

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE FARMACIA

**DESARROLLO *IN SILICO* DE UN AGONISTA
PROTEICO DE RECEPTORES DE PÉPTIDO FORMILO
2 (FPR2), COMO UN ANTIINFLAMATORIO
PRORRESOLUTIVO**

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIATURA**

ERICK SOLANO MONGE

TUTOR: DENNIS JIMÉNEZ VARGAS

SAN JOSÉ, NOVIEMBRE, 2018

Pensamiento

“No sé lo que le podrá parecer al mundo, pero a mí me parece como si hubiese sido un niño que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa de lo común, mientras que el inmenso océano de la verdad se extiende inexplorado frente a mí”.

Isaac Newton

Dedicatoria

Agradezco al farmacéutico y químico más grande, Dios y a su compañera la Reina de los Ángeles, por la inspiración y la fuerza brindada, así como por la conspiración que provocan en el universo para que todo marche como debe, para lograr las metas propuestas y esta tesis, gracias a ellos.

A mis padres Denis y Marbelle, por su amor, apoyo incondicional, y brindarme gran parte de lo que he llegado a ser con sus enseñanzas, experiencia y consejos; han sido mi motor y mi inspiración. A mi hija Sofia, que me inspira a ser cada día mejor. Los amo.

Agradecimientos

A mi tío Mauricio, por su apoyo incondicional y sus consejos. A mis hermanos y familia en general, por su apoyo, cariño, el tiempo que comparten, el cual llena mis días de felicidad, compañía, y demuestran interés genuino por el bienestar de los demás.

A mi tutor, profesor y amigo Dennis Jiménez, por su colaboración, tiempo, además de compartir su conocimiento para el mejoramiento de las ideas del presente proyecto y brindarme la oportunidad de ser instruido por tan excelente profesor.

Y a un gran químico y amigo, Carlos Villegas, por sus tutorías, compartir su tiempo, conocimientos, brindarme su apoyo incondicional, sus consejos y su apoyo para concluir la carrera.

Resumen

Se desarrollaron *in silico*, varios péptidos derivados de la región N terminal de la Anexina A1 humana, a los cuales se les realizaron sustituciones de aminoácidos en sitios donde ocurre degradación por enzimas, lo que los hace al menos, teóricamente, resistentes a escisión. Estos péptidos podrían ejercer un efecto agonista sobre los receptores celulares FPR2, que se encuentra en neutrófilos, monocitos, eosinófilos y macrófagos principalmente. Con un posible agonismo sobre estos receptores se podría obtener un efecto antiinflamatorio prorresolutivo. Estos péptidos desarrollados fueron evaluados mediante programas computacionales, y se determinó la capacidad de unión a un receptor FPR2 construido por homología de secuencias de aminoácidos.

El péptido que presentó mejor capacidad de unión, al receptor modelado fue seleccionado y se determinaron algunas propiedades fisicoquímicas *in silico*, y se describieron además algunas posibles características farmacocinéticas que podría presentar el péptido.

Además, se describieron algunos métodos modernos de síntesis, para la obtención de péptidos y proteínas, con los cuales se podría sintetizar el péptido desarrollado *in silico*, en un eventual deseo de realizar pruebas *in vitro* posteriormente.

Contenido

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
Planteamiento del Problema	1
Objetivos.....	2
Objetivo General	2
Objetivos Específicos	3
Justificación.....	3
Antecedentes.....	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	11
Inflamación.....	11
Respuesta inflamatoria	11
Inflamación aguda	13
fase vascular.	13
fase celular.....	14
Mediadores inflamatorios	19
Inflamación crónica.....	24
Resolución de la inflamación	26
Corticoides.....	28
Los Aminoácidos, Péptidos y Proteínas	33
Los aminoácidos	35
Péptidos	42
Las Proteínas	44

Anexina A1	58
Características antiinflamatorias de Anexina A1	60
Degradación endógena de anexina A1	63
Receptores de Péptido Formilo Tipo 2 (FPR2)	64
Agonistas y Antagonistas de Receptores FPR2/ALX	65
Medicamentos Biotecnológicos.....	69
Farmacocinética de los medicamentos obtenidos por biotecnología	70
Química Medicinal <i>In Silico</i>	78
Descriptores utilizados en la investigación <i>in silico</i>	80
Desarrollo <i>In Silico</i> de Proteínas	81
Sitios de unión o receptores (objetivo macromolecular).....	85
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	87
Enfoque.....	87
Método.....	87
Variables.....	87
Instrumentos y técnicas	90
Procedimiento de Recolección y Análisis de los Datos	93
Obtención y análisis de la estructura cristalizada de Anexina A1.....	93
Modificación del péptido obtenido de Anexina A1	94
Obtención de la estructura del receptor FPR2.....	94
Simulación del acople molecular (Docking).....	95
Determinación de propiedades fisicoquímicas del péptido seleccionado	95

CAPITULO IV: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	96
Obtención de la Estructura de la Anexina A1	96
Modificación de la Región N Terminal de la Anexina A1 Humana	100
Desarrollo de Derivados Peptídicos de la Región N Terminal de Anexina A1 Humana.	104
Obtención del Receptor FPR2 por Homología de Secuencias	105
Acople Molecular (Docking).....	106
Resultados de acople molecular	108
Propiedades Fisicoquímicas Determinadas <i>In Silico</i> para el Mejor Ligando.....	112
Análisis de propiedades fisicoquímicas.....	113
Posible Obtención del Péptido 5.....	115
Síntesis química en fase sólida	115
Síntesis de proteínas recombinantes.....	118
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	121
Conclusiones.....	121
Recomendaciones	123
Referencias	124
Apéndices	132

Contenido Figuras

Figura 1. Estructura del Compuesto 43	8
Figura 2. Células Inflamatorias de la Fase Aguda	19
Figura 3. Vías de la Lipooxigenasa y Ciclooxygenasa, y Sitios Donde los Fármacos Esteroideos y No Esteroideos Ejercen su Acción	21
Figura 4. Representación Esquemática de Respuesta Inflamatoria y Resolución en el Tiempo ...	28
Figura 5. Mecanismo de Acción de los Corticoides.....	32
Figura 6. Algunas Proteínas del Cuerpo Humano en Representación 3D	34
Figura 7. Estructura General de un Aminoácido.....	36
Figura 8. Formación de un Enlace Peptídico	43
Figura 9. Tipos de Proteínas Integrales de Membrana.....	49
Figura 10. Niveles de Estructuras de las Proteínas	51
Figura 11. Estructura Secundaria α Hélice.....	52
Figura 12. Laminas Plegadas β , Paralela y Antiparalela, en Detalle Tipo Antiparalela (Color) ...	53
Figura 13. Estructuras Secundarias Derivadas	55
Figura 14. Interacciones que Favorecen la Estabilidad de la Estructura Terciaria	57
Figura 15. Representación 3D de Anexina A1 en Presencia de Calcio, del Organismo <i>Sus scrofa</i> (PDB-ID: 1HM6)	59
Figura 16. Eventos Celulares Asociados con los Efectos Antiinflamatorios y Proresolventes de la Anexina A1 y Péptidos Miméticos de la Región N Terminal.....	62

Figura 17. Molécula ACT-389949	68
Figura 18. Moléculas Patentadas por la Compañía Allergan	69
Figura 19. Procedimientos para Desarrollo de Proteínas <i>In Silico</i>	84
Figura 20. Ejemplo de Sitio de Unión (Binding Site) Celecoxib Unido al Sitio Activo de Anhidrasa Carbónica II	86
Figura 21. Grafico Comparativo de Alineaciones de las Distintas Anexinas Humanas	97
Figura 22. Estructura Cristalográfica de Anexina A1 del Organismo <i>Sus Scrofa</i> (Región Terminal En Azul), Visualizada con Software Chimera Versión 1.13.....	98
Figura 23. Alineación Básica de Secuencias (Blast) de Aminoácidos para Anexinas A1 de Humano (Query) y <i>Sus Scrofa</i> (Sbjct), Primeros 48 Aminoácidos de Región N Terminal	99
Figura 24. Estructura de la Anexina A1 Humana Construida por Homología de Secuencia de Aminoácidos Utilizando la del Organismo <i>Sus Scrofa</i> como Plantilla.....	100
Figura 25. Región N Terminal de Anexina A1	101
Figura 26. Región N Terminal de Anexina A1 Modificada <i>In Silico</i> Resistente a Escisión y Secuencia de Aminoácidos Sin Modificación.....	104
Figura 27. Receptor FPR2 Humano Desarrollado por Homología de Secuencias de Aminoácidos Utilizando al Receptor de Leucotrienos como Plantilla (PDB ID: 5X33)	106
Figura 28. Delimitación del Área de Interacción (Gridbox) por medio de Herramienta Autodock Vina, Implementada Dentro del Software Pyrx	107
Figura 29. Visualización <i>In Silico</i> del Acople Molecular con El Péptido 5 Como Mejor Ligando	109

Figura 30. Posibles Fuerzas Intermoleculares Determinadas por Predicción, Implicadas en la Unión Ligando – Receptor	110
Figura 31. Péptido 5 (28 Aminoácidos), Mejor Ligando <i>In Silico</i> , y su Respectiva Secuencia de Aminoácidos.....	111
Figura 32. Predicción de acuerdo con el Índice de Solubilidad para Péptido 5	114
Figura 33. Esquema de Síntesis de Merrifield	117
Figura 34. Esquema de la Síntesis de Proteínas Recombinantes en Levaduras	119

Contenido Tablas

Tabla 1. Símbolos y Algunas Propiedades Fisicoquímicas de los Aminoácidos.....	37
Tabla 2. Variables de la Investigación	88
Tabla 3. Información Obtenida por Alineaciones Básicas de Secuencias de Las 12 Anexinas en Comparación con la Anexina A1, Realizado Utilizando Blastp	96
Tabla 4. Proteasas que Degradan Anexina A1 y Residuos como Sustratos Específicos	102
Tabla 5. Péptidos Desarrollados y Modificaciones Contenidas.....	105
Tabla 6. Energía Global De Unión al Receptor FPR2 para los Distintos Péptidos Desarrollados	108
Tabla 7. Frecuencia de los Aminoácidos en el Péptido 5 (Mejor Ligando).....	112
Tabla 8. Composición Atómica del Péptido.....	113

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del Problema

Los antiinflamatorios esteroideos se utilizan desde hace décadas masivamente por distintas especialidades, ya que son muy eficaces y sus efectos beneficiosos son apreciados en numerosos tratamientos de diversas patologías. Sin embargo, muchos de los tratamientos con corticoides son utilizados sin contar con un conocimiento adecuado de su uso y mecanismo de acción, la dosis terapéutica eficaz, o su eficacia. Esto se ha comprobado mediante estudios clínicos que indicaron que ciertos medicamentos carecen de propiedades de las cuales se pensaba que poseían; además, es importante este hecho, debido a los frecuentes y graves efectos secundarios producidos por el uso de corticoides (Galofré, 2009, p.9).

