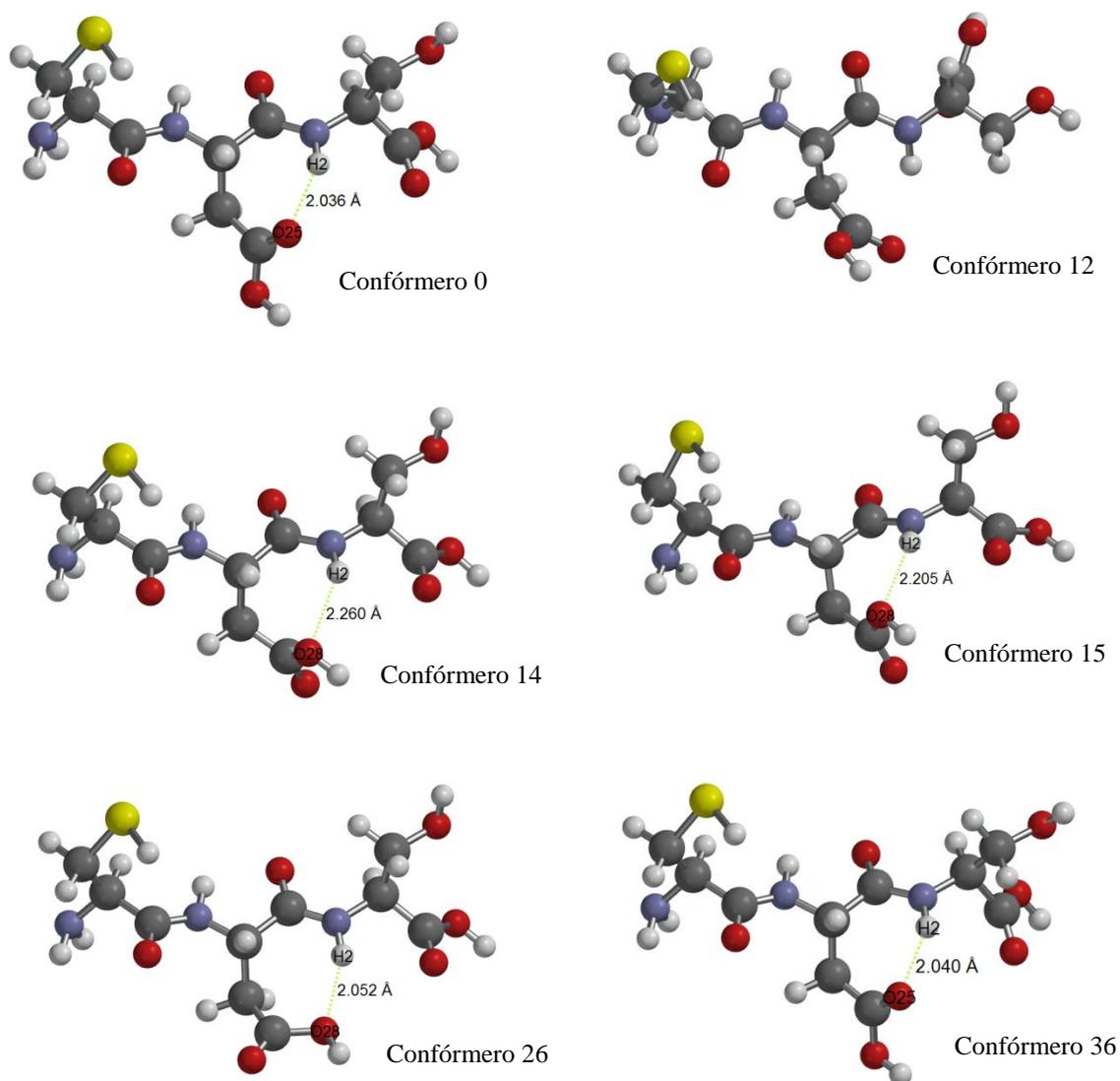


Figura 23. Puentes de hidrógeno en conformeros de mínima y máxima energía local y global del tripéptido CDS

9.4 Parámetros geométricos de los tripéptidos: CNS y CDS

- **Parámetros geométricos**

A partir de las estructuras optimizadas de los conformeros del tripéptido CNS, en la Tabla 10 se presentan los parámetros geométricos de los conformeros de mínima y máxima energía.

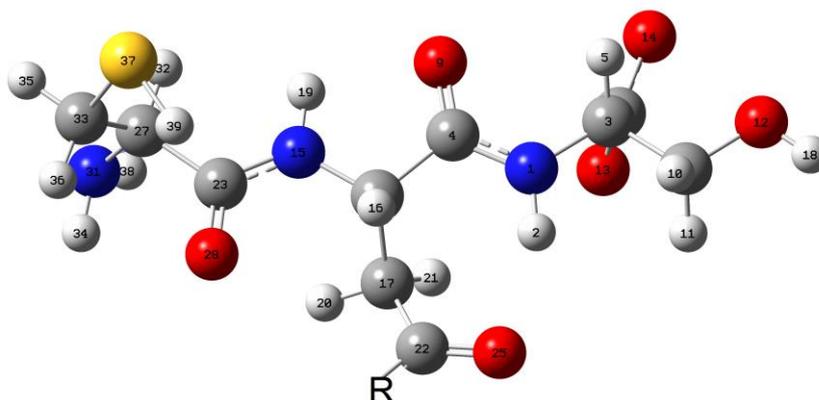


Figura 24. Estructura genérica del tripéptido, R = -NH₂ para CNS y R= -OH para CDS

Tabla 10. Parámetros geométricos de la familia de conformeros del tripéptido CNS a nivel B3LYP/6-311+G(d,p)

Parámetro geométrico	Conf-0 (°)	Conf-22 (°)	Conf-36 (°)	Rayos-X [4]
N1-H2	1.02	1.01	1.01	0.94
C4-O9	1.22	1.22	1.22	
C22-O25	1.22	1.22	1.21	1.259
C8-C17	1.55	1.53	1.53	
N15-H19	1.01	1.01	1.01	
C23-O28	1.23	1.23	1.22	
N26-C22	1.35	1.35	1.38	
C33-S37	1.83	1.83	1.83	1.811
S37-H39	1.34	1.34	1.34	
C4-N1-H2	118.50	118.46	118.08	117.0
C8-C4-N1	114.82	113.93	113.78	
C8-C4-O9	121.18	121.79	121.93	
C8-C17-C22	109.07	113.49	112.53	
C23-N15-H19	121.99	116.84	118.59	
O28-C23-N15	122.43	122.33	122.51	
C8-C4-N1-H2	10.72	-5.24	-8.94	
C8-C4-N1-C3	174.59	-177.30	-178.99	
C8-C17-C22-O25 (d25)	-81.08	58.91	-81.11	
C8-C17-C22-N26	96.11	-121.52	96.95	
N15-C8-C4-O9	3.38	-113.07	-100.40	
H19-N15-C8-C4	-1.76	120.03	104.69	
O28-C23-N15-C8	-4.99	17.05	7.17	
O28-C23-N15-H19	-171.95	166.63	179.25	

De acuerdo a los resultados obtenidos, los parámetros geométricos están de acuerdo con los datos experimentales de rayos-X [4].

Se observa que el tripéptido CNS sufre ligeras modificaciones en los enlaces N₁-H₂, C₂₂-O₂₅, C₈-C₁₇, C₂₃-O₂₈ y N₂₆-C₂₂, con la rotación del ángulo d25, los cambios más importantes se dan en los ángulos diedros, como se observa en la Tabla 10. Lo cual es consistente con las modificaciones que sufren las estructuras de mínima y máxima energía del tripéptido CNS y aunado a esto, las interacciones intramoleculares que se presentan favorecen modificaciones estructurales como se observa en el conformero 36 (Figura 22).

En la Tabla 11, se muestran los parámetros geométricos de distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros de los conformeros de mínima y máxima energía del tripéptido CDS.

