

Universidad Autónoma Metropolitana



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Doctorado en Ciencias Biológicas

**Estudio teórico de la estructura electrónica
de los aminoácidos 12 al 26 de p53
del dominio de unión a hdm-2**

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

PRESENTA

Carolina Barrientos Salcedo

Comité Tutorial:

Dra. Catalina Soriano Correa

Dra. Alda Rocio Ortiz Muñiz

Dr. Diego Julio Arenas Aranda

México D.F. enero 2008

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presenta

Carolina Barrientos Salcedo

El día de 30 de enero del año de 2008

Jurado:

Co-tutor: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Co-tutor: Dra. Catalina Soriano Correa

Asesor: Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Sinodal: Dra. Marisol López López

Sinodal: Dr. Arturo Rojo Domínguez

AGRADECIMIENTOS

- ◆ Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**), por el financiamiento a través del proyecto IN109206.
- ◆ A la Dirección General y Servicios de Cómputo Académico (DGSCA), Depto. de Supercómputo, UNAM por las horas de cómputo en la supercomputadora Kanbalam.
- ◆ A la Unidad de Investigación en Genética Humana, Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social por todas las facilidades dadas.

AGRADECIMIENTOS

Por confiar en mí, darme su apoyo y compartir su conocimiento

- ◆ A la Dra. Catalina Soriano Correa
- ◆ A la Dra. Alda Rocío Ortíz Muñíz
- ◆ Al Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez
- ◆ Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Por emprender conmigo este camino de nuevos conocimientos:

- ◆ Thuluz Meza Menchaca
- ◆ Edgar Fabricio Ricardez Marcial
- ◆ Yazmín Mecalco Ruíz
- ◆ José Luis Zárate Alvarado
- ◆ Pilar Amellali Badillo Suárez
- ◆ Francisco Javier Rojo Gómez

Por el combustible de risas, charlas, peleas, comidas, bebidas, lecturas y sonrisas que le dan a mi corazón paz, a mi mente lucidez y a mi espíritu fuerza

- ◆ Catalina Soriano Correa
- ◆ Silvia Salomé Arzate Trujillo
- ◆ Maria Luisa Ruiz Valerio
- ◆ Isabel Valerio Rosas
- ◆ Ana Bernarda Delgado Campos
- ◆ Angélica Beatriz Raya Rangel
- ◆ Yelda Aurora Leal Herrera
- ◆ Juan Antonio Giménez Scherer
- ◆ Patricia Quintana Rocha
- ◆ Lourdes Romero Villafranco
- ◆ Lili Esther Flores Rodríguez
- ◆ José Antonio Cervantes Martínez
- ◆ Mario Tomás Flores Martínez

DEDICATORIA

◆ *A Serendipia y a quien tanto amor le dio.*

◆ *A mi madre*

INDICE

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	4
ANTECEDENTES E INTRODUCCIÓN.....	7
Aminoácidos	9
Péptidos.....	23
Proteína TP53.....	27
El péptido sintético PNC-27	38
La Química Computacional en el diseño de fármacos.....	40
JUSTIFICACIÓN.....	46
OBJETIVO GENERAL.....	49
OBJETIVOS PARTICULARES.....	50
HIPÓTESIS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	52
Diseño de las moléculas en estudio.....	55
Optimización de la geometría	56
Cálculos puntuales	59
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	109
PERSPECTIVAS.....	112
BIBLIOGRAFÍA.....	114
APÉNDICES.....	123
Método Hartree-Fock.....	0
Teoría del Funcional de la Densidad	0
Tablas con las coordenadas cartesianas.....	0
Publicaciones generadas.....	0
GLOSARIO.....	0

ABREVIATURAS Y ACRONIMOS EMPLEADOS EN ESTA TESIS

Å	Angstrom
Acido Aspártico	Asp, D
Acido Glutámico	Glu, E
Alanina	Ala, A
AM1	Modelo 1 de Austin
Aminoácido	aa
Arginina	Arg, R
Asparagina	Asn, N
B3LYP	Método de Becke que utiliza tres parámetros (con el funcional híbrido y la correlación Lee-Yang-Parr)
Cisteína	Cys, C
TFD	Teoría de funcionales de la densidad
ESP	Cargas procedentes del potencial electrostático
Fenilalanina	Phe, F
Glicina	Gly, G
Glutamina	Gln, Q
Histidina	His, H
HF	Hartree-Fock
HOMO	Orbital molecular más alto ocupado
Isoleucina	Ile, I
Leucina	Leu, L
Lisina	Lys, K
LUMO	Orbital molecular más bajo desocupado
Metionina	Met, M
NBO	Orbital natural de enlace
p53	Gen p53
Prolina	Pro, P
Serina	Ser, S
Tirosina	Tyr, Y
Treonina	Thr, T
TP53	Proteína p53
Triptófano	Trp, W
Valina	Val, V
μ	Momento dipolar
PI	Potencial de ionización
η	Dureza
ω	Índice de electrofilicidad
AE	Afinidad electrónica

RESUMEN

Introducción. Los péptidos en la terapia del cáncer son cada vez más empleados debido principalmente a su especificidad y baja toxicidad, si a ello se le aúna la efectividad sin requerir de un vector, se presenta un panorama prometedor. Debido a la importancia en la tumorigénesis del gen p53 y su respectiva proteína TP53, algunos autores han estudiado una serie de péptidos que proceden de ella; uno de estos contiene a los residuos 12 a 26 de la región amino terminal que corresponde al dominio de unión de la proteína TP53 a HDM2 y en el que se ha demostrado experimentalmente la capacidad membranolítica específica contra células neoplásicas. **Objetivo.** Fue realizar el análisis de la estructura electrónica, la geometría y las propiedades fisicoquímicas de los residuos (12 al 26) de TP53, desde el punto de vista teórico, con la finalidad de mostrar a los aminoácidos químicamente más reactivos y contribuir al conocimiento de la selectividad específica de estos residuos por la membrana de las células neoplásicas. **Material y Métodos.** La molécula analizada consiste en 15 aminoácidos equivalentes a 240 átomos y 896 electrones, por lo que se generaron tres fragmentos (PPLSQ, ETFS y DLWKLL), debido a que el nivel de cálculo empleado es costoso computacionalmente (ocupa mucho tiempo y mucha memoria). Las geometrías se optimizaron mediante el método Hartree-Fock y con el conjunto base 6-31G(d); sobre estas estructuras optimizadas se realizaron los cálculos puntuales con el funcional híbrido B3LYP y con el conjunto base 6-311G(d) empleando el paquete computacional Gaussian 98 y 03. **Resultados.** Las cargas atómicas procedentes del potencial electrostático mostraron como aminoácidos reactivos importantes a

L14, S15, T18, S20, L25 y L26 lo que sugiere que éstos están expuestos a ataques nucleofílicos y electrofílicos. Además los datos geométricos que se obtuvieron, correlacionan con los datos experimentales de resonancia magnética nuclear informados. Los aminoácidos D, L W, K y L son necesarios para mantener la estructura de alfa hélice en la molécula y las prolinas le dan rigidez a la estructura y al coincidir con sitios altamente negativos, es posible que también permitan el primer contacto electrostático del péptido con la membrana de la célula. Por otro lado, el análisis de los órdenes de enlace, de las interacciones intramoleculares, así como de algunos descriptores químico-cuánticos de reactividad global tales como los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) y el potencial electrostático condujeron a la caracterización de la estructura electrónica y de los sitios de interacción más importantes en los fragmentos bajo estudio. **Conclusiones.** Se demostró que es posible emplear los métodos químico-cuánticos para caracterizar las propiedades electrónicas, estructurales y fisicoquímicas de oligopéptidos con 15 aminoácidos y que los cálculos teóricos obtenidos se podrían correlacionar con la actividad biológica; buscando con esto el diseño de nuevos péptidos terapéuticos.

ABSTRACT

Introduction. The peptides in the cancer therapy are further employees mainly to their specificity and low toxicity if to is joined it the effectiveness without requiring of a vector, these shown up a promising panorama. Due to the importance of the gene p53 in the tumorogenesis and their respective protein, TP53, a péptides series has been designed that TP53 proceeds; one of these it contains to the residuals 12 at 26 of the region terminal carboxilo that it corresponds to the binding domain between TP53 and hDM2y in which has been demonstrated experimentally the specific capacity membranolytic against cancer cells. **Objective.** This doctoral thesis (doctoral dissertation) consists on the theoretical analysis of the electronic structure, the geometry and the physiochemical properties of such residuals (12 at the 26) with the purpose of to detect to the amino acids chemically more reagents and to contribute to the knowledge of the specific selectivity of these residuals for the membrane of the cancer cells. **Material and Methods.** The analyzed molecule consists on 15 amino acids that correspond to 340 atoms and almost 2000 electrons, therefore, three fragments (PPLSQ, ETFS and DLWKLL) were generated, since the level of used calculation is expensive in computer time. The geometries were optimized with HF/6-31G* and on these structures were carried out the punctual calculations with B3LYP/6-311G * using the computational package Gaussian 98. **Results.** The atomic and group charges fitting to the electrostatic potential (ESP) show as important reactive amino acids to L14, S15, 718, S20, L25 and L26 what suggesting that these amino acids are exposed to nucleophilic and electrophilic attacks. Analysis of bond orders, intramolecular interactions, and of several global reactivity descriptors, such as ionization potentials, hardness, electrophilicity index, dipole moments, total energies,

frontier molecular orbitals (HOMO/LUMO), and electrostatic potential let us to the characterize active sites and the electronic structure features. **Conclusions.** A) It was demonstrated that it is possible to use the chemical-quantum methods to characterize properties of the peptides that can be correlated with the biological activity, consequently is recommended to leave of this type of studies on the guide design of therapeutic peptides.

B) Moreover, the geometric data structure obtained, are correlate with the experimental data by magnetic nuclear resonance informed in the literature.

The amino acids D, L W, K and L are necessary to preserve the structure of alpha helix in the molecule. C) The prolines gives rigidity to the structure and when coinciding with highly negative sites, it is possible they also allow the first electrostatic contact of the péptide on the surface cell membrane.

Capítulo 1

Antecedentes e Introducción

El cáncer es una serie de diversas manifestaciones clínicas que tienen en común la desregulación celular de varios genes de tipo supresores de tumor, oncogenes, genes de reparación y genes asociados a la apoptosis, al desarrollo y a la diferenciación.

Una de las grandes interrogantes en la genética molecular del cáncer es el reconocimiento del sitio-específico de las proteínas reguladoras. Algunos grupos de investigación, han trabajado en los últimos 20 años el tema de la regulación proteica, y han incorporado métodos computacionales a sus protocolos de Biología Molecular, conceptuando que la información sobre las interacciones atómicas que se llevan a cabo en los complejos moleculares, proporciona datos que benefician a las ciencias farmacológicas.

Es importante recordar que en las células tumorales se modifican considerablemente las rutas en las que participan complejos proteicos; por lo que los péptidos derivados o basados en sitios con interacciones críticas entre estos complejos, son los “puntos de partida” para el desarrollo de nuevas drogas no genotóxicas.

El límite metodológico de los estudios que emplean técnicas de Biología Molecular, es la secuencia nucleotídica en el caso de los genes (a nivel de DNA y/o RNA) y los aminoácidos en el caso de las proteínas; por lo que se ha planteado que algunas de las interrogantes respecto al mecanismo de acción de las moléculas biológicas en los diferentes procesos celulares, se pueden ir respondiendo al conocer las interacciones moleculares a niveles de estructura atómica (Figura 1). En los últimos años, los avances en el desarrollo de nuevos modelos matemáticos y de programas computacionales más intuitivos que describen fenómenos químicos, así como la disponibilidad de computadoras con mayor capacidad para el procesamiento

de datos, han provisto a los investigadores experimentales de herramientas que si se utilizan en conjunto con técnicas de investigación tradicionales, permiten examinar tanto las propiedades estructurales de compuestos existentes como predecir propiedades y actividades para desarrollar nuevas formas químicas.

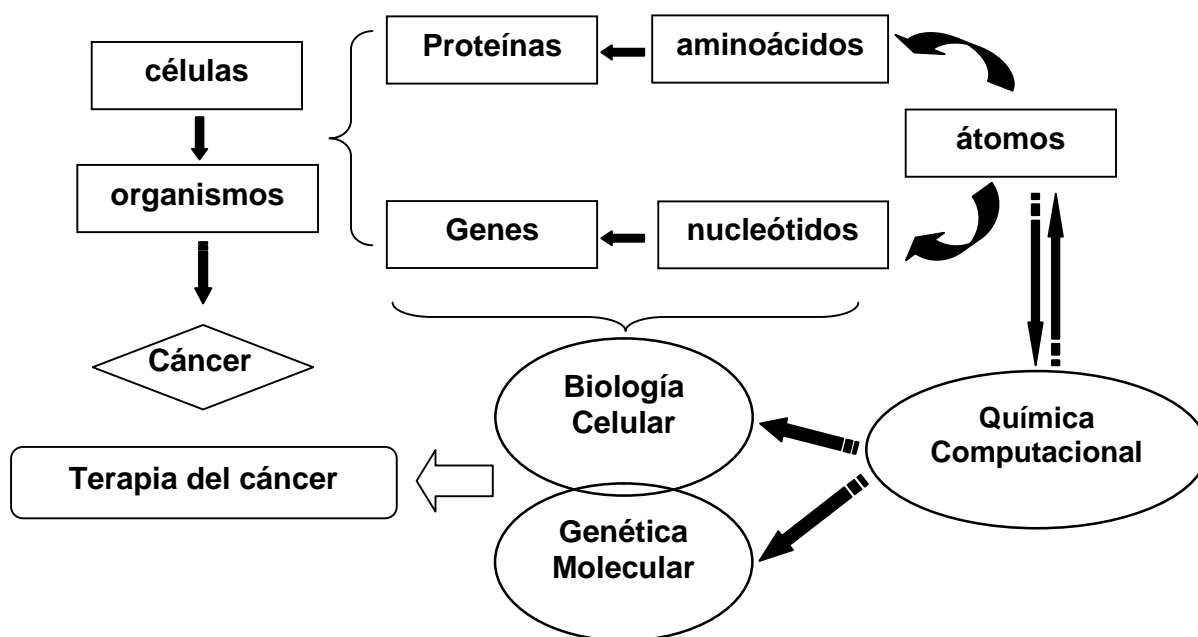


Figura 1. Interacción entre disciplinas diferentes en el estudio del cáncer.

1. Aminoácidos.

Para representar la secuencia de aminoácidos de una proteína, se han establecido abreviaturas de una y de tres letras para cada uno de los aminoácidos comunes, de acuerdo a: "Guidelines for Human Gene Nomenclatura"¹.

Estas abreviaturas están aceptadas universalmente. Las de tres letras de los ácidos aspártico (Asp) y glutámico (Glu) deben diferenciarse con las de la asparagina (Asn) y la glutamina (Gln). En la determinación experimental de los aminoácidos de una proteína mediante síntesis química, se pueden encontrar dificultades para distinguir entre Asn y Asp o entre Gln y Glu, debido a que los grupos amida de la cadena lateral en Asn y Gln se hidrolizan, formando Asp y Glu (Figura 2). En estos casos, se emplean los símbolos Asx para Asp o Asn y Glx para Glu o Gln. Se utiliza un sistema parecido para simbolizarlos con las abreviaturas de una sola letra (Dx, Nx, Ex, Qx). Para nombrar el péptido se empieza por el NH₂ terminal por acuerdo. Si el primer aminoácido de nuestro péptido fuera alanina y el segundo serina tendríamos el péptido alanil-serina.



Figura 2. Grupos R del aspartato (izquierda) y del glutamato (derecha).

Todas las proteínas se sintetizan como polímeros de α -aminoácidos (aa) y de ellos sólo existen 20 llamados aa comunes; éstos se definen como aquellos para los que existe un codón específico en el código genético de DNA. La traducción de las secuencias nucleotídicas conduce a la polimerización de aminoácidos en una

secuencia lineal específica, que es característica de cada proteína².

En las proteínas pueden encontrarse además de los aminoácidos comunes, aminoácidos derivados, que se forman a partir de uno común, generalmente mediante una reacción que es facilitada por una enzima; algunos ejemplos son la cistina, la desmosina y la isodesmosina que se encuentran en la elastina, la hidroxiprolina y la hidroxilisina presentes en el colágeno y el γ -carboxiglutamato que se encuentra en la protrombina. Los aminoácidos comunes tienen en común un átomo de carbono central (alfa) al que están unidos covalentemente un grupo ácido carboxílico, un grupo amino y un átomo de Hidrógeno (Figura 3).

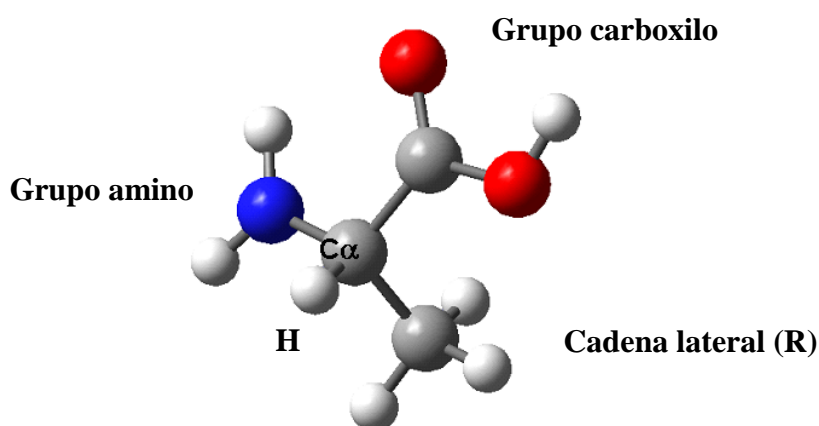


Figura 3. Estructura de un aminoácido.

En su forma ionizada, un aminoácido en solución acuosa a pH 7.0 presenta el grupo α -amino protonado en su forma de ion amonio mientras que el grupo ácido carboxílico se encuentra en su forma desprotonada o carboxilato (Figura 4).

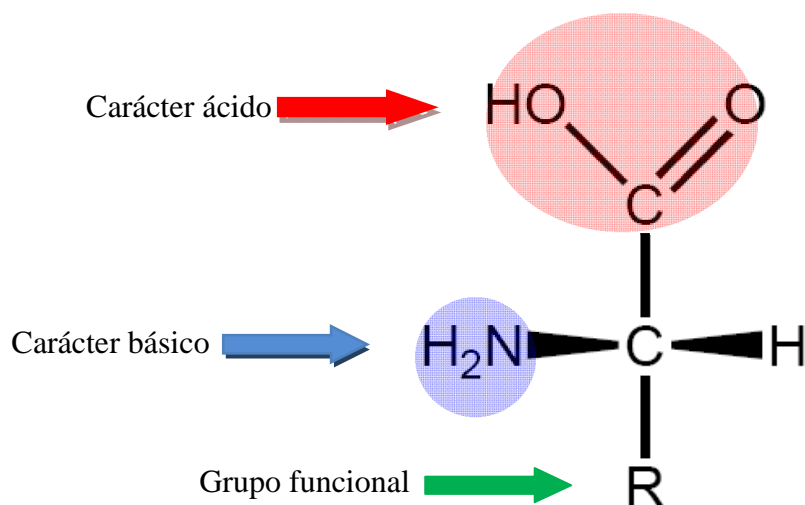





Figura 4. Los aminoácidos tienen carácter ácido y básico.

Además, de estos tres grupos, al carbono alfa se le une un grupo químico específico conocido como cadena lateral (R), que difiere en cada uno de los aminoácidos comunes. Los alquil-aminoácidos tienen cadenas laterales constituidas por grupos alquilo e incluyen a la glicina (Gly o G), alanina (Ala o A), valina (Val o V), leucina (Leu o L) e isoleucina (Ile, I). La glicina tiene la estructura más sencilla de los 20 aa; la A contiene un grupo $R=CH_3-$ (metilo); en la Val el grupo $R=CH_3-CH_2-$ (isopropilo); por su parte tanto en la Leu como la I el grupo $R=CH_3-CH_2-CH_2-$ (butilo), que son isómeros estructurales entre sí, en la Leu la ramificación de la cadena lateral de isobutilo se encuentra sobre el carbono γ del aminoácido, y en la Ile la ramificación se encuentra sobre el carbono β . Los aminoácidos aromáticos son la fenilalanina (Phe o F), la tirosina (Tyr o Y) y el triptófano (Trp o W). El grupo R de la Phe contiene un anillo bencénico (); la Tyr contiene un grupo fenólico () y

el grupo R del triptófano contiene un grupo indol () en estos tres aminoácidos, la parte aromática está unida al carbono alfa a través de un carbono metilénico ($-\text{CH}_2-$). La cisteína (Cys o C) y la metionina (Met o M) contienen azufre; el grupo R de la Cys es el tiometil ($\text{HS}-\text{CH}_2-$) y en la Met la cadena lateral es un metil etil éster tiológico ($\text{CH}_3-\text{SCH}_2-\text{CH}_2-$). Existen dos aminoácidos comunes, la serina (Ser o S) y la treonina (Thr o T) que contienen grupos hidroxialcólicos; la cadena lateral de la Ser es un hidroximetil (HOCH_2-) y en la Thr un etanol está conectado al carbono α del aminoácido a través del carbono que contiene el sustituyente hidroxilo, dando lugar a una estructura de alcohol secundario en el grupo R ($\text{CH}_3-\text{CHOH}-\text{CH}_\alpha-$). Por su parte, la cadena lateral de la prolina (Pro o P) es notable porque incorpora al grupo α -amino por lo que se clasifica de manera más apropiada como α -iminoácido, ya que su amina en α es secundaria porque su nitrógeno en α forma enlaces covalentes con dos átomos de carbono (uno en el carbono α y otro en el carbono de la cadena lateral). La incorporación del nitrógeno α -amino a un anillo de cinco átomos restringe en la prolina la libertad rotacional alrededor del enlace $-\text{N}_\alpha-\text{C}_\alpha-$ a un ángulo rotacional específico; ello limita la participación de la prolina en las conformaciones de la cadena polipeptídica³.

La glutamina (Gln o Q) y la asparagina (Asn o N) contienen una amida en su R. Ambos son análogos estructurales de los ácidos glutámico y aspártico respectivamente, con los grupos carboxílicos de su cadena lateral amidados. Sin embargo, existen codones de DNA específicos para glutamina y para asparagina que son diferentes para el ácido aspártico y el ácido glutámico. Las cadenas laterales amídicas de la glutamina y la asparagina no se pueden protonar y permanecen sin carga a pH fisiológico³.

Los aminoácidos comunes tienen cuatro sustituyentes (R , H , COO^- , NH_3^+) unidos covalentemente al carbono alfa ($C\alpha$). Un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes dispuestos en una configuración tetrahédrica es asimétrico, por lo que existe en dos formas enantioméricas y cada una muestra isomería óptica, exceptuando a la glicina cuyo $R=H$.

En la configuración absoluta de un aminoácido se utiliza la proyección de Fisher para mostrar la dirección en el espacio de los sustituyentes del carbono alfa dispuestos de forma tetrahédrica. El α - COO^- está dirigido hacia arriba y hacia atrás del plano, y el grupo R se dirige hacia abajo y hacia atrás del plano (Figura 5). Tanto el H como el grupo NH_3^+ en alfa se dirigen hacia el frente. Un aminoácido que se mantiene en esa posición, proyecta su grupo α - NH_3^+ hacia la derecha o hacia la izquierda del carbono alfa; así si está proyectado hacia la izquierda, tiene una configuración absoluta L y su enantiómero óptico que se proyecta hacia la derecha será D . Estas configuraciones L o D , hacen referencia a su capacidad para girar el plano de la luz polarizada hacia la izquierda (L , *levo*) o hacia la derecha (D , *dextro*)⁴.

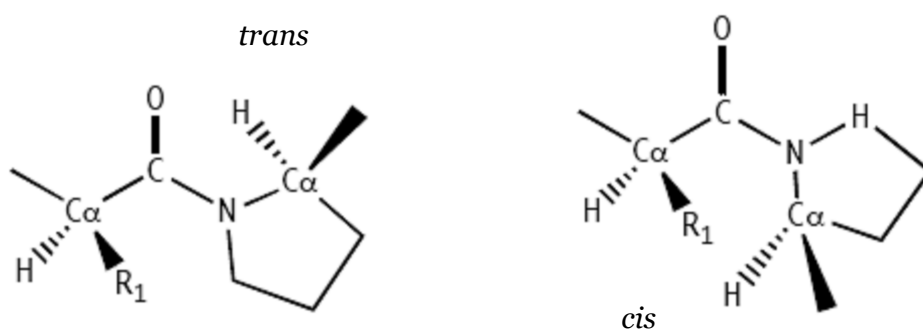


Figura 5. Conformaciones *trans* y *cis* de la prolina.

Debido a que los aminoácidos son asimétricos, los péptidos y las proteínas en los que se encuentran en forma polimérica, también tienen propiedades asimétricas.

La polimerización de los aminoácidos comunes se cataliza a través de enzimas y se asocia con los ribosomas desde el punto de vista químico es una reacción de deshidratación en la que el grupo α -carboxílico de un aminoácido con cadena lateral R1 forma un enlace covalente con el grupo α -amino del R2 con la eliminación de una molécula de agua (Figura 6)⁴.

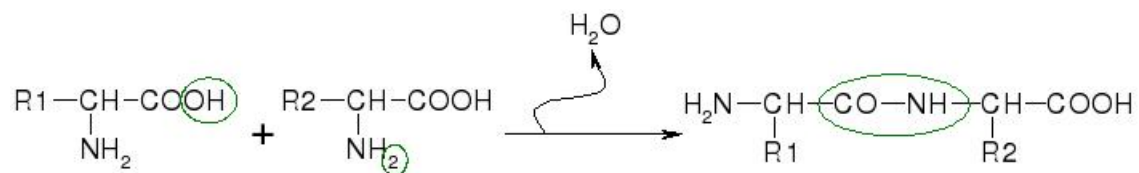


Figura 6. Formación del enlace peptídico.