Entre algunos de los efectos adversos no deseados en el uso de altas dosis o tratamientos no adecuados de glucocorticoides se encuentran: aumento de la gluconeogénesis y resistencia a la insulina, aumento del catabolismo proteico, osteoporosis y adelgazamiento de la piel, se produce obesidad abdominal, cara de luna, acumulación de grasa en zona dorsal, manteniendo las extremidades relativamente delgadas. Se produce una disminución de la inmunidad celular y humoral, aumento de la secreción de ácido por el estómago, retención de sodio y redistribución de los fluidos corporales; en hombres disminuye la concentración de testosterona, en mujeres produce supresión de la secreción de estrógenos y progestágenos, anovulación y amenorrea (Gómez, Gutiérrez y Valenzuela, 2007, p.63).

En cuanto a la toxicidad, el uso extenso de antiinflamatorios esteroideos a menudo provoca efectos indeseables incapacitantes y pueden poner en riesgo la vida. Entre algunos de estos efectos se tiene el retraso de crecimiento en niños, necrosis vascular ósea, osteopenia, aumento del riesgo de infección, mala cicatrización de heridas, hiperglucemia, hipertensión arterial, y pueden producir cataratas. La morbilidad causada por el uso de glucocorticoides se ha disminuido por la combinación con inhibidores de calcineurina que anulan la activación de linfocitos T, reduciendo dosis o suspendiendo el uso de esteroides (Brunton, Chabner y Knollman, 2018, p.1008).

La resistencia a los glucocorticoides es otro aspecto limitante en el uso de estos antiinflamatorios; ocurre aproximadamente entre el 4 y el 10% de pacientes con asma, 30% de pacientes con artritis reumatoide, y en casi la totalidad de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y sepsis, lo que limita el uso de estos como terapia, pero conservando sus efectos no deseados. La resistencia puede deberse a defectos en la señalización de los glucocorticoides, la reducción de la expresión de receptores glucocorticoides, disminución de la unión al receptor, alteración de la translocación nuclear o alteración de actividad del cofactor (Vandewalle, Luypaert, De Bosscher y Libert, 2018, p.42).

Con lo mencionado anteriormente, surge la principal interrogante de la investigación: ¿Será posible desarrollar *in silico* un compuesto proteico con propiedades antiinflamatorias semejantes a los corticoides evitando los efectos secundarios indeseables del uso de antiinflamatorios esteroideos?

Hipótesis

Se obtiene una proteína *in silico*, derivada de la Anexina A1 endógena, que se una a los receptores FPR2, realizando teóricamente un agonismo, y con ello obtener un efecto antiinflamatorio prorresolutivo de la molécula sin los efectos indeseables del uso de corticoides.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar un agonista de Receptores péptido formilo 2 (FPR2) de origen proteico *in silico* con características antiinflamatorias prorresolutivas.

Objetivos Específicos

-Obtener un péptido con característica agonista de receptores FPR2 *in silico* con propiedades antiinflamatorias prorresolutivas.

-Determinar *in silico* la capacidad de unión de la proteína desarrollada al receptor y sus propiedades fisicoquímicas.

-Describir las posibles maneras de obtener compuestos proteicos deseados, con los métodos actuales de síntesis.

Justificación

El organismo humano en general se ve afectado por el uso de corticoides; por ello las reacciones adversas después de la terapia con corticoides son múltiples y variadas, desde manifestaciones no graves pero molestas, hasta otras que ponen en peligro la vida del paciente. Son causa frecuente de iatrogenia; las dosis utilizadas son un factor de riesgo; estos efectos se pueden subdividir en agudos o crónicos dependiendo de la afectación que produzcan, y además se debe tener especial cuidado con las interacciones que pueden ocurrir con otros medicamentos (Serra, Roganovich y Rizzo, 2012, p.165).

A pesar de los grandes beneficios que se obtienen con el uso de corticoides para el tratamiento de distintas patologías por su gran efecto antiinflamatorio mayormente de tipo celular, no se deben ignorar los frecuentes y graves efectos secundarios; sumado a esto, la resistencia que se presenta a los glucocorticoides se vuelve, como una limitante y problemática, en el uso de corticoides en la práctica clínica. De lo anterior surge la necesidad de buscar otras alternativas antiinflamatorias en la inmunidad de tipo celular que disminuyan la incidencia de efectos adversos y complicaciones del uso de corticoides.

A través de los años de estudio, el interés por mediadores antiinflamatorios con propiedades prorresolución, en especial de origen endógeno, como la proteína anexina A1, se consideran hoy en día como un motivo de interés para proyectos de desarrollo de nuevos fármacos, con la certeza

de que medicamentos basados en las vías antiinflamatorias endógenas podrían actuar de manera homóloga en efectos prorrresolución, y que potencialmente tienen menos efectos secundarios que los tratamientos existentes (Gavins y Hickey, 2012, p.1).

Muchos de los pacientes, que requieren el uso de antiinflamatorios esteroideos para el tratamiento de sus patologías, podrían verse beneficiados con el desarrollo de nuevas alternativas antiinflamatorias, especialmente en casos donde las patologías sean causadas por inmunidad celular. Esto permitiría a dicha población, contar con una mejor calidad de vida sin que se presenten los efectos indeseables del uso de corticoides, y evitando la otra limitante del uso de corticoterapia, que es la resistencia glucocorticoide.

La visión orientada a que la resolución inflamatoria es un fenómeno activo, y no es un proceso que se resuelve de manera espontánea en relación con el diagnóstico, abre múltiples oportunidades para evaluar la complejidad de este proceso y sus principales mediadores; una de ellas es la proteína regulada por glucocorticoides, la anexina A1 y su receptor acoplado a la proteína G (FPR2). En los últimos años se han comprendido los procesos mediante los cuales la Anexina A1 realiza su papel antiinflamatorio en la inmunidad innata, con lo cual esta proteína se considera un regulador fundamental de homeostasis; si no actuara en contra de la inflamación esta se prolongaría y agravaría (Perretti y Dalli, 2009, p.936).

La investigación para el desarrollo *in silico* de un agonista proteico FPR2, proporcionaría alternativas de tratamientos antiinflamatorios para la parte clínica, ya que los tratamientos existentes redundan en la probabilidad de desarrollar eventos adversos. Por otra parte, se podría proporcionar una molécula de la cual se podrían derivar otras con distintas características y aplicaciones clínicas, del mismo modo en que los fármacos tradicionales de síntesis orgánica han dado lugar a otras moléculas derivadas de un medicamento.

Hoy en día existe interés en desarrollar fármacos que imiten el modo de acción de los factores de resolución endógena para promover el curso de la inflamación hacia una vía prorrresolución. Esto representaría un nuevo método para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. Sin embargo, los fármacos antiinflamatorios tradicionales se analizan para

determinar su eficacia durante las primeras horas de aparición de la inflamación; en otras palabras, disminuir la formación de leucocitos y edemas, y nunca se analiza su capacidad de desencadenar procesos de resolución; actualmente no existe un modelo para evaluar los agentes prorrresolventes (Navarro et al., 2009, p.1516).

Los mediadores endógenos reguladores de la inflamación, como la anexina A1, son potenciales herramientas terapéuticas para el control de enfermedades inflamatorias. Aunque si el uso clínico de estrategias de prorrresolución será útil o podría generar efectos indeseables se debe estudiar bien, se cree que estos serán efectivos y tendrán menos efectos secundarios, debido a su capacidad para imitar o inducir las vías naturales de la fase de resolución de la inflamación (Amantéa, Vago, Teixeira y Pires, 2016, p.2).

El uso de péptidos como potenciales agentes terapéuticos tiene como grandes ventajas su alta especificidad y su gran actividad; además, por lo general tienen poca toxicidad y pocos efectos secundarios, se pueden administrar en pequeñas dosis, reduciendo así las cantidades de producto a sintetizar en escala industrial. Otra ventaja es que no se acumulan en el organismo, ya que poseen una vida media relativamente corta. El estudio e investigación de nuevos acercamientos para identificar nuevas moléculas activas, basados en la preparación de bibliotecas de productos y la evaluación de su actividad masivamente, expande un futuro prometedor para los péptidos en el campo médico (Giralt, Albericio y Jiménez, 2004, p.10).

El progreso en cuanto al conocimiento sobre péptidos y proteínas ha dado un impulso a la innovación y el descubrimiento de fármacos, y esto ha ocasionado un desafío para los desarrolladores farmacéuticos, para implementar nuevas técnicas y métodos de administración para terapias presentes y futuras. El potencial de proteínas y péptidos es sorprendente; la diversidad química ofrecida por la industria farmacéutica no está enfocada en otra clase de moléculas biológicas, y mientras más se puedan utilizar proteínas y péptidos naturales o sus análogos derivados, mayor será su especificidad y seguridad. Las ventajas de las proteínas y péptidos estructuralmente desarrollados, derivados de proteínas endógenas fisiológicamente activas sobre otras moléculas, son que reducen sustancialmente el riesgo de efectos secundarios no deseados (Mahajan, Rawat, Bhatt y Chauhan, 2014, p.34).

La visión actual, respaldada por una serie de datos producidos por distintos laboratorios, es que un receptor específico de la familia de receptores péptido formilo (FPR) transmite las señales antiinflamatorias promovidas por Anexina A1 para ejercer una función inhibidora sostenida sobre la reacción inflamatoria. Además, se han dedicado esfuerzos paralelos de investigación a la caracterización del farmacóforo de la anexina A1, los cuales señalan que la región N-terminal de la proteína, contiene secuencias que podrían reproducir la mayoría, o si no todos los efectos de la proteína Anexina A1 completa. (Perretti et al., 2009a, pp.158-159).

Por lo anterior, se espera que con los resultados de la investigación se puedan mostrar alternativas similares a moléculas endógenas con capacidad antiinflamatorias proresolutivas, desarrollando *in silico* una proteína con propiedades similares a la Anexina A1, la cual actúa sobre los receptores FPR2, provocando una acción antiinflamatoria de resolución. Podría demostrarse, además, que otras moléculas implicadas en la resolución de la inflamación pueden desarrollarse y modificarse al menos en una primera etapa de manera *in silico*.

Con la investigación, pueden obtenerse nuevas formas de desarrollar, modificar y optimizar proteínas *in silico*, con la capacidad de interactuar con el receptor celular deseado. Podría obtenerse además información sobre las posibles rutas de síntesis actuales para la obtención de la proteína desarrollada *in silico*, y con ello proporcionar, en una eventual etapa posterior de la investigación o algún otro proyecto de síntesis proteica, la información para sintetizar la proteína deseada.