Tabla 11. Parámetros geométricos de la familia de conformeros de CDS a nivel B3LYP6-311+G(d,p)

Parámetro geométrico	Conf-0 (°)	Conf-15 (°)	Conf-36 (°)	Rayos-X[4]
N1-H2	1.01	1.01	1.01	0.94
C4-O9	1.22	1.22	1.22	
C22-O25	1.21	1.20	1.21	1.259
C8-C17	1.54	1.54	1.54	
N15-H19	1.01	1.01	1.01	
C23-O28	1.22	1.22	1.22	
O26-C22	1.34	1.36	1.34	
C33-S37	1.83	1.83	1.83	1.811
S37-H39	1.34	1.34	1.34	
C4-N1-H2	118.87	119.78	118.44	117.0
C8-C4-N1	115.43	115.20	115.24	
C8-C4-O9	120.67	121.19	120.75	
C8-C17-C22	114.19	117.64	114.38	
C23-N15-H19	121.62	121.63	121.59	
O28-C23-N15	122.62	122.60	122.66	
C8-C4-N1-H2	1.37	-0.64	4.36	
C8-C4-N1-C3	178.73	175.06	176.87	
C8-C17-C22-O25	-2.86	-152.86	-2.86	
C8-C17-C22-O26 (d25)	176.45	29.20	176.41	
N15-C8-C4-O9	-11.74	-19.77	-13.27	
H19-N15-C8-C4	7.12	12.25	7.66	
O28-C23-N15-C8	-4.84	-2.79	-4.48	
O28-C23-N15-H19	-172.82	-175.69	-173.77	

Respecto a los ángulos diedros del tripéptido CDS, se observa que el valor de los ángulos diedros $O_{28}C_{23}N_{15}H_{19}$ y $H_{19}N_{15}C_8C_4$ son mínimas, el primero tiene una disminución de 0.96° y el segundo aumenta 0.54° .

La modificación más importante se dio en el ángulo diedro $C_8C_4N_1H_2$. Sin embargo, en estas estructuras se aprecian ligeras variaciones en sus ángulos diedros, pero estructuralmente no se perciben al superponer los conformeros 0 y 36, de hecho en estas estructuras no se presentaron grandes modificaciones en comparación con las estructuras de CNS. Esto es debido a que en CDS el tripéptido tiene Asp como aminoácido central y en su cadena lateral un grupo carboxilo, el cual no influye de manera significativa en las interacciones intramoleculares.

9.5 Descriptores químico-cuánticos de reactividad

A partir de las estructuras optimizadas se realizaron cálculos puntuales a nivel B3LYP/6-311+G(2d,2p), de cada uno de los conformeros del CNS, para determinar los descriptores químico-cuánticos, con la finalidad de analizar los sitios más importantes de interacción y conocer la estructura electrónica y reactividad química de los conformeros. En la Tabla 12 se muestran los valores de dureza (η), índice de electrofilicidad (ω), momento dipolar total (μ_T) y extensión espacial de la densidad electrónica (R^2).

Tabla 12. Descriptores químico-cuánticos de la familia de conformeros CNS a nivel B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-311+G(d,p)

Conformero	HOMO	LUMO	η (e.V)	ω (e.V)	μ_T (Debyes)	R^2 (a.u)
CNS-0	-0.2475	-0.0269	3.00	2.32	2.47	9286.89
CNS-22	-0.2412	-0.0331	2.83	2.46	4.90	8199.34
CNS-36	-0.2559	-0.0315	3.05	2.50	3.01	7967.16

Se observa que los conformeros 0 y 36 presentan un valor de dureza mayor lo cual nos indica que tienen mayor resistencia al cambio de su configuración electrónica por lo tanto son más estables que el conformero 22; es decir, menos reactivos. Por otra parte, podemos ver que el valor de electrofilia es mayor para el conformero 36 lo cual sugiere que presenta una mayor deficiencia de carga, el menor valor es para el conformero 0.

El conformero 22 posee el mayor momento dipolar y el conformero 0 el menor, lo que indica que la densidad de carga podría estar más deslocalizada en el conformero 22, lo cual concuerda con el valor de la dureza.

Analizando la densidad electrónica podemos conocer la medida de la extensión electrónica de estos conformeros, siendo que el conformero 36 es el que tiene el menor valor, es decir, su densidad es más compacta en comparación con los conformeros 0 y 22, lo que nos indica que la zona de interacción podría ser mayor para estos conformeros.

En la Tabla 13 se muestran los descriptores químico-cuánticos de los conformeros de la familia del tripéptido CDS, tales como dureza (η), índice de electrofilicidad (ω), momento dipolar total (μ_T) y extensión espacial de la densidad electrónica (R^2).

Tabla 13. Descriptores químico-cuánticos de la familia de conformeros CDS a nivel B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-311+G(d,p)

Conformero	HOMO	LUMO	η (e.V)	ω (e.V)	μ_T (Debyes)	R^2 (a.u)
CDS-0	-0.2435	-0.0327	2.87	2.46	3.16	9422.84
CDS-15	-0.2450	-0.0390	2.80	2.66	3.03	9353.52
CDS-36	-0.24323	-0.0318	2.88	2.43	3.33	9404.26

Para los conformeros de la familia del tripéptido CDS se observa que el valor de la dureza en los conformeros 0 y 36 es mayor, por lo tanto, son los conformeros menos reactivos. Mientras que el conformero 15 es el que presenta la menor dureza, por lo que su resistencia al cambio de su nube electrónica es menor y consecuentemente mayor su reactividad.

Respecto al índice de electrofilia, el conformero 15 es el que tiene el mayor valor por lo que es el conformero con mayor deficiencia de carga, mientras que el conformero 36 es el que presenta el menor valor.

Al analizar el momento dipolar se observa que el conformero 36 tiene el mayor valor; es decir, es el conformero con la densidad de carga más deslocalizada, en contraste con el conformero 15 que presenta el valor más pequeño.

Para la extensión de la densidad electrónica, los conformeros 0 y 36 presentan valores semejantes y mayores en comparación con el conformero 15 que tiene una extensión de densidad electrónica más compacta, por lo que los conformeros 0 y 36 podrían presentar un mayor zona de interacción.

9.6 Cargas atómicas

- **Tripéptido Cys-Asn-Ser**

En la Tabla 14 se presentan los valores obtenidos para las cargas atómicas de los átomos N_1 , H_2 , N_{15} , O_{25} , N_{26} , O_{28} , N_{31} , S_{37} , H_{39} , de las cadenas laterales del tripéptido CNS (R_{Cys} , R_{Asn} , R_{Ser}) y las de los aminoácidos Cys, Asn y Ser. El cálculo de las cargas atómicas se realizó bajo el esquema del ESP (a partir potencial electrostático), que es uno de los métodos más confiables para la determinación de las cargas atómicas.

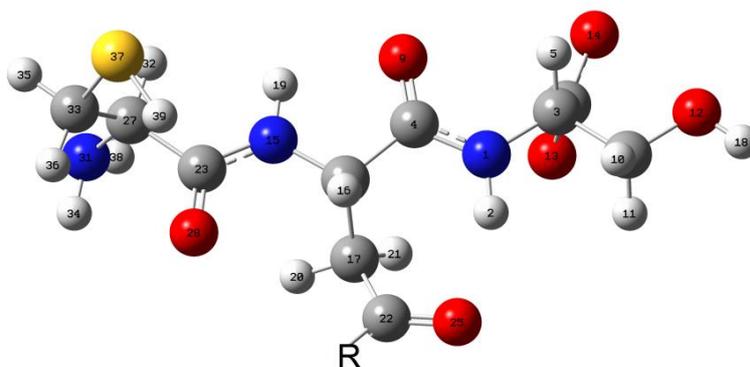


Figura 25. Estructura genérica del tripéptido CNS donde R = $-NH_2$ (N_{26}) y R = $-OH$ (O_{27}) del tripéptido CDS

Tabla 14. Cargas atómicas de la familia de conformeros CNS a nivel B3LYP/6-311++G(2d,2p)//B3LYP/6-311+G(d,p)

Conf	N ₁	H ₂	N ₁₅	O ₂₅	N ₂₆	O ₂₈	N ₃₁	S ₃₇	H ₃₉	R _{Cys}	R _{Asn}	R _{Ser}	Cys	Asn	Ser
CNS-0	-0.887	0.309	-0.827	-0.603	-0.850	-0.593	-0.956	-0.298	0.180	-0.066	-0.027	-0.083	0.156	-0.009	-0.147
CNS-22	-0.959	0.389	-0.795	-0.645	-1.007	-0.496	-1.015	-0.317	0.177	-0.084	-0.105	-0.112	0.106	0.016	-0.120
CNS-36	-0.936	0.390	-0.513	-0.574	-0.776	-0.575	-0.972	-0.287	0.142	-0.050	-0.084	-0.137	0.057	0.035	-0.092

Cargas en unidades atómicas (a.u)

Al analizar la carga de los átomos, se observa que N₁, N₁₅, O₂₅, N₂₆, N₃₁ y S₃₇, tienen un valor negativo por lo que presentan un carácter nucleofílico; por lo que podrían ser susceptibles a un ataque electrofílico. Lo cual concuerda con la naturaleza de estos átomos ya que son electronegativos.