El dipéptido (dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico) puede formar un segundo enlace peptídico con el α -amino de un tercer aminoácido (R3) a través de su grupo ácido carboxílico terminal, lo que genera un tripéptido (Figura 7)⁴.

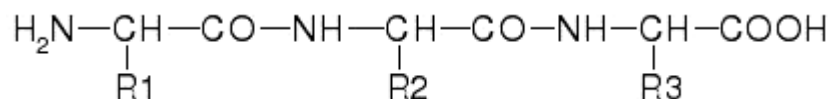


Figura 7. Tripéptido mostrando sus tres cadenas laterales R1, R2, R3.

La repetición de este proceso genera un oligopéptido (hasta 20 residuos) o polipéptido (más de 20 residuos) con una secuencia específica de aminoácidos a la que se le conoce como estructura primaria de la proteína y está establecida por la

secuencia de DNA de su gen correspondiente. La estructura primaria es la que hace posible que una cadena polipeptídica se pliegue en una estructura tridimensional específica y le confiere a la proteína sus propiedades químicas y fisiológicas.

El enlace peptídico se puede representar utilizando dos isómeros de resonancia (Figura 8). En la estructura I se encuentra un doble enlace entre el carbono y el oxígeno del carbonilo (C=O) mientras que en el carbono y el nitrógeno el enlace es sencillo (C-N). En la estructura II, ocurre lo contrario (C-O⁻ y C=N); en esta estructura el oxígeno tiene una carga negativa y el nitrógeno carga positiva⁴.

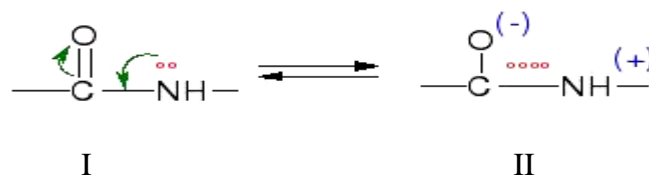


Figura 8. Estructuras de resonancia del grupo amido.

Podríamos pensar que una proteína puede adoptar miles de conformaciones debidas al giro libre en torno a los enlaces sencillos. Sin embargo, en su estado natural sólo adoptan una única conformación tridimensional nativa que es directamente responsable de la actividad de la proteína.

Los enlaces peptídicos son híbridos de resonancia de estas dos estructuras (I, II) de isómeros electrónicos; de tal manera que el enlace entre el carbono del carbonilo y el nitrógeno tiene un 50-60% de carácter de doble enlace. El enlace híbrido se apoya en mediciones espectroscópicas y en estudios de difracción de rayos X, que muestran que la longitud del enlace peptídico tiene un valor de 1.33 Å con respecto a los enlaces sencillos C-N de ~1.45 Å y a los dobles enlaces C=N de

1.25 Å. Una de las consecuencias de este carácter de doble enlace parcial es que la rotación alrededor del enlace entre el carbono del carbonilo y el nitrógeno del enlace peptídico no puede tener lugar a temperatura fisiológica (37°C) como en las estructuras de enlace simple convencional; como resultado de la química del doble enlace (C=N), todos los átomos que se unen al C y al N se encuentran en un mismo plano (Figura 9). Por lo que a una cadena polipeptídica se le considera un polímero de planos de enlaces peptídicos conectados entre sí en los átomos de carbono alfa; este carbono conecta a los enlaces peptídicos mediante enlaces sencillos que permiten la rotación de los planos peptídicos adyacentes uno respecto al otro. De esta manera, cada residuo de aminoácido aporta un carbono alfa (dos enlaces sencillos y uno peptídico) a dicha cadena polipeptídica⁵.

En la configuración *cis* los dos grupos de las cadenas laterales se encuentran del mismo lado del doble enlace parcial (C=N), lo que provoca la generación de fuerzas estéricas de repulsión, que son desfavorables entre los dos R, mientras que en la conformación *trans* se forma un enlace entre los átomos de oxígeno y de hidrógeno del enlace peptídico, esta es la conformación más estable de dicho enlace peptídico ya que los dos grupos de R también se encuentran en *trans*, es decir en sentidos opuestos, por lo que los enlaces peptídicos de las proteínas se encuentran siempre en *trans*, excepto en donde existen residuos de prolina, ya que en esta la cadena lateral está unida a su grupo α -amino y los enlaces en *trans* y en *cis* con el α -imino tienen aproximadamente la misma energía; por lo que la conformación del enlace peptídico en la que se encuentre la prolina en una proteína dependerá de las fuerzas que se generen por la estructura tridimensional plegada de la molécula completa.

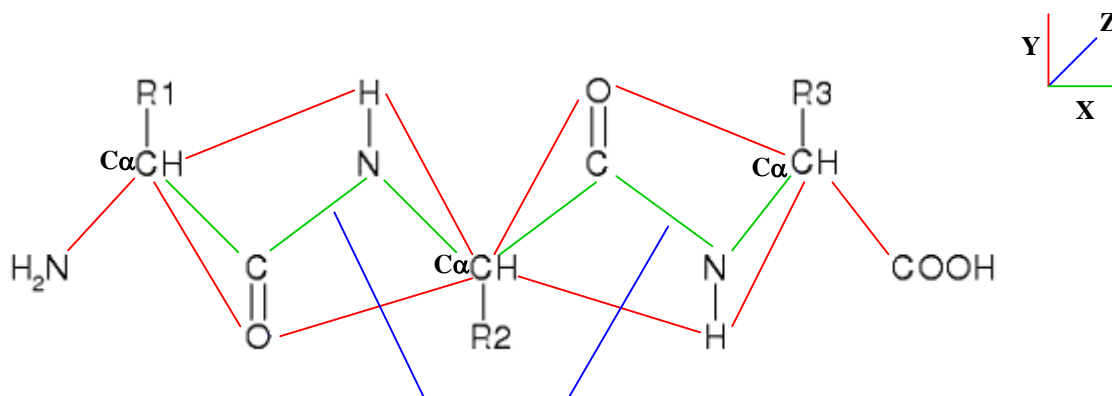


Figura 9. Plano espacial de un polipéptido. Se observa que todos los átomos que se unen al $C\alpha$ y al N se encuentran en un mismo plano.

Los aminoácidos D-aa en *trans*, contienen cadenas laterales sin carga a pH fisiológico pero los grupos ácido carboxílico de la cadena lateral están desprotonados y por lo tanto su carga es negativa⁵.

La cadena lateral de la lisina es la N-butilamina, de la arginina un grupo guanidino que está separado del carbono α por tres carbonos metilénicos. Tanto el grupo guanidino de la arginina como el grupo amino de la lisina están protonados a pH fisiológico y por lo tanto se encuentran en su forma cargada⁵.

En la histidina la cadena lateral contiene una estructura heterocíclica de cinco carbonos llamada imidazol. El pKa del grupo imidazol es de aproximadamente 6 en agua; y las soluciones fisiológicas contienen concentraciones relativamente elevadas tanto de la forma básica (imidazol) como de la ácida (imidazolio) de la cadena lateral de la histidina⁵.

En la tabla I se listan los grupos ionizables comunes a las proteínas y a los aminoácidos; las formas ácidas se encuentran a la izquierda del signo de equilibrio y las básicas a la derecha. Al formar su base conjugada, la forma ácida disocia un

protón; lo contrario la forma básica se asocia con un protón para formar el respectivo ácido. La disociación de un protón de un ácido determinado se caracteriza por una constante de disociación ácida (K_a) con su valor correspondiente de pK_a que es el \log_{10} de $1/pK_a$ se muestra un intervalo de valores pK_a para cada grupo ácido dependiendo del pK_a real del ambiente en el que se encuentra la molécula. Los aminoácidos cuyos R contienen átomos de nitrógeno como la Lys y Arg, son los aa básicos, ya que estas cadenas laterales tienen valores de pK_a relativamente elevados y actúan como bases a pH fisiológico. Los aa cuyos R contienen un grupo ácido carboxílico tienen valores de pK_a relativamente bajos y se denominan aa ácidos, se encuentran predominantemente en sus formas desprotonadas y poseen carga negativa a pH fisiológico. Los péptidos o las proteínas en los que la proporción $\Sigma Lys + \Sigma Arg / \Sigma Glu + \Sigma Asp$ es mayor que uno, son llamados péptidos o proteínas básicos y aquellas cuya proporción es menor a 1 son llamados ácidos³.

Tabla I. Grupos ionizables comunes a las proteínas y a los aminoácidos

Lugar donde se encuentra el grupo ácido	Forma ácida	Forma básica	Intervalo aproximado de pKa para el grupo
Resto NH ₂ -ter en los péptidos Lisina	$\text{R} - \text{NH}_3^+$ Amonio	$\text{R} - \text{NH}_2 + \text{H}^+$ Amina	7.6-10.6
Resto COOH-ter en los péptidos Glutamato, aspartato	$\text{R} - \text{COOH}$ Ácido carboxílico	$\text{R} - \text{COO}^- + \text{H}^+$ Carboxilato	3.0-5.5
Arginina	$\text{R} - \text{NH} - \overset{+}{\text{C}}(\text{NH}_2) = \text{NH}_2$ Guanidinio	$\text{R} - \text{NH} - \text{C} = \text{NH} + \text{H}^+$ Guanidinio	11.5-12.5
Cisteína	$\text{R} - \text{SH}$ Tiol	$\text{R} - \text{S}^- + \text{H}^+$ Tiolato	8.0-9.0
Histidina	$\text{R} - \text{C} \begin{array}{l} \text{---} \text{CH} \\ \quad \\ \text{HN} \quad \text{C}^+ \text{---} \text{NH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Imidazolio	$\text{R} - \text{C} \begin{array}{l} \text{---} \text{CH} \\ \quad \\ \text{HN} \quad \text{N}^+ \text{---} \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Imidazol	6.0-7.0
Tirosina	$\text{R} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{OH}$ Fenol	$\text{R} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{O}^- + \text{H}^+$ Fenolato	9.5-10.5

Todo parece indicar que la vida se originó en el agua y no podría existir sin esta molécula eléctricamente neutra; por lo que la importancia de las propiedades físicas del agua y su capacidad de disolvente son únicas. Ya que la región de su oxígeno es negativa y la de sus hidrógenos es positiva, lo cual hace que cuando se le acerque un catión o un anión pueda reaccionar con el agua. Las sustancias hidrofóbicas son aquellas solubles en solventes no polares pero insolubles en agua. Las membranas celulares tienen regiones hidrofílicas e hidrofóbicas y cuando la zona hidrofílica es mayor que las colas lipídicas, se forman esferas con la cabeza orientada hacia el agua y las colas retraídas (micelas) (Figura 10A). Cuando las colas hidrofóbicas son muy voluminosas forman capas como en el caso de las membranas biológicas (Figura 10B)⁶.

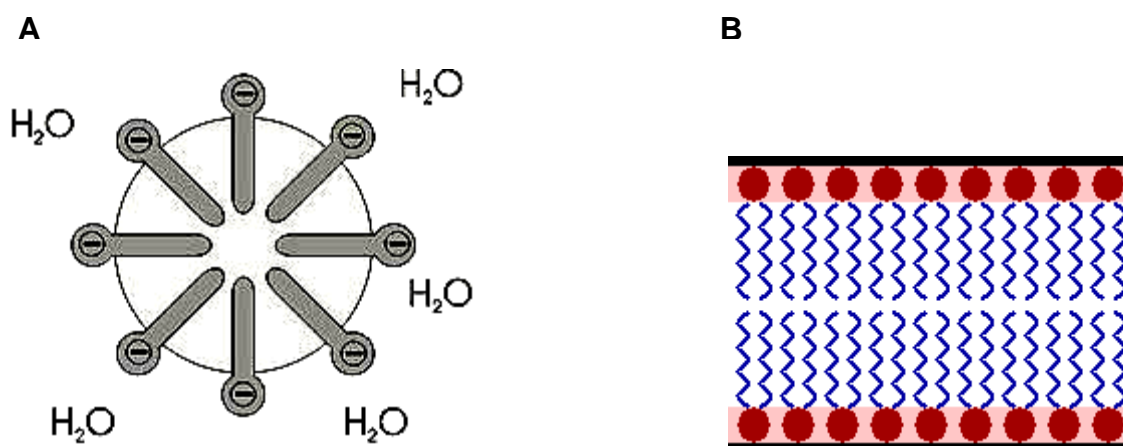


Figura 10. A) organización de los fosfolípidos en una micela y B) organización en una membrana

La hidrofobicidad relativa de las cadenas laterales de los aminoácidos es fundamental para el plegamiento de una proteína en su estructura nativa y para su estabilidad. La escala de hidrofobicidad inicia con la glicina, cuyo valor se considera cero. Las cadenas laterales de los aminoácidos que se disuelven preferentemente

en el disolvente apolar, tienen un valor de hidrofobicidad positivo. En general, entre más afinidad presente un aminoácido por el disolvente dipolar será más positivo; sin embargo, esta correlación no es exacta debido a la naturaleza anfótera de muchos de los aminoácidos hidrofóbicos que sitúan las partes más polares de sus cadenas laterales cerca de la superficie para interactuar con el disolvente polar tal como el agua, del exterior. Por otro lado, contrario a lo que se esperaría, no todas las cadenas laterales hidrofóbicas apolares yacen hacia el interior de la estructura tridimensional plegada de una proteína; cuando los grupos hidrofóbicos están en la superficie se encuentran generalmente dispersos entre cadenas laterales polares y cuando se agrupan cadenas apolares⁴. En la Figura 11 se muestra el grado de hidrofobicidad de los aminoácidos comunes. En esta tesis la hidrofobicidad de cada fragmento, así como de la molécula con los quince aminoácidos (de referencia), se obtuvo calculando la relación de reparto (P) empleada en forma logarítmica ($\log P$) como se explica en el capítulo de materiales y métodos.

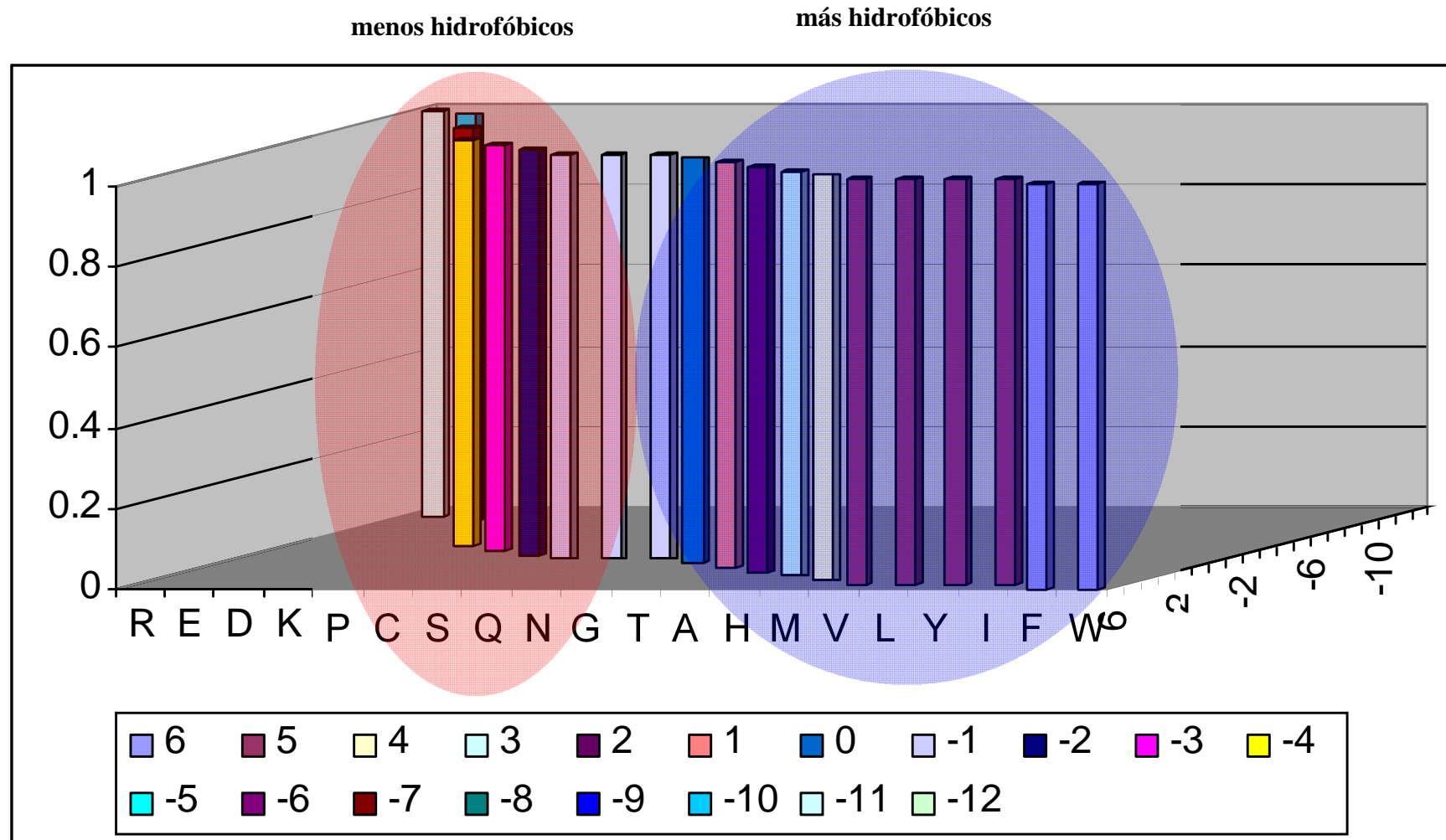


Figura 11. Grado de hidrofobicidad de los 20 aminoácidos comunes. Tomado y modificado de Whitford, 2005.

2. PÉPTIDOS

Los péptidos son el resultado de la unión covalente de dos o mas aminoácidos a través de enlaces amida o peptídicos; son estructuras intermedias entre los aminoácidos y las proteínas. Se nombran enumerando a los aminoácidos que tiene libre el grupo amino (llamado amino terminal o NH_2).

Los péptidos presentan a menudo ciertas peculiaridades estructurales que no aparecen en las proteínas (Figura 12); es frecuente encontrar grupos amino terminales que están acetilados o en forma de ácido piroglutámico (un residuo de Glu N-sustituido por su propia cadena lateral) y grupos carboxilo terminales en forma de amidas. El bloqueo de los grupos terminales confiere ventajas al péptido, como por ejemplo resistencia frente a exopeptidasas⁵.

Se han utilizado como drogas terapéuticas péptidos de tamaños, propiedades y orígenes diversos. Si bien los péptidos se pueden producir biosintéticamente (por medio de fermentaciones microbianas naturales o recombinantes) la síntesis química, la química cuántica y el modelado molecular posibilitan la modificación de dichos péptidos y pequeñas moléculas o aminoácidos no naturales diseñados con características fisicoquímicas específicas; la incorporación de aminoácidos sintéticos modificados hace posible que existan tantos y tan específicos como la diversidad química lo permita. La capacidad de unir moléculas pequeñas a los péptidos sintéticos, está abriendo el campo de estudio a los agentes citotóxicos dirigidos en la terapia antitumoral. Estos agentes suelen ser análogos a otras moléculas químicas medicinales, solo que con mayor afinidad y especificidad en el reconocimiento molecular. Los aminoácidos sintéticos también evitan la degradación rápida, al hacer diseños moleculares irreconocibles a las proteasas o al modificar su estructura para darles mayor rigidez. Por ejemplo, dos familias estructuralmente diferentes de

péptidos miméticos de inmunoglobulina E tienen estabilidad diferente cuando se incuban por periodos largos en matrices biológicas⁷. Debido a su tamaño pequeño, los péptidos se remueven rápidamente de la circulación vía filtración renal, lo que representa una vida media corta que es limitante para el uso de los péptidos en la medicina. Sin embargo, en caso de ser empleados con fines citotóxicos para la terapia del cáncer, el metabolismo rápido de las células neoplásicas les confiere ventajas en dosis apropiadas y el tamaño en si, les permite entrar o bien interactuar con la membrana de las células tumorales^{8,9}.

Los péptidos con fines terapéuticos proceden de diseños *de novo*¹⁰ o de moléculas naturales¹¹; por ejemplo el análogo a la protegrina, llamado IB-367 se emplea de forma oral contra mucositis¹², o aquellos tomados de fuentes naturales como por ejemplo el *Plenaxis* (Praecis Pharmaceuticals) que se utiliza contra el cáncer de próstata y que ya esta en el mercado^{13,14}; el *FUZEON* (Trimeris) contra el virus HIV que está aprobado por la FDA¹⁵; el *Symlyn* (Amylin) contra diabetes tipos I y II que se encuentra en fase clínica III¹⁶, entre otros^{17,18}. Todos ellos presentan un espectro amplio, sin toxicidad sistémica y sin desarrollar resistencia¹⁹.

También se han empleado péptidos capaces de evitar la angiogénesis en ratones con cáncer de mama²⁰ y carcinomas de próstata²¹. La forma de administración ha sido a través del endotelio en proliferación, lo que libra uno de los obstáculos más importantes en la terapia con péptidos.

La vida media de un péptido se puede extender con modificaciones como la glicosilación²², la conjugación con polietilenglicol (PEG)^{23,24}, la sustitución de D-aminoácidos por L-aminoácidos para reducir el ataque por ciertas proteasas, así como la asociación con albúmina sérica para limitar la proteólisis y la expulsión en el cuerpo^{25,26}.

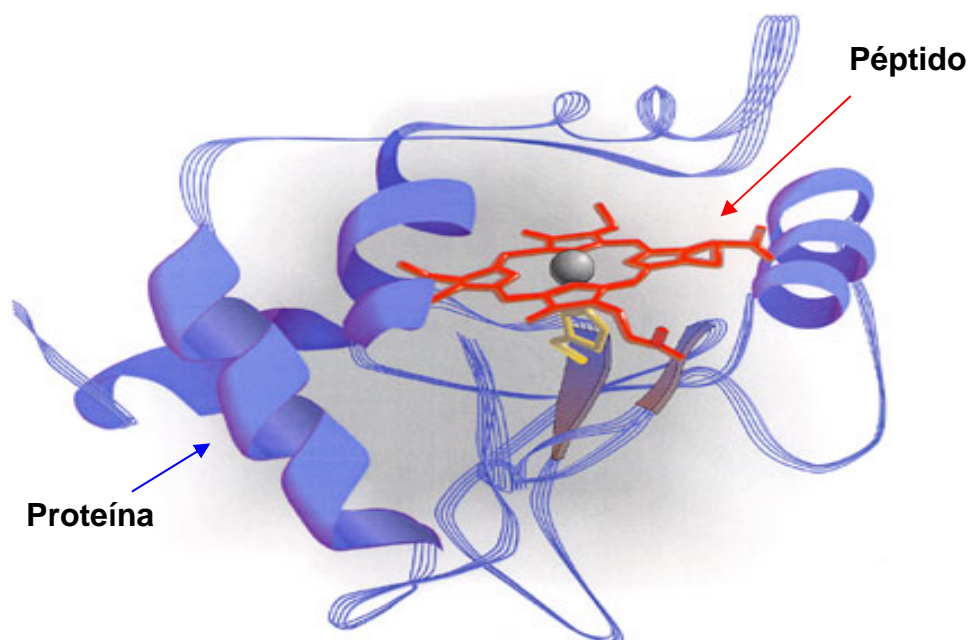


Figura 12. Representación esquemática de un péptido (molécula en rojo al centro) unido a una proteína (molécula en azul).

De acuerdo a la clasificación para proteínas estructurales (SCOP)²⁷ los péptidos antineoplásicos se clasifican dentro de la clase de los péptidos y familia de los péptidos anticancerígenos.

El desarrollo de péptidos con fines terapéuticos está motivado por lo siguiente: 1) por su tamaño pequeño comparado con los anticuerpos y las proteínas, 2) porque las rutas de administración y de liberación pueden ser muy diversas y no se limitan a las inyecciones intravenosas y 3) por la reducción del costo total del tratamiento, una vez liberada la patente. Sin embargo, en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos existen varios obstáculos tales como los costos elevados y el tiempo prolongado, es por ello que en los últimos años se están empleando para su síntesis métodos teóricos como son la química cuántica computacional y el modelado molecular, como herramientas fundamentales en el diseño de nuevas moléculas con características específicas y con prometedores resultados en las de tipo peptídico.

Aunque los resultados de los modelos teóricos aplicados *in vitro* frecuentemente son promisorios, la eficacia cambia cuando se aplican *in vivo*. Esto puede ser el resultado de las interacciones con muchos componentes en la circulación, el tracto gastrointestinal, la dermis, la excreción o la afinidad a receptores entre los organismos y se sabe poco acerca de la inmunogenicidad provocada por D-aminoácidos o por aminoácidos totalmente sintéticos. A pesar de estas barreras técnicas, varios péptidos se encuentran en fase clínica experimental avanzada como se mencionó anteriormente. Además muchos de los tratamientos antitumorales que se utilizan actualmente, carecen de especificidad y provocan efectos colaterales significativos^{10,16}. Los péptidos tienen un mejor intercambio celular²⁸, especificidad al blanco²⁹⁻³³ y capacidad antigénica al emplearse como vacuna^{34,35}. Con base en propiedades tales como el tamaño, carga y capacidad de formar estructuras anfipáticas en solventes no polares, las moléculas peptídicas pueden actuar sobre las membranas celulares. A continuación en la Tabla II, se señalan algunas propiedades moleculares de moléculas con potencial capacidad farmacológica.

Tabla II. Propiedades de moléculas con potencial farmacológico

Propiedad	Valor mínimo	Valor máximo
Donadores de puentes de H	0	5
Aceptores de puentes de H	0	10
Carga electrónica formal	-2	2
Número de enlaces con rotación libre	0	8
Masa molar (Da)	200	500
Número de átomos pesados	20	50
Hidrofobicidad (LogP)	-2	5

Tomada y modificada de Padilla-Zúñiga y Rojo Domínguez³⁶.