Antecedentes

A finales de los años 70, se descubrió y analizó una nueva proteína con capacidad de anular la producción de eicosanoides al afectar la actividad de la fosfolipasa A2. La acción de esta proteína sobre la liberación de eicosanoides y araquidonato *in vitro*, como la inhibición de PGE2 y la liberación de leucotrieno B4 por monocitos y neutrófilos, además, de manera paralela se obtuvo un efecto inhibitorio en modelos experimentales de inflamación *in vivo*, como ejemplo, inhibición de la liberación de tromboxano A4 de los pulmones de cobaya perfundidos. Se propusieron diferentes nombres para esta nueva proteína, cuyo peso molecular varió de 15 a 40 kDa, macrocortina,

renocortina, orlipomodulina, lipocortina. Hoy en día se ha aceptado el nombre Anexina 1 como un nombre apropiado, debido a la capacidad de esta proteína para "anexar" membranas de fosfolípidos (Gavins et al., 2012, p.1).

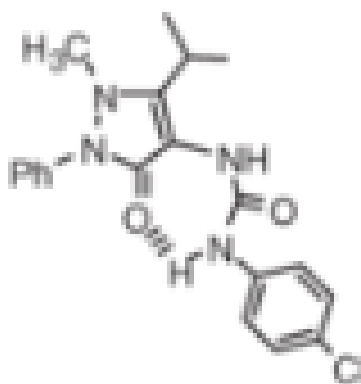
La comprensión de los mecanismos de la inflamación y su resolución ha avanzado mucho en los últimos 10 años; una muestra reciente es la eficacia informada de un análogo estable a la lipoxina, anteriormente descrito como activo en modelos de células animales y humanas para el tratamiento tópico del eccema en humanos. Estas innovaciones han llevado a la investigación para identificar moléculas pequeñas capaces de controlar la inflamación a través de receptores específicos, como FPR2 / ALXR, un miembro de la familia de los receptores peptídicos de formilo (FPR) (Corminboeuf y Leroy, 2014, p.3).

La anexina 1 ejerce sus efectos antiinflamatorios a través de la interacción con el receptor FPR2 en la superficie de algunas células; sin embargo, el compuesto nombrado compuesto 43 (Cpd43), es un compuesto sintético de bajo peso molecular, fue desarrollado como un ligando para FPR2, y se ha demostrado que inhibe quimiotaxis de neutrófilos y marcadamente reduce la inflamación del oído del ratón en un experimento realizado. Las alteraciones en la estructura de FPR2 afectan la acción de Cpd43, evidenciando la presencia de sitios específicos sobre el FPR2 con el que Cpd43 interactúa; esto no se ha demostrado físicamente usando cristalografía para evidenciarlo, en neutrófilos humanos, y Cpd43 se presume que puede interactuar con ambos FPR1 y FPR2, sugiriendo que, por lo menos en algunas condiciones, es un agonista doble para FPR1 y FPR2 (Kao et al., 2014, p.4088).

El compuesto 43, también llamado compuesto A en otro estudio, su nombre según IUPAC es [n-(4-chlorofenil)-n-(5-isopropílico-1metil-3-oxo-2-fenil-2 -urea 3-dihidro-1H-pirazol-4-il)] se sintetizó en los laboratorios de investigación en química medicinal de Daiichi Sankyo en Japón. En este estudio, mostraron que el compuesto A, tenía actividades agonistas para FPR1 y FPR2/ALX en humanos y FPR1 y FPR2 en ratones, y también inducía quimiotaxis de neutrófilos tanto en humanos como en ratones; originalmente se desarrolló como un agonista FPR2 selectivo sin actividad para FPR1 hasta $10 \mu\text{m}$. Sin embargo, mostró tanto para FPR1 como para FPR2/ALX actividades agonistas. Estas diferencias podrían deberse a los diferentes tipos de proteínas G

utilizados en los respectivos ensayos con Aequorin (Sogawa, Shimizugawa, Ohyama, Maeda y Hirahara, 2010, p.317).

Figura 1. Estructura del Compuesto 43



Nota: Ye et al. (2009)

El antagonista de FPR2 más potente identificado hasta ahora es un péptido de 10 aminoácidos derivado de gelsolina, conjugado con rodamina (PBP10), esto ha permitido una mayor comprensión de este receptor. El grupo de rodamina se requiere para el efecto inhibitor específico de FPR2 del péptido, y se ha identificado un péptido central (RhB-QRLFQV) para la inhibición de FPR2, pero este péptido más pequeño también inhibe en menor proporción el FPR1, lo que sugiere que una estructura de unión de importancia para la inhibición está presente también en FPR1, pero no disponible para el péptido completo. (Winther, Dahlgren y Forsman, 2017, p.194).

Según varios autores, el primer informe de agonistas de FPR2/ALXR no peptídicos se realizó en el 2004, después de la investigación realizada en Arena Pharmaceuticals. Luego de preincubación de eosinófilos con estos agonistas específicos, y sintéticos de bajo peso molecular de FPR2/ALXR, se suprimió la desgranulación inducida por la parte C-terminal de 37 aminoácidos de la proteína antimicrobiana catiónica humana (hCAP/LL-37). En neutrófilos, la preincubación suprimió la liberación de interleucina 8(IL-8) inducida por TNF α (Corminboeuf et al., 2014, p.3).

La compañía biotecnológica estadounidense Amgen ha investigado pequeños compuestos químicos que se unen y activan selectivamente a FPR2. A nivel celular, estas moléculas se unirían y promoverían la activación celular, que induce la generación de interleucina 6 a partir de monocitos de sangre humana. Es importante señalar que la administración de algunos de estos agonistas selectivos de FPR en modelo animal produjo efectos inhibitorios, mientras que otras moléculas relacionadas que se unieron a FPR2, sin promover una respuesta de señalización, resultaron inactivas sobre este receptor (Perretti et al., 2009a, p.942).

Se realizó una investigación en el 2012, para relacionar la estructura-actividad (SAR) de 24 ureidopropanamidas quirales, ya que en estudios recientes se indica que los receptores FPR tienen cierta preferencia estereo selectiva, incluyendo los compuestos anteriormente divulgados, que fueron llamados PD168368 y PD176252 y sus análogos cercanos; se utilizó el modelado molecular para definir el reconocimiento quiral de FPR2. De manera similar, reportado antes el 6-methyl-2,4-disustituido pyridazin-3 (2H)-ona, en sus R-formas preferentemente activaron FPR1/FPR2, encontraron que cuatro S-enantiómeros en los siete pares ureidopropanamida activan el flujo intracelular de calcio en células de FPR2 transfectadas, mientras que las estructuras R eran más activas en dos pares del enantiómero (Schepetkin et al., 2013, p.405).

La selección de moléculas por cribado virtual (screening), en una biblioteca electrónica de compuestos químicos, en el año 2009, formada por 6000 moléculas, dio lugar a la selección de 21 agonistas de FPR2 con una concentración inhibitoria promedio de niveles bajos (micromoles). Con base en las estructuras de estos agonistas, utilizaron materias comerciales como Benzimidazol, N-fenilurea, 2-(N-piperazinil) acetamida y derivados de fenilacetohidrazida. encontraron una excelente tasa de éxito (21,6 -26,3%) entre estos análogos seleccionados. Descubrieron seis agonistas FPR1 específicos entre derivados de 2 (benzimidazol-2-ilsulfanil)-N-fenilacetamida. Es importante mencionarlo, porque solamente se conocen 2 agonistas FPR1, nombrados compuesto 1910-5441 y compuestos AG-14 y AG-104 (Kirpotina et al., 2010, p.160).

Se ha determinado, con otros estudios, que la anexina A1 al unirse al calcio sufre un cambio conformacional, dando como resultado que su único dominio N-terminal quede expuesto, y luego puede interactuar con FPR2 / ALXR. Esta porción de la proteína es propensa a sufrir escisión por

enzimas proteolíticas, lo que lleva a la inactivación de Anexina A1, lo que impulsa el diseño de péptidos basados en anexina estables, como AC2-26. La porción AC2-26 de la anexina puede actuar sobre otros receptores FPR a una concentración similar en las células embrionarias de riñón humano (HEK-293). Esta porción de la proteína contaba con poca potencia para actuar en FPR2/ALXR, que sumado a una falta de selectividad hacia FPR1, por esta razón, se desarrollaron otros péptidos derivados de Anexina 1, tales como AnxA12-50 (Corminboeuf et al., 2014, p.1).

En Costa Rica no se ha encontrado evidencia de que se haya hecho algún estudio u análisis con Anexina A1 o con el receptor FPR2 de manera *in silico* o experimental, tanto en investigaciones privadas como en las diferentes universidades nacionales como Universidad Iberoamericana (UNIBE), Universidad de las Ciencias Médicas (UCIMED), Universidad Internacional de las Américas (UIA), Universidad Latina de Costa Rica y Universidad de Costa Rica (UCR), donde se realizó una búsqueda relacionada con el tema; sin embargo, no se encontraron estudios ni publicaciones a nivel nacional relacionados directamente.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

En el presente capítulo se definen los conceptos de mayor importancia que dan el sustento teórico al trabajo de investigación, como son la fisiopatología de la inflamación, los corticoides y su mecanismo de acción y efectos secundarios. Se describen, además, las proteínas en general, el receptor que es parte de la investigación, así como la proteína endógena Anexina A1, y la farmacocinética de la administración de proteínas y biodisponibilidad de productos biotecnológicos también se describen en este apartado.

Inflamación

El contenido de esta sección explicativa sobre la fisiopatología de la inflamación está basado en libros de texto, reconocidos internacionalmente por su contenido, y otros artículos de interés sobre inflamación y resolución de este proceso, con ello comprender con profundidad el papel de la Anexina A1 y los derivados peptídicos de esta proteína que podrían ejercer acciones antiinflamatorias preresolutivas.

Respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria es una reacción de los tejidos irrigados cercanos al sitio donde ocurre un daño celular y de tejidos (lesión); busca eliminar la causa inicial de la lesión celular, eliminar el tejido dañado y generar tejido nuevo. Cuenta con mediadores inflamatorios, entre ellos el complemento, factor de necrosis tumoral α , factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), neutrófilos, amiloide sérico, y además movilización de fluidos; esta reacción sirve por lo general para una localización y eliminación de microorganismos, cuerpos extraños y células defectuosas. En general se agrega la terminación “-itis” al sistema u órgano afectado, y otras descripciones adicionales pueden dar a conocer si la inflamación es de tipo aguda o crónica, y el tipo de secreción (Grossman y Porth, 2014, p.306).

La inflamación aguda localizada es un componente de la reacción fisiológica protectora a la lesión tisular e infección por patógenos microbianos invasores. Aunque la respuesta inflamatoria actúa sobre una gama de estímulos perjudiciales, protege al huésped, con el restablecimiento de homeostasis como objetivo final; si la inflamación se mantiene sin control puede causar una amplia gama de enfermedades agudas, crónicas y trastornos inflamatorios sistémicos (Corminboeuf et al., 2014, p.1).