Mientras que los átomos H₂ y H₃₉, presentan un carácter electrofílico y al tener deficiencia de carga electrónica pueden sufrir un ataque nucleofílico

Se observa que las cadenas laterales de los aminoácidos Cisteína, Asparagina y Serina presentan una carga negativa pequeña con un carácter nucleofílico y podrían sufrir un ataque electrofílico.

La cisteína tiene una deficiencia de carga electrónica, lo cual le confiere un carácter electrofílico y la hace susceptible de un ataque nucleofílico, mientras que la serina presenta un carácter nucleofílico y puede sufrir un ataque electrofílico, en los tres conformeros respectivamente.

En el caso de la asparagina, el conformero 0 presenta un carácter nucleofílico por lo que esta estructura podría sufrir un ataque electrofílico; mientras que, los conformeros 22 y 36 su carácter es electrofílico.

Tripéptido Cys-Asp-Ser

El análisis de cargas atómicas también se realizó para el tripéptido CDS. En la Tabla 15 se muestran los valores obtenidos de las cargas atómicas para los átomos N_1 , H_2 , N_{15} , O_{25} , N_{29} , S_{36} y H_{38} , de las cadenas laterales R_{Cys} , R_{Asp} y R_{Ser} , y de los aminoácidos que forman este tripéptido.

Tabla 15. Cargas atómicas de la familia de conformeros CDS a nivel B3LYP/6-311+G(2d,2p)//B3LYP/6-311+G(d,p)

Conf	N_1	H_2	N_{15}	O_{25}	O_{28}	O_{27}	N_{29}	S_{36}	H_{38}	R_{Cys}	R_{Asp}	R_{Ser}	Cys	Asp	Ser
CDS-0	-1.052	0.407	-0.804	-0.560	-0.591	-0.578	-0.97	-0.308	0.184	-0.066	-0.022	-0.119	0.143	0.008	-0.152
CDS-15	-0.943	0.373	-0.852	-0.548	-0.611	-0.573	-0.975	-0.308	0.181	-0.070	-0.067	-0.067	0.157	-0.031	-0.124
CDS-36	-0.998	0.383	-0.827	-0.567	-0.588	-0.584	-0.968	-0.310	0.180	-0.063	-0.042	-0.118	0.152	-0.021	-0.125

Cargas en unidades atómicas (a.u)

En el análisis de cargas del tripéptido CDS, se observa que los átomos N_1 , N_{15} , O_{25} , O_{28} , O_{27} , N_{29} y S_{36} tienen un valor de carga negativa por lo que presentan un carácter nucleofílico y por ende podrían sufrir un ataque electrofílico. El H_2 y H_{38} presentan deficiencia de carga y tienen carácter electrofílico. Se observa que las cadenas laterales de los tres aminoácidos, tienen un carácter nucleofílico y podrían ser susceptibles a un ataque electrofílico. La cisteína tiene carácter electrofílico y la serina nucleofílico; mientras que el ácido aspártico en el conformero 0 presenta un carácter electrofílico y en los conformeros 15 y 36 carácter nucleofílico.

9.7 Orbitales moleculares frontera: HOMO y LUMO

Las propiedades químicas de las moléculas, como su reactividad química son determinadas por sus orbitales moleculares frontera (el orbital ocupado de más alta energía HOMO y el orbital vacío de más baja energía LUMO). El orbital que es dador del par electrónico es el HOMO que bajo la teoría de ácidos de Lewis es una base y el orbital que es aceptor del par electrónico es el LUMO, que es un ácido de Lewis. Por lo tanto, la distribución y energía del orbital HOMO y LUMO determina la capacidad relativa ácida o básica de una molécula.

- **Tripéptido Cys-Asn-Ser**

En la Figura 26, se muestran las isosuperficies de los orbitales moleculares HOMO de los conforméros 0, 22 y 36 del tripéptido CNS.

En los tres conforméros se encuentra localizada la densidad electrónica correspondiente al orbital HOMO en el grupo amino inicial y en la cadena lateral de la cisteína. Lo que implica que esta región presente una capacidad básica y pueda sufrir un ataque electrofílico, como se observó en las cargas atómicas (Tabla 14).

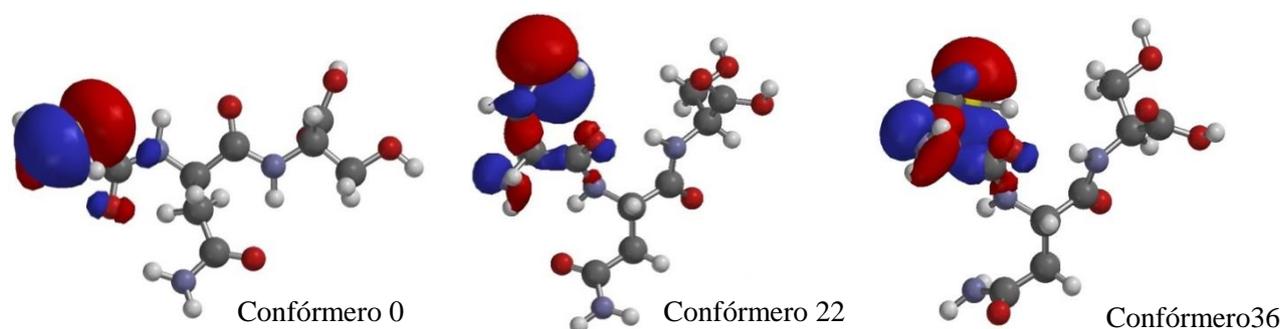


Figura 26. Orbitales moleculares frontera: HOMO de los conforméros del tripéptido CNS

En la Figura 27 se muestran las isosuperficies de los orbitales moleculares LUMO de los conforméros 0, 22 y 36 del tripéptido CNS.

En dicha Figura se observa que la zona que presenta deficiencia de densidad electrónica en estos conforméros se encuentra distribuido en los aminoácidos asparagina y serina, por lo que esta zona del esqueleto principal y las cadenas laterales de ambos aminoácidos podrían ser susceptibles a un ataque nucleofílico y de igual forma esta zona es ácida.

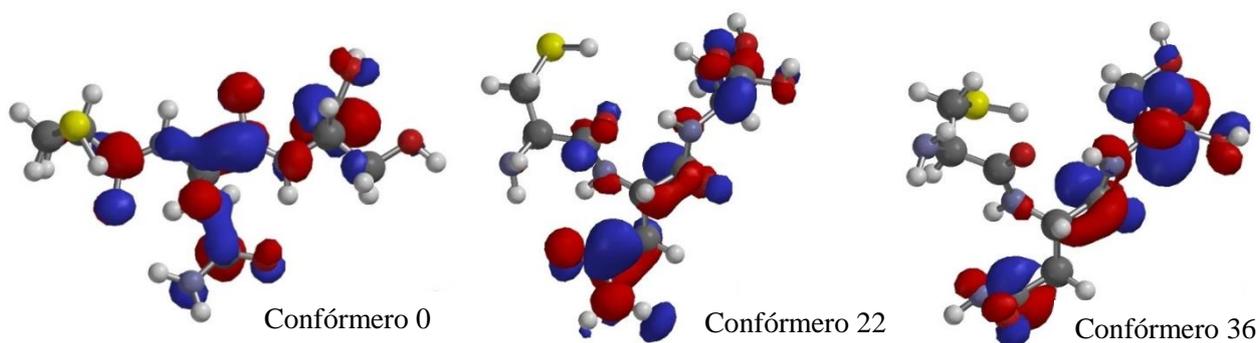


Figura 27. Orbitales moleculares frontera: LUMO de los conforméros del tripéptido CNS

En los conforméros 22 y 36 en la cadena lateral del aminoácido asparagina se observa una mayor deficiencia de densidad electrónica, mientras que en la cadena lateral de la asparagina en la estructura del conforméromo 0 no se observa esta misma deficiencia de densidad electrónica, lo que indica que en los conforméros 22 y 36 la cadena lateral de la asparagina presenta un mayor carácter ácido. Cabe mencionar que la densidad de carga se encuentra más localizada en el conforméromo 36.

- **Tripéptido Cys-Asp-Ser**

En la Figura 28 se muestran las isosuperficies de los orbitales moleculares HOMO de los conformeros 0,15 y 36 del tripéptido CDS.