3. LA PROTEÍNA TP53

Hace cerca de 28 años que la proteína TP53 fue descrita por primera vez en publicaciones independientes como un **oncogén**, debido a su capacidad de unión al antígeno T del virus SV40 y de transformar células en cultivo^{37,38}. Pero aproximadamente 10 años después de su descubrimiento, en 1989, el grupo de Levine, atribuyó a esta proteína su verdadera función fisiológica, la de suprimir la formación de tumores³⁹. En el año 1992, recibió el nombre por el que familiarmente hoy se le conoce, "guardián del genoma", debido a que desempeña una función crítica en los mecanismos de respuesta celular frente al daño o mutación en el genoma⁴⁰. TP53 mantiene la integridad del genoma por dos mecanismos, el primero implica la interrupción de la progresión del ciclo celular y el segundo la inducción de la muerte de la célula. Cuando se inactiva la función supresora de TP53 (por deleciones o mutaciones puntuales del gen), se desarrollan algunos tipos de cáncer debido a que las células se encuentran más predispuestas a la acumulación de mutaciones oncogénicas, se favorece la inestabilidad genética y se pueden transactivar los promotores de genes blanco de TP53 e inducir apoptosis.

Los análisis filogenéticos sugieren que p53 proviene de un gen ancestral similar a p73/p63³⁷; sin embargo, existen ciertas diferencias, ya que al contrario que p53, los genes p63 y p73 pueden dar lugar a otras isoformas proteicas con propiedades funcionales diferentes. Otra diferencia es el número de exones de los genes. El gen p53 está constituido por 11, mientras que p63 y p73 lo están por 15 y 14 respectivamente. Las secuencias de p63 y p73 divergen de p53 fundamentalmente en sus extremos C-terminales (Figura 13C). Así mismo, las señales implicadas en la activación de p63 y p73 difieren de las implicadas en la activación de p53. Sólo una parte de los agentes que producen daño en el DNA y

que activan a p53 puede hacerlo con p73, de esta manera, p73 no se induce por daño en el DNA; y su expresión conduce a un descenso en los niveles de p53⁴¹. Además, las oncoproteínas celulares y virales pueden discriminar entre p53 y el resto de su familia. Contrariamente a la elevada prevalencia de las mutaciones de p53 en cánceres humanos, son pocas las mutaciones en p63 y p73. De hecho, los niveles de p73 aumentan durante la progresión maligna. Asimismo, opuestamente a lo que ocurre en los ratones p53^{-/-}, los ratones p63^{-/-} y p73^{-/-} no desarrollan tumores, sino que presentan anormalidades en el desarrollo⁴¹.

En humanos el gen de p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y está constituido por 11 exones, de los cuales el exón 1 contiene una secuencia no-codificante; en el **exón 2** existen dos sitios putativos de inicio de la transcripción y el **exón 11** contiene el codón de terminación y una gran secuencia no codificante. Este gen da lugar a una proteína de 393 aminoácidos con tres dominios funcionales: 1) el dominio amino-terminal (NH₂), implicado en la activación transcripcional (residuos 1-70) y donde se localiza una subregión rica en prolinas que contiene 5 copias de la secuencia PXXP (residuos 20-97); esta tesis está orientada al estudio de los aminoácidos 12 al 26 como se observa en la Figura 13. 2) el dominio central que contiene la zona de unión al DNA específica de secuencia y que es la región más conservada de la proteína (residuos 100-300); y 3) el dominio carboxilo-terminal (COOH) que está constituido por una región flexible (residuos 300-325), una zona de tetramerización (residuos 325-356) y un extremo básico (363-393) (Figura 13A). La región C-terminal en el estado de latencia TP53 se pliega sobre el dominio central de la molécula y evita su unión al DNA.

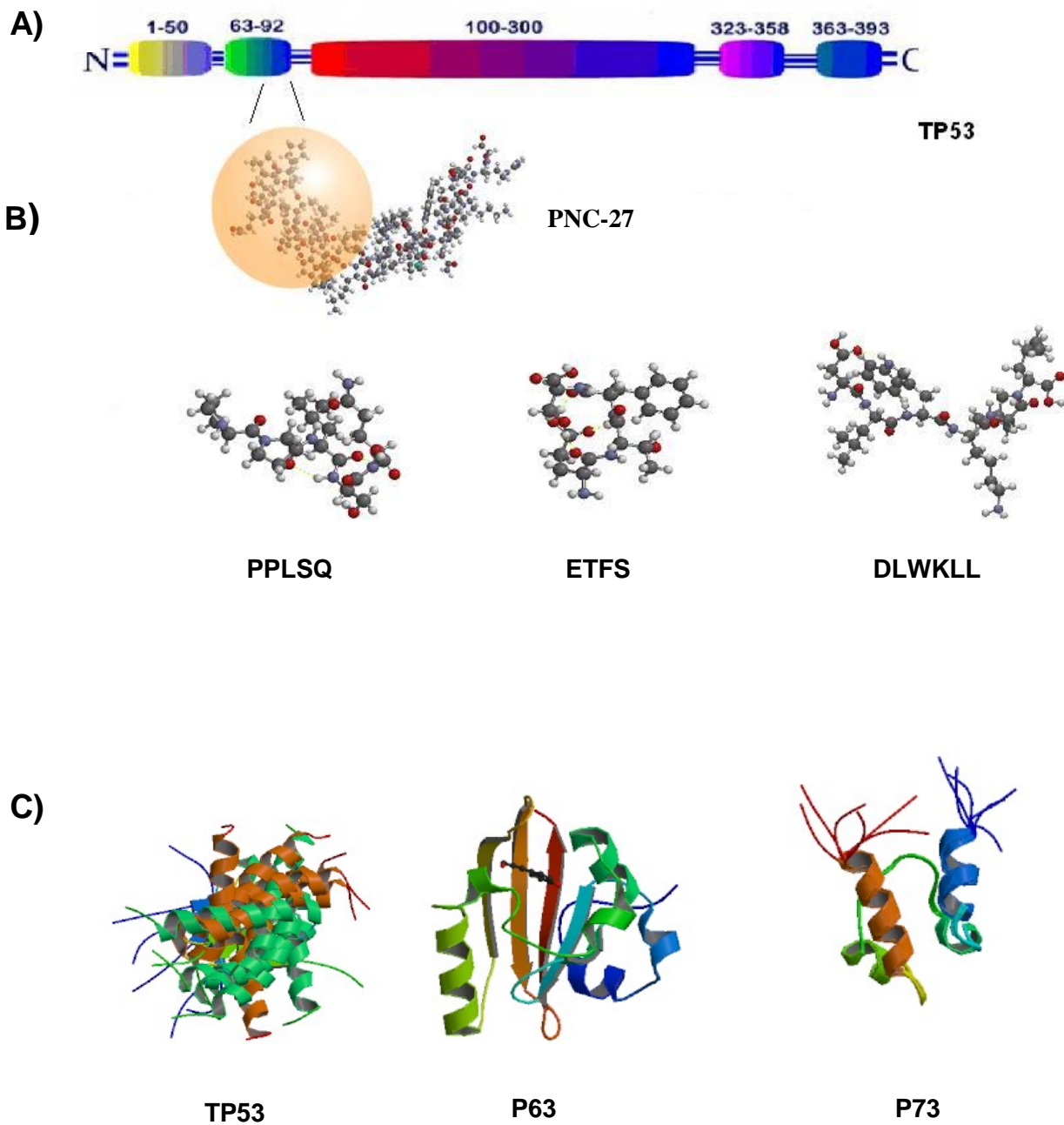
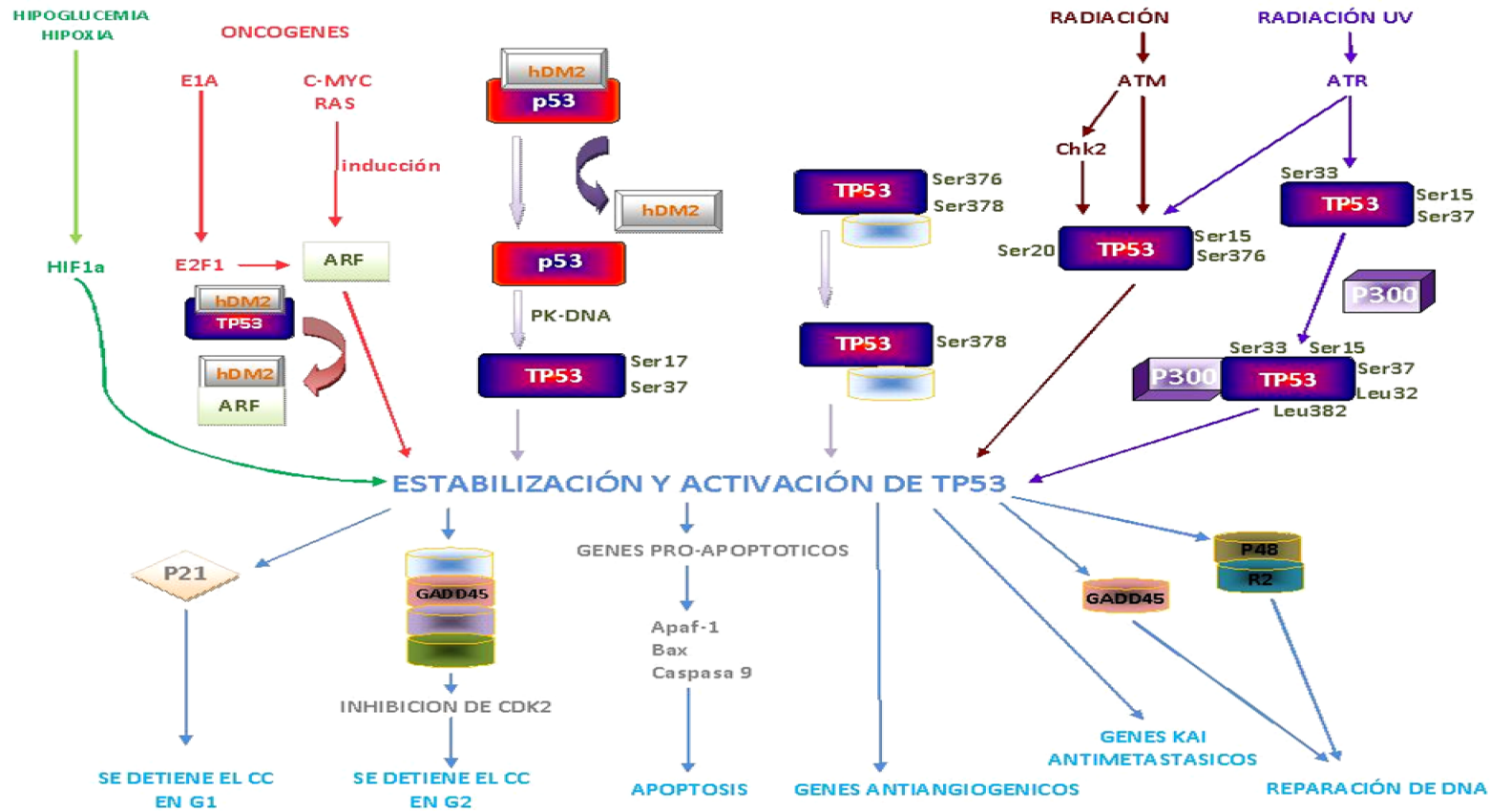


Figura. 13. A) Dominios de TP53; B) PNC27, el círculo señala a los aa 12 al 26 de TP53. PPLSQ, ETFS y DLWKLL son los fragmentos analizados en esta tesis; C) Proteínas: TP53, P63 y P73 tomadas de Protein Data Bank números de acceso: 1hs5, 10tb y 1cok.

En condiciones fisiológicas la proteína TP53 se encuentra en estado latente y en algunos tipos celulares, llega a unos niveles de expresión indetectables por técnicas inmunocitoquímicas o por Western Blot; los niveles de expresión, y con ello la actividad de TP53 están regulados bajo un estricto control. Los niveles proteicos de TP53 sufren un aumento rápido en respuesta a diferentes estímulos entre los que destacamos: el daño directo al DNA (roturas de cadenas simples y dobles), la hipoxia, la exposición a monóxido de nitrógeno, la radiación gamma, UV y la presencia de dímeros de piridina. Este incremento rápido de los niveles de TP53 es consecuencia de un mecanismo postraducciona. La forma inactiva de TP53 presenta una localización difusa a lo largo de toda la célula: en el citoplasma parece que se encuentra unida a proteínas que impiden su desplazamiento hacia el núcleo⁴²; una vez estabilizada o activada migra al núcleo y a la mitocondria. En células donde el genoma se encuentra seriamente dañado resulta muy ventajoso el hecho de que no exista necesidad de la transcripción *de novo* de la proteína, sino incrementa su vida media por mecanismos post-traduccionales, tales como fosforilación, acetilación y sumoilización, que además regulan su actividad biológica. Por otro lado, la estabilidad de la proteína TP53 puede ser regulada dependiendo de su estado de óxido-reducción y de la alteración de la conformación por fármacos oxidantes o quelantes. Así mismo, TP53 puede inhibir su propia síntesis uniéndose a su mismo RNAm (Figura 14)³⁹.

La disminución de los niveles de proteína TP53 se lleva a cabo, en su mayor parte, a través de la vía de señalización ubiquitina-proteosoma, aunque también intervienen otras enzimas proteolíticas como son las calpaínas. Tres sistemas preparan a TP53 para su ubiquitinación: 1) la cinasa JNK que en respuesta a daño en DNA en la fase G0 del ciclo celular fosforila a TP53 en 81Thr. 2) el señalosoma

COP9 (CSN) que fosforila la 155Thr y residuos cercanos⁴³, y 3) la proteína MDM2 (del inglés, murine double minute 2) que es la encargada de dirigir la translocación desde el núcleo al citoplasma⁴⁴. MDM2 es un **oncogén** que codifica una fosfoproteína de 90 KDa que actúa como una enzima E3-ubiquitina ligasa, una de las enzimas involucradas en el marcaje de la proteína TP53, debido a su capacidad de interactuar con su extremo amino terminal. MDM2 es el responsable de los bajos niveles de TP53 en células no sometidas a estrés⁴⁵. En algunas situaciones la transcripción de MDM2 es inducida más tarde por los genes blanco de TP53, este espacio temporal permite a TP53 ejercer sus efectos bioquímicos y biológicos. MDM2 participa también en la estabilización de TP53 en los procesos mediados por la proteína p19ARF; esta proteína secuestra a MDM2 en el nucleolo, e impide que acceda al nucleoplasma donde interacciona con TP53. Aunque también se postula que p19ARF pueda inhibir la actividad ubiquitina ligasa de MDM2 sin que sea necesaria la traslocación al nucleolo. En ratones donde se ha extraído el gen MDM2, tiene lugar una desregulación rápida de TP53 y su exceso conduce a la muerte embrionaria (Figura 14)⁴⁵.



Tomado de diversas fuentes y modificado.

Figura 14. Representación esquemática de las rutas de regulación en las que participa la proteína TP53.

Cuando la célula es incapaz de corregir el daño en el DNA, con la finalidad de evitar que dicho daño pase a las células hijas, TP53 activa rutas de señalización que conducen a su muerte. En estas rutas están involucrados varios miembros proapoptóticos de la familia de Bcl2, como bax, NOXA, PUMA y los conocidos como PIGs por sus siglas en inglés "P53 Induced Genes"; algunos de éstos participan en procesos de oxidación celular, y en la expresión de receptores de muerte como CD95 (Fas/APO-1), DR5 o PIDD. Dependiendo del grado de activación de TP53, éste es capaz de inducir unos u otros genes reguladores. Por ejemplo, la fosforilación de ATM, ADNPK o Chk2, en respuesta a daño celular regula la expresión de genes asociados bien a la reparación o a la regulación del ciclo celular, mientras que la fosforilación de la ser46, por las cinasas p38aMAPK o HIPK2 contribuye a la activación de genes apoptóticos. TP53 puede también regular los procesos de apoptosis a través de mecanismos independientes de la transcripción⁴⁶. En experimentos con fármacos inhibidores tanto de la transcripción como de la síntesis de proteínas, TP53 puede inducir apoptosis⁴⁷. Los mecanismos de regulación no transcripcionales se asocian a la capacidad que tiene TP53 de interactuar con otras proteínas que pueden modificar su función. Entre éstas se encuentran proteínas virales como la proteína del adenovirus Ad E1B 55kD, o del virus de la hepatitis HBV X, o la interacción con securina, proteína responsable de la correcta segregación cromosómica, y que inhiben las funciones de TP53. Pero no todas las proteínas que interactúan con TP53 provocan una inhibición de todas sus funciones; por ejemplo ASPP1 y ASPP2 (del inglés Apoptosis- Stimulating Protein for p53) inducen de forma específica la apoptosis pero no provocan la interrupción del ciclo celular. Las ASPP intensifican la unión de TP53 al DNA lo que favorece la transactivación de genes proapoptóticos *in vivo*. ASPP1 y ASPP2

pueden también inducir apoptosis de una forma independiente de TP53, mediante su unión a p63 y p73 y así estimulan sus funciones de transactivación sobre los promotores de genes como Bax, PIG3 y PUMA, pero no de MDM2 o p21WAF1/CIP1. Por lo tanto, ASPP1 y ASPP2 son los primeros activadores comunes a todos los miembros de la familia de TP53. Se ha observado también la participación de TP53 en la muerte neuronal que ocurre en procesos neurodegenerativos donde juega un papel importante la activación de los receptores de la familia del neurotransmisor glutamato, entre los que destaca la isquemia. Se ha descrito en modelos neurotóxicos como despolarización, radiación gamma y modelos de isquemia que se incrementa la expresión de TP53⁴⁸.

Las alteraciones en la transcripción de genes supresores de tumores pueden ser la respuesta a la pregunta que frecuentemente nos hacemos: "¿por qué algunos cánceres del mismo tipo histológico tienen diferente sensibilidad a la radio y quimioterapia?". Así, por ejemplo dentro de los tumores cerebrales se ha identificado la delección de genes supresores de tumores de determinados cromosomas: en el meningioma (cromosoma 22), neurinomas del acústico (17 y 22), hemangioblastoma (3p) y astrocitoma (cromosoma 10 y 17). Además, se ha observado que las células que carecen de p53 son resistentes a fármacos antitumorales ionizantes o quimioterapéuticos como el fluoracilo, el etoposide y la dopsorubicina, mientras que aquellas que poseen el gen p53 son sensibles a la terapia y desaparecen por apoptosis. Casi la mitad de los cánceres humanos presentan mutaciones en el gen p53 y el 20% de estas mutaciones están concentradas en 5 codones, habiéndose descrito, 18,585 mutaciones somáticas y 225 mutaciones en la línea germinal. En el caso de las mutaciones somáticas el 82% se corresponden con mutaciones puntuales, el 9% a delecciones, el 7% a mutaciones silenciosas y el 2% a otras como

inserciones y repeticiones en tandem. Es interesante resaltar que mientras que las mutaciones de p53 que son resultado de un cambio de sentido, provocan cambios conformacionales en la proteína, lo que aumenta su estabilidad aunque pierde su actividad; otros genes supresores de tumores mutados en algunos tipos de cáncer, como el retinoblastoma y el APC, presentan mutaciones sin sentido, que dan lugar a una proteína truncada. El análisis inmunoquímico de TP53 se ha correlacionado en una gran variedad de cánceres con parámetros clinicopatológicos. En el carcinoma de próstata se ha relacionado la inmunopositividad de TP53 con un mayor índice de Gleason, estado patológico y la presencia de metástasis. En cánceres escamosos de cabeza y cuello la presencia de expresión anormal de TP53 se correlaciona con un aumento en el riesgo de recurrencia, resistencia a radioterapia y riesgo de desarrollar un segundo tumor primario. En un 40-75% de cánceres colorrectales la acumulación nuclear de p53 aberrante es un indicador de un peor pronóstico⁴⁹.

Más del 50% de cánceres de mama invasivos contienen mutaciones en p53 que se asocian con una mayor agresividad y un peor pronóstico. En melanomas, la expresión de p53 mutado se asocia con un aumento en la profundidad de la invasión del tumor primario y en la presencia de metástasis⁵⁰. Las formas mutadas de p53 se clasifican en 1) aquellas que han perdido su actividad antiproliferativa y son muy poco transformantes y 2) las que crean un alelo dominante que inactiva su propia función antiproliferativa, contrarrestando el funcionamiento en *trans*, por su capacidad de oligomerización, del alelo no mutado en la misma célula y son muy transformantes. Esta última es una diferencia significativa con otros genes supresores de tumores mutados en algunos tipos de cáncer ya que al no formar complejos oligoméricos, la mutación de uno de sus alelos no es suficiente para

bloquear su función⁴⁹.

Diversas disciplinas han abordado la posibilidad de que TP53 sea un blanco terapéutico y hoy disponemos de modelos experimentales donde la modulación de la actividad de TP53 presenta muy buenos resultados. El campo donde se han realizado mayores avances es el oncológico. Los proyectos de terapia génica se centran fundamentalmente en reemplazar genes supresores defectuosos o en la introducción de genes suicidas o inductores de apoptosis. La transferencia de genes citotóxicos a células tumorales es también conocida como GDEPT (*Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy*). La GDEPT incluye genes como el p53, toxinas (ricina, toxina diftérica, de pseudomonas, etc.), o proteínas sensibilizadoras como la enzima timidina cinasa o la interlucina-2. Los protocolos y estudios experimentales sobre la sobreexpresión de p53 son una realidad y destacan especialmente aquellos que utilizan vectores retrovirales o adenovirales. La transferencia de p53 con adenovirus (Adp53) demuestra la capacidad selectiva de TP53 de inducir apoptosis en tumores inyectados y en carcinomas avanzados localizados de células grandes de pulmón es capaz de controlar temporalmente el tamaño de los tumores, alcanzando su remisión parcial al ser combinado con *cis*-platino. En tumores de cabeza y cuello Ad-p53 ha producido regresiones ocasionales de más del 50% del tamaño tumoral (2 de 17 pacientes evaluados)⁵¹ y se ha aplicado también con éxito en el tratamiento de cánceres avanzados, como tumor de ovario, glioblastoma recurrente o carcinoma de célula bronquioalveolar, pulmón no microcítico y el tumor de cabeza y cuello, en estos últimos se ha observado un incremento de la respuesta antitumoral frente a los tratamientos convencionales, como la quimioterapia, llegando a valores cercanos al 25% los casos de la enfermedad que deja de progresar, frente a un 8% de remisión que se observa en los enfermos tratados con citostáticos. En varios países se

realizan ensayos clínicos con p53 en diversos procesos tumorales. Por ejemplo, a principios de esta década, eran varios los ensayos abiertos con el p53 en cáncer de cabeza y cuello (fase III); en cáncer colorrectal (fase I); y en numerosos estudios exploratorios en cáncer de pulmón⁵². Otras líneas de investigación farmacológicas aún se encuentran en fases de desarrollo muy incipiente, si bien resultan muy prometedoras, postulan la utilización de péptidos miméticos de las regiones proteicas activas del p53, con el fin de que puedan tener efecto supresor antitumoral. Las nutlinas son proteínas que se adaptan perfectamente al lugar de interacción de MDM2 con p53 y evitan su unión e inhibición y de esta manera bloquean la división celular y desencadenan procesos de apoptosis.

Finalmente, en algunas patologías como los procesos degenerativos (Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica) p53 se encuentra sobreexpresado. La inactivación de la ruta apoptótica conseguiría disminuir la muerte neuronal que ocurre durante el daño cerebral, al disminuir las alteraciones neurológicas que ocurren en la etapa inicial de la lesión cerebral. Existen inhibidores selectivos de p53 como los análogos de los tetrahydrobenzotiazoles (alfa-pifitrina)⁵³ cuya función es suprimir la transactivación mediada por p53.

De acuerdo a lo previamente expuesto, el estudio de TP53 desde el punto de vista teórico es importante por las aportaciones que se pueden generar a la terapia del cáncer y de otras enfermedades degenerativas.

4. EL PÉPTIDO SINTÉTICO PNC-27

Kanovsky *et al.*, 2001⁵⁴ demostraron que tres péptidos sintéticos llamados PNC-27, PNC-21 y PNC-28 (**residuos** 12-26, 12-20 y 17-26 respectivamente) del dominio de unión de TP53 a HDM-2, son citotóxicos en varias líneas celulares cancerosas pero no en líneas celulares normales; también demostraron que la actividad no está comprometida con TP53, por lo que se trata de un mecanismo no ligado a la ruta de apoptosis⁵⁵⁻⁵⁸, sin embargo, a la fecha se desconoce el mecanismo por el cual se lleva a cabo.

El péptido PNC-27 consta, de los aminoácidos PPLSQETFSDLWKLL (12 al 26) de la proteína TP53, éstos están ligados a una secuencia de 17 aminoácidos (KKWKMRRNQFWVKVQRG) de la región de transferencia de la proteína antenapedia de *Drosophila*; la traslocación a través de las membranas biológicas está conferida por las hélices-alfa entrando a las células vivas a través de un mecanismo independiente de receptor y de energía (difusión pasiva). Estudios biofísicos⁵⁹ demostraron que la entrada de la penetratina a las células es a través de su unión a los lípidos de membrana pero tanto la unión como la traslocación se ven afectados diferencialmente por las modificaciones de algunas propiedades fisicoquímicas del péptido así como por la anfipaticidad de la hélice y la carga neta; **esto** sugiere que la composición de la membrana plasmática lipídica afecta la internalización de la penetratina y que ésta requiere tanto de la unión a los lípidos de membrana, como de otras propiedades específicas⁶⁰. De esta manera, los lípidos cargados negativamente promueven el traspaso de la penetratina de un ambiente hidrofílico a un ambiente hidrofóbico, probablemente a través de la transferencia de cargas; en sentido contrario se puede obtener en ausencia de lípidos cargados negativamente, al adicionarle oligonucleótidos de DNA⁶¹. Esta transmisión de cargas

también se observa con un péptido variante de la misma carga e hidrofobicidad en el cual hubo un reemplazo del triptófano 6 por fenilalanina; sin embargo, esta versión mutante no es internalizada por las células vivas. Esto subraya que la neutralización de la carga y la fase de transferencia de carga representan solamente un primer paso en el proceso de internalización y que existen residuos críticos en este proceso, como es el caso del triptófano en la posición 6, de esta manera, se ha propuesto por varios grupos, que la penetratina requiere de al menos dos eventos consecutivos para su entrada⁶²⁻⁶⁴.