Aproximadamente hace 2000 años se describió por primera vez la inflamación; en los últimos años ha tomado un nuevo interés, razón por la cual se determinó que la fisiopatología de distintas enfermedades se relaciona con la respuesta inflamatoria. En esos casos donde se activan los mecanismos inflamatorios de una determinada manera con suficiente intensidad para provocar daño en distintos tejidos humanos por condiciones autoinmunes como artritis reumatoide (Grossman et al., 2014, p.306).

Los signos cardinales de la inflamación como eritema, tumefacción, calor y dolor son descripciones que datan del primer siglo después de Cristo, y así se describía la inflamación; para el siglo II d.C. se incluyó otro signo, *functio laesa*, que se refiere a pérdida de la función. Además de estos signos descritos puede presentarse fiebre; simultáneamente los mediadores químicos, como citosinas, que son sintetizadas en el sitio donde ocurre la inflamación, ingresan a la circulación (Grossman et al., 2014, p.589; Valencia y Ancer, 2014, párr.2).

La respuesta inflamatoria puede tener distinta magnitud, ya que muchas variables pueden afectar el desarrollo de la inflamación o su resolución, entre ellos la duración del daño, los agentes causales extraños, el grado de la lesión y el ambiente propio donde ocurre la inflamación. La inflamación puede dividirse en aguda y crónica dependiendo del periodo de tiempo que trascurra la inflamación, así como en muchos casos la inflamación aguda antecede a la crónica, y cada tipo de inflamación tiene su característica propia y varía la respuesta celular en cada caso (Grossman et al., 2014, p.306; Valencia et al., 2014, párr. 6).

Inflamación aguda

La inflamación aguda es una respuesta temprana y que se desarrolla de manera inmediata, ya que tiene como función controlar y eliminar antígenos, microorganismos y células dañadas o defectuosas. El proceso de inflamación aguda consta de 2 fases, la fase vascular y la fase celular, y muchos tejidos y células participan de estas reacciones, entre ellos la células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, los leucocitos cercanos circulantes, algunas células del tejido conectivo como las células cebadas, fibroblastos, macrófagos tisulares y linfocitos; también participan proteínas fibrosas de la matriz extracelular como colágeno y elastina, proteínas glucoadhesivas y proteoglicanos (Grossman et al., 2014, p.307; Kumar, Abbas y Aster, 2015, p. 71).

Este proceso agudo, caracteriza por presentar una duración breve, que varía desde algunos minutos hasta incluso días; una de sus características es la salida de fluido y componentes plasmáticos por la pared vascular por aumento de la permeabilidad hacia el espacio extravascular, además se presenta una movilización de leucocitos, en mayor medida, neutrófilos. La inflamación aguda se presenta antes que se desarrolle la inmunidad adaptativa y su objetivo es, en mayor medida, erradicar el causante de la lesión y limitar que se extienda el daño a los tejidos; algunos de los causantes pueden ser necrosis tisular por distintas causas, infecciones, reacciones autoinmunes, quemaduras, congelamientos, agentes químicos, traumatismos por golpes o cortaduras (Grossman et al., 2014, p.307; Kumar et al., 2015, p. 71).

fase vascular.

En la fase vascular de la inflamación aguda se dan cambios en la vascularización en el lugar donde ocurre la lesión, lo que es una característica de esta fase, donde al inicio sucede una vasoconstricción momentánea; luego sucede la vasodilatación en arteriolas o vénulas, se incrementa el flujo en los capilares, produciendo calor y eritema que son signos cardinales de la inflamación, se da un incremento de la permeabilidad vascular con exudado, el cual es un líquido rico en proteínas que se dirige hacia el exterior de los vasos sanguíneos; la salida de proteínas provoca que se reduzca la presión osmótica capilar y se incremente la presión osmótica intersticial (Valencia et al., 2014, párr.8).

La vasodilatación es inducida por la acción de distintos mediadores, como la histamina y el óxido nítrico. Además, el incremento de la permeabilidad que caracteriza a la inflamación aguda deriva de la formación de espacios endoteliales en las vénulas de la microcirculación. La unión de los mediadores químicos a los receptores del endotelio provoca la contracción de las células endoteliales y la separación de las uniones intercelulares. Este es el mecanismo más común de la fuga vascular, y es inducido por histamina, bradicinina, leucotrienos y muchos otros tipos de sustancias proinflamatorias (Grossman et al., 2014, p.308).

Lo mencionado anteriormente, sumado al incremento de la presión capilar, genera que hacia el exterior del capilar se dé un gran flujo sanguíneo, con una consiguiente acumulación en los tejidos cercanos; esto conlleva a la producción de dolor, tumefacción y alteraciones de la función del órgano o tejido (los anteriores son signos cardinales también de la inflamación aguda). Con la salida de fluidos al espacio extravascular se da simultáneamente un estancamiento del flujo sanguíneo y se produce coagulación, y esto funciona como un limitante, evitando la propagación de microorganismos u objetos extraños (Grossman et al., 2014, p.308; Kumar et al., 2015, pp.73-74).

fase celular.

La fase celular correspondiente a la inflamación aguda requiere el reclutamiento de leucocitos, en mayor medida de neutrófilos, hacia el lugar de la lesión para ejercer su efecto de protección del organismo, y esto puede desarrollarse en varias etapas, llamadas adhesión y marginación, migración y quimiotaxis. El reclutamiento de estas células hacia las vénulas de las cuales salen de circulación es facilitado por la menor velocidad del flujo y la marginación en la superficie del vaso; la adhesión y la migración de leucocitos a partir del interior del vaso al exterior se facilita por moléculas complementarias de adhesión, como selectinas e integrinas en la superficie del vaso y del leucocito; luego de salir del vaso estos migran hasta la lesión por quimiotaxis o se orientan por gradiente químico. En la figura 1 se muestran los distintos tipos de células involucradas en esta fase de la inflamación (Grossman et al., 2014, p.309; Valencia et al., 2014, párr.9-15).

Cuando en los cambios vasculares los eritrocitos disminuyen su velocidad y se agrupan al centro de los vasos, proceso llamado estasis, dejan a los leucocitos en la periferia o la pared vascular, fenómeno que se conoce como marginación. Otro subproceso se conoce como rotadura, el cual se refiere a una adhesión transitoria de los leucocitos al endotelio vascular, facilitando aún más la agregación de células nucleadas, y esto principalmente se debe a moléculas de adhesión conocidas como selectinas (CD62E y CD62P) que se encuentran en las células del endotelio, las cuales se unen a su ligando en el leucocito (Valencia et al., 2014, párr.10).

Luego de los procesos, descritos anteriormente, ocurre la adhesión, cuando los leucocitos se unen con fuerza al endotelio vascular a través de moléculas de la familia de las inmunoglobulinas presentes en la pared vascular llamadas moléculas de adhesión intercelular (CAM) y moléculas de adhesión vascular (VCAM) por medio de glucoproteínas transmembrana conocidas como integrinas de los leucocitos. Se da la transmigración o diapédesis, es decir; la migración de los leucocitos a través de las células endoteliales ayudadas por moléculas de adhesión modificadas, la principal es la PECAM o CD 31 (Kumar et al., 2015, p.76; Valencia et al., 2014, párr. 11-12).

La quimiotaxis inicia cuando las células nucleadas salen de la luz de los vasos, deben dirigirse al tejido dañado a través de sustancias y mediadores químicos (quimioatrayentes) que funcionan como una indicación a dichas células; estas sustancias pueden ser propias del organismo, como las citocinas, productos del metabolismo del ácido araquidónico, factores del complemento o de patógenos externos como ciertas sustancias conformacionales de las bacterias. Todos estos quimioatrayentes activan la formación de actina mediante proteínas G de membrana para la motilidad celular (Grossman et al., 2014, p.314; Kumar et al., 2015, p.77).

La activación de leucocitos ocurre con los productos generados luego de la lesión tisular, provocando respuesta de los leucocitos como fagocitosis y eliminación celular. La opsonización de los microbios por el factor C3b del complemento y los anticuerpos, facilita el reconocimiento por los receptores específicos en neutrófilos; cuando estos receptores son activados se produce una señalización intracelular y el ensamblaje de actina en el neutrófilo, y con esto se induce la formación de pseudópodos que rodean al agente causante de la inflamación al interior de un fagosoma, que luego se mezcla con un lisosoma intracelular, formando un fagolisosoma, en el cual

son liberadas enzimas lisosómicas y radicales de oxígeno para matar y degradar al agente extraño. (Kumar et al., 2015, p.78; Valencia et al., 2014, párr.15).

Las células endoteliales forman parte de la fase celular, ya que son el único recubrimiento epitelial de los vasos sanguíneos; estas células producen sustancias antiplaquetarias y antitrombóticas que controlan la permeabilidad, y por medio de vasodilatadores y vasoconstrictores que regulan el flujo sanguíneo. Estas células participan en la respuesta inflamatoria, como barrera que permite una permeabilidad selectiva para los estímulos inflamatorios exógenos y endógenos, controla la salida de leucocitos al exterior por la expresión de moléculas de adhesión celular y receptores; además, regulan la respuesta inmune por síntesis de mediadores inflamatorios y regulan crecimiento de estas células por factores estimuladores de colonias (FEC). Las células endoteliales colaboran en la reparación paralela a la inflamación, producen factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis y la producción de matriz extracelular (Grossman et al., 2014, p.310).

Las plaquetas o trombocitos son otro factor importante en la fase celular; son derivados fragmentados de células, presentes en la sangre y participan en la hemostasia primaria. Las plaquetas activadas liberan algunos mediadores inflamatorios potentes, alrededor de 300 proteínas, y se cree que la mayoría son proinflamatorias, que incrementan la permeabilidad vascular y alteran las propiedades quimiotácticas, adhesivas y proteolíticas de las células endoteliales. Las plaquetas se asocian a patologías inflamatorias, donde se ha confirmado su relación con su activación (Grossman et al., 2014, p.310).

neutrófilos y monocitos.

Los macrófagos y los neutrófilos son leucocitos con capacidad fagocítica; circulan en grandes cantidades y en algunas horas acuden al sitio de lesión. Estos dos tipos de leucocitos expresan en su superficie receptores y moléculas que influyen en su activación. Algunos de estos receptores son receptores de manosa, que se unen a glucoproteínas de bacterias, receptores tipo Toll que responden a varios microorganismos; además, son receptores para comunicación celular que reconocen citocinas y quimiocinas específicas que se sintetizan cuando hay infección o lesión de tejidos; también moléculas de adhesión celular que afectan la adhesión de leucocitos, y

receptores de complemento que reconocen fragmentos de degradación del receptor en la superficie de bacterias (Grossman et al., 2014, p.311; Kumar et al., 2015, pp.78-79).