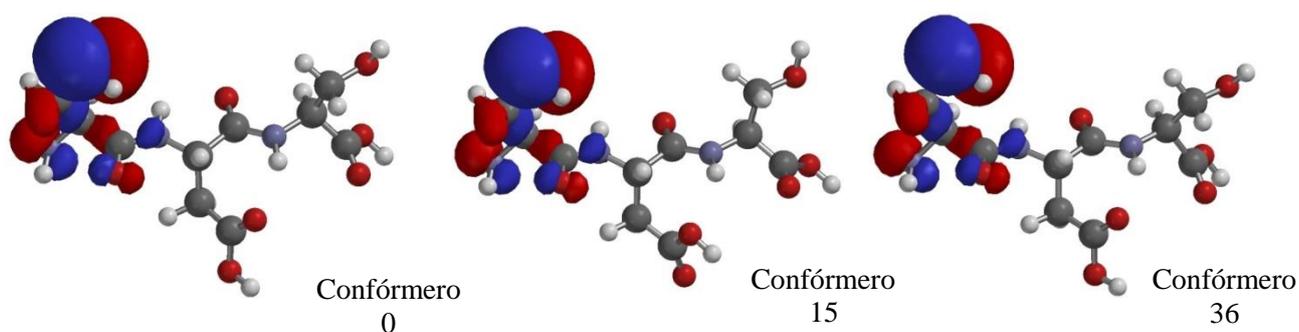


Figura 28. Orbitales moleculares frontera: HOMO de los conformeros del tripéptido CDS

Se observa en las tres estructuras que la densidad electrónica correspondiente al orbital molecular HOMO; está localizado en la cisteína. La principal área básica en esta región corresponde a la cadena lateral donde se encuentra el azufre, como se observa en los valores de las cargas atómicas (Tabla 15).

En la Figura 29 se muestran las isosuperficies de los orbitales moleculares LUMO de los conformeros 0, 15 y 36 del tripéptido CDS.

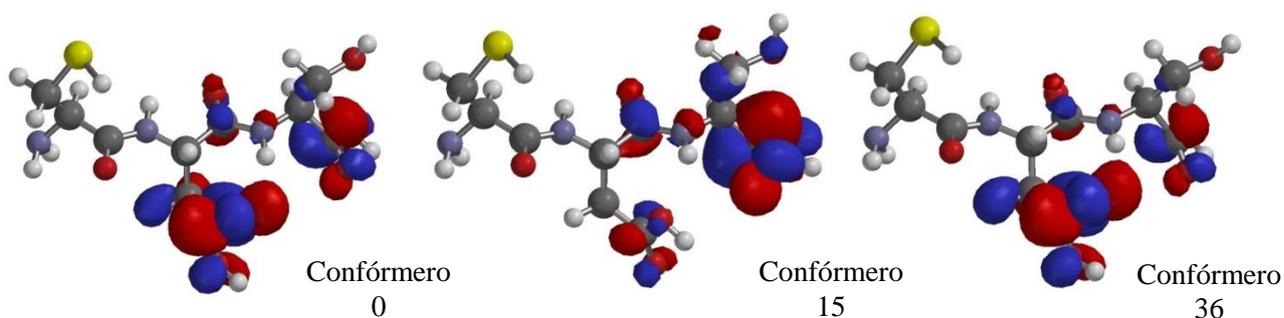


Figura 29. Orbitales moleculares frontera: LUMO de los conformeros del tripéptido CDS

Se observa que la zona con deficiencia de densidad electrónica se encuentra localizada y distribuida en la cadena lateral del ácido aspártico y en el grupo carboxilo terminal de la serina.

En los conformeros 0 y 36 el orbital molecular LUMO se encuentra con una mayor distribución en la cadena lateral del ácido aspártico. Y en el conformero 15 el orbital molecular LUMO está localizado en el grupo carboxílico de la serina. Por lo tanto, las zonas mencionadas presentan un carácter ácido ya que es donde se puede aceptar densidad electrónica.

9.8 Isosuperficies del potencial electrostático: densidad electrónica

- Tripéptido Cys-Asn-Ser

En la Figura 30, se muestran las isosuperficies del potencial electrostático de los conformeros 0, 22 y 36 del tripéptido CNS. Las cuales fueron obtenidas a partir de sus estructuras optimizadas, se observa que la densidad electrónica se encuentra localizada y distribuida en las cadenas laterales de los tres aminoácidos. Principalmente en átomos electronegativos, que son el azufre, nitrógenos y oxígenos, que corresponden a las zonas en rojo y que presentan un carácter básico, por lo que son átomos con características nucleofílicas y podrían ser susceptibles a sufrir ataques electrofílicos.

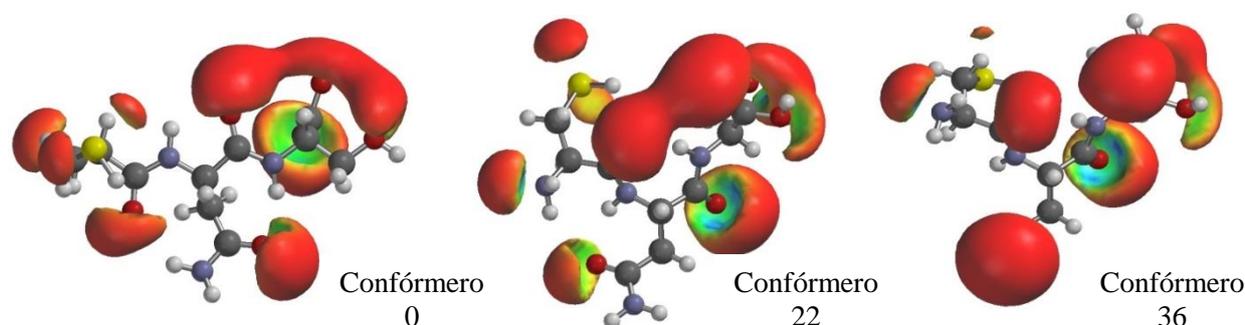


Figura 30. Isosuperficies del potencial electrostático mostrando la densidad electrónica de los conformeros del tripéptido CNS

- Tripéptido Cys-Asp-Ser

Las isosuperficies de los conformeros 0, 15 y 36 del tripéptido CDS, se muestran en la Figura 31. Se observa que la densidad electrónica se encuentra distribuida en toda la estructura del tripéptido, tanto en el esqueleto principal y en las cadenas laterales. Principalmente en los átomos electronegativos que son el azufre, nitrógenos y oxígenos; que son las zonas en rojo, las cuales presentan un carácter básico por lo que son átomos con carácter nucleófilos. Sin embargo, en el grupo hidroxilo (OH), de la cadena lateral del ácido aspártico no se observa densidad electrónica, debido a que el oxígeno del grupo carboxílico tiene la mayor densidad electrónica. Por lo que, este grupo OH presenta características ácidas.

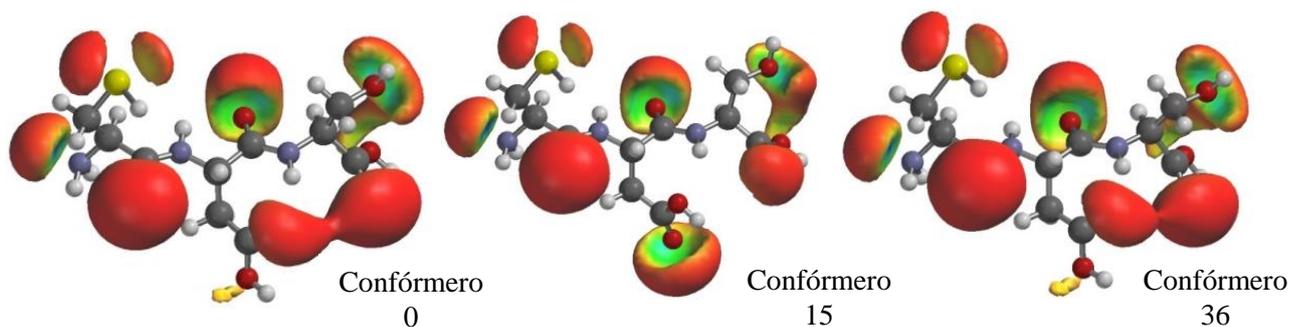


Figura 31. Isosuperficies de densidad del potencial electrostático que muestra la densidad electrónica de los conformeros del tripéptido CDS