De acuerdo a lo previamente mencionado, este trabajo de investigación se enfocara al estudio de la estructura electrónica, debido a que se pueden conocer qué residuos son los responsables de la citotoxicidad específica para células cancerosas y cuáles son sus características estructurales para poder entender el posible mecanismo y los probables sitios reactivos involucrados en la necrosis membranolítica que se ha observado en líneas celulares transformadas⁵⁶.

En este estudio se partió de la estructura tridimensional del péptido, informada con estudios de resonancia magnética nuclear (RMN); ésta indica que puede presentar dos clases de disposiciones en solución acuosa y tres en solución de tipo membrana y éstas últimas pueden formar poros debido a su forma hélice-vuelta-hélice^{57,58}. Esta característica conformacional en el solvente de tipo membrana, puede promover la formación de tales poros de tipo toroidales y conferir la actividad membranolítica⁵⁷; sin embargo hasta ahora, los estudios a este nivel no han podido dilucidar la selectividad por las células cancerosas de los péptidos en estudio.

5. LA QUÍMICA COMPUTACIONAL EN EL DISEÑO DE FÁRMACOS.

La química computacional es una disciplina que se extiende mas allá de los límites cotidianos que separan a la química, la física, la biología y la computación, lo que permite la investigación de átomos, moléculas y macromoléculas mediante un sistema de computadoras, cuando la investigación de laboratorio es inconveniente, impracticable o muy costosa.

La química computacional incluye aspectos como:

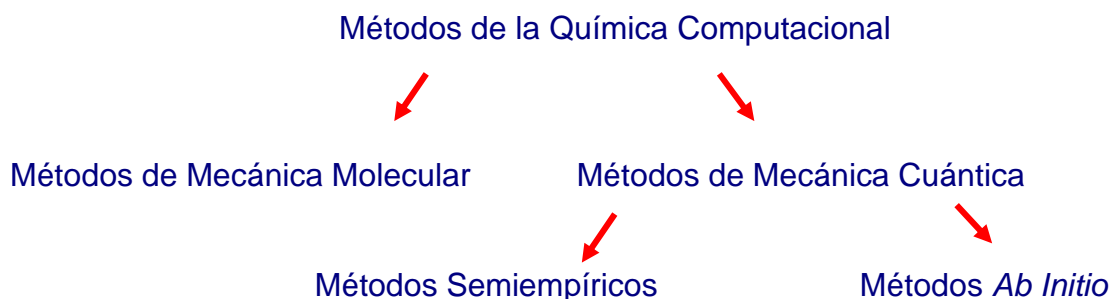
- El modelado molecular.
- Los métodos computacionales.
- El diseño molecular asistido por computadora.
- Las bases de datos químicas.
- El diseño de síntesis orgánica.
- La búsqueda de datos en bases químicas.
- La química cuántica

Aunque hay distintas definiciones de química computacional quizás la más apropiada es: “aquellos aspectos de la química que son explicados o realizados mediante computadoras”⁶⁵.

La química computacional abarca un amplio rango de métodos matemáticos que pueden dividirse en dos grandes categorías:

- Métodos de mecánica molecular: que aplican las leyes de la física clásica al núcleo molecular sin considerar explícitamente a los electrones.
- Métodos de mecánica cuántica: se basan en la ecuación de Schrödinger para describir una molécula con un tratamiento directo de la estructura electrónica.

En el siguiente esquema se resume la forma en que se dividen los métodos químicos computacionales⁶⁶.



Con estos métodos se pueden realizar los siguientes cálculos⁶⁷:

- Optimización Geométrica: consiste en la modificación sistemática de las coordenadas atómicas de un modelo dando como resultado una geometría donde las fuerzas netas en la estructura son iguales a cero. En una disposición 3D de los átomos, representa un mínimo de energía local (se encontrará una geometría molecular estable sin necesidad de cruzar una barrera de energía conformacional).
- Cálculo de la Energía: es la energía de una geometría de mínima energía.
- Cálculo de propiedades: es la predicción de determinadas propiedades físicas y químicas, tales como la carga, momento dipolar, calor de formación, etc.

No existe un solo método que incluya a todos los tipos de cálculos para conocer la reactividad de una molécula, de tal manera que para cada aplicación, existe un método que posee ventajas y desventajas que se deben conocer, dependiendo de una serie de factores como son:

- La naturaleza de la molécula.
- El tipo de información que se quiera obtener.
- La disponibilidad para poder aplicar parámetros experimentales determinados, ya que algunos de los métodos así lo requieren.
- Los recursos en equipos de cómputo de alto rendimiento.

Los tres criterios más importantes para la elección de un método computacional son⁶⁷:

- Tipo de modelo: el tamaño de un modelo puede llegar a ser un factor limitante para un método en particular, de manera que el número límite de átomos en una molécula se incrementa aproximadamente en un orden de magnitud entre métodos distintos desde el *ab initio* a los de mecánica molecular.
- Disponibilidad de parámetros: algunos de los métodos que se han indicado necesitan para sus cálculos de una serie de parámetros experimentales que se les proporcionan previamente. Si la molécula contiene átomos de los que no hubiera sido posible obtener los parámetros, el modelo obtendrá unas predicciones inválidas. Se tiene en cuenta que cualquier campo de fuerza particular solo se aplica a la clase limitada de moléculas para las cuales esta parametrizado.
- Recursos computacionales: las necesidades de computación aumentan con relación al tamaño del sistema según el método y los conjuntos base elegidos, en los *-Ab initio*, el tiempo requerido para realizar los cálculos se incrementa en el orden N^4 , donde N es el número de átomos del modelo.

-Semiempírico: el tiempo de computación se eleva según la relación N^3 o N^2 .

-Mecánico Moleculares (MM): el tiempo de cálculo aumenta del orden de N^2 .

Los cálculos de energía se utilizan para calcular las propiedades de la geometría actual de un modelo. Los valores de estas propiedades dependerán de donde este situado el modelo en la superficie de potencial de acuerdo a las siguientes consideraciones⁶⁸:

- El cálculo de energía en un mínimo global nos dará información sobre el modelo con la conformación más estable.

Cuando el cálculo se realiza en un mínimo local la información que nos dará, corresponderá a una de las muchas conformaciones estables.

- Si el cálculo se realiza en un punto distinto de los dos anteriores entonces la superficie de energía potencial nos dará información sobre esa geometría particular pero no sobre una conformación estable o un estado de transición representado por un punto de silla.

Una visión general de las características de cada método y sus aplicaciones se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Principales métodos químicos computacionales y sus aplicaciones.

Tipo	Características	Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Mecánica Molecular (MM2)	<ul style="list-style-type: none"> • Usa la física clásica • Depende de campos de fuerza con parámetros obtenidos empíricamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es rápido. • Utiliza pocos recursos computacionales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Campo de fuerzas sólo aplicable a un limitado número de moléculas. • No calcula propiedades electrónicas. • Requiere de datos experimentales o del método <i>ab initio</i> para pasarlos como parámetros 	<ul style="list-style-type: none"> • Grandes sistemas como enzimas (miles de átomos). • Sistemas en los que no hay rotura ni creación de enlaces.
Semiempírico (MOPAC)	<ul style="list-style-type: none"> • Usa la física cuántica. • Utiliza parámetros empíricos derivados experimentalmente. • Usa aproximaciones extensivas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere menos recurso de ordenador que el método <i>ab initio</i>. • Es capaz de calcular estados de transición y estado excitados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere de datos experimentales o del método <i>ab initio</i> para pasarlos como parámetros. • Menos riguroso que el método <i>ab initio</i> en el procedimiento de cálculo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas de tamaño medio (cientos de átomos). • Sistemas en los que se producen transiciones electrónicas.
<i>Ab initio</i> (Gaussian)	<ul style="list-style-type: none"> • Usa la física cuántica • Riguroso matemáticamente y no utiliza parámetros experimentales; se basa en constantes físicas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Útil para un amplio campo de sistemas. • No utiliza datos experimentales. • Capaz de calcular estados de transición y estados excitados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Necesita de muchos recursos computacionales. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeños sistemas (decenas de átomos). • Sistemas en los que existen transiciones electrónicas. • Moléculas o sistemas sin datos experimentales (Química de Nuevos compuestos). • Sistemas que requieran de una precisión rigurosa.

Las reacciones químicas implican compartir o intercambiar electrones. Los electrones se mueven alrededor del núcleo en orbitales atómicos, a los cuales corresponden distintos niveles de energía. La absorción de energía puede hacer que un electrón cambie a un nivel energético superior. Los electrones pueden transferirse de unas moléculas a otras, llevando consigo energía. Con frecuencia dicha transferencia ocurre a través de la cesión de átomos de H.

El compartir electrones da lugar a la formación de enlaces covalentes. Los enlaces contienen energía y requieren esa misma energía para romperse. La energía de enlace es la energía necesaria para romper un enlace. A continuación, en Tabla IV se presenta el patrón de interacciones intermoleculares que no involucran carga, ya que estas son importantes desde un punto de vista biológico⁷⁰.

Tabla IV. Fuerzas intermoleculares que no involucran carga.

TIPO DE INTERACCIÓN	FACTORES RESPONSABLES DE LA INTERACCIÓN	EJEMPLO
Dipolo-dipolo	Momento bipolar (depende de la electronegatividad de los átomos y de la estructura molecular)	H ₂ O, HCl
Enlace de Hidrógeno (X-H ...Y:)	Enlace muy polar X-H (donde X=F, N,O) y el átomo y tiene un par solitario de e ⁻	H ₂ O...H ₂ O
Dipolo/dipolo inducido	Momento dipolar de moléculas polares y polarizabilidad de moléculas no polares	H ₂ O...I ₂
Dipolo inducido/dipolo inducido	polarizabilidad	I ₂ ...I ₂

JUSTIFICACIÓN

Los péptidos son buenos candidatos antineoplásicos, sin embargo, tienen que evadir al sistema inmunológico y evitar la degradación en el citoplasma. Además, la mayoría de estos péptidos van encaminados a inducir la apoptosis en las células neoplásicas, una desventaja de este tipo de péptidos es que podrían activar alguna otra ruta en su trayecto hacia el núcleo o lo que es peor en el mismo núcleo celular. Por lo que se consideró que son preferibles los péptidos que inducen necrosis, como el péptido sintético PNC-27 que provoca membranolisis selectiva en células neoplásicas. Los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) indican que PNC-27 presenta estructuras de tipo alfa hélice en un ambiente que simula a la membrana y tanto los estudios *in vitro* como *in vivo* confirman su actividad⁵⁴⁻⁵⁸.

En este trabajo de tesis se planteó que la caracterización de la estructura electrónica de los aminoácidos 12 al 26 provenientes de TP53, lo que podría permitir obtener un conocimiento detallado de la estructura electrónica y de la reactividad química de los mismos de tal manera que los valores teóricos de la estructura electrónica se corresponderían con los experimentales realizados en PNC-27.

Debido a la importancia de la proteína TP53 en el cáncer, es el blanco obligado en la terapéutica de esta enfermedad, y como se ha descrito, es muy ventajoso el empleo de la química computacional para el desarrollo de péptidos con una actividad específica. Por lo que en esta tesis se plantea que a partir del conocimiento generado por los estudios genéticos y genómicos, se puede recurrir a la química cuántica computacional para caracterizar la estructura electrónica de puntos muy específicos con la finalidad de conocer su reactividad química, las propiedades fisicoquímicas y sus parámetros geométricos, para posteriormente desarrollar nuevos péptidos con fines terapéuticos.

En la figura 16 se presenta un esquema general de la interacción de las diferentes disciplinas químico-biológicas con la finalidad de generar nuevas moléculas con fines curativos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar mediante métodos *ab initio* y de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT), la estructura electrónica, las propiedades fisicoquímicas y los parámetros geométricos de los aminoácidos 12 al 26 del dominio de unión de TP53 a HDM-2.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener la estructura geométrica optimizada de mínima energía, empleando el método *ab initio* a nivel Hartree-Fock, con el conjunto base 6-31G(d) del sistema peptídico en estudio constituido por 15 aminoácidos (12 al 26 de TP53) dividido en tres fragmentos: PPLSQ, ETFS y DLWKLL y PPLSQETFSDLWKLL.
2. Comparar los parámetros geométricos (ángulos, enlaces) con las estructuras obtenidas mediante resonancia magnética nuclear por Rosal y Colaboradores⁵⁵.
3. Realizar cálculos puntuales para determinar diversos descriptores químico-cuánticos empleando el método de la Teoría de Funcionales de la Densidad con la base 6-311G (d), para obtener los descriptores de la densidad electrónica que representan mejor al sistema de aminoácidos en estudio.
4. Describir la estructura electrónica de los aminoácidos en estudio mediante el análisis de cada uno de los fragmentos y de los aminoácidos juntos.
5. Correlacionar los datos experimentales ya conocidos del péptido con los descriptores teóricos obtenidos en este trabajo, con la finalidad de validar el uso de las metodologías químico-cuánticas en sistemas biológicos de tipo peptídico.
6. Generar una serie de nuevas moléculas peptídicas (prototipo) que mantengan la actividad biológica del péptido original, con base en los resultados teóricos obtenidos de la estructura electrónica, sus propiedades fisicoquímicas y sus parámetros geométricos.

HIPÓTESIS

La geometría y la estructura electrónica de los aminoácidos 12 al 26 del dominio de unión de TP53 a HDM2 calculados con métodos teóricos químico cuánticos a nivel *ab initio* y DFT, son semejantes a los informados mediante métodos experimentales; por lo que resultan interesantes las metodologías teóricas como un abordaje útil para generar nuevas moléculas peptídicas con propiedades biológicas definidas.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

El desarrollo de los métodos teóricos y el avance tecnológico de las computadoras ha permitido en los últimos años un tratamiento químico cuántico eficaz y confiable para el estudio de sistemas multielectrónicos. Algunos de estos sistemas son de gran interés en campos tecnológicos y farmacológicos⁸⁰. En las últimas décadas, la química teórica ha ayudado a la elucidación de fenómenos experimentales, los cuales durante mucho tiempo carecieron de alguna explicación, debido a que en muchas de las ocasiones la realización del experimento no era factible; tal era el caso de estructuras de transición, la detección de radicales con vidas medias muy cortas o bien en aquellos casos en donde el experimento requería de condiciones muy extremas, ya sean de presión, volumen o temperatura por mencionar algunas de ellas.

El estudio de aminoácidos con características resulta de gran relevancia, de tal manera que esta tesis consistió en el análisis de la estructura electrónica y de las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos 12 al 26 del dominio de unión de TP53 a HDM2; como ya se expuso en la introducción, esta región es importante debido a que p53 es el gen más mutado en los cánceres humanos y HDM2 es su regulador negativo y se encuentra sobre-expresado en las células neoplásicas, por lo que es una región crucial en la carcinogénesis.

Debido al interés terapéutico, es importante conocer los sitios de mayor reactividad química, y generar bases de datos de reactividad química con métodos químico-cuántico computacionales, para que sirvan de referencia para otras posibles secuencias de aminoácidos con actividad antineoplásica y sea posible hacer predicciones dirigidas, lo que ahorraría tiempo y dinero en el desarrollo de péptidos terapéuticos. Además, este estudio mostró descriptores químico

cuánticos que modelan bien el sistema polipeptídico de interés. Es importante mencionar que en esta parte del análisis se ha considerado incluir conjuntos de base con funciones polarizadas y el efecto de la correlación mediante el uso de la teoría de funcionales de la densidad, con el funcional híbrido B3LYP^{72,73}

Los cálculos de la estructura electrónica se realizaron en una supercomputadora Dual Intel 64-bit Xeon, así como en la supercomputadora Kanbalam utilizando el paquete computacional Gaussian, versiones 98 y 03⁷⁴.

I. CONSTRUCCIÓN DE LAS MOLÉCULAS.

Partiendo de que una molécula es una entidad formada por un conjunto de átomos ligados por enlaces covalentes (en el caso del enlace iónico no se consideran moléculas, sino redes cristalinas) las moléculas biológicas, tales como las proteínas, el DNA y los péptidos son macromoléculas que están compuestas por cientos o miles de átomos.

Para la construcción de la secuencia de 15 aminoácidos que se analizaron (PPLSQETFSDLWKLL), se empleó el programa Spartan 06⁶⁶ tomando en consideración la orientación de la molécula neutra original.

Al iniciar el estudio y debido a que esta molécula contiene 240 átomos y a que no se contaba con mucho tiempo de cómputo ni equipo, se hicieron tres fragmentos, con base en los datos experimentales de la geometría, cuidando de que se conservara una alfa hélice hacia el extremo carboxilo terminal y en mantener los aminoácidos que evolutivamente estaban conservados en bloques como es el caso de ETFS; cada uno de ellos se construyó con el mismo paquete computacional, quedando de la siguiente manera: un pentapéptido (PPLSQ), un tetrapéptido (ETFS) y un hexapéptido (DLWKLL).

Posteriormente con equipo propio de alto rendimiento y con la facilitación de horas de tiempo-máquina en la supercomputadora Kanbalam, fue posible realizar los cálculos para la secuencia con los 15 aa (pep0R), así como para los nuevos cuatro péptidos generados (pep1A, pep2A, pep5A y pep10A) los cuales tienen 240, 94, 117, 179 y 139 átomos respectivamente.

II. OPTIMIZACIÓN DE LA GEOMETRÍA DE LAS MOLÉCULAS.

Para cada una de las moléculas se realizó la optimización de la geometría de mínima energía con el método Hartree-Fock y con el conjunto base 6-31G(d) empleando los paquetes computacionales Gaussian 98 y 03⁷⁴.

La geometría final se logró realizando los cálculos paso a paso a partir de una optimización previa con el método semiempírico AM1 y posteriormente con el conjunto base STO-3G con cuya orientación estándar final se construyó la matriz para subirla a la base 3-21G(d) y después a la base 6-31G(d).

A continuación se describirán brevemente los principales términos tales como conjunto base, métodos *ab initio* y de la Teoría de Funcionales de la Densidad.

Un conjunto base es una descripción matemática de los orbitales en un sistema molecular. Los conjuntos de bases más grandes constituyen una aproximación más exacta de los orbitales moleculares por imponer pocas restricciones sobre la localización de los electrones en el espacio. Los conjunto base estándar para cálculos de estructura electrónica son combinaciones lineales de funciones gaussianas para formar cada orbital, de allí el nombre del paquete computacional *Gaussian*.

El paquete computacional *Gaussian* ofrece un amplio espectro predefinido de conjuntos base, los cuales pueden clasificarse por el número y tipo de funciones base que contienen. Los conjuntos base asignan un grupo de funciones base a cada átomo en una molécula para aproximar sus orbitales, estas funciones base son una combinación lineal de funciones gaussianas, a cuyas funciones

bases se les refiere como funciones contraídas y las funciones gaussianas componentes son referidas como primitivas. Un conjunto base que consiste en una simple función gaussiana es llamada no contraída⁶⁷; en el apéndice se amplía la información y en la tabla IV a continuación se resume a los conjuntos base utilizados en esta tesis:

Tabla IV. Descripción breve de los conjuntos base empleados en esta tesis. Tomada y modificada de Foresman y Frisch, 1996.

Conjunto Base / Funcional*	Descripción
STO-3G	Base mínima que se maneja principalmente para obtener resultados cualitativos
3-21G(d) o 3-21G(d)	Presenta dos conjuntos de funciones en la región de valencia por lo que da una representación más exacta de los orbitales
6-31G(d) o 6-31G(d)	Añade funciones de polarización a los átomos pesados.
*B3LYP/6-311G(d)	Funcional híbrido de intercambio de Becke ⁷² y el de correlación de Lee, Yang y Parr ⁷³

III. DESCRIPTORES DE REACTIVIDAD QUÍMICA.

Más allá del interés *per se* que presenta el conocimiento de nuevas propiedades moleculares, el caso particular del estudio de la estructura electrónica, representa un aspecto de relevancia primaria a fin de lograr una comprensión integral del resto de las propiedades antes mencionadas. En el presente trabajo de tesis de doctorado se presentan los primeros resultados sistemáticos tendientes al conocimiento de la estructura electrónica de un péptido con actividad membranolítica específica contra células neoplásicas.

Los descriptores se calcularon a partir de los valores de los orbitales moleculares frontera (HOMO, LUMO), aplicando el Teorema de Koopmans⁹⁹ y a las aproximaciones finitas para moléculas de capa cerrada; con ello se determinaron la dureza (η) y el potencial de ionización (I) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\eta = 1/2(PI-AE) = 1/2(E_{LUMO} - E_{HOMO}) \quad (1)$$

$$\mu = - 1/2(PI+AE) = 1/2(E_{HOMO} + E_{LUMO}) \quad (2)$$

$$PI = - E_{HOMO} \text{ Y } AE = - E_{LUMO} \quad (3)$$

Donde PI es el potencial de ionización, AE es la afinidad electrónica de las moléculas y μ es el potencial químico. La afinidad electrónica se refiere a la capacidad de un ligando para aceptar a un electrón desde un átomo o molécula donadora.

Además, el índice de electrofilicidad (ω) se calculó de acuerdo a Parr y colaboradores⁸², quienes lo consideran como una medida de la minimización de

energía debido a un flujo máximo de electrones entre el donador y el aceptor y se calcula de la siguiente manera:

$$\omega = \mu^2 / 2\eta \quad (4)$$

Esta ecuación indica que cuando dos moléculas reaccionan, actuarán como nucleófilo o electrófilo de acuerdo a si su ω es más alto o más bajo. La electrofilicidad es un descriptor de reactividad que permite una clasificación cuantitativa de la naturaleza electrofílica global de una molécula en una escala relativa⁷⁴.

El coeficiente de reparto (P) es una propiedad fisicoquímica que se emplea como indicador de la solubilidad de un compuesto orgánico en lípidos. Este en forma de LogP es uno de los parámetros considerados en las reglas de Lipinski para la determinación de las propiedades de un fármaco que cabe esperar para una molécula. Dado el carácter predictivo de estas reglas, resulta esencial disponer de métodos empíricos confiables para el cálculo del coeficiente de reparto a partir de la estructura de un compuesto determinado. Se empleó el programa libre ACD/LogP version 10.0 para calcular el logP de cada una de las moléculas analizadas el cual toma el algoritmo $P = (\text{mezcla de disolvente } n\text{-octanol}) / (\text{molécula en agua})$ ^{75,76}.

En los nuevos péptidos generados, se evaluaron también los descriptores de función química (CFDs por sus siglas en inglés) que forman parte del paquete computacional Spartan 06 y Trident (Wavefunction). Estos descriptores son indicadores de funcionalidad química y se generan automáticamente con base en la estructura de las moléculas analizadas^{77,78}.

Capítulo 3

Resultados y Discusión

La secuencia de aminoácidos en estudio es: PPLSQETFSDLWKLL que corresponden a los aminoácidos 12 al 26 del extremo amino-terminal de la proteína TP53; esta secuencia, unida al acarreador llamado penetratina o Antp: KKWKMRNRNQFWVKVQRG conforman al péptido membranolítico específico a células neoplásicas, llamado PNC27⁵⁵ (Protein Data Bank IQ2F)(Figuras 18A y 13B).

Como se mencionó en el capítulo de materiales y métodos, debido al tamaño de la molécula se obtuvieron tres fragmentos. Sobre cada uno de estos fragmentos y posteriormente ya en los 15 aminoácidos juntos y en los cuatro péptidos generados, se realizaron los cálculos teóricos para conocer la geometría, la estructura electrónica y algunas características fisicoquímicas.

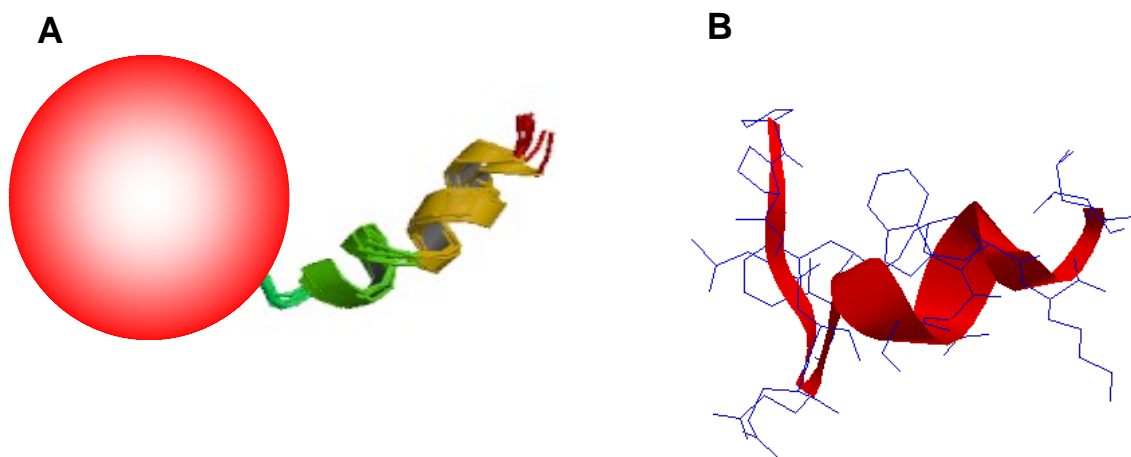


Figura 18. Estructura del péptido PNC27 obtenida por RMN en solución, tomado de Protein Data Bank número de acceso 1q2f⁷⁹. El círculo rojo señala la región que comprende a los aminoácidos 12 al 26 de TP53. B). La estructura optimizada de los aminoácidos señalados obtenida en esta tesis.

I. OPTIMIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA GEOMÉTRICA

En las moléculas, la presencia de varios núcleos hace muy pesados los cálculos mecanocuánticos y su función de onda electrónica depende de varios parámetros: las distancias de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos diedros de rotación entorno a enlaces simples, cabe destacar que estos ángulos definen la conformación molecular. Un análisis teórico de una molécula peptídica incluye el cálculo de la función de onda electrónica para cada uno de estos parámetros.

De entre las cuatro aproximaciones más importantes para calcular las propiedades moleculares, en esta tesis se emplearon dos: el método *ab initio* a nivel Hartree-Fock y de la Teoría de Funcionales de la Densidad.

Con la finalidad de corroborar si al fragmentar la secuencia de aminoácidos sin perder la geometría se mantenía la tendencia observada en los descriptores químico-cuánticos, se realizaron los análisis sobre la molécula completa.

Con base en las consideraciones geométricas, se obtuvieron en cada uno de los fragmentos las geometrías que se observan en las figuras 19, 20 y 21. En la Figura 22 se muestran los 15 aminoácidos analizados (12 al 26 de TP53) y en la Tabla V a continuación, se incluyen los valores de las energías de cada uno de ellos.

Tabla V. Estructura geométrica de mínima energía de los aminoácidos en estudio, obtenidos con el método Hartree-Fock y la base 6-31G(d).

Aminoácidos	Energía (u.a)	Figura
PPLSQ	-1869.4800	19
ETFS	-1714.8136	20
DLWKLL	-2639.2816	21
PPLSQETFSDLWKLL	-5672.9287	22

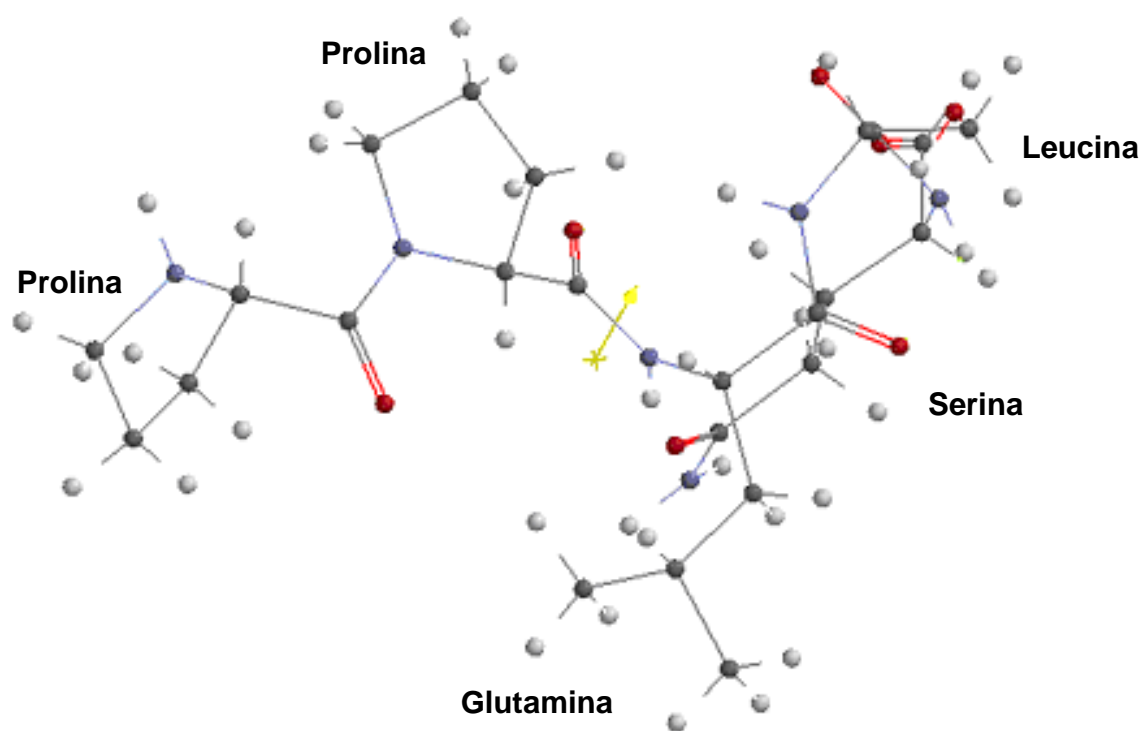


Figura 19. Estructura geométrica de mínima energía del fragmento PPLSQ, obtenida con HF/6-31G(d).

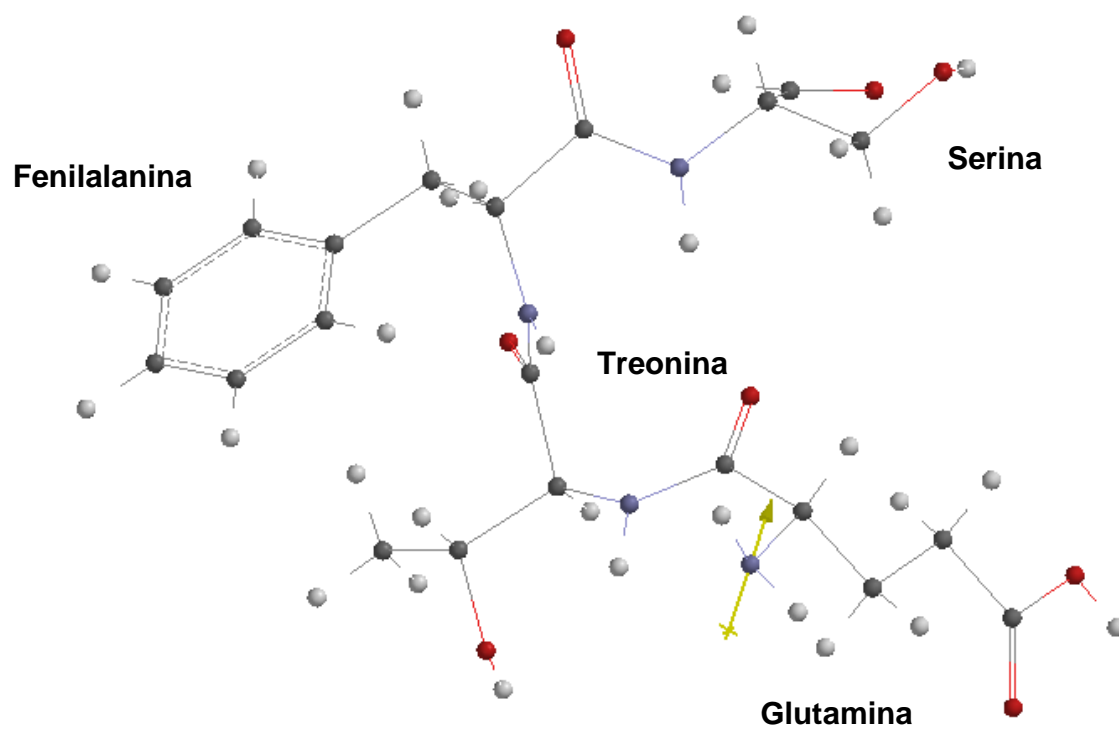


Figura 20. Estructura geométrica de mínima energía del fragmento ETFS, obtenida con HF/6-31G(d)

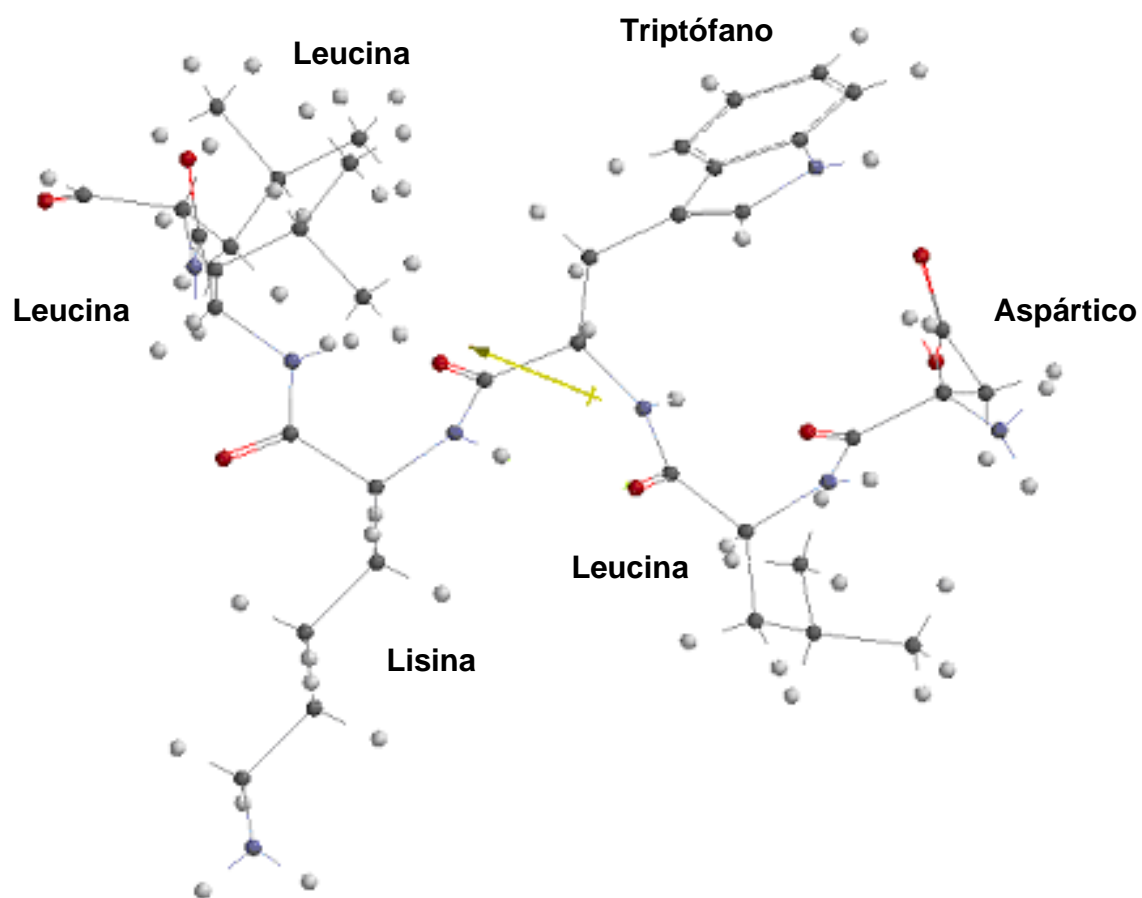


Figura 21. Estructura geométrica de mínima energía del fragmento DLWKLL obtenida con HF/6-31G(d).

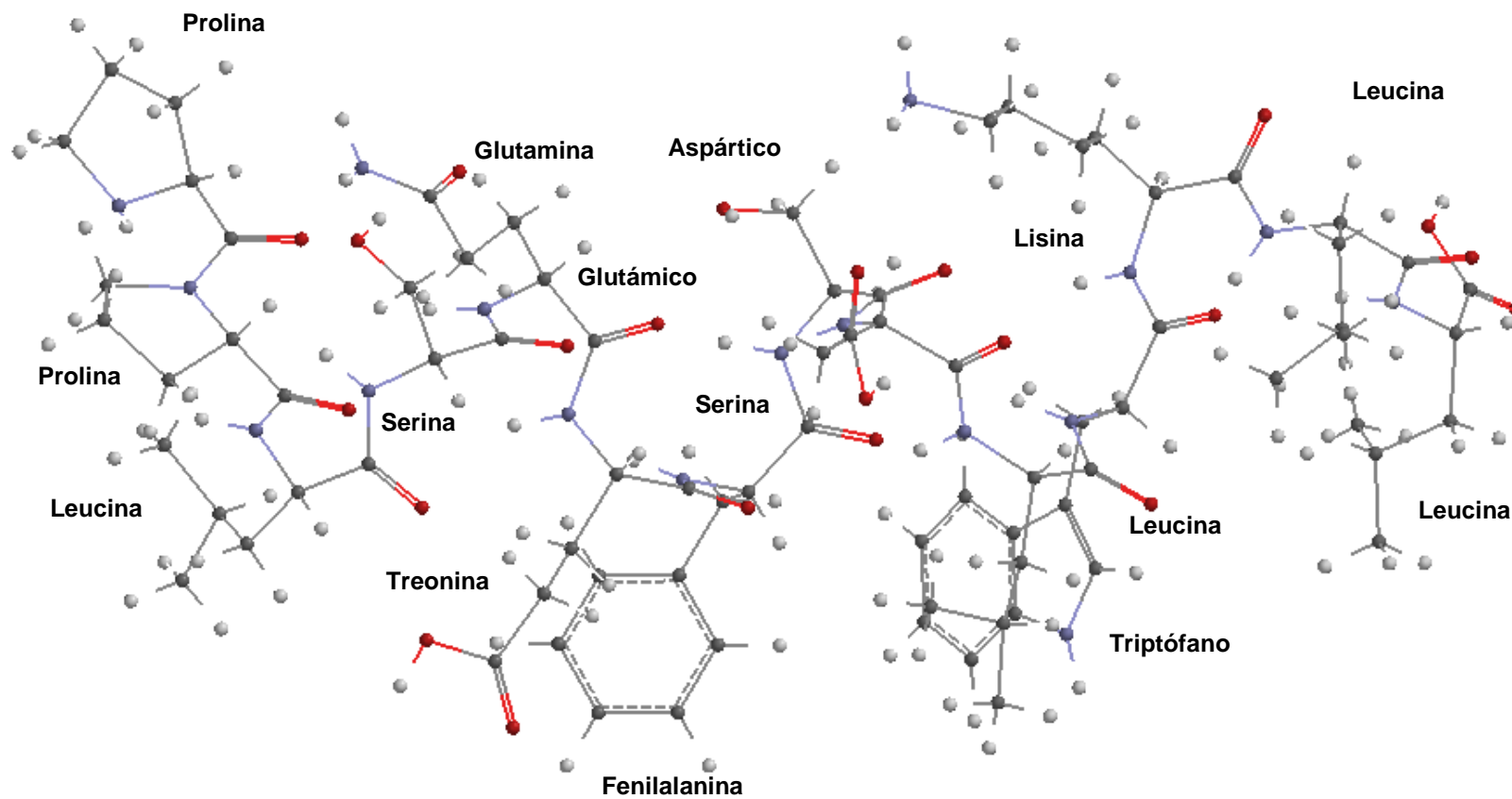


Figura 22. Estructura de mínima energía que incluye los 15 aminoácidos analizados: PLSQETFSDLWKLL obtenida con HF/6-31G(d).

La química y bioquímica modernas se basan en la teoría de que la materia está compuesta de átomos de diferentes elementos, y como se ha venido diciendo en esta tesis, la química computacional ha permitido el desarrollo de diversas disciplinas, de entre las que destaca la farmacéutica y la de materiales las que han desarrollado dispositivos útiles en el diagnóstico y tratamiento con elementos a nanoescala.

El modelo del átomo describe las posiciones de los electrones en un átomo en términos de probabilidades. Un electrón se puede encontrar potencialmente a cualquier distancia del núcleo, pero —dependiendo de su nivel de energía— tiende a estar con más frecuencia en ciertas regiones alrededor del núcleo que en otras; estas zonas son conocidas como orbitales atómicos⁸³.

Las cargas que derivan del potencial electrostático asignan cargas puntuales al potencial electrostático calculado en un número de puntos sobre o cerca de la superficie de van der Waals. En esta tesis se empleó uno de los tres esquemas más utilizados para seleccionar los puntos, el esquema de CHelpG. En la sección de anexos se enlistan las cargas del potencial electrostático para cada uno de los sistemas moleculares neutros en estudio (PPLSQ, ETFS y DLWKLL). Al observar el efecto de las cargas sobre los aminoácidos PPLSQETFSDLWKLL, se encontró que Q16 y S20 poseen las cargas más negativas. Los aminoácidos más negativos están más expuestos a ataques electrofílicos tanto en los fragmentos como en la secuencia completa. Como se observa en la Tabla VI, el aminoácido T18 presenta la carga con el valor más positivo, por lo que este residuo es más susceptible a ataques nucleofílicos y por consecuencia tiene

propiedades atractoras.

Se analizó el efecto de la carga atómica de cada uno de los aminoácidos para analizar la naturaleza nucleofílica o electrofílica de todos los sitios (Tabla VI) y se observó que los átomos de nitrógeno de los aminoácidos Q16 (N₇₆ y N₅₉), K24 (N₈₀), E17 (N₁), D21 (N₁), S20 (N₄₂) y W23 (N₂₃) respectivamente, tienen las cargas más negativas sobre los átomos de nitrógeno de los grupos amida; ello sugiere que los átomos de nitrógeno más negativos están más expuestos a ataques electrofílicos que el resto de los átomos de nitrógeno de los aminoácidos en estudio.

Por otra parte, en los grupos carbonilo se observó que los siguientes átomos de oxígeno presentan las cargas más negativas sobre los extremos carboxilo terminal: S20 (O₅₇), T18 (O₂₄), S15(O₅₆), D21 (O₁₅ y O₁₆) y Q16 (O₇₅). Por lo que en comparación con el resto de los átomos, en estos sitios también podrían ocurrir ataques electrofílicos.

Respecto a los átomos cargados más positivamente, se observó que son los siguientes carbonos : Q16 (C), D21 (C), E17 (C), P13 (C), L26 (C), S15 (C), S20 (C), L14 (C), T18 (C) y L25 (C) ; ello indica que en estos sitios se pueden llevar a cabo ataques nucleofílicos (Tabla VI).

Estos resultados son consistentes con los datos experimentales informados por Kanovsky y Rosal^{54,55} y fortalecen la propuesta de que el segmento 17 al 20 de TP53, esto es ETFS, es importante ya que además, se encuentra conservado en la escala evolutiva; ello cobra relevancia debido a que existen regiones peptídicas que juegan un papel elemental en las redes proteicas y estos aminoácidos podrían constituir una de dichas regiones⁸¹ (Fig. 23).

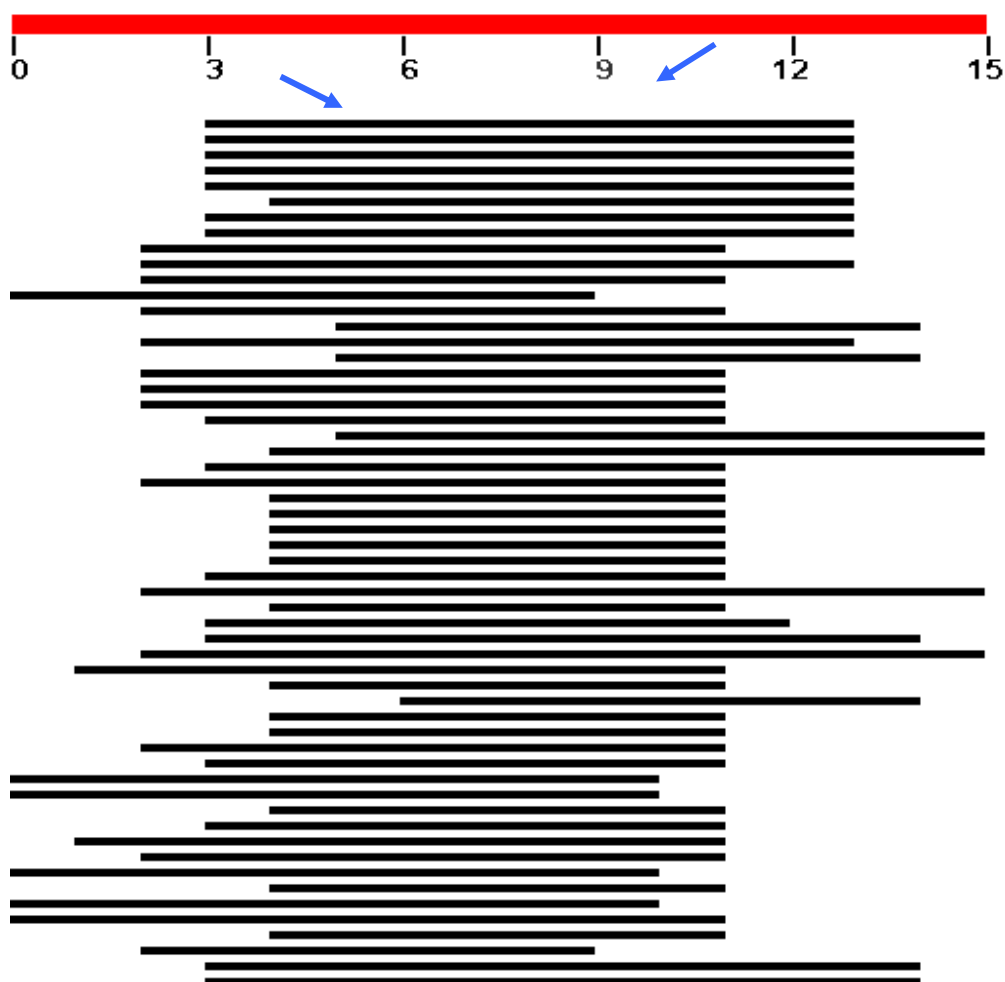


Figura 23. Homología de la secuencia de aminoácidos 12 al 26 de TP53 con diferentes especies animales ; tomada a partir del análisis de 6,028,191 secuencias depositadas en el NCB1 Data Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Las flechas azules señalan a los aminoácidos más conservados.

Los descriptores de reactividad global que fueron evaluados son: el potencial de ionización (PI), la dureza (η), el índice de electrofilicidad (ω); además se incluyó al descriptor de densidad espacial (R^2) (Tabla VII). A este respecto se observa que el segmento 17 al 20 que corresponde al fragmento ETFS (glutámico, treonina, fenilalanina y serina) contienen los valores más altos de potencial de ionización, el cual se relaciona con una mayor estabilidad química global; los valores más altos indican menores efectos oxidativos, es decir el fragmento es químicamente más estable. En concordancia con esto, al evaluar la dureza, se obtuvo que los segmentos PPLSQ y DLWKLL presentan valores más bajos de este descriptor global, lo que indica que estos aminoácidos son más blandos y por consecuencia, más reactivos que ETFS. Los datos de los valores del índice de electrofilicidad indican que el fragmento ETFS tiene mayor capacidad electrofílica global que los otros dos segmentos. Todo ello concuerda con lo anteriormente discutido al respecto, incluyendo a las cargas atómicas. Los valores de R^2 que indican la medida de extensión espacial, es mayor en el fragmento DLWKLL que en los otros dos fragmentos.

Tabla VII. Principales descriptores químico-cuánticos analizados en esta tesis. PI= potencial de ionización ; η =dureza; w =índice de electrofilicidad.

Fragmento	I^a (eV)	η^a (e.V)	w^a (e.V)	R^2 (u.a)	Energía (u.a)
PPLSQ	5.85	2.89	1.51	21 432	1869.48
ETFS	6.59	3.06	2.03	18 105	1714.81
DLWKLL	5.72	2.62	1.84	48 785	2639.28

^acalculados de acuerdo al Teorema de Koopmans. e.V=electronvolt; u.a= unidades atómicas

El análisis del momento dipolar (μ) se evaluó para conocer la carga electrónica del momento dipolar total y de sus componentes x , y , z en cada aminoácido. En la Tabla VIII se observa que los valores más pequeños los poseen los segmentos PPLSQ y ETFS. Cabe destacar que los componentes del momento dipolar de DLWKLL tiene el valor más negativo sobre el eje x lo que indica que la carga negativa se orienta hacia los aminoácidos L22 y W23; ello guarda relación con lo discutido previamente respecto a los valores de las cargas atómicas. Otra observación interesante es el hecho de que en el segmento ETFS el valor más positivo se orienta sobre el eje de las x del aminoácido E17; este valor se puede asociar con sitios de interacción intermolecular o con la membrana celular (como sitios reactivos en el marco de la reactividad química) ello concuerda con los valores obtenidos para el índice de electrofilicidad y las cargas atómicas, así como lo informado de los datos experimentales.

Tabla VIII. Valores del momento dipolar (Debye) y de sus componentes. Con un nivel de cálculo B3LYP/6-311G(d)// HF/6-31G(d).

Fragmento	$\mu(x)$	$\mu(y)$	$\mu(z)$	$\mu(\text{total})$
PPLSQ	-2.07	-4.50	5.02	7.05
ETFS	0.21	-5.51	0.51	5.54
DLWKLL	-13.86	3.46	-1.28	14.34

Debido al tamaño de las moléculas, el cálculo de los órdenes de enlace se tomó como un método indirecto para analizar la acidez relativa de los grupos amida, (en donde la acidez es inversamente proporcional a los valores de los órdenes de enlace) indicó que sobre los residuos PPLSQ se observaron dos órdenes de enlace interesantes: N₃₀-H₃₂ (0.676) y N₅₉-H₆₂ (0.678). El segmento ETFS presentó solo uno: N₄₂-H₄₆ (0.699); mientras que en DLWKLL se observaron tres órdenes de enlace: N₄₂-H₄₈ (0.693), N₈₃-H₉₄ (0.702) y N₄₉-H₆₁ (0.711). Estos resultados indican que el segmento PPLSQ posee los valores más bajos de orden de enlace por lo cual estos sitios ácidos son importantes para interacciones de tipo van der Waals. Los cálculos de energía de desprotonación son métodos alternativos para analizar la acidez de los grupos amida al analizar la fuerza de enlace de los átomos de hidrógeno (H), sin embargo debido al tamaño de las moléculas, no fue posible calcularla. Los datos obtenidos en este sentido, refuerzan la propuesta de Soriano-Correa^{84,85} de que existe una relación entre la naturaleza ácida de los átomos de hidrógeno con la actividad biológica de una molécula.

Respecto a las interacciones intramoleculares se observó que en el fragmento PPLSQ se forman dos puentes de hidrógeno uno en NH₃₂...O₇₅C con una distancia de 2.31 Å y el otro en NH₆₂...O₃₆C con una distancia de 2.09 Å. En el fragmento ETFS sólo se forma un puente de hidrógeno en NH₄₆...O₈C cuya distancia es de 2.16 Å. Respecto al fragmento DLWKLL se observaron tres puentes de hidrógeno; uno entre NH₄₈...O₂₁C, otro NH₉₄...O₄₀C y el tercero entre NH₆₁...O₁₅C con distancias de 2.10 Å, 2.35 Å y 2.36 Å respectivamente (Figuras

24-28). Cabe destacar que estos resultados están en concordancia con los valores de los órdenes de enlace.