Los neutrófilos son los principales fagocitos; acuden al sitio de inflamación aproximadamente en 90 minutos de ocurrida la lesión; su núcleo está dividido entre 3 a 5 lóbulos, y por ello también se les conoce como polimorfonucleares. Los leucocitos que presentan gránulos en el citoplasma que lo distingue se llaman granulocitos, y estos gránulos citoplasmáticos contienen enzimas y sustancias antibacterianas para eliminar microorganismos y tejido muerto por endocitosis. Estas células, además, tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno y óxido nítrico que ayudan a la destrucción del contenido endocitado (Grossman et al., 2014, p.311; Kumar et al., 2015, pp.77-79; Valencia et al., 2014, párr.69).

En cuanto a los monocitos o macrófagos, existen varias clases de macrófagos agrupados en lo que se denomina sistema mononuclear fagocítico, que está formado por promonocitos de la médula ósea, monocitos circulantes y macrófagos fijos en los tejidos o histiocitos, que se encuentran en todas las fases de la inflamación, desde su inicio hasta la reparación; estas células llegan al sitio de inflamación y realizan sus funciones fagocíticas varios días. Estas células forman parte de la inmunidad celular innata (inflamación); es decir, inician una respuesta natural contra los microorganismos, porque expresan receptores de membrana para numerosas moléculas bacterianas (Grossman et al., 2014, p.311).

Los monocitos y macrófagos producen sustancias con actividad sobre los vasos sanguíneos, como prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas (PAF), citocinas inflamatorias y factores de crecimiento que favorecen la regeneración de tejidos. Los macrófagos pueden fagocitar cantidades mucho mayores de sustancias extrañas que los neutrófilos, cuentan con un mayor tiempo de vida, ayudan a eliminar el objeto extraño, propician el inicio de la cicatrización, contribuyen a que el proceso inflamatorio se resuelva; además, en la inflamación crónica el cuerpo extraño que no se pueda digerir lo rodean creando una especie de muro (Grossman et al., 2014, p.311; Kumar et al., 2015, p.82; Valencia et al., 2014, párr.79).

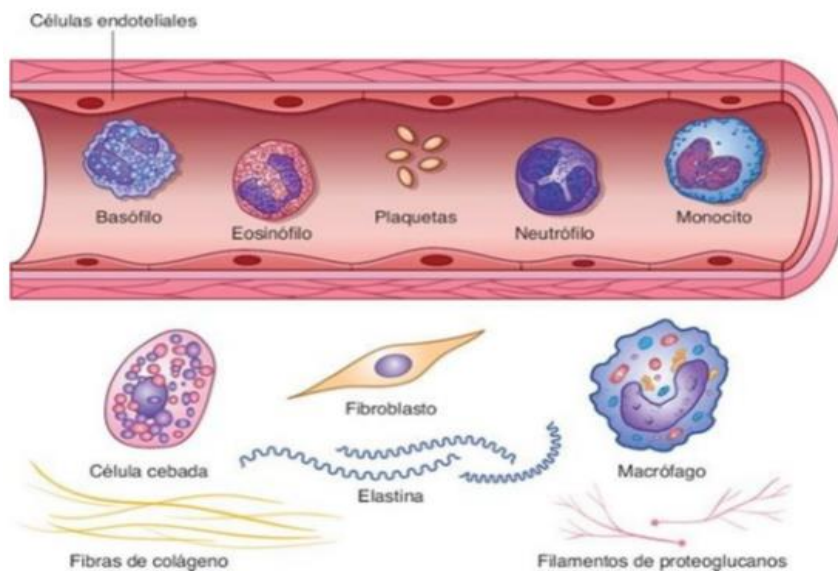
eosinófilos, basófilos y células cebadas.

Las células cebadas, los eosinófilos y basófilos sintetizan mediadores de tipo lipídico y citocinas que provocan inflamación. Estas células contienen gránulos en su citoplasma que culminan produciendo la inflamación, sobre todo la relacionada con reacciones alérgicas y de hipersensibilidad inmediata. Los eosinófilos son reclutados al lugar de la inflamación de un modo parecido al que ocurre con los neutrófilos; estos granulocitos aumentan en las infecciones parasitarias y en reacciones alérgicas; los gránulos de estas células contienen sustancia proteica muy tóxica para parásitos que no pueden fagocitarse, y otra función importante es que en reacciones alérgicas controlan la liberación específica de mediadores químicos (Grossman et al., 2014, pp.311-312).

Otros granulocitos sanguíneos son los basófilos, que poseen una estructura y funciones comparables a las células cebadas en los tejidos conectivos; se originan de progenitores en la médula ósea, sus gránulos contienen histamina y otros mediadores proinflamatorios; estos granulocitos y las células cebadas se unen a las inmunoglobulinas E (IgE), y estas inmunoglobulinas son producidas por células plasmáticas; cuando ocurre esta unión con la inmunoglobulina se da la liberación de histamina y sustancias que afectan los vasos sanguíneos (Grossman et al., 2014, p.312).

Las células cebadas o mastocitos derivan de los mismos progenitores de los basófilos, pero se desarrollan hasta que se depositan en los tejidos; cuando estas células son activadas por parásitos helmintos o IgE se libera del contenido de sus gránulos histamina, proteoglicanos, citocinas (FNT α y IL16) y proteasas; además, sintetizan otros mediadores de tipo lipídico como metabolitos de ácido araquidónico como el PAF y prostaglandinas, y por otro lado estimulan también a monocitos y macrófagos a producir citosinas y quimiocinas (Kumar et al., 2015, p.82; Valencia et al., 2014, párr.75).

Figura 2. Células Inflamatorias de la Fase Aguda



Nota: Grossman et al. (2014)

Mediadores inflamatorios

El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos; es un derivado del ácido linoleico; se encuentra en la dieta o incorporado a la fosfatidilcolina o fosfatidilinositol, los cuales son fosfolípidos estructurales de las membranas plasmáticas de todas las células. Este ácido se libera por acción de las fosfolipasas, las cuales pueden ser estimuladas por diversos factores a partir de cualquier célula activada; una vez liberado por las fosfolipasas, y luego de reacciones complejas se producen derivados llamados Eicosanoides, y para llegar a esto el ácido araquidónico puede metabolizarse por 2 vías distintas, como se muestra en la figura 2 (Grossman et al., 2014, p.313; Kumar et al., 2015, pp.83-84; Valencia et al., 2014, párr.41).

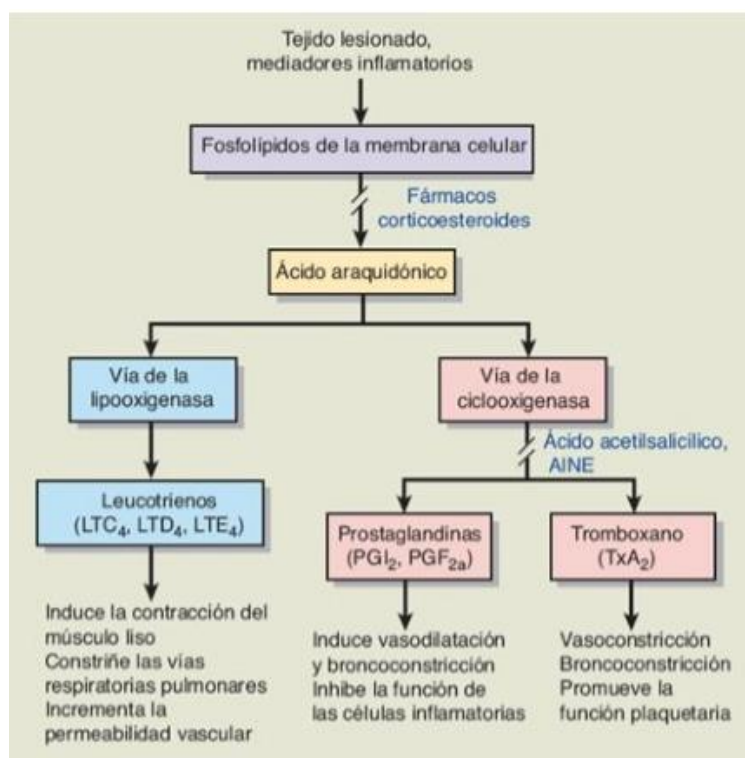
Una de las vías del metabolismo del ácido araquidónico, es la de las enzimas ciclooxigenasas, a las que principalmente se les conocen la forma constitutiva COX-1 y la inducible COX-2; estas ciclooxigenasas generan intermediarios que, después de ser procesados por enzimas específicas en algunas células, producen las prostaglandinas, como la PGD2 producida por mastocitos, PGE2 por macrófagos y células endoteliales, entre otros tipos; además, se producen los tromboxanos, uno de ellos el TXA2, el principal metabolito del ácido araquidónico generado por las plaquetas; el endotelio vascular no produce tromboxanos, pero posee una prostaciclina sintetasa

y, por tanto, genera prostaciclina (PGI₂). Los efectos de PGD₂ y PGE₂ son vasodilatación, dolor y fiebre; las prostaciclinas PGI₂ causan vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria, y los tromboxanos TXA₂ provocan vasoconstricción y activación de la agregación plaquetaria (Grossman et al., 2014, p.314; Kumar et al., 2015, p.84; Valencia et al., 2014, párr.42).

La otra vía para metabolizar el ácido araquidónico es el de las lipooxigenasas; en esta vía el ácido araquidónico es convertido en una serie de ácidos peroxidados que corresponden a los leucotrienos y las lipoxinas. En el caso de los leucotrienos, como el LTB₄, actúa como quimiotáctico y activador de los neutrófilos; los otros leucotrienos son vasoconstrictores, inducen el broncoespasmo y aumentan la permeabilidad vascular de una manera más potente que la histamina (Grossman et al., 2014, p.315; Kumar et al., 2015, p.85; Valencia et al., 2014, párr.45).

Las lipoxinas, que también son derivados del ácido araquidónico, tienen un efecto antiinflamatorio y participan en la resolución de esta, ya que provocan vasodilatación, inhibición de la adhesión de los neutrófilos. Las lipoxinas, a diferencia del resto de los derivados del ácido araquidónico, necesitan dos tipos celulares para ser sintetizados; en un inicio los neutrófilos que producen son intermediarios de su síntesis, y luego son convertidos en lipoxinas por las plaquetas (Kumar et al., 2015, p.85; Valencia et al., 2014, párr.46).

Figura 3. Vías de la Lipooxigenasa y Ciclooxygenasa, y Sitios Donde los Fármacos Esteroideos y No Esteroideos Ejercen su Acción



Nota: Grossman et al. (2014)

histamina y serotonina.

Estas 2 sustancias son las aminas vasoactivas principales que actúan de inmediato en la fase vascular, se almacenan preformadas en gránulos en células cebadas y basófilos circulantes, por lo que son mediadores tempranos de la inflamación. Los mastocitos liberan histamina cuando se produce desgranulación, como respuesta a estímulos como daño, traumatismo, frío o calor; unión de anticuerpos a los mastocitos, como ocurre en reacciones alérgicas; unión de elementos del sistema del complemento denominados anafilotoxinas (sobre todo $C3a$, $C5a$); proteínas que inducen la liberación de histamina derivadas de leucocitos; neuropéptidos como la sustancia P y citocinas (IL-1, IL-8) (Kumar et al., 2015, p.84; Valencia et al., 2014, párr.47).