9.9 Ensayos *in vitro*

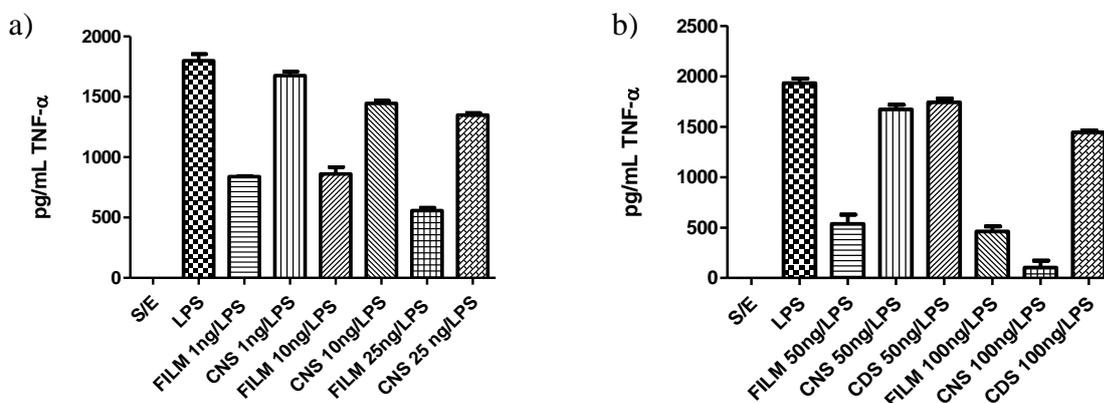
Se realizó la evaluación de los tripéptidos Cys-Asn-Ser y Cys-Asp-Ser en células mononucleadas totales y células dendríticas estimuladas con LPS, lo cual simula una infección bacteriana. Dicho ensayo, se llevó a cabo a diferentes concentraciones de los tripéptidos: 1, 10, 25, 50 y 100 ng para evaluar la dosis-efecto, sobre la expresión de citocinas pro- y antiinflamatorias. El péptido de referencia que se empleó en este trabajo de tesis fue el Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM).

9.9.1 Ensayo en células mononucleares totales

Evaluación de TNF α

Los resultados de la evaluación del factor de necrosis tumoral alfa, se muestra en la Gráfica 5. Las células mononucleadas totales se estimularon con LPS y fueron tratadas con FILM y CNS; 5a) 1, 10 y 25 ng, y con FILM, CNS y CDS; 5b) 50 y 100 ng.

En la Gráfica 5(a) se muestra, que al aplicar 1 y 10 ng de FILM la concentración de TNF α disminuyó 50% y con 25 ng la concentración disminuyó 70%. Observamos, que al incrementar la dosis de CNS la concentración del TNF α decreció gradualmente; sin embargo, no con el mismo efecto que presenta el FILM. Es decir, con 1 ng de FILM la concentración de TNF α disminuyó 5%. Al aplicarse 10 ng de FILM la concentración de la citocina fue menor en un 10%; y al aplicar 25 ng la concentración de TNF α sólo disminuyó 20%.

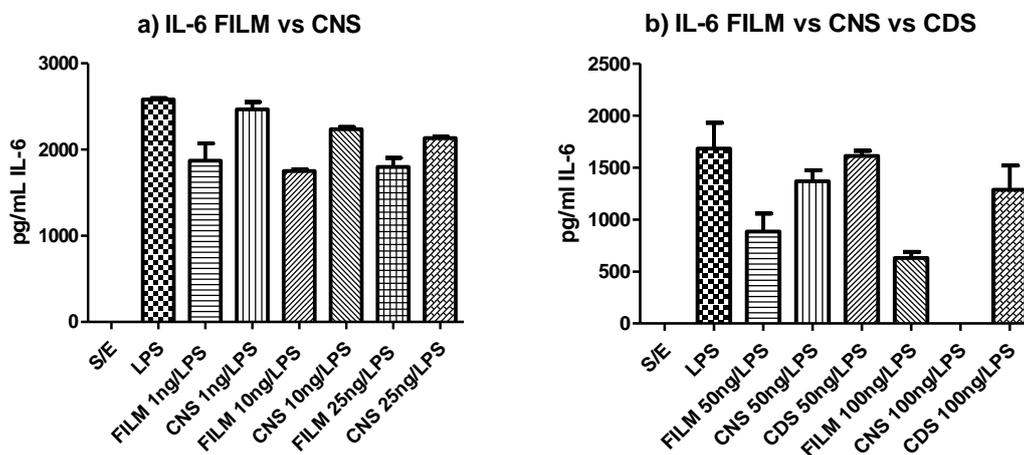


Gráfica 5. Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre TNF- α en células mononucleadas totales estimuladas con LPS

En la Gráfica 5(b) se muestran los resultados para TNF α al aplicar 50 y 100 ng de FILM, CNS y CDS. El FILM a una dosis de 50 ng, disminuyó la concentración de esta citocina 70% y con 100 ng la concentración bajó 75%. Por otro lado, al aplicar 25 y 50 ng del tripéptido CNS, éste disminuyó la concentración de la citocina en un 20%. Con una dosis de 100 ng del tripéptido CNS, se observa que la inhibición del TNF α es del 95%, siendo mayor el efecto con respecto al que presentó el FILM a la misma concentración. El tripéptido CDS a 50 ng disminuyó esta citocina 18 %, mientras que a 100 ng se observó una disminución del 25% en la concentración del TNF α .

Evaluación de IL-6

La interleucina 6 (IL-6), es una citocina pleiotrópica; sin embargo, es considerada con mayor efecto proinflamatorio ya que se produce al estimular células mononucleadas totales con LPS, cuyos resultados de nuestra evaluación se muestran en la Gráfica 6.



Gráfica 6. Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre IL-6 en células mononucleadas totales estimuladas con LPS

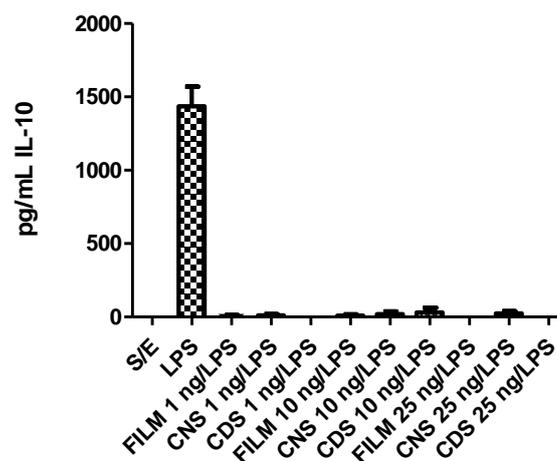
Gráfica 6 (a), cuando la dosis aplicada de FILM fue de 1, 10 y 25 ng, se observó un mismo efecto debido a que la concentración de IL-6 disminuyó 25%. Con dosis de 1, 10 y 25 ng del tripéptido CNS, el efecto inhibitorio de dicho tripéptido es menor, disminuyendo 3%, 7% y 12% respectivamente.

En la Gráfica 6 (b), al aplicarse el FILM a una dosis de 50 ng la disminución de la concentración de IL-6 fue del 50% y a una dosis de 100 ng de FILM, la concentración de esta citocina disminuyó 70%. Al aplicar 50 ng del tripéptido CNS la concentración de IL-6 disminuyó 25%, mientras que con 100 ng de este tripéptido, se consiguió disminuir la concentración de IL-6 en un 100%. Cuando se aplicó el tripéptido CDS a una dosis de 50 ng, la concentración de IL-6 se vio disminuida en 10%, mientras que a la dosis de 100 ng la disminución fue del 25%, siendo este tripéptido el que presentó el menor efecto biológico en comparación con el FILM y CNS.

Evaluación de IL-10

La interleucina 10 (IL-10), tiene como una de sus principales funciones biológicas el efecto antiinflamatorio. La hipótesis experimental del presente trabajo se basa; tanto, en que el péptido control el FILM como los péptidos bajo estudio CNS y CDS, son capaces de actuar como inhibidores de citocinas proinflamatorias y por ende, también son capaces de estimular la producción de IL-10, citocina antiinflamatoria.

Sin embargo, en la Gráfica 7 se muestra que los péptidos FILM, CNS y CDS a dosis de 1, 10 y 25 ng respectivamente, no estimulan la producción de IL-10.



Gráfica 7. Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre IL-10 en células mononucleadas totales estimuladas con LPS

Dicho efecto se explica de la siguiente manera, en nuestro modelo estimulamos células mononucleadas totales de sangre periférica con LPS, esta molécula es una toxina muy potente y con un amplio espectro de efectos fisiopatológicos, los cuales dependerán de su concentración en el organismo o para nuestro fin de su concentración en los cultivos celulares bajo estudio. En el modelo empleado, la concentración de LPS fue de 250 ng en 500µL de medio de cultivo por lo que la concentración de dicha toxina se encuentra en una concentración elevada.