El análisis de estas interacciones intramoleculares indica que estas distancias son más cortas que las de van der Waals. Estos resultados indican que la presencia de puentes de hidrógeno contribuye a la estabilidad de la hélice alfa conforma el fragmento DLWKLL.

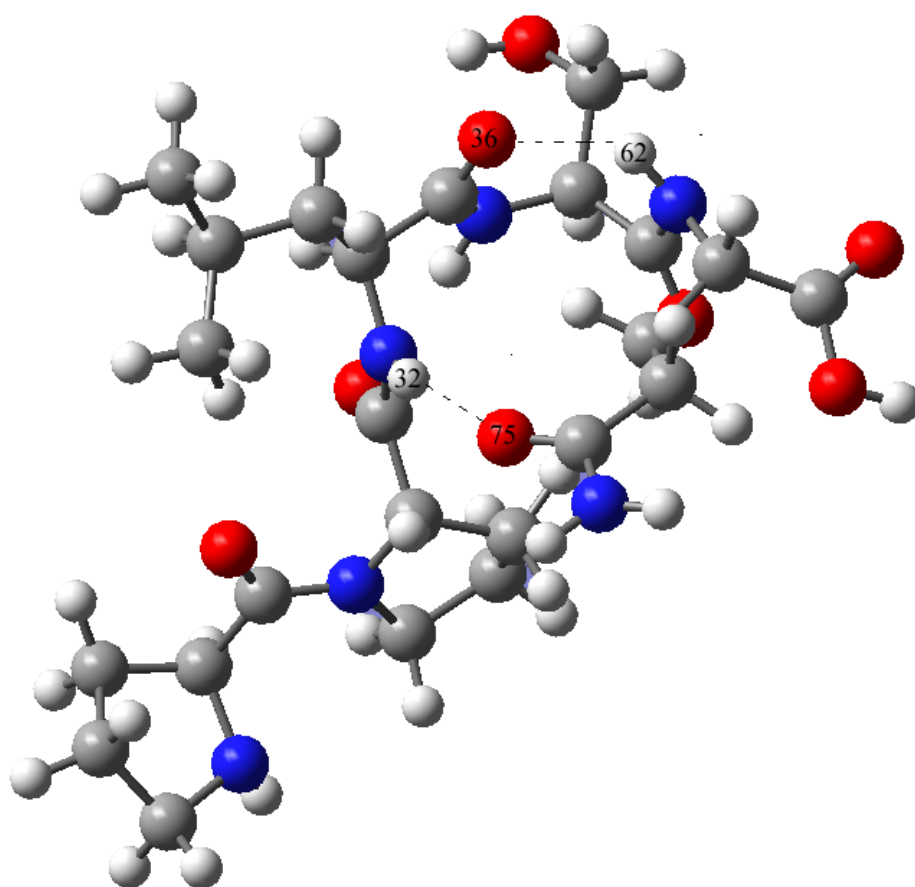


Figura 24. Localización de dos puentes de hidrógeno en el fragmento PPLSQ.

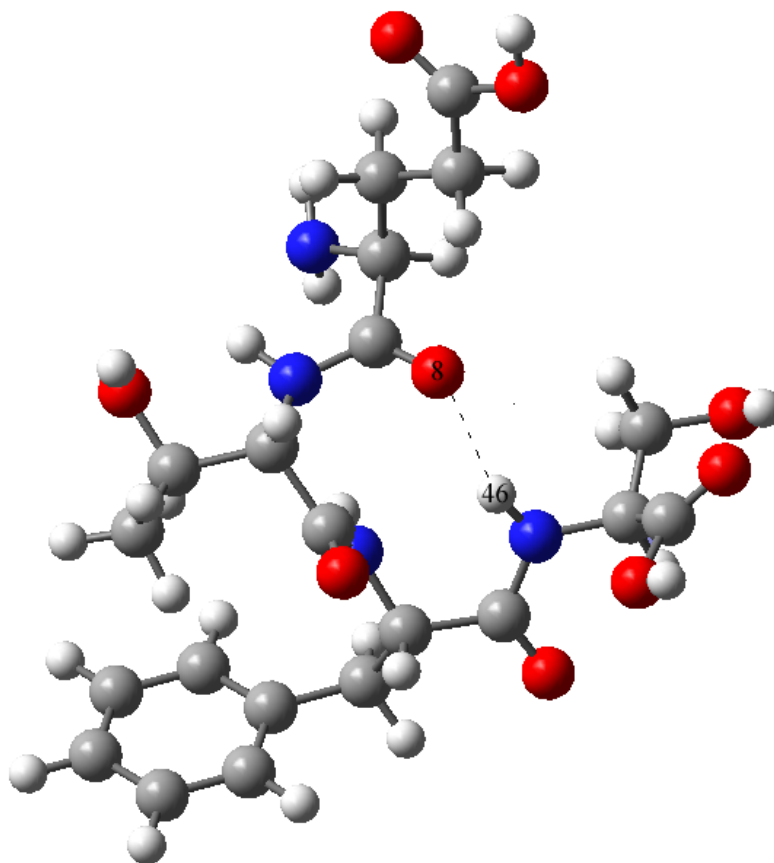


Figura 25. Localización de un puente de hidrógeno en el fragmento ETFS.

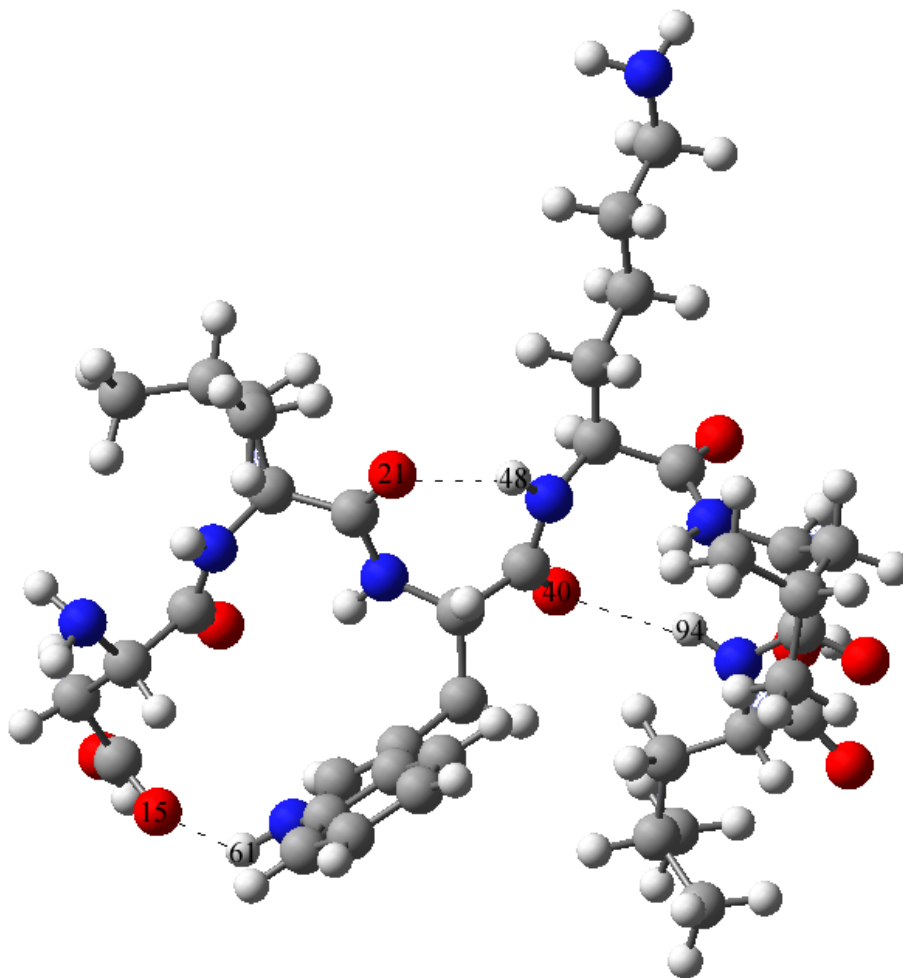


Figura 26. Localización de tres puentes de hidrógeno en el fragmento DLWKLL.

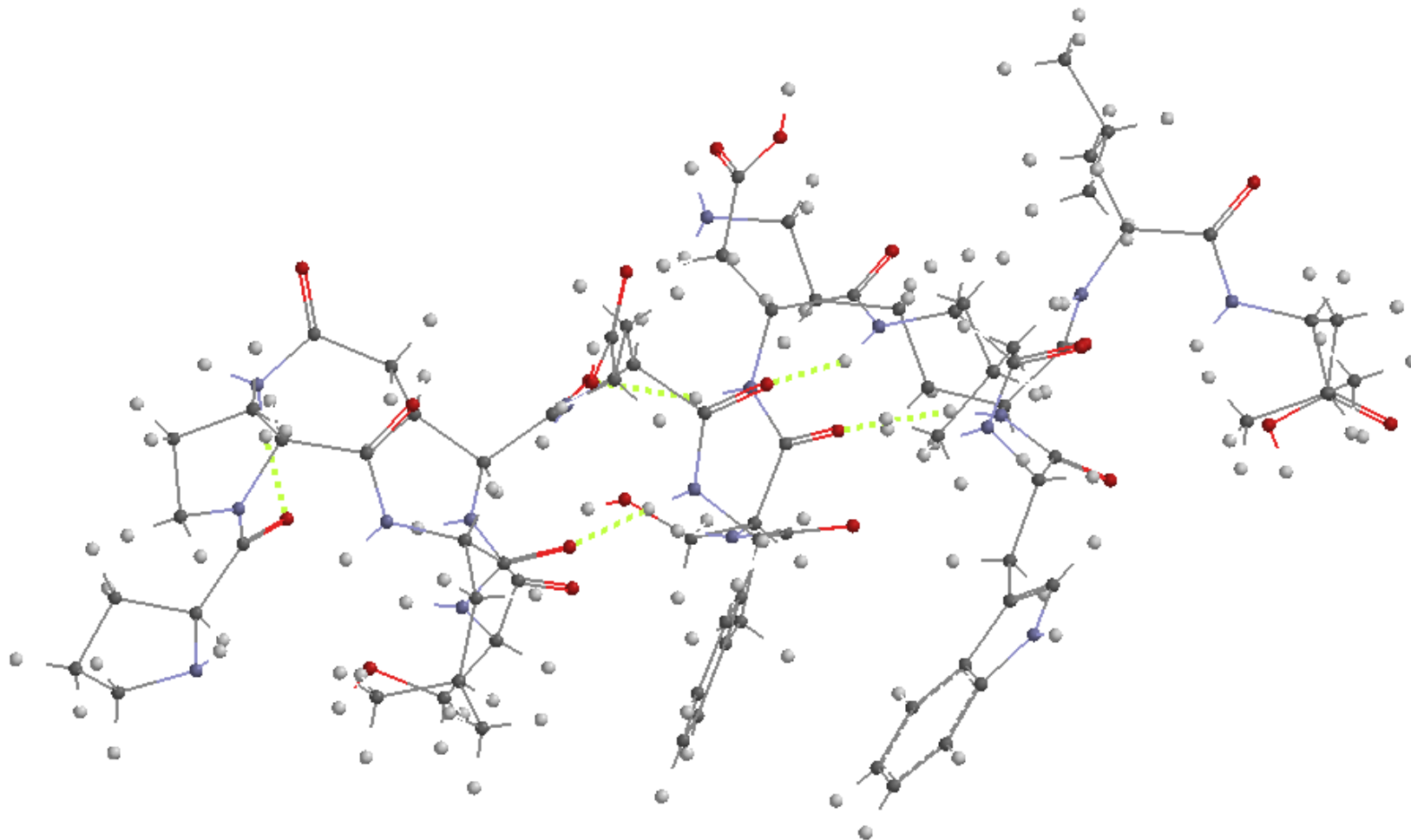


Figura 27. Localización de cinco puentes de hidrógeno de los aminoácidos 12 al 26 (PPLSQETFSDLWKLL).

En las Figuras 29-32 se presenta a los orbitales moleculares frontera, el más alto ocupado (HOMO) y el más bajo desocupado (LUMO) (Figuras 32-35) de cada uno de los fragmentos analizados. Los resultados indican que en el fragmento PPLSQ el HOMO se localiza en las prolinas 12 y 13, mientras que el LUMO en la leucina 14 y en la serina 15. En el fragmento ETFS tanto HOMO como LUMO se sitúan sobre la fenilalanina 19. Finalmente en el fragmento DLWKLL ambos orbitales moleculares frontera se localizan sobre el triptófano 23 como se enlista continuación en la tabla IX.

Tabla IX. Orbitales moleculares frontera (HOMO-LUMO) en cada uno de los fragmentos analizados, así como de los 15 aa juntos. Calculados con B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d)

Secuencias de aa analizados	HOMO	LUMO	aa comunes en 3 péptidos membranolíticos ⁵²
PPLSQ	Pro12 Pro13	Leu14 Ser15	Ser15
ETFS	Phe19	Phe19	Thr18 Phe19
DLWKLL	Trp23	Trp23	AA comunes en 22 péptidos anticancerígenos ⁷³
PPLSQETFSDLWKLL	Trp23	Pro12 Pro13	Lys, Phe, Val, Trp, Ser

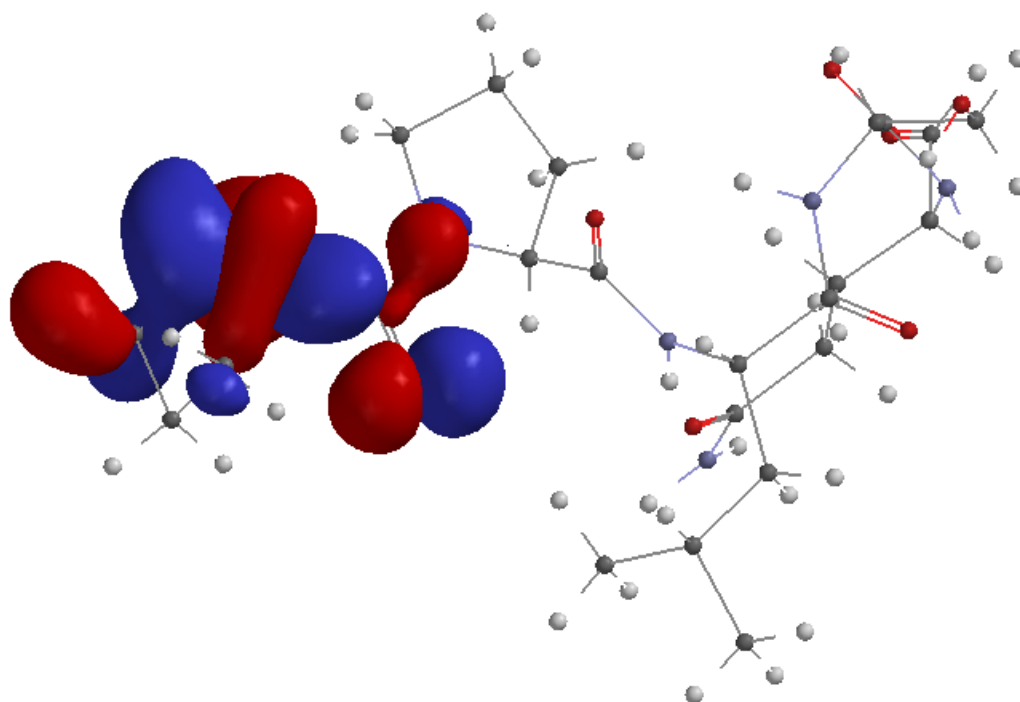


Figura 28. Localización de los orbitales moleculares HOMO sobre la prolina 12, en el fragmento PPLSQ.

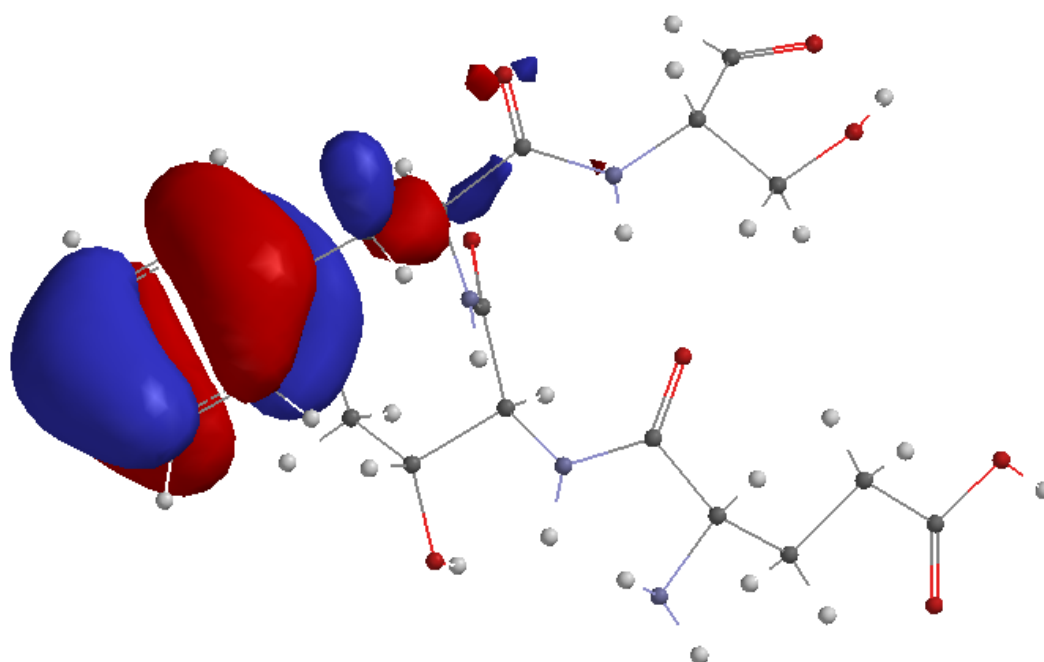


Figura 29. Localización de los orbitales moleculares HOMO sobre la fenilalanina 19, en el fragmento ETFs.

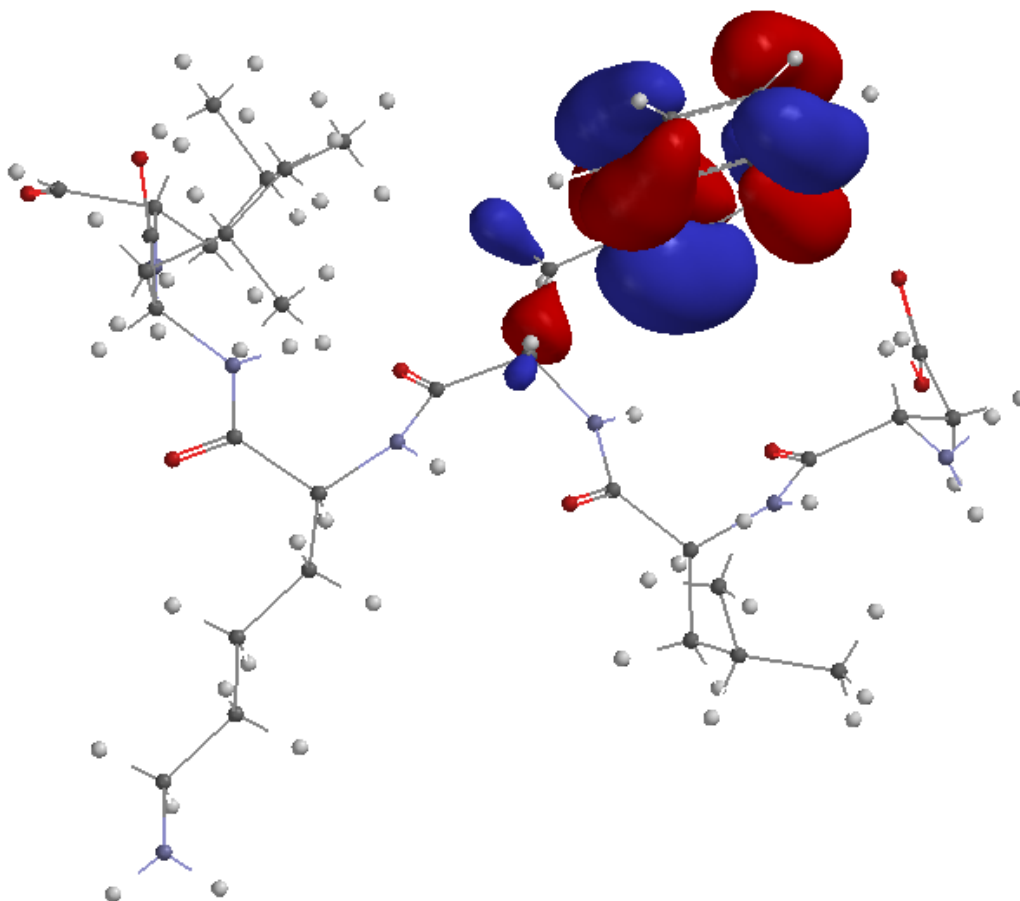


Figura 30. Localización de los orbitales moleculares HOMO sobre el triptófano 23, en el fragmento DLWKLL. Calculados a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

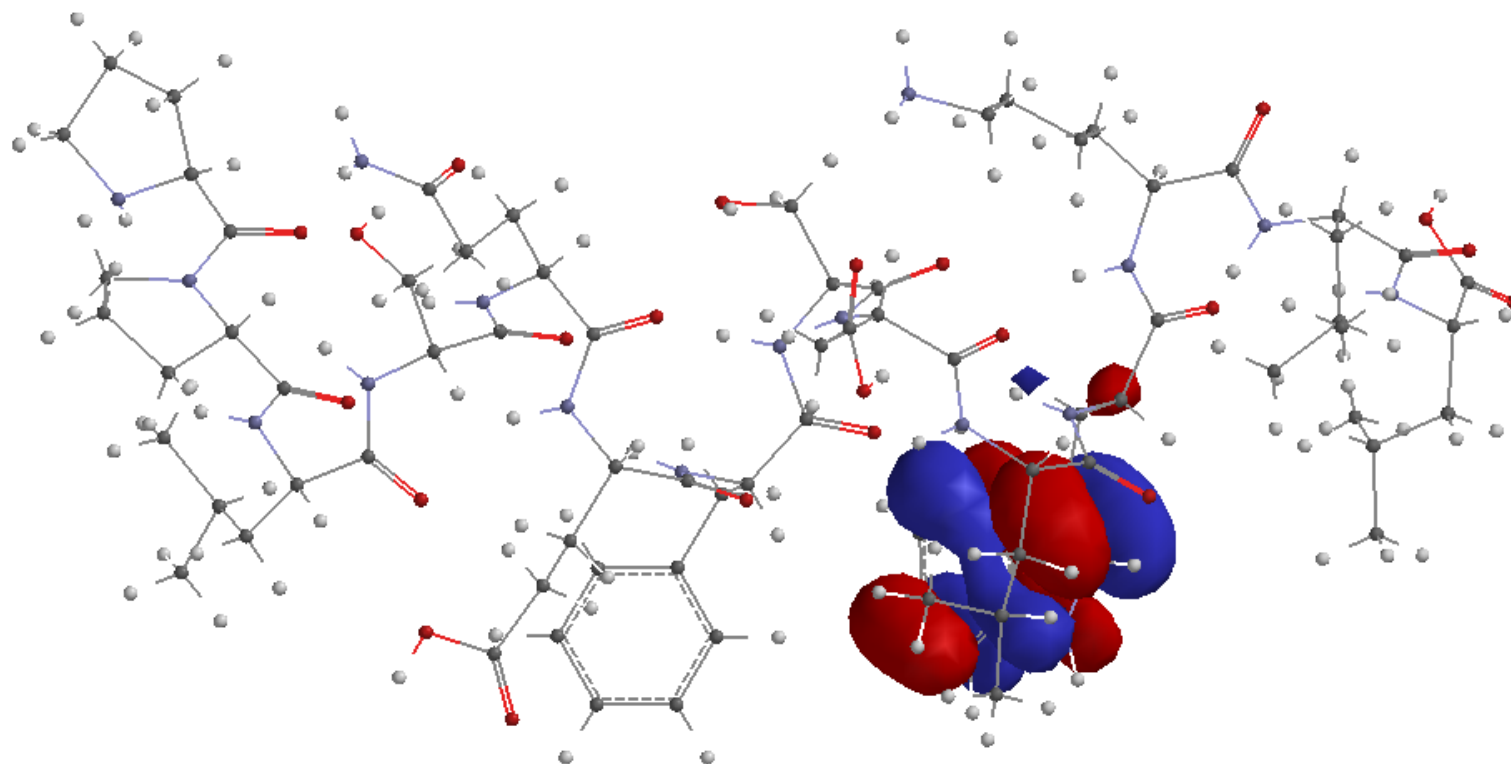


Figura 31. Localización de los orbitales moleculares HOMO sobre el triptófano 23, en los aminoácidos 12 al 26 (PPLSQETFSDLWKLL). Calculados a nivel B₃LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