La histamina causa dilatación de arteriolas y aumenta la permeabilidad de las vénulas; se considera el principal causante del aumento de permeabilidad vascular en el momento, produciendo

espacios intercelulares en el endotelio en las vénulas que favorecen la salida del exudado plasmático. Este efecto se realiza a través de receptores H_1 presentes en las células endoteliales. La serotonina produce efectos similares y se encuentra preformada en las plaquetas y en ciertas células neuroendocrinas como en el tracto gastrointestinal; la liberación de estas 2 sustancias también se puede presentar y se activa cuando las plaquetas se agregan en contacto con el colágeno, la trombina, ADP y complejos antígeno-anticuerpo (Kumar et al., 2015, p.83; Valencia et al., 2014, párr.49-50).

factor activador de plaquetas (paf).

El factor activador de plaquetas es otro mediador derivado de fosfolípidos, el cual proviene de plaquetas, mastocitos, basófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales. Sus funciones son: favorecer la agregación de las plaquetas, vasoconstricción y broncoconstricción, adhesión leucocitaria al endotelio, quimiotaxis de neutrófilos, desgranulación y estallido oxidativo; activación de la síntesis de eicosanoides (Grossman et al., 2014, p.315; Kumar et al., 2015, p.89; Valencia et al., 2014, párr.57).

proteínas del plasma.

Las proteínas del plasma que participan como mediadores químicos engloban a 3 sistemas interrelacionados que incluyen la coagulación, el sistema de complemento y las cininas (Kumar et al., 2015, p.89; Valencia et al., 2014, párr.51-54).

El sistema de coagulación está implicado en la fase vascular de la inflamación principalmente por medio de los fibrinopéptidos que se producen en la etapa final de coagulación. La proteasa trombina, que se une a los llamados receptores activados por proteasa (RAP), es parte de la interacción final entre el sistema de la coagulación y la inflamación. Cuando el receptor RAP interactúa con la trombina o proteasas, provoca varias respuestas proinflamatorias, como síntesis de quimiocinas, promueve expresión de moléculas de adhesión endoteliales, inducción de la síntesis de prostaglandinas y producción de PAF (Grossman et al., 2014, p.315; (Kumar et al., 2015, p.89; Valencia et al., 2014, párr.51-54).

La otra parte de estos sistemas, que actúan en conjunto, es el sistema del complemento, donde hay proteínas que facilitan la cascada de la inflamación al incrementar la permeabilidad vascular, mejorar la fagocitosis e inducir vasodilatación. Este sistema está formado por 20 proteínas, incluyendo, además, sus productos de escisión, los cuales en plasma mayormente son inactivos; varias de estas proteínas se activan para convertirse en enzimas proteolíticas que degradan a otras proteínas del complemento, actúan formando una secuencia de acciones que desempeñan un papel importante tanto en la inmunidad como en la inflamación (Grossman et al., 2014, p.316; Kumar et al., 2015, p.89; Valencia et al., 2014, párr.55).

Existen proteínas plasmáticas llamadas cininógenos; el sistema cinina genera péptidos vasoactivos a partir de los cininógenos por proteasas llamadas calicreínas; cuando este sistema se activa, favorece la liberación de bradicinina, que incrementa la permeabilidad vascular y provoca la contracción de músculo liso, la dilatación de los vasos sanguíneos; cuando se inyecta en la piel, bradicinina, causa un efecto similar al de histamina, su acción es breve, ya que se inactiva por una enzima llamada cininasa o en pulmones por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) si no fueron degradadas por la cininasa (Grossman et al., 2014, p.316; Kumar et al., 2015, p.89).

citocinas y quimiocinas.

Las citocinas se producen por distintos tipos de células, mayormente por macrófagos y linfocitos activados, también por células del endotelio, epitelio y tejido conectivo. Estas citocinas son proteínas que participan tanto en las respuestas inmunitarias, infecciones, lesiones, así como en la inflamación aguda y crónica. Dentro de las principales citocinas se encuentra interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). La respuesta sistémica a estos compuestos proteicos incluye fiebre, disminución de la presión arterial, efecto cronotrópico positivo, anorexia, propicia la liberación de neutrófilos a circulación y, además, se elevan las concentraciones de corticoesteroides endógenos. Las citocinas quimiotácticas, o quimiocinas, son una familia de proteínas pequeñas que actúan de manera primordial como quimioatrayentes para reclutar y dirigir la migración de las células inmunitarias e inflamatorias (Grossman et al., 2014, p.316; Kumar et al., 2015, p.86; Valencia et al., 2014, párr.57-58).

radicales libres derivados del óxido nítrico y del oxígeno.

Los radicales libres, derivados del óxido nítrico (NO) y el oxígeno, tienen implicaciones importantes en la inflamación; en el caso del NO, el cual se produce en distintas células, causa relajación del músculo liso y actúa contrario a la adhesión, la agregación y la desgranulación de las plaquetas, y actúa como un regulador de leucocitos; cantidades elevadas del óxido reducen el número de leucocitos, y una disminución del compuesto puede aumentar la adhesión leucocitaria; por esta razón parece ser un regulador de la respuesta celular en la inflamación (Grossman et al., 2014, p.316; Kumar et al., 2015, p.79; Valencia et al., 2014, párr.60).

En el caso de los radicales libres de oxígeno, pueden liberarse hacia el medio extracelular a partir de los leucocitos tras la exposición a microorganismos, citocinas y complejos inmunitarios, o durante la fagocitosis en la fase celular del proceso inflamatorio. El radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son las principales especies que se producen en las células; por otra parte, estas sustancias pueden combinarse con el óxido nítrico para producir productos de nitrógeno que pueden favorecer el proceso inflamatorio y provocar daños mayores en tejidos (Grossman et al., 2014, p.316; Kumar et al., 2015, p.79; Valencia et al., 2014, párr.61-62).

Inflamación crónica

Este tipo de inflamación crónica se caracteriza por mantenerse durante semanas, meses y en casos incluso hasta años; se puede presentar después de una inflamación aguda que sea recurrente o progresiva, o también se puede presentar por continuas respuestas pequeñas y rápidas que no tienen una magnitud para considerarse como inflamación aguda. Este tipo de inflamación presenta infiltración de macrófagos y linfocitos, no así de neutrófilos, como sucede en la inflamación aguda; también se da la proliferación de fibroblastos en lugar de la producción de exudados, lo que aumenta el riesgo de deformaciones y cicatrización (Grossman et al., 2014, p. 317; Kumar et al., 2015, p. 93; Valencia et al., 2014, párr. 94-95).

Algunas causas características de inflamación crónica son infecciones recurrentes de baja intensidad o pueden provocar irritación que no es capaz de ser profunda o expandirse con rapidez; algunos de estos causantes pueden ser asbesto, sílice, talco, materiales de sutura quirúrgicos, virus,

bacterias como el bacilo de tuberculosis y la treponema causante de sífilis, hongos y parásitos de mayor tamaño. En algunas fracturas donde exista tejido lastimado alrededor de la reparación de hueso dañado, puede ocurrir inflamación crónica de dicho tejido. Se piensa que los mecanismos de defensa influyen en el desarrollo de la inflamación crónica, la cual se agrupa en 2 tipos, de acuerdo con sus patrones: en inflamación crónica inespecífica e inflamación granulomatosa (Grossman et al., 2014, p.317; Kumar et al., 2015, p.93).

inflamación crónica inespecífica.

Este tipo de inflamación crónica inespecífica se caracteriza por una acumulación difusa de macrófagos y linfocitos en el lugar de la lesión; se presenta una acumulación de macrófagos debido a la quimiotaxis recurrente que provoca que estas células infiltren el sitio de inflamación y, además, a su mayor tiempo de vida y a la inmovilización que sufren estas células. Con lo anterior se da la proliferación de fibroblastos, lo que conduce a cicatrización, ocasionando muchas veces que se sustituya tejido normal conectivo o tejido parenquimatoso funcional por tejido cicatrizal (Grossman et al., 2014, p.317).

inflamación granulomatosa.

La inflamación granulomatosa está relacionada con objetos extraños como asbesto, astillas, suturas, microorganismos como los causantes de sífilis, tuberculosis, sarcoidosis, brucelosis y, además, infecciones micóticas profundas. Estos agentes causales tienen la característica que no pueden ser fagocitados de una manera adecuada y no se logran controlar bien por otros mecanismos antiinflamatorios (Grossman et al., 2014, p.317; Kumar et al., 2015, p.93; Valencia et al., 2014, párr.97).

Se denomina granuloma a lesiones pequeñas entre 1 a 2 milímetros, en la cual existe una acumulación de macrófagos rodeados por linfocitos; estas modificaciones en las células monocíticas causan que se parezcan a células epiteliales con lo cual se denominan epiteloides. Este tipo de células epiteloides pueden aglomerarse y producir lo que se asemeja a una célula gigantesca con múltiples núcleos que rodea el cuerpo extraño, y luego de un tiempo se crea una membrana de tejido conectivo denso que aísla la lesión (Grossman et al., 2014, p.317).

Resolución de la inflamación

Aunque la inflamación es un fenómeno biológico que se desarrolló a lo largo del periodo evolutivo, cuyo propósito es eliminar o limitar el daño y repararlo, sus efectos son potencialmente dañinos también para el organismo y se convierte, así, en una herramienta que puede ser nociva, ya que, una vez desencadenado el proceso, puede provocar enfermedades graves. La reacción inflamatoria es la base donde se asientan enfermedades reumatológicas y su tratamiento (antiinflamatorio), por lo que mientras se aumente el conocimiento sobre la respuesta inflamatoria, aumentarán también las posibilidades de ofrecer tratamientos adecuados y eficaces para los pacientes (Valencia et al., 2014, párr.5).

Contrarrestar la inflamación es un problema común que tienen los profesionales de la salud, ante una gran cantidad de enfermedades; por esta razón es importante comprender los mecanismos moleculares y celulares responsables que actúan en la inflamación para diseñar nuevas y mejores terapias. Por medio de teorías modernas, realizadas en este campo, se sugiere que una forma de lograr una terapia antiinflamatoria mejor y más eficiente es utilizar vías endógenas y moléculas que el cuerpo ya posee, que funcionan como antiinflamatorios (Dufton y Perretti, 2010, p.176).

La fase de resolución de la inflamación se inicia con cambios en la biosíntesis de los mediadores lipídicos. Este interruptor genera mediadores especializados prorresolutivos, que son capaces de influir en la apoptosis y la eferocitosis, 2 parámetros claves para la resolución de la inflamación. Por medio de activación de receptores por estos mediadores, y la señalización provocada, los macrófagos promueven la resolución de la inflamación al fagocitar eficientemente células moribundas, evitando así la interrupción celular y la liberación de contenidos inflamatorios; además, producen mediadores antiinflamatorios que amortiguan las respuestas proinflamatorias (Corminboeuf et al., 2015, p.2).