Rojas y colaboradores [54], encontraron en un modelo de lesiones controladas como lo son las contusiones y fracturas aplicando el péptido FILM, que a las 24 horas la producción de IL-10 es baja mientras que aumenta a las 48 horas. Sin embargo, en el modelo de fractura a las 24 horas de dicha lesión y habiendo aplicado el FILM la producción de IL-10 es nula y es hasta las 48 horas que se nota una concentración cuantificable de esta citocina. Lo anterior puede estar sucediendo en nuestro modelo, debido a que la concentración de LPS es elevada. Por lo que, al cuantificar IL-10 a las 24 horas de estimular las CMN estimuladas con LPS y aplicar los péptidos FILM, CNS y CDS, no existe en el sobrenadante de nuestros medios de cultivo una concentración cuantificable de esta citocina.

9.9.2 Ensayo en células dendríticas

El modelo de células estimuladas con LPS simula *in vitro* una infección bacteriana; una vez que los microorganismos establecen contacto con el organismo, primeramente con las células epiteliales, que aparte de tener un papel estructural, pueden reconocerlos e iniciar una respuesta inmune.

Los microorganismos tienen moléculas propias, que pueden ser reconocidas por el sistema inmune, llamadas moléculas asociadas a patógenos y reconocidas por receptores de reconocimiento de patógenos como Lectinas de unión a manosa, receptores tipo Toll (TLR), entre otros [20,41].

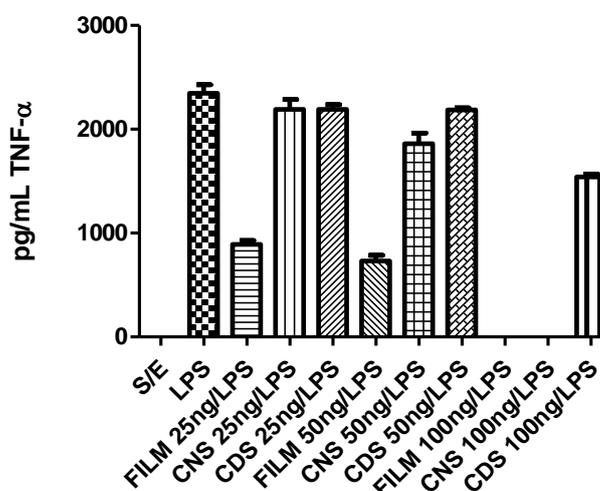
Las células de defensa como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas expresan este tipo de receptores. Tal que, la toxina LPS puede activar células dendríticas vía TLR4 y una vez activado este receptor es capaz de desencadenar la cascada del Factor Nuclear kappa B estimulando la producción de citocinas proinflamatorias [36, 37].

Además de evaluar en células mononucleadas totales el efecto de los péptidos FILM, CNS y CDS como inhibidores de citocinas proinflamatorias (TNF α e IL-6) y estimuladores de la producción de la citocina antiinflamatoria (IL-10), también se evaluaron estos efectos en células dendríticas.

Evaluación TNF α

En la Gráfica 8, se muestra que el FILM a una dosis de 25, 50 y 100 ng disminuyó la concentración de TNF α en un 60%, 65% y 100%, respectivamente. El CNS presentó el mismo efecto, debido a que a la dosis de 100 ng consiguió la inhibición total de TNF α ; mientras que, a dosis de 25 ng disminuyó 7% y con 50 ng la concentración de dicha citocina en disminuida 20%.

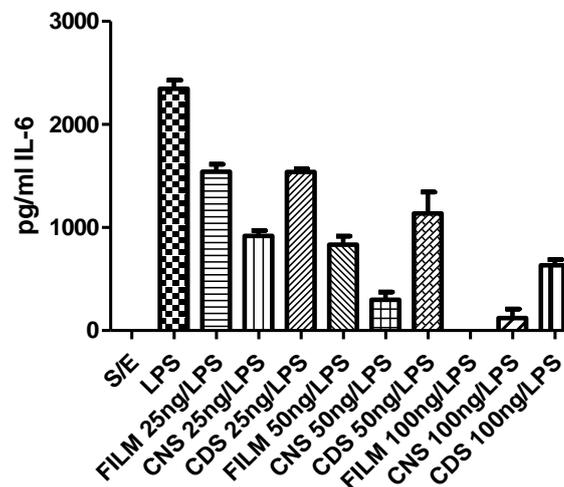
Se observó, que el tripéptido CDS a una dosis de 25 ng y 50 ng disminuyó la concentración de TNF α en un 7% y 9% respectivamente, mientras que a 100 ng la disminución de esta citocina es del 35%.



Gráfica 8. Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre TNF- α en células dendríticas estimuladas con LPS

Evaluación de IL-6

El FILM en una dosis de 25 ng es capaz de inhibir 25% la producción de IL-6, a la dosis de 50 ng inhibe en un 75%, mientras que al aplicar 100 ng inhibió la producción de esta citocina en un 100%. Tal, como se observa en la Gráfica 9.



Gráfica 9. Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre IL-6 en células dendríticas estimuladas con LPS

Sucedo el mismo efecto gradual en la inhibición de IL-6 conforme se aumenta la dosis del péptido CNS, debido a que a una dosis de 25 ng la concentración de IL-6 disminuyó 73%, con una dosis de 50 ng de CNS la concentración se observó disminuida 86%; mientras que a la dosis es de 100 ng la concentración descendió en un 95%.

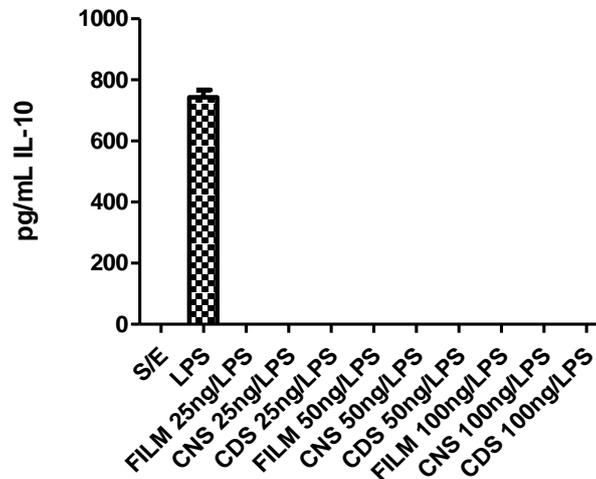
Con dichos resultados se puede decir que ambos péptidos presentan gran efecto como inhibidores de estas dos citocinas proinflamatorias; tanto en células mononucleadas totales, como en células dendríticas y dicho efecto se ve aumentado conforme la dosis se incrementa a partir de una dosis de 25 ng donde se comenzó a percibir; tanto cualitativamente como cuantitativamente la inhibición de las citocinas.

Para el tripéptido CDS; también, se observó una mínima inhibición de esta citocina a 25 y 50 ng. A la dosis de 100 ng se presentó la disminución del 75% de la concentración de IL-6; por lo tanto, este tripéptido también tiene efecto antiinflamatorio sobre las citocinas TNF α e IL-6, aunque no en las mismas dimensiones que el FILM y CNS.

Esto puede estar dado por la estructura química de CNS y CDS, debido a que difieren en un grupo funcional en el aminoácido central, asparagina en el caso del CNS y FILM, y ácido aspártico en el CDS, lo cual le confiere propiedades fisicoquímicas y, de reactividad química diferentes y por consecuencia modifica la funcionalidad biológica, como se mostró en los resultados teóricos.

Evaluación IL-10

En la Gráfica 10, se observó que el efecto de los péptidos FILM, CNS y CDS a dosis de 25, 50 y 100 ng sobre la producción de IL-10 es nulo a las 24 horas en células dendríticas, dicho efecto se ha analizado en la Gráfica 7. Lo cual podría estar relacionado con la concentración elevada de LPS que empleamos en nuestro modelo.



Gráfica 10. Evaluación de FILM/CNS/CDS sobre IL-10 en células dendríticas estimuladas con LPS

10. Conclusiones

- El análisis geométrico y de la estructura electrónica indicaron que interacciones intramoleculares de tipo puentes de hidrógeno estabilizan nuevas conformaciones, que no se habían detectado en estudios previos.
- Los diagramas de Ramachandran mostraron que los conformeros de máxima y mínima energía de los tripéptidos seleccionados CNS y CDS son estructuras permitidas.
- El análisis conformacional, de la estructura electrónica y de los descriptores de reactividad química mostraron que el grupo funcional de la cadena lateral en el aminoácido central (Asn) modifica las propiedades fisicoquímicas y de reactividad química; dichas características influyen de manera importante en la funcionalidad biológica del tripéptido CNS con respecto al CDS.
- El tripéptido CNS inhibió a las citocinas proinflamatorias $\text{TNF}\alpha$ e IL-6, en células mononucleadas y en células dendríticas.
- La dosis efectiva del CNS como inhibidor de las citocinas $\text{TNF}\alpha$ e IL-6, en nuestro modelo empleado fue de 100 ng, dicha dosis de CNS tiene mayor efecto que el control positivo FILM, lo cual nos proporciona datos farmacológicos originales y relevantes de este tripéptido.