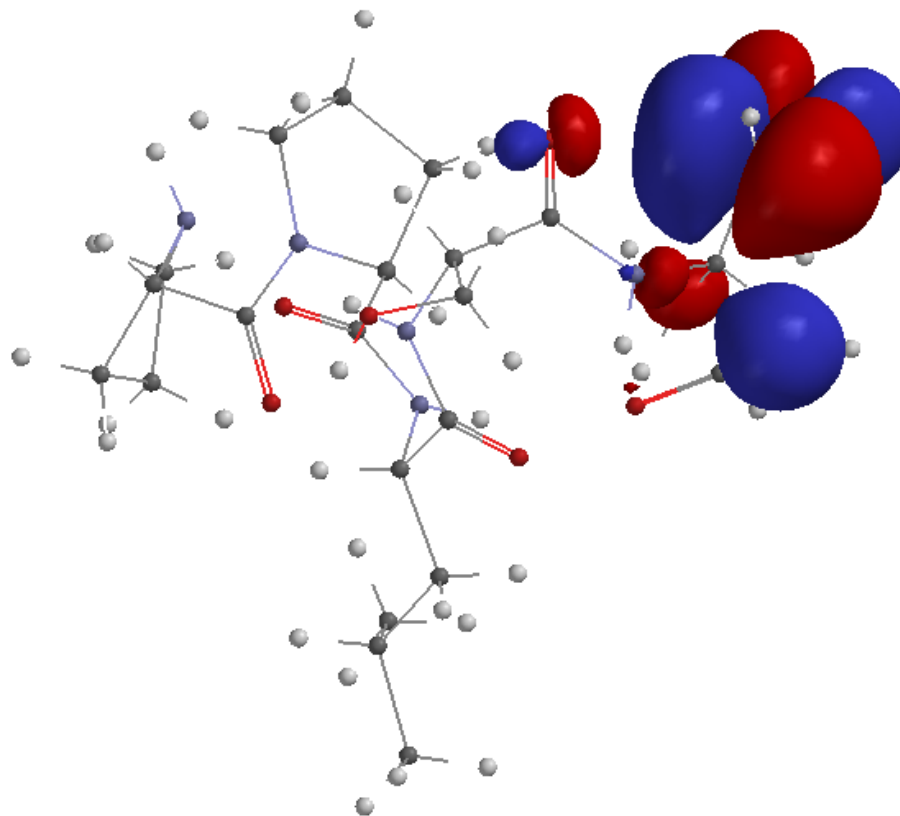


Figura 32. Localización de los orbitales moleculares LUMO sobre la serina 15, en el fragmento PPLSQ. Calculados a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

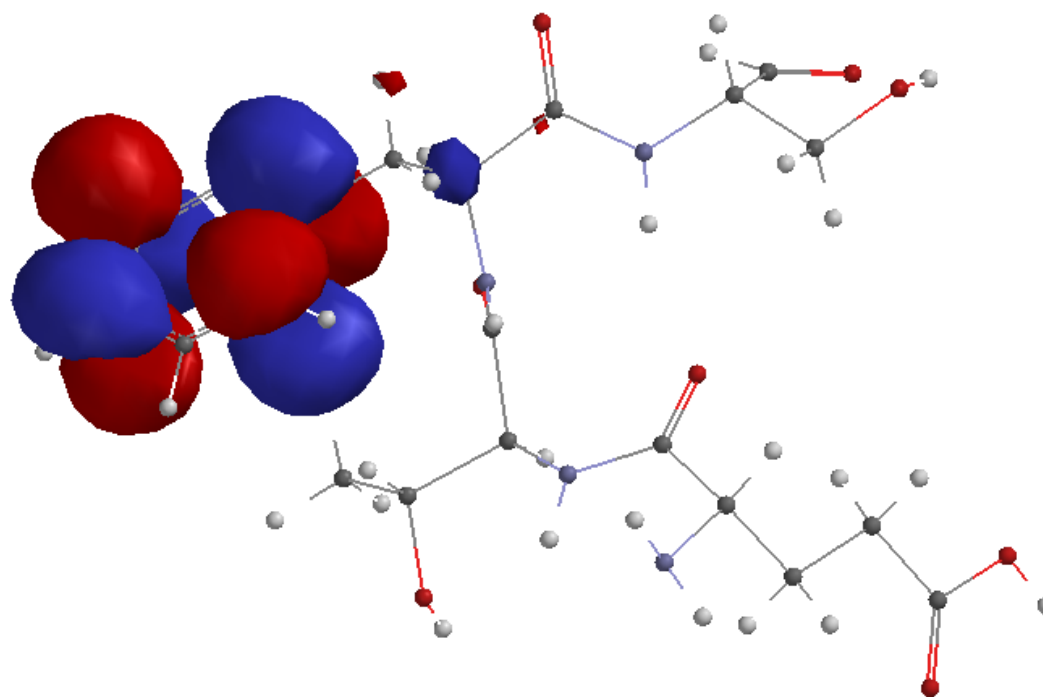


Figura 33. Localización de los orbitales moleculares LUMO sobre la fenilalanina 19, en el fragmento ETFS. Calculados a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

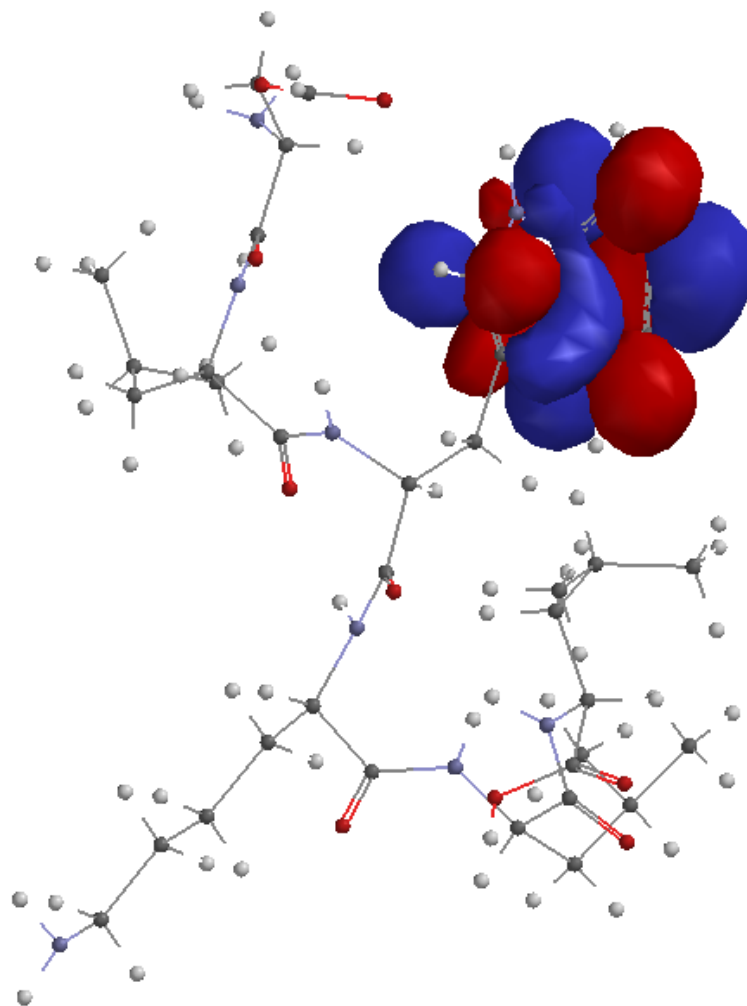


Figura 34. Localización de los orbitales moleculares LUMO sobre el triptófano 23, en el fragmento DLWKLL. Calculados a nivel B₃LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

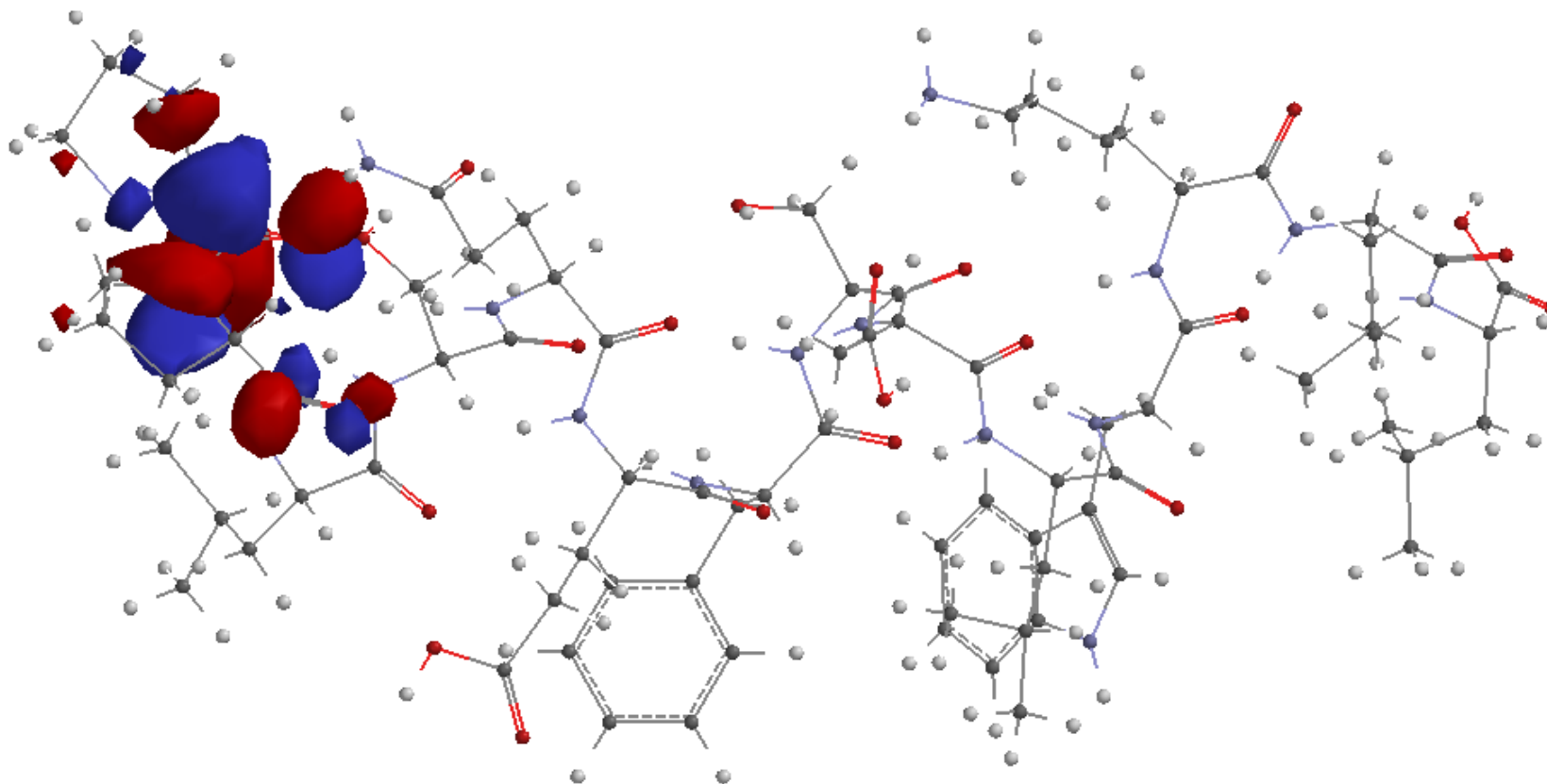


Figura 35. Localización de los orbitales moleculares LUMO sobre las prolínas 12 y 13, en los aminoácidos 12 al 26 (PPLSQETFSDLWKLL). Calculados a nivel B₃LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

Estos resultados sugieren la existencia de posibles sitios reactivos sobre los aminoácidos mencionados pudiéndose llevar a cabo ataques nucleofílicos y electrofílicos respectivamente cabe destacar que estos residuos están conservados en la escala evolutiva, lo que habla de su importancia en la proteína total.

Por último el análisis de la isosuperficie del potencial electrostático que muestra la densidad electrónica en cada uno de los fragmentos que constituyen los aminoácidos 12 al 26 de la proteína TP53, ilustran una distribución de la densidad de cargas sobre los extremos carboxilo terminal en todos los fragmentos (Figuras 36 a 39).

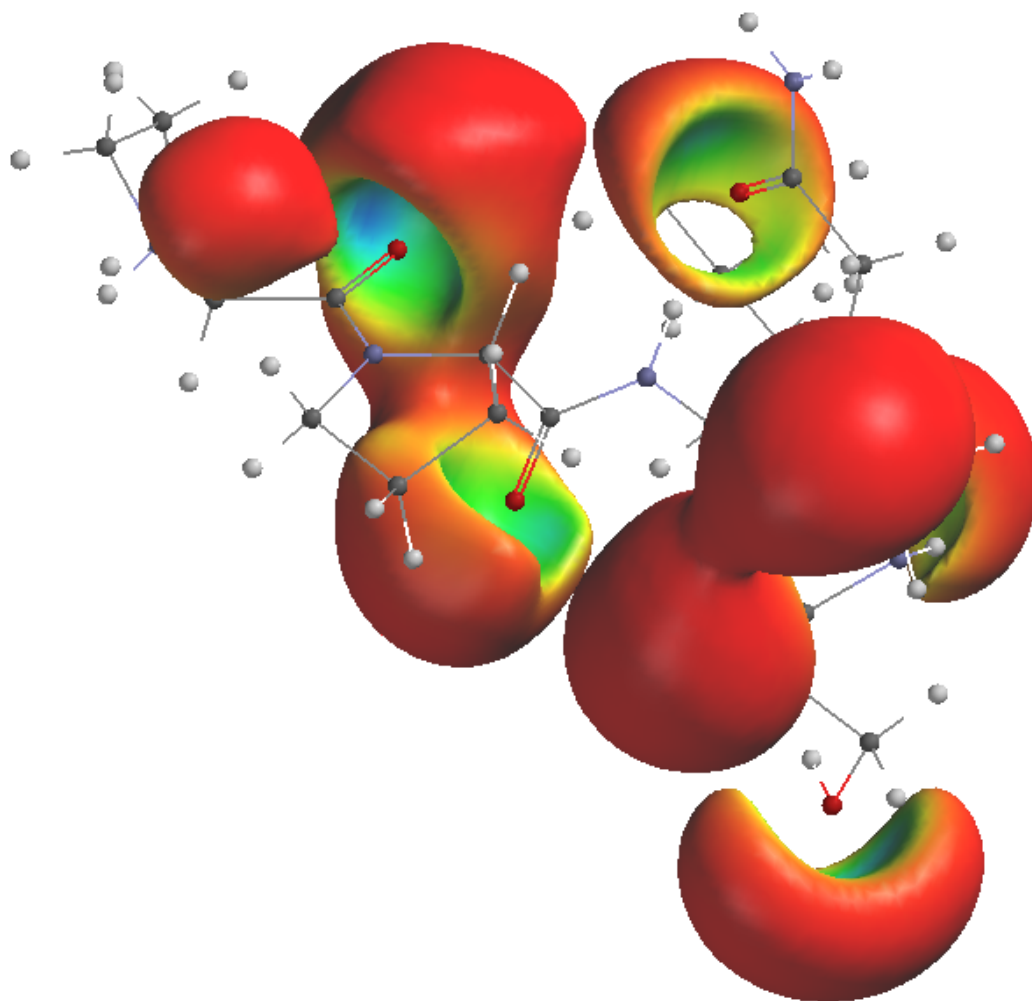


Figura 36. Localización de la Isosuperficie del potencial electrostático mostrando la densidad electrónica del fragmento PPLSQ. Calculada a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

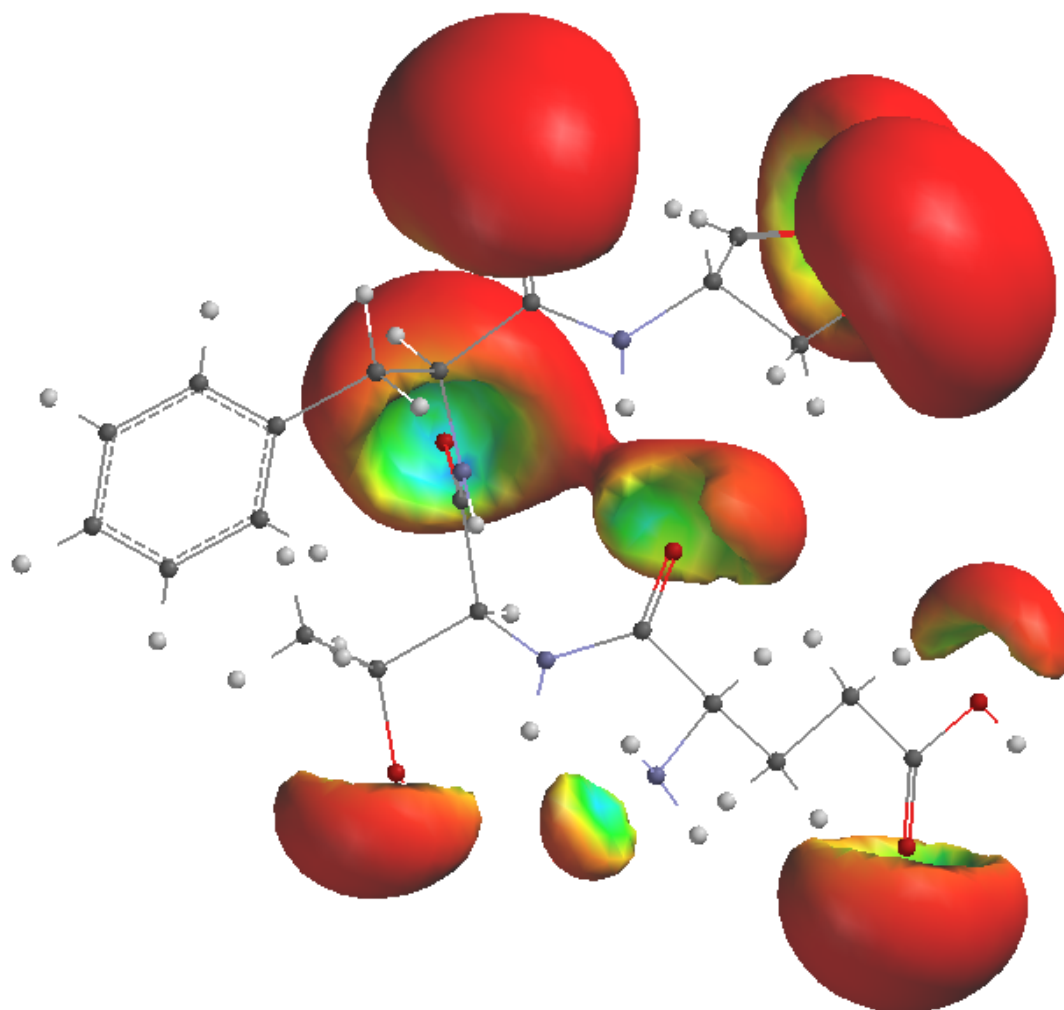


Figura 37. Localización de la isosuperficie del potencial electrostático mostrando la densidad electrónica del fragmento ETFS. Calculada a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

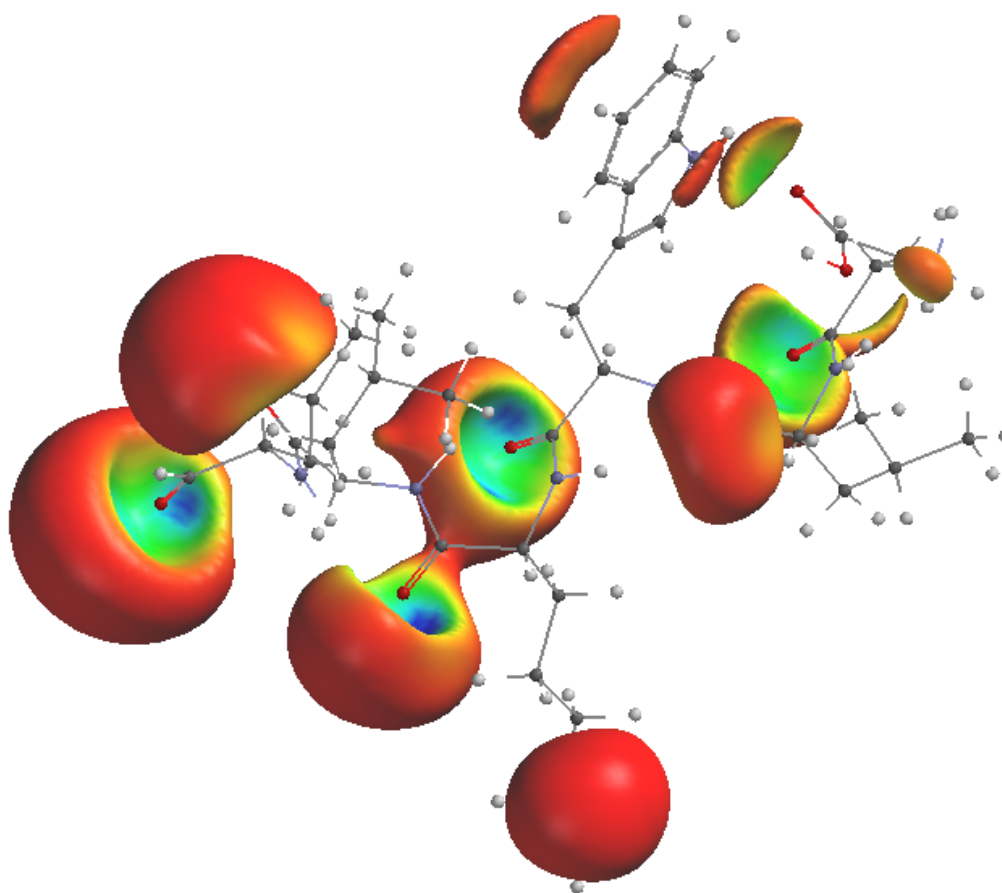


Figura 38. Localización de la isosuperficie del potencial electrostático mostrando la densidad electrónica del fragmento DLWKLL. Calculada a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

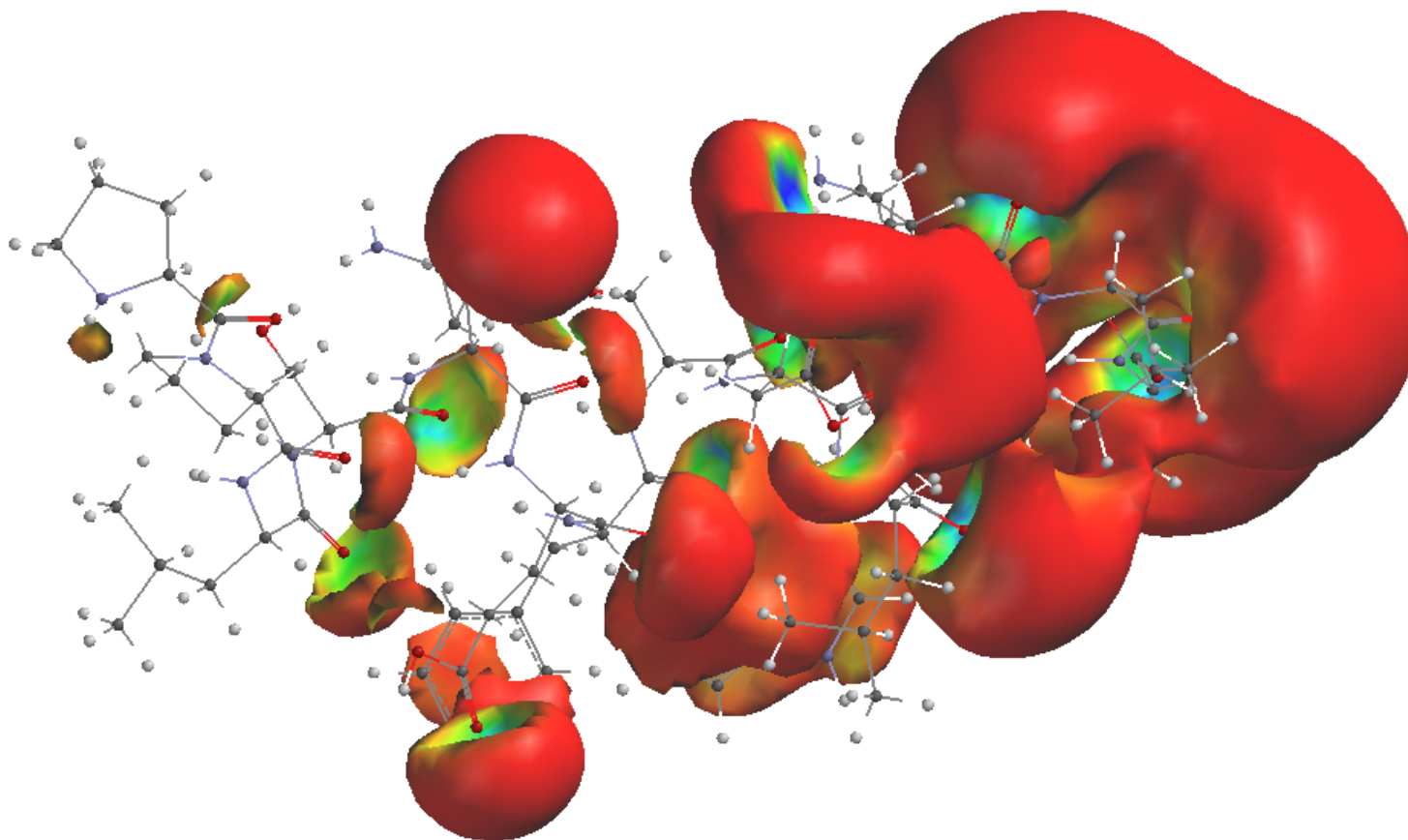


Figura 39. Localización de la isosuperficie del potencial electrostático mostrando la densidad electrónica de la secuencia completa de los aminoácidos 12 al 26 (PPLSQETFSDLWKLL). Calculada a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

Una vez terminada la caracterización de la estructura electrónica de los aminoácidos 12 al 26 de TP53, se generó una familia inicial de 20 estructuras polipeptídicas, se realizaron los cálculos correspondientes a cada una de ellas y se obtuvieron cuatro péptidos que de acuerdo a los resultados obtenidos de la estructura electrónica, hace suponer que pueden presentar actividad membranolítica.