Cuando se elimina el agente causal de la inflamación correctamente, es la primera señal para promover la resolución de la inflamación, ya que se activan las vías de prorresolución para restaurar la estructura, función y homeostasis del tejido, por lo que se liberan moléculas antiinflamatorias y prorresolventes, mediadores lipídicos como Lipoxina A4, resolvinas, maresinas y protectinas, péptidos y proteínas como melanocortinas, galectinas y Anexina A1, y varias otras

sustancias de diferente naturaleza al sitio de inflamación. Estas moléculas prorresolutivas endógenas disminuyen la activación endotelial, reducen la infiltración de leucocitos y activan la apoptosis de neutrófilos; esto causa que los macrófagos fagociten eficazmente células apoptóticas, proceso llamado eferocitosis (Amantéa et al., 2016, pp.1-2).

Las células apoptóticas son evaluadas por células viables, típicamente macrófagos, y la ingestión de estas células apoptóticas desencadena en los macrófagos la liberación de citoquinas de resolución inflamatoria. Si las células apoptóticas no se ingieren rápidamente, a menudo se desarrolla necrosis y se liberan productos que generan señales proinflamatorias. Por lo tanto, la inflamación puede prolongarse por una falla de los neutrófilos para sufrir una apoptosis o por una falla de los macrófagos para eliminar las células apoptóticas (Nathan y Ding, 2010, p.874).

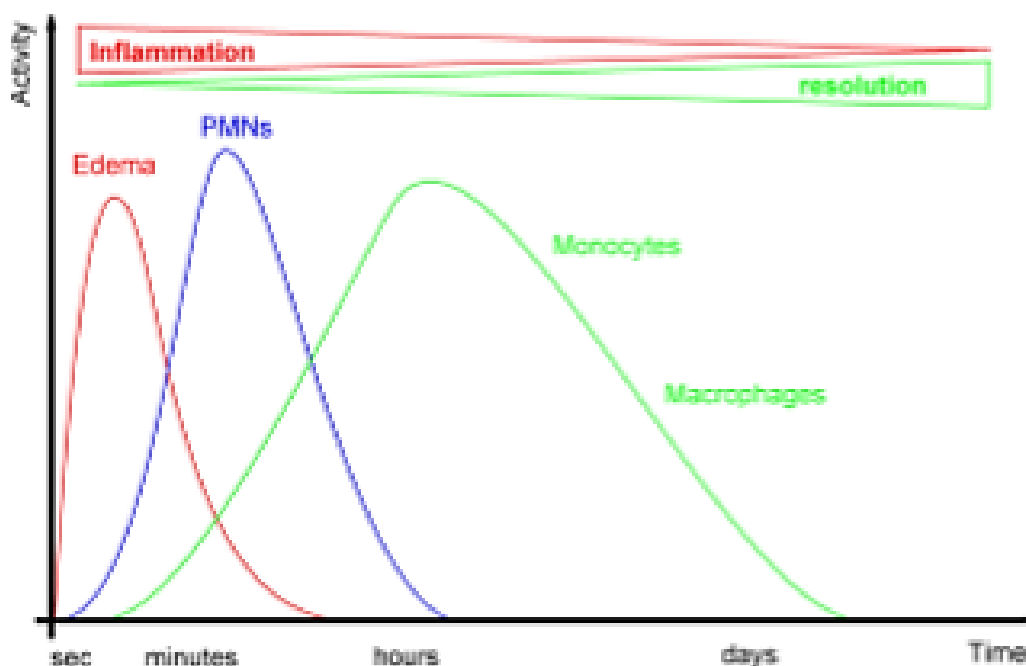
Además, se ha demostrado que la resolvina E1 estimula la producción endógena de Lipoxina A4, lo que demuestra que el proceso es un mecanismo progresivo. Esta cascada de resolución especializada previamente desconocida puede ser útil en el desarrollo de nuevas terapias que estimulen la resolución de la inflamación. Además, se ha demostrado que los mediadores prorresolutivos, como las resolvinas y específicamente la Lipoxina A4, estimulan moléculas antiinflamatorias adicionales in vivo, como la interleucina-10 (IL-10) (Corminboeuf et al., 2015, p.3).

Los leucocitos, como los neutrófilos y los macrófagos, juegan un papel clave en la respuesta inflamatoria, mediante la liberación de sustancias proinflamatorias adicionales y la acción de las células vectoriales y los fagocitos para eliminar el agente causal de la inflamación o que desencadena el proceso inflamatorio. A pesar de los importantes roles de los neutrófilos para una eficaz defensa del organismo, deben ser eliminadas y reguladas. Una inflamación continua o prolongada provoca una respuesta más fuerte y duradera, y esto puede ocasionar daños en el organismo y producir una inflamación crónica (Amantéa et al., 2016, p.1).

La respuesta inflamatoria del huésped requiere una regulación estricta y un adecuado control, para evitar excesos, prolongaciones y daños autoprovocados. Las distintas clases de mediadores proinflamatorios operan en paralelo y en serie; con ello provocan los signos clásicos

de inflamación como edema, migración celular, y nocicepción, mientras que una cantidad igual de mediadores antiinflamatorios endógenos contrarrestan y dirigen una respuesta de resolución de la inflamación, en respuesta a los agentes que produjeron inicialmente el proceso inflamatorio. Este último aspecto ha despertado interés en los últimos años, por lo que clases de inhibidores endógenos peptídicos o no peptídicos con características específicas en la inflamación han sido identificados y caracterizados (Dufton et al., 2010, p.176).

Figura 4. Representación Esquemática de Respuesta Inflamatoria y Resolución en el Tiempo



Nota: Cotran, Kumar y Collins (1999), citados por Corminboeuf et al. (2015)

Corticoides

Los antiinflamatorios esteroideos (glucocorticoides) son ampliamente utilizados en distintas patologías desde su invención por su gran efecto sobre la inflamación; independientemente del origen de esta, surgieron como derivados del cortisol, el cual se produce fisiológicamente por respuesta a estrés emocional o físico. El uso de corticoides como una terapia revolucionaria antiinflamatoria, inició cuando se aplicaron los resultados obtenidos en el

laboratorio y se trasladaron a la práctica clínica, lo que se conoce hoy en día como medicina traslacional (Serra et al., 2012, p.158).

Los glucocorticoides se descubrieron en la década de 1940, y con su uso en enfermedades reumatológicas, se otorgó el Premio Nobel en Fisiología y Medicina para Hench, Kendall y Reichstein, en 1950. Los glucocorticoides son hormonas esenciales del estrés que se unen a receptores de glucocorticoides, y desempeñan un papel en diferentes procesos fundamentales como la homeostasis metabólica, cognición, salud mental, proliferación celular, desarrollo, reproducción e inflamación. Varios trastornos autoinmunes, inflamatorios y alérgicos, tales como como artritis reumatoide, lupus eritematoso, enfermedad inflamatoria intestinal, trasplante/rechazo de órganos y asma, a menudo se tratan con antiinflamatorios glucocorticoides sintéticos como la dexametasona y prednisolona. Por esta razón los antiinflamatorios esteroides se encuentran entre los medicamentos más recetados (Vandewalle et al., 2018, p.42).

Los corticosteroides, así como sus derivados sintéticos biológicamente activos, difieren en sus actividades metabólicas. Por una parte, los efectos conocidos como glucocorticoides, y los efectos reguladores de electrolitos llamados mineralocorticoides. Se utilizan en dosis fisiológicas como terapia de reemplazo cuando la producción endógena se ve afectada. Los glucocorticoides suprimen potentemente la inflamación, y su uso en enfermedades inflamatorias y autoinmunes es común. En los humanos, el cortisol es el principal glucocorticoide, y la aldosterona es el mineralocorticoide fisiológico (Brunton et al., 2018, p.1209).

El efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides se obtiene por distintas acciones como lo son: la reducción de la concentración, distribución y función de los leucocitos en la periferia, disminución de la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos, enzimas proinflamatorias, producción de peróxido por los neutrófilos, eosinófilos e inmunoglobulinas, desencadenan la apoptosis y disminuyen los factores quimiotácticos, como la IL3, IL5; además, causan vasoconstricción, lo que disminuye la permeabilidad capilar, inhibiendo la actividad de kininas, endotoxinas bacterianas y cantidad de histamina liberada por basófilos (Gómez et al., 2007, p. 58).

Los glucocorticoides son utilizados en diversas patologías en combinaciones con inmunodepresores o en monoterapia para prevenir rechazo de órganos, exacerbaciones agudas de trastornos inmunitarios, en la enfermedad de injerto contra hospedador en el trasplante de médula ósea; además, se utilizan de forma sistematizada para patologías autoinmunes como artritis reumatoide, otros tipos de artritis, lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis sistémica, psoriasis, varias patologías de la piel, asma, trastornos alérgicos, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades oftálmicas de tipo inflamatorio, trastornos hematológicos inmunitarios y en casos de exacerbaciones agudas de esclerosis múltiple (Brunton et al., 2012, p. 1210).

Los glucocorticoides son lipofílicos y pueden difundirse libremente a través de la membrana celular; desde ahí ejercen su acción cuando se unen al receptor glucocorticoide (GR). En ausencia de glucocorticoides, el receptor para estos compuestos se localiza predominantemente en el citoplasma en un complejo que contiene proteínas de choque térmico, inmunofilinas y otros factores que evitan su degradación y mejoran su afinidad por su ligando. Al unirse al ligando, estos receptores experimentan un cambio conformacional, dando como resultado una disociación parcial del complejo chaperón y la translocación nuclear. En el núcleo, el receptor de glucocorticoides interactúa con el ADN, así como con otras proteínas, y funciona como factor de transcripción (Vandewalle et al., 2018, p.43).

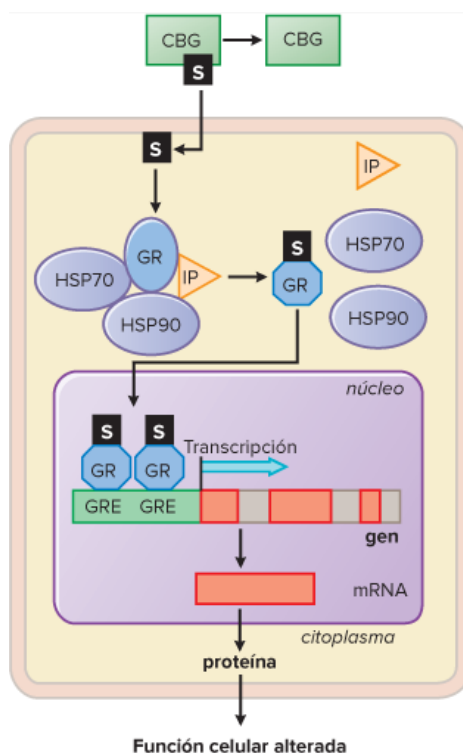
Los glucocorticoides tienen dos vías principales para producir sus efectos, mecanismos no genómicos: a dosis altas y de manera rápida, como la alteración de membranas celulares, y mecanismos genómicos, que son generados a dosis bajas y de manera lenta; por ejemplo: síntesis de proteínas antiinflamatorias inhibidoras de citocinas (Gómez et al., 2007, p. 66; Vandewalle et al., 2018, p.43).