11. Perspectivas

En la actualidad existen numerosos métodos experimentales para determinar y caracterizar la estructura molecular de una sustancia. La espectrofotometría ultravioleta (UV) e infrarroja (IR), así como la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear de hidrógeno y de carbono, al igual que las técnicas de difracción de rayos X que son las más comunes. No obstante a ello, el desarrollo alcanzado por la química computacional ha propiciado la generación de sistemas que permiten calcular con detalle los parámetros geométricos, la estructura electrónica y la reactividad química de diversas moléculas. Estas metodologías son capaces de generar datos con una amplia aplicación en la investigación de experimental, tanto para la interpretación de los resultados obtenidos y la planificación de futuros estudios, así como para deducir información no asequible experimentalmente.

Por lo que a partir de este trabajo de tesis y en base a nuestros resultados, dan pauta a continuar con la investigación tanto teórica como experimental:

Investigación teórica

- Ampliar el trabajo con otros métodos teóricos y funcionales, para realizar un estudio detallado y específico de los puentes de hidrógeno intra e intermoleculares de los tripéptidos CNS y CDS.
- Realizar estudios teóricos que incluyan el efecto del solvente.
- Mediante estudios QSAR determinar la correlación, entre la estructura química y la actividad biológica de los tripéptidos CNS y CDS.
- Mediante Docking analizar sitios específicos de interacción.

Investigación experimental

Resultados experimentales previos han demostrado que el tripéptido CNS presenta actividad biológica como molécula antiinflamatoria en modelos *in vitro* como *in vivo*. Con base a estos resultados, se ha planteado un mecanismo de acción hipotético sobre el factor nuclear kappa B, el cual se inicia en los receptores tipo TOLL. El modelo *in vitro* también tiene como efecto evaluar esta ruta, por lo que se pretende la colaboración con grupos experimentales con la finalidad de:

- Determinar la estructura secundaria del tripéptido CNS.
- Evaluar el tripéptido CNS activando la familia de receptores tipo TOLL [TLR1-TLR11], esto con el fin de determinar si este péptido es específico a algún TLR.
- De igual forma, realizar estudios farmacológicos dosis-efecto en un modelo *in vivo*; como por ejemplo ratas, ratones o conejos, y analizar si es que presenta un efecto toxicológico.
- Realizar estudios *in vitro* en neuronas, empleando un modelo para inflamación; como, estimular con LPS y analizar si existe al efecto positivo o negativo del tripéptido sobre el estrés oxidativo.
- Utilizando las mismas características experimentales *in vitro* utilizados en el presente trabajo, cuantificar IL-10 a 36 y 48 horas.

12. Apéndice

Receptores Tipo Toll

La respuesta inmune se divide en innata y adaptativa. La inmunidad innata filogenéticamente es primitiva, mediada por monocitos, macrófagos y células dendríticas. Se caracteriza por ser de respuesta rápida, no requiere selección o maduración celular y no tiene memoria. La respuesta inmune adaptativa se caracteriza por la selección clonal de linfocitos antígenos específicos, es tardía, tiene memoria y da protección prolongada.

La función de la inmunidad innata es el reconocimiento de componentes microbianos, lo que desencadena una respuesta celular y humoral caracterizada por activación de neutrófilos, células endoteliales, monocitos-macrófagos y la síntesis de citocinas proinflamatorias, lo que tiene como finalidad el control de la infección.

Los productos microbianos que activan esta respuesta son: lipopolisacárido, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, lipoproteínas, DNA, glicolípidos, fragmentos de pared celular y lipoarabinomannan, que en conjunto reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns). Los receptores celulares encargados del reconocimiento de los PAMPs se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR: Pattern Recognition Receptor), los cuales se han seleccionado en el transcurso de la evolución para reconocer estructuras o productos microbianos y de los que forman parte los receptores Toll.

Los receptores Toll (TLR) son una familia de proteínas transmembrana con un dominio extracelular caracterizado por repeticiones de leucina (LRR) y un dominio intracelular homólogo al receptor de la IL-1 (IL-1r) de los mamíferos.

Estos receptores fueron descritos primero en *Drosophila melanogaster*, como un grupo de moléculas necesarias durante el desarrollo embrionario; posteriormente se estableció que eran parte fundamental de la inmunidad innata de la mosca para su defensa en contra de infecciones bacterianas y micóticas.

En los mamíferos, incluyendo al hombre existe un sistema de receptores de reconocimiento de PAMPs que por su semejanza en estructura y función con el sistema Toll de *Drosophila* se denomina receptores semejantes a Toll (TLRs: Toll Like Receptor), los cuales se describen en la Figura 41.

En la actualidad se conocen 11 TLR en humanos (TLR1-TLR11) que tienen un patrón de expresión variable en los tejidos linfoides y no linfoides. De modo característico, los TLR tienen un amplio rango de ligandos que incluyen motivos estructurales presentes en bacterias, hongos, levaduras y parásitos. Después de la interacción con su ligando respectivo, los TLR dimerizan y sufren un cambio conformacional requerido para el reclutamiento de moléculas de señalización. Estas incluyen moléculas adaptadoras como MyD88, TIRAP/MAL, TRIF y TRAM, cinasas asociadas con el receptor de IL-1 (IRAK), cinasas activadas por el factor transformante de crecimiento beta/TGF- β (TAK1), proteínas de unión a TAK1, TAB2 y el factor 6 asociado con el receptor de TNF (TRAF6). Cada molécula adaptadora induce vías de señalización intracelular distintas que promueven la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas coestimuladoras, con la finalidad de dar una respuesta rápida como primera línea de defensa por parte de la inmunidad innata, frente al daño infeccioso.

Receptor	Expresión (mRNA)	Ligando	Origen del ligando
TLR1 (con TLR2)	M, N, LB, NK, CDi, CDpl	Lipopéptidos triacilados (Pam ₃ Cys) Factores solubles	Bacterias y micobacterias <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	PMN, M, CD, CDi	Lipoproteínas y lipopéptidos Peptidoglicano (PG) Ácido lipoteicoico (LTA) Lipoarabidomanano Modulina soluble en fenol Glicoinositolfosfolpidos Glicolpidos Porinas Lipopolisacárido atípico Lipopolisacárido atípico Zymosan	Varios patógenos Bacterias Gram + Bacterias Gram + Mycobacteria <i>S. epidermidis</i> <i>T. cruzi</i> <i>T. maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonaa gingivalis</i> Hongos
TLR3	CD, CDi	RNA viral de doble cadena Poli(I:C)	Virus Sintético
TLR4	C.End, M, N, CD	Lipopolisacárido (LPS) Poteína de fusión Proteína de la envoltura HSP60	Bacterias Gram - Virus Sincitial respiratorio Virus de tumor mamario <i>Chlamydia pneumoniae</i>
TLR5	M, CD, CDi	Flagelina	Bacterias
TLR6 (con TLR2)	M, CDi, CDpl	Lipopéptidos diacilados (Pam ₂ Cys) LTA Zymosan	Mycoplasma Bacterias Gram + Hongos
TLR7	CDpl	Imidazoquinolina ss RNA	Compuesto sintético Virus
TLR8	M, CDi	Imidazoquinolina ss RNA	Compuesto sintético Virus
TLR9	M, CDpl	DNA con motivos CpG	Bacterias y virus
TLR10	CDi	ND	ND
TLR11	Epitelio renal*	ND	Bacterias uropatógenicas

M: monocito; N: neutrófilo; CD: célula dendrítica, CDi: CD inmadura; CDpl: CD plasmocitoide; C.End: célula endotelial; NK: Natural killer. * Murino. En humanos se expresa una forma truncada de la proteína. (Adaptado de Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004;4:499-511.