La Tabla X muestra los valores del índice de electrofilicidad (ω), dureza (η), potencial de ionización, así como del logaritmo del coeficiente de reparto ($\log P$). Con estos valores se evidenció que el péptido pep5A presenta mayor reactividad química respecto a los demás y se asemeja al péptido de referencia pep0R; sin embargo, tienen un $\log P$ bajo con respecto a pep0R, a diferencia del péptido pep2A en donde es mayor. Este péptido parece ser el mejor candidato para tener la actividad biológica del péptido de referencia (membranolítica) ya que presenta el mayor índice de electrofilicidad; y presenta además una dureza muy parecida al pep5A y ambos son ligeramente menos blandos que el de referencia. De acuerdo a lo previamente mencionado, los péptidos pep2A y pep5A podrían presentar características similares al péptido de referencia pep0R. Algo semejante ocurre con los valores del índice de ionización, ya que se requiere aproximadamente la misma energía para sustraer un electrón; comparándolo con el pep1A, que al igual que los restantes fue elegido con base en su estructura geométrica, este presenta un potencial de ionización mayor.

Tabla X. Descriptores químico-cuánticos analizados para cada péptido prototipo. ω =índice de electrofilicidad; η =dureza; PI=potencial de ionización;. Calculados a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

Péptidos	ω(e.V)*	η(e.V)*	PI(ev)*	logP
pep1A	0.71	7.18	10.37	-0.83+/-0.99
pep2A	0.60	5.59	8.18	6.53+/-0.98
pep5A	0.47	5.50	7.77	2.86+/-1.12
pep10A	0.49	5.91	8.31	6.14+/-1.12
pep0R	0.37	5.29	7.27	7.73+/-1.17

*eV=electronvolts logP= coeficiente de reparto

Respecto al momento dipolar, se observa que los valores más pequeños los posee pep2A. El valor más negativo de pep5A se encuentra sobre el eje de las x y el más positivo de pep2A sobre el eje de las y. Esto indica que los sitios más reactivos se localizan en esos planos.

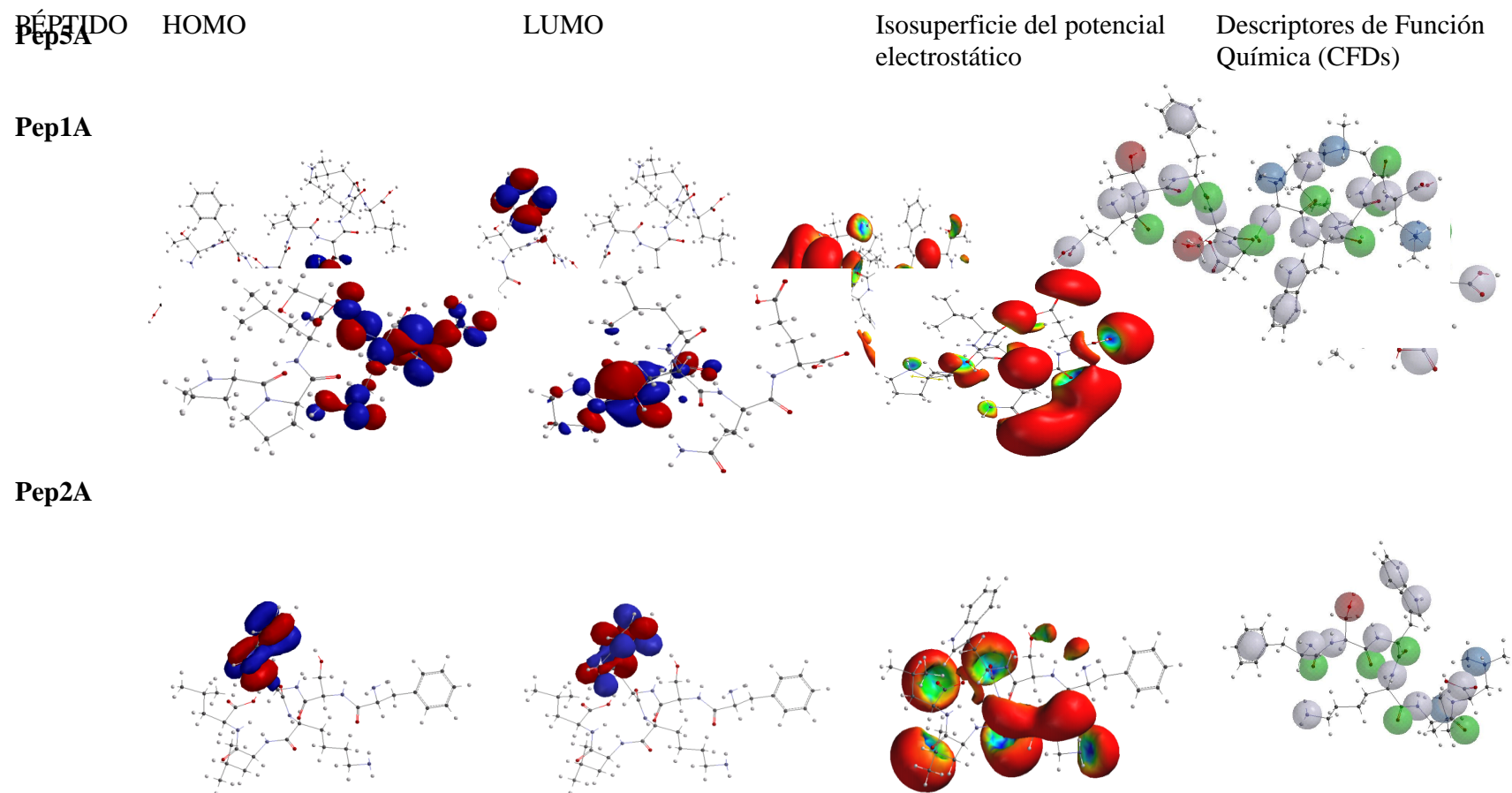
PONER DOS TABLAS

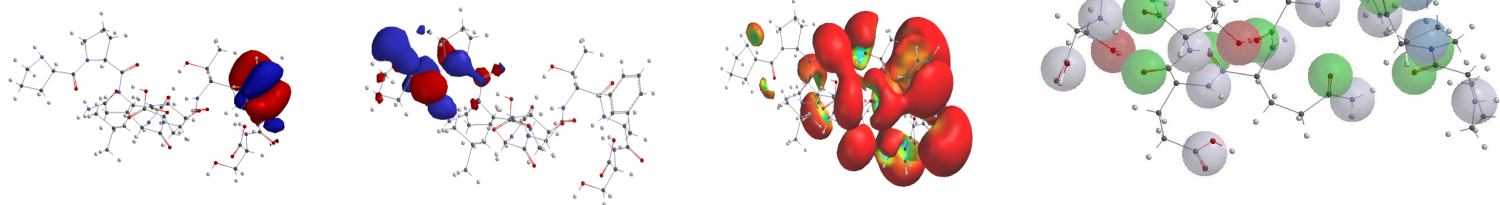
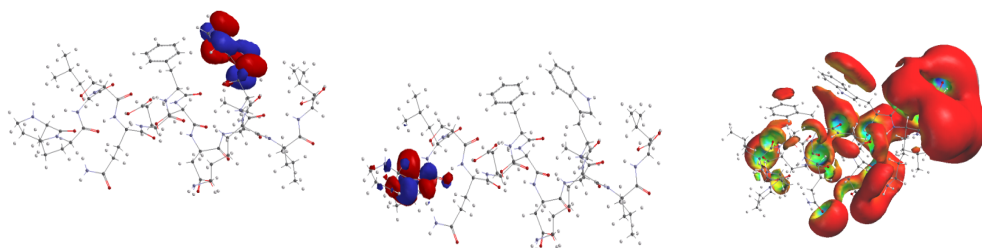
Tabla XI. Valores de los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) y del momento dipolar con sus componentes. Calculados a nivel B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d).

Péptidos	HOMO	LUMO	$\mu(X)$	$\mu(Y)$	$\mu(Z)$	$\mu(TOTAL)$
pep1A	-0.3810	0.1465	-15.10	8.68	0.76	17.44
pep2A	-0.3007	0.1100	4.03	10.19	1.40	11.05
pep5A	-0.2856	0.1184	-20.16	-7.77	1.74	21.67
pep10A	-0.3054	0.1291	-18.67	-1.83	1.58	18.82
pep0R	-0.2672	0.1220	47.02	2.21	-2.41	47.14

La Tabla XII resume en forma gráfica la localización de los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO), la isosuperficie del potencial electrostático, así como algunos descriptores de función química (CFDs por sus siglas en inglés).

Tabla XII. Se resumen los sitios en los que se localizan los orbitales moleculares frontera (HOMO y LUMO) así como la distribución de la densidad electrónica y algunos descriptores fisicoquímicos (CFDs). Calculados con **B3LYP/6-311G(d)//HF/6-31G(d)**.



Pep10A**Pep0R**

Sin imagen

Continuación de la Tabla XII.

Todo lo anterior señala que los aminoácidos Pro12, Pro13, Gln16, Trp18 y Phe19 son químicamente más reactivos. De estos resultados se destaca que los orbitales moleculares frontera HOMO y LUMO se distribuyen preferentemente sobre los residuos de prolina, fenilalanina y triptófano (Tabla XIII).

Tabla XIII. Aminoácidos en los que se localizan los orbitales moleculares frontera (HOMO-LUMO) en cada uno de los péptidos propuestos, así como en el de referencia (Pep0R).

Péptido	HOMO	LUMO
Pep1A	Gln	Pro
Pep2A	Trp	Trp
Pep5A	Trp	Phe
Pep10A	Phe	Pro
Pep0R	Trp	Pro

La hidrofobicidad, tomada de los CFDs indica que existe una correlación entre esta característica y el logP; estos descriptores también señalan al péptido pep2A con mejores características para la función biológica que se busca. Respecto a este mismo parámetro el péptido pep5A, a pesar de presentar características de estructura electrónica que lo señalan como químicamente muy reactivo, su grado de hidrofobicidad y de lipofilicidad es bajo, considerando que lo que se busca es que estos péptidos tengan un primer contacto electrostático con la membrana celular, y después se integren a ella sin llegar a entrar al citoplasma, permaneciendo el tiempo y en la concentración suficiente para formar poros toroidales. Con base en la característica de los posible sitios donadores de hidrógeno en la molécula (HBD por sus siglas en inglés), y los sitios aceptores de hidrógeno o lone pair (HBA por sus siglas en inglés) esto es los sitios en donde existen electrones libres o desapareados; estos sitios se corresponden, con los residuos más positivos y más negativos obtenidos a partir del análisis de las cargas del potencial electrostático, calculadas con el método DFT con el funcional híbrido B3LYP y con la base 6-311g(d); los posibles donadores de electrones son en la secuencia PPLSQETFSDLWKLL (aa 12 al 26 de TP53) o péptido de referencia (pep0R) son Ser20, Thr18, Asp21, S16; mientras que los posibles aceptores son Glu17, Pro13, Leu26, Leu14, Leu25 (Figuras 40-42).

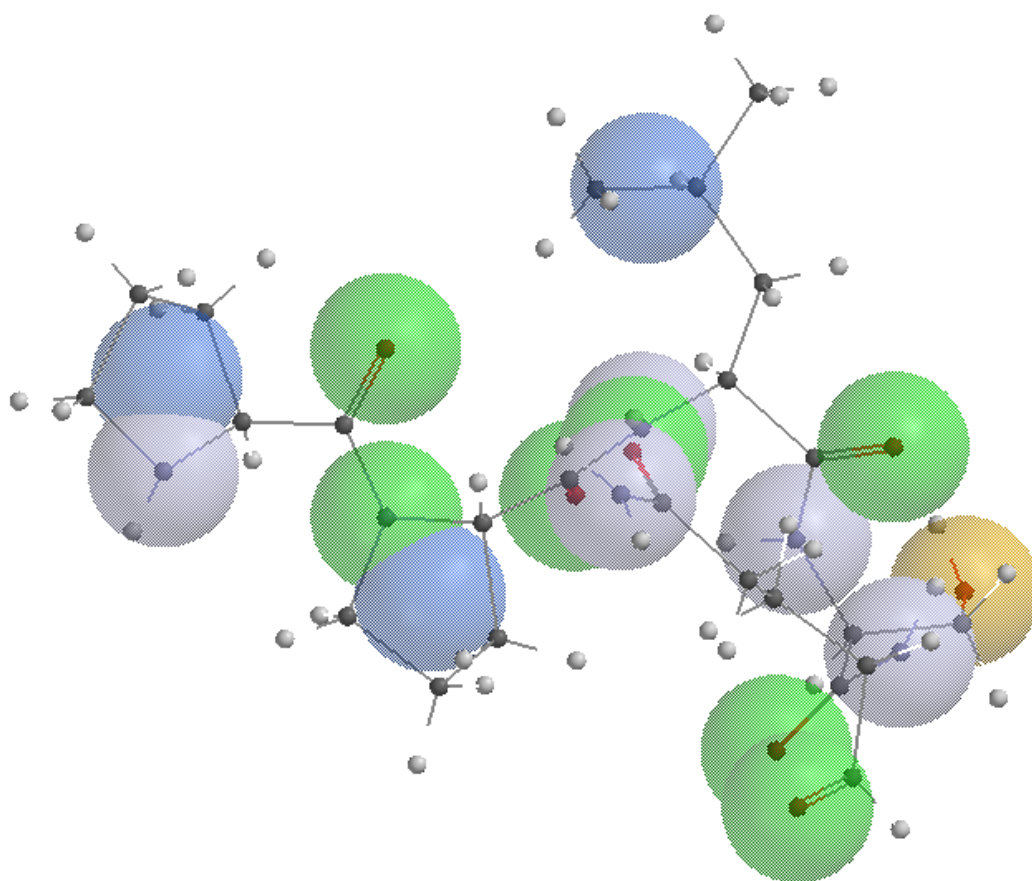


Figura 40. Se muestran los descriptores de hidrofobicidad (en azul bajo), sitios donadores en puentes H (en verde), sitios básicos (azul subido) y sitios ácidos (amarillo) en el fragmento PPLSQ.

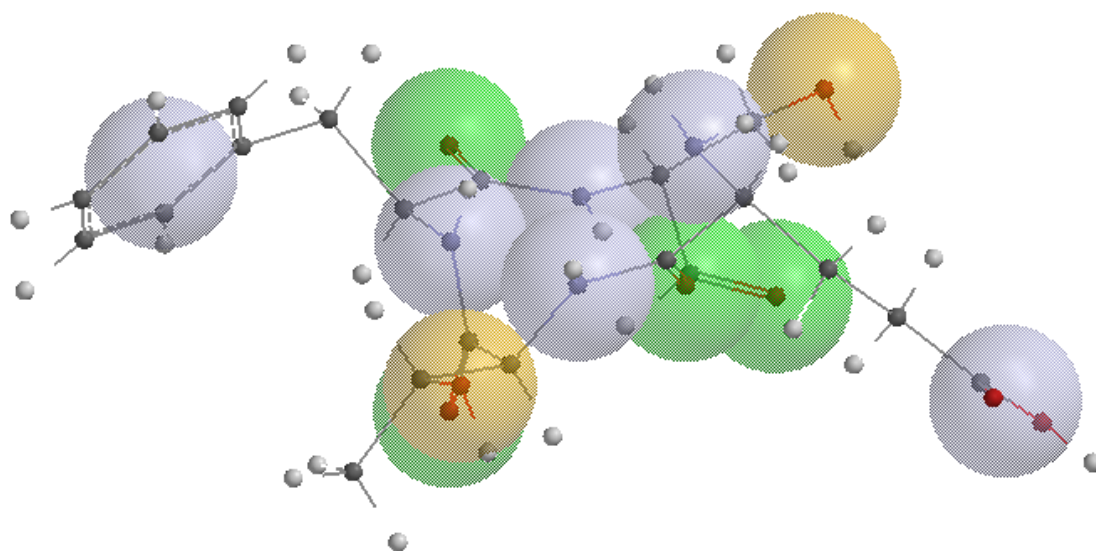


Figura 41. Se muestran los descriptores de hidrofobicidad (en azul bajo), sitios donadores en puentes H (en verde), sitios básicos (azul subido) y sitios ácidos (amarillo) en el fragmento ETFS.

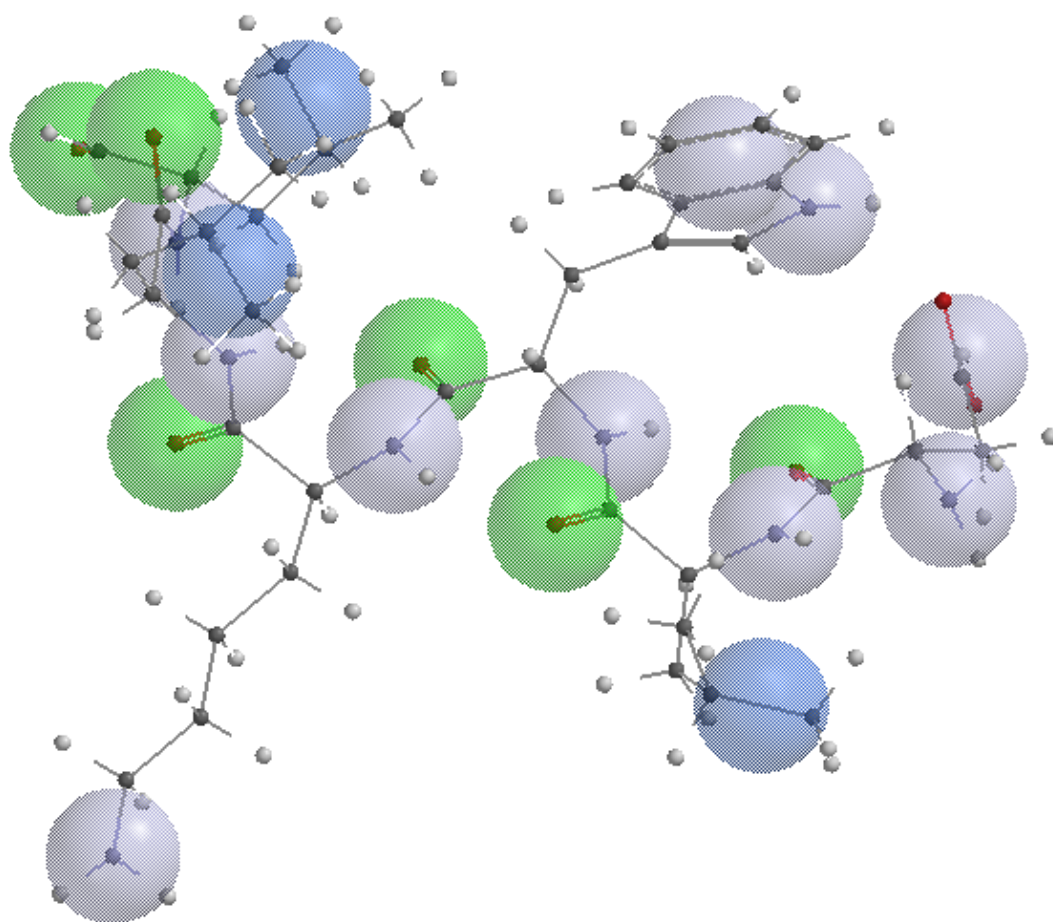


Figura 42. Se muestran los descriptores de hidrofobicidad (en azul bajo), sitios donadores en puentes H (en verde) y sitios básicos (azul subido) en el fragmento DLWKLL.

Por otro lado, las estructuras de los péptidos prototipo presentan similitud con la de los péptidos antimicrobianos de tipo alfa hélice, tales como magainina, Ah-AMP-1⁸⁶, etc. por lo que pueden tener mecanismos de interrupción de la membrana similares ; por ejemplo los sitios iónicos presentan una positividad muy compacta, que puede ser capaz de alterar la superficie de la membrana celular. El grupo de Robert Fine ha informado que el péptido PNC-27, el cual presenta alfa hélices en su estructura, induce necrosis independiente de TP53 en células pancreáticas transformadas (TUC-3) y de cáncer de mama (MDA-MB-468, MCF-7, MDA-MB-157); además reduce el tamaño de tumores pancreáticos inducidos en ratones Hsd: atímicos Nu/Nu. Estos investigadores observaron también que todas las células transformadas murieron en un tiempo aproximado de 15 minutos y con microscopía electrónica que aproximadamente 5 minutos después del tratamiento con el péptido, se formaron poros uniformes⁵⁴⁻⁵⁸.

El mecanismo de formación de poros de la magainina, la cual es estructuralmente parecida al péptido PNC-27, es como sigue: interactúan con la membrana e introducen la llamada « curvatura positiva de la cadena » a la bicapa lipídica, lo que induce la formación de poros toroidales que interrumpen la continuidad de la bicapa; una vez insertado el péptido forma este complejo poro toroidal cuya estructura se estabiliza intercalando sus aminoácidos básicos cargados positivamente entre las cabezas de los fosfolípidos cargados negativamente⁸⁷. Las estructuras alfa helicoidales de la magainina se encuentra bajo fases de transición, por lo que el proceso de unión a la membrana induce el aumento en la formación de estructuras de tipo hélices alfa⁸⁸.

La hidrofobicidad de los péptidos prototipo les permitiría insertarse en la bicapa lipídica y mediante la anfipaticidad podrían interactuar con las regiones polares y apolares de dicha bicapa.

Finalmente respecto a la selectividad hacia las células neoplásicas que muestra el péptido PNC-27, puede también como en los péptidos antimicrobianos, deberse al contenido de fosfolípidos⁸⁹ y de estero⁹⁰. Pero PNC-27 contiene también al péptido acarreador penetratina, cuya secuencia es altamente hidrofóbica, contiene alfa hélices y se inserta fácilmente en las membranas celulares ; mientras que los péptidos prototipo que se han propuesto no contienen esa secuencia. Sin embargo, debido a que el tipo de residuos de aminoácidos y a que la estructura tridimensional es semejante a PNC-27, se puede suponer que podría ocurrir un mecanismo semejante en las células neoplásicas; ya que está bien documentado que las membranas de estas células presentan muchas diferencias en el contenido de fosfolípidos, colesterol y proteínas, en comparación con las membranas de las células sanas.

Capítulo 5

Conclusiones

- ◆ En los fragmentos PPLSQ, ETFS y DLWKLL se mantiene la tendencia de los diferentes descriptores químico cuánticos globales con respecto a la secuencia PPLSQETFSDLWKLL.
- ◆ Se obtuvo la estructura geométrica optimizada de cada uno de los fragmentos bajo estudio y sobre estos se observó que los sitios electrofílicos importantes recaen en los siguientes aminoácidos (los átomos se indican entre paréntesis): Q16 (C₇₁), D21 (C₁₂), E17 (C₁₇), P13 (C₁₉), L26 (C₁₀₃), S15 (C₅₂), S20 (C₅₃), L14 (C₃₃), T18 (C₁₈) y L25 (C₈₂); lo que significa que estos residuos están expuestos a ataques nucleofílicos. Las cargas más negativas comparadas con las del resto de los residuos se ubicaron en los siguientes aminoácidos: Q16 (N₇₆ y N₅₉), K24 (N₈₀), E17 (N₁), D21 (N₁), S20 (N₄₂) y W23 (N₂₃); así como en los átomos de oxígeno S20 (O₅₇), T18 (O₂₄), S15 (O₅₆), D21 (O₁₅ y O₁₆) y Q16 (O₇₅) por lo que en estos átomos se pueden llevar a cabo ataques electrofílicos.
- ◆ Al comparar los datos experimentales de la estructura geométrica informados para PNC-27 por RMN en ambiente que simula a la membrana⁵⁵, se observan similitudes entre estos y la estructura terciaria del modelo teórico PPLSQETFSDLWKLL estudiado.
- ◆ De los descriptores químico cuánticos globales que se emplearon en esta tesis, los que establecen mejor la reactividad química y la estabilidad estructural son los valores del potencial de ionización y la dureza.
- ◆ Al analizar los órdenes de enlace N-H se encontró que los valores más bajos se encuentran en el fragmento PPLSQ lo que evidenció la acidez relativa de los grupos amida de estos residuos y puede llevar a una mayor reactividad del

fragmento.

◆ Otra característica importante que se relaciona con las cargas y con las características ácidas de los átomos de hidrógeno, es que estos forman interacciones intramoleculares, que contribuyen a la estabilidad de las estructuras peptídicas.

◆ Se generaron cuatro péptidos prototipo, de los cuales dos (Pep2A y Pep5A) son los mejores candidatos para realizar los estudios experimentales posteriores.

Capítulo 6

Perspectivas

La química teórica es útil en el diseño de moléculas con aplicaciones farmacológicas, una vez que con metodologías genómicas se identifican genes y/o proteínas importantes en los procesos celulares.

En este trabajo de tesis, se presenta el análisis de descriptores químico cuánticos de una secuencia de aminoácidos, que generaron cuatro moléculas prototipo; mismas que serán ensayadas en líneas celulares transformadas y en cultivos primarios. Si alguno de estos nuevos péptidos presenta actividad, se iniciará una colaboración con grupos de investigación que trabajen con modelos animales con cáncer.

La continuidad de esta línea de investigación también contempla realizar estudios biofísicoquímicos, con la finalidad de estudiar la interacción de los péptidos con la membrana celular. Asimismo, se fortalecerá el desarrollo del modelado matemático para la simulación de membrana con la finalidad de estudiar su interacción con diversas moléculas, principalmente peptídicas.

Con base en la actividad que presente alguno de los péptidos prototipo, se realizarán modificaciones de la estructura química de estos, con la finalidad de potenciar su actividad antineoplásica y diseñar nuevas moléculas con mayor especificidad.

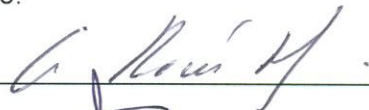
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presenta

Carolina Barrientos Salcedo

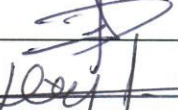
El día de 30 de enero del año de 2008

Jurado:

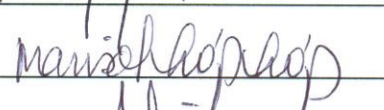
Co-tutor: Dra. Alda Rocio Ortiz Muñiz



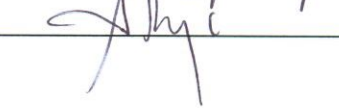
Co-tutor: Dra. Catalina Soriano Correa



Asesor: Dr. Diego Julio Arenas Aranda



Sinodal: Dra. Marisol López López



Sinodal: Dr. Arturo Rojo Domínguez