Los mecanismos no genómicos están caracterizados por el rápido inicio del efecto (menos de 15 minutos), tiempo en el cual no alcanza a ocurrir transcripción génica ni traducción proteica. Se clasifican en mecanismos específicos, cuando interactúan corticoides con el receptor, y mecanismos inespecíficos, donde no hay interacción con el receptor. Este mecanismo se ha utilizado para explicar el aumento del efecto clínico de la terapia de pulso con dosis de corticoides mayores a 250 mg (Gómez et al., 2007, p.66).

El mecanismo mejor descrito para los efectos genómicos de glucocorticoides es la transactivación (TA), la cual es una mejora de la expresión génica mediada por la unión directa de los homodímeros de los receptores a los elementos de respuesta de glucocorticoides (ERG) de los genes. Los elementos de respuesta a glucocorticoides clásicos son repeticiones invertidas de nucleótidos de semi-sitios hexaméricos separados por una secuencia de tres pares de bases. Sin embargo, solo una fracción de las secuencias de unión a receptores observadas contiene la secuencia del consenso de elementos de respuesta a corticoides (Vandewalle et al., 2018, p.43).

En el espacio plasmático los glucocorticoides están ligados a las proteínas ligadoras de glucocorticoides (CBG). Al ingresar el glucocorticoide al interior de la célula, en el citoplasma se unen a su receptor específico, se dimerizan y se traslocan al núcleo donde ejercen su acción sobre el ADN, se unen a secuencias específicas de bases, denominadas elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE). De esta manera, actúan sobre el gen promotor, lo que promueve la síntesis de ARN mensajero, el cual sale al citoplasma y es traducido en los ribosomas, para formar proteínas que son secretadas o permanecen dentro de la misma célula. Esto conlleva al efecto de respuesta de los corticoides, se muestra este proceso en la figura 5 (Gómez et al., 2007, p.67).

Figura 5. Mecanismo de Acción de los Corticoides



Nota: Brunton et al. (2018)

Además de las consecuencias que resultan de la supresión del eje hipotalámico hipofisario adrenal, el uso prolongado con glucocorticoides causa una serie de otras complicaciones. Entre algunos de los principales efectos indeseables se incluyen: anomalías de líquidos y electrolitos, hipertensión, hiperglucemia, mayor susceptibilidad a infecciones, úlceras pépticas, osteoporosis, miopatía, alteraciones del comportamiento, cataratas, detención del crecimiento y el hábito característico de sobredosis de esteroides, incluida la redistribución de grasa, estrías y equimosis (Brunton et al., 2018, p.1224).

Los glucocorticoides inducen la expresión de Anexina A1 y la expresión de FPR2/ALXR, ya que se ha observado que la administración de glucocorticoides a voluntarios humanos sanos conduce a un aumento en los niveles de expresión de anexina A1, en monocitos y neutrófilos que circulan en sangre. Los niveles de Anexina A1 también están regulados por los glucocorticoides durante la enfermedad, en pacientes con enfermedad de Cushing, asociada con niveles altos de

cortisol, que tienen niveles intracelulares más altos de anexina A1, y los leucocitos de pacientes con enfermedad de Addison, asociada con niveles bajos de cortisol, quienes tienen niveles intracelulares más bajos de anexina A1 que los pacientes sanos. Sin embargo, el mecanismo por el cual los glucocorticoides regulan la Anexina A1 no se ha definido (Perreti y D'Acquisto, 2009, p.64).

La dexametasona y otros esteroides pueden aumentar rápidamente la localización de la Anexina A1 en la superficie celular; este proceso no requiere la síntesis de nuevas proteínas y se asocia con cambios rápidos en la localización celular de la proteína. El aumento más lento en la expresión de anexina A1 en la superficie celular es consecuencia de la activación del gen; aunque la región promotora de la anexina A1 carezca de un elemento de respuesta a los glucocorticoides canónicos, no se excluye la posibilidad de que estas regiones puedan estar presentes antes de las secuencias de ADN analizadas hasta ahora; no obstante, plantea el problema de cómo los glucocorticoides podrían aumentar la expresión del gen de la anexina A1. En células monocíticas, se ha postulado la participación de factores de transcripción específicos como el factor nuclear interleucina (IL) -6 para regular la expresión del gen de la Anexina A1 (Perretti et al., 2009a, p.938).

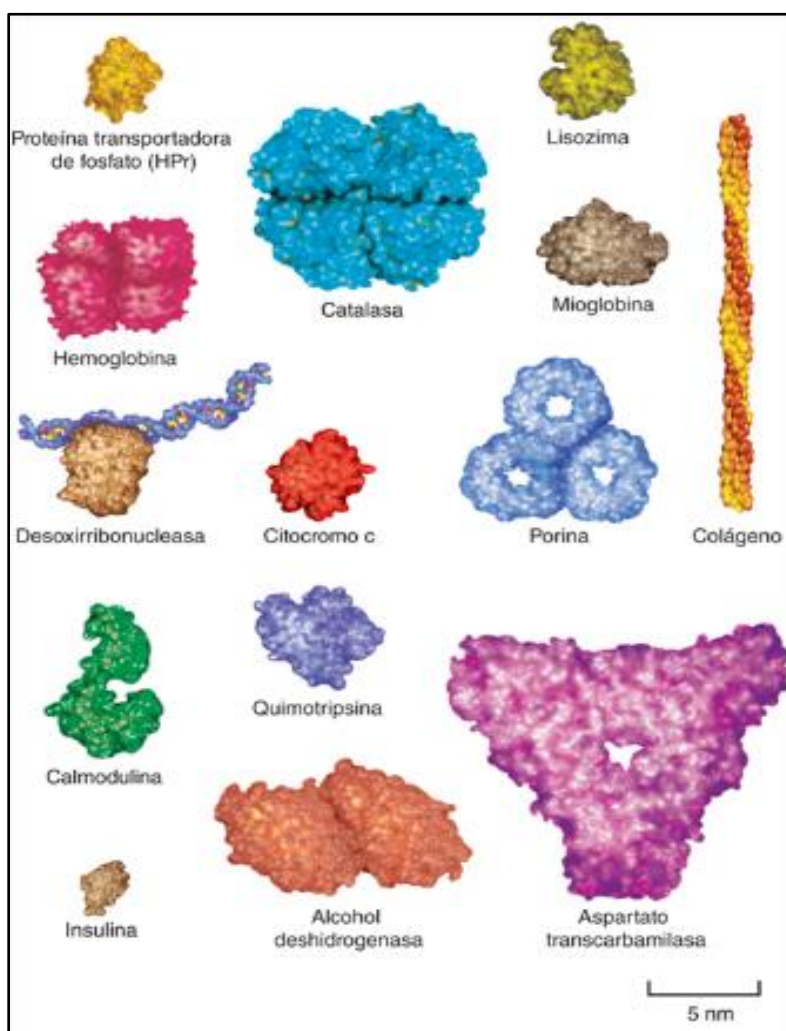
Los Aminoácidos, Péptidos y Proteínas

A nivel general, las proteínas participan prácticamente en todos los procesos que ocurren en una célula, exhibiendo una casi infinita variedad de funciones. Las proteínas de cada organismo, desde la más simple de las bacterias a los seres más complejos, se construyen a partir del mismo conjunto de 20 aminoácidos que siempre están presentes en distinta organización. Estas subunidades monoméricas relativamente simples son la clave de la estructura para los miles de proteínas que se pueden encontrar. Cada uno de estos 20 aminoácidos tiene una cadena lateral con propiedades químicas características; este conjunto puede ser considerado como un lenguaje de la estructura proteica con la cual es leído, y para generar una proteína determinada los aminoácidos se unen de manera covalente en una secuencia lineal (Nelson y Cox, 2014, p.75).

Es importante destacar que las células producen proteínas con propiedades y actividades completamente diferentes uniendo los mismos 20 aminoácidos en combinaciones y secuencias muy

diferentes, dispuestas por el código genético. A partir de estas unidades de construcción, diferentes organismos pueden generar productos tan diversos como enzimas, hormonas, anticuerpos, transportadores, fibras musculares, proteínas de las lentes de los ojos, plumas, telarañas, cuernos de rinocerontes, proteínas de la leche, antibióticos, venenos, proteínas de hongos, y miles de otras sustancias con actividades biológicas distintas. Entre estos productos de proteínas, las enzimas son las más variadas y especializadas, como catalizadores de casi todas las reacciones celulares, y son una de las claves para la comprensión de los procesos químicos en el organismo. En la figura 6 se muestran distintas proteínas del cuerpo humano (McKee, T., y McKee, J., 2014, párr.2; Nelson et al., 2014, p.75).

Figura 6. Algunas Proteínas del Cuerpo Humano en Representación 3D



Nota: McKee et al., (2014).

Los aminoácidos

Existen más de 300 aminoácidos en la Naturaleza; sin embargo, las proteínas se sintetizan de manera casi exclusivamente a partir de 20 (L) α -aminoácidos codificados por tripletes de nucleótidos llamados codones. El código genético de tres letras potencialmente podría permitir más de 20 aminoácidos; el código genético es redundante, ya que varios aminoácidos son especificados por múltiples codones. Estos aminoácidos pueden clasificarse como hidrofílicos o hidrofóbicos, propiedades que afectan su ubicación en la conformación plegada de la proteína. Algunas proteínas contienen aminoácidos adicionales que surgen por la modificación postraducciona de un aminoácido que se encontraba en un péptido (Rodwell, Bender, Botham, Kennelly, y Weil, 2016, párr.2).

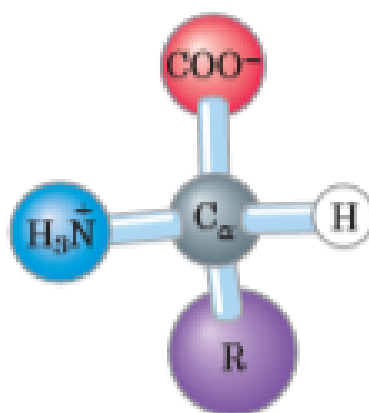
Las proteínas son polímeros de aminoácidos; cada parte residual de aminoácido unido a otro de manera lineal por un tipo específico de unión covalente; el término residuo se refiere a la pérdida de elementos de agua cuando un aminoácido se une a otro. Las proteínas pueden ser degradadas (hidrolizadas) en sus aminoácidos que las componen, por varios métodos, y los estudios de proteínas inicialmente de manera natural se enfocaron en