Figura 32. TLR de mamíferos: expresión y ligandos [55]

13. Bibliografía

1. Soriano-Correa C, Sánchez-Ruiz JF, Rico G, Giménez JA, Velázquez JR, Kretschmer RR. Electronic structure and physicochemical properties of the anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica*: A theoretical study. *THEOCHEM*. 2006; 769: 91-95.
2. Kretschmer RR, Rico G, Giménez JA. A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Mol BiochemParasitol*. 2001; 112(2): 201-209.
3. Morales ME, Silva R, Soriano-Correa C, Giménez-Scherer JA, Rojas S, Blanco-Favela F, Rico-Rosillo G. 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; 158 (1): 46-51.
4. Barrientos-Salcedo C, Rico-Rosillo G, Giménez-Scherer JA, Soriano-Correa C. Computational study of the electronic structure characterization of a novel anti-inflammatory peptide derived from monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) –pentapeptide. *Eur J Med Chem*. 2009; 44 (8): 3114-3119.
5. Soriano-Correa C, Olivares del Valle FJ, Muñoz-Losa A, Fdez Galván 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. (B)*. 2010; 114 (27): 8961-8970.
6. Soriano-Correa C, Barrientos-Salcedo C, Raya A, Rubio-Póo C, Esquivel RO. 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.
7. Casserly I, Topol E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. *Lancet*. 2004; 363(9415):1139-1146.
8. Bamberger ME, Harris M, McDonald DR, Husemann J, Landreth GE. A cell surface receptor complex for fibrillar b-amyloid mediates microglial activation. *J.Neurosci*. 2003; 23(7): 2665-2674.

9. Hernández Montiel HL. Aspectos Moleculares y Prospectos de Terapias en la enfermedad de Parkinson. *Bioquímica*. 2006; 31(004): 146-158.
10. González-Torres LC, Armendáriz-Borunda J. Aspectos inmunológicos en la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién (Mex)*. 2005; 10(3): 168-169.
11. Kowalewska M, Nowak R, Chechlińska M. Implications of cancer-associated systemic inflammation for biomarker studies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1806: 163-171.
12. Rakoff-Nahoum S. Cancer Mechanisms: Why Cancer and Inflammation?. *Journal of Biology and Medicine*. 2006; 79: 123-130.
13. Kotz D. Quenching the slow burn. The evidence is mounting that chronic inflammation plays a role in diseases from cancer to heart disease to Alzheimer's. Here's how you can stop it. *US News World Rep*. 2009; 146(11):32, 35-36.
14. Rosado Pérez J, Mendoza Núñez VM. Inflamación Crónica y Estrés Oxidativo en la Diabetes Mellitus. *Bioquímica*. 2007; 32(002): 58-69.
15. Velarde MS, et al. Marcadores de inflamación y disfunción endotelial en niños con Diabetes Tipo 1. *Medicina (Buenos Aires)*. 2010: 44-48.
16. Gutteridge J, Rowley D, Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radical and lipid peroxidation in the presence of iron salt: detection of catalytic iron and antioxidant activity in extracellular fluids. *Biochem J*. 1982; 206: 605.
17. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin and resistin. *Clin Chem*. 2004; 50: 1511-1525.
18. Pérez Tamayo R. *Introducción a la Patología*. 2 ed. México: Médica Panamericana; 1987.
19. Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J. Clin. Invest*. 2007; 117 (2): 289-296.
20. Mantovani A, Garlanda C, Allavena P. Molecular pathways and targets in cancer-related inflammation. *Ann Med*. 2010; 42(3):161-70.

21. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr. Mol. Med.* 2010; 10(4):369-373.
22. Nelson D, Cox M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5 ed. España: 2007.
23. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 2006; 16: 945-960.
24. Pérez Tamayo R, Brandt H. Amebiasis En: Marcial Rojas (ed). *Pathology of protozoan and helminthic disease*. Baltimore. William and Wilkins, 1971: 145-188.
25. Kretschmer R, et al. An anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* down-regulates the expression of pro-inflammatory chemokines. *Parasite Immunology*. 2003; (25): 475-482.
26. Velázquez JR, Kretschmer R. *Entamoeba histolytica*, a remarkable anti-inflammatory parasite. *Immunology*. 2004; 23(2): 200-206.
27. Kretschmer R, et al. Immunization with a tetramer derivative of an anti-inflammatory pentapeptide produced by *Entamoeba histolytica* protects gerbils against experimental amoebic abscess of the liver. *Parasite Immunology*. 2004;(26): 343-349.
28. Jia Yao, et al. Protective effects of MILF analogs on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Peptides*. 2011; (32): 1047-1054.
29. IV Reunión científica de la sociedad española del dolor: Inhibidores de la COX-2, mecanismo de acción. Badajoz; 2000. España.
30. Núñez Cámara C, Ventura López P, Martínez Escudero JA. AINES “clásicos” e inhibidores selectivos de la COX2. *Boletín Farmacoterapéutico de Castilla la Mancha*. 2001; Vol. II (4): 1-8.
31. The human genome compendium. PTGS2 Gene. [Consultado el 03 enero, 2015]. Disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTGS2>.
32. The human genome compendium. PTGS1 Gene. [Consultado el 03 enero, 2015]. Disponible en: <http://genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTGS1&search=PTGS1>.

33. De la Fuente G. Inflamación. Rev. Fisiopatología de la Inflamación. 2004; 36: 1-20.
34. Kumar, Contran, Robbins. Capítulo 2: Inflamación aguda y crónica. En: Patología Humana. 8ª edición. México. Editorial Elsevier. 2008. p. 33-60.
35. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. Inmunología. 5ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
36. García Barreno P. Inflamación. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. 2008; 102 (1): 91-159.
37. Celada, Cotarelo A. Cellular immunology and immune regulation: inflammation. J Immunol. 2009; 185:4572-4577.
38. Celada A, Peña J. Tema 16. Inflamación. Inmunología en línea. [Consultado el 28 de noviembre, 2014] Disponible en: <http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php/site-map-4/16..>
39. Rodríguez JL. Tema 14. Inmunopatología. [Consultado el 11 de enero, 2015]. Disponible en: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/pdfcaps/tema-14.pdf..>
40. González Álvarez R, Zamora Rodríguez Z, Alonso González Y. Citocinas anti-inflamatorias y sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico. REDVET [Revista on-line] 2009 [Consultado 11 de enero, 2015]; 10 (8). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080809/08091.pdf..>
41. Roitt I, Delves P. Inmunología: fundamentos. 10ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003.
42. Carr JH, Rodak B. Atlas de hematología clínica. 3ªed. Argentina: Médica Panamericana; 2010
43. Resino S. Epidemiología molecular de enfermedades infecciosas: citocinas. Actualizada: 14 de Febrero. [Fecha de consulta: 21 de noviembre 2014]. Disponible en : <http://epidemiologiamolecular.com/14/02/2009/citocinas/>
44. Jeffrey, G. A. An Introduction to Hydrogen Bonding; Oxford University Press: New York, 1997.

45. Van Holde KE, Jonson WC, Ho PS. Principles of Physical Biochemistry: Prentice may.
46. Dobado Jiménez JA. Cálculos ab initio de orbitales moleculares en sistemas –O-O-. Interacciones intermoleculares de enlace de hidrógeno en complejos H₂O₂...XH (X= OOH, OH, F, Cl) [Tesis doctoral]. España: Universidad de Granada, Facultad de Ciencias; 1994.
47. Donald Voet, Judith G. Voet. Biochemistry. 4^aed. Pennsylvania: WYLE; 2010.
48. Morones Mendoza LG. Estudio de la estructura electrónica y propiedades fisicoquímicas de compuestos antichagásicos [Tesis]. México: Universidad del Valle de México; 2007.
49. Sherrill DC. A Brief Review of Elementary Quantum Chemistry. Georgia, USA: School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology; 2001.
50. Foresman JB, Frisch A. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods. Second edition. USA: Gaussian, Inc. &Pittsburgh, PA; 1996.
51. Levine IN. Química Cuántica. 5^a edición. Madrid: Pearson Educación, S. A.; 2001.
52. Parr RG, Pearson RG, J. Am. Chem. Soc., 105, 7512-7516.
53. Cuevas G, Cortés F. Introducción a la Química Computacional. 1^{ra} ed. México: Fondo de Cultura Económica; 2003.
54. López Ruiz AK. Efecto anti-inflamatorio del FILM en la inflamación producida en lesiones controladas postraumáticas en ratas Wistar [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza; 2008.
55. Mesa-Villanueva M, Patiño PJ. Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro. *Inmunología*. 2006; 25(2): 115-130.
56. Carrillo-Esper R. Inmunidad innata, receptores Toll y sepsis. *Cir Ciruj*. 2003; 71(3): 252-258.
57. Ruiz-López C, Gutiérrez-Venegas G. Receptores Toll y mecanismos de transducción en la inmunidad innata. *REB*.2003; 22(2): 67-75.
58. Aderem A, Ulevitch R. Toll-like receptor in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000; 406:782-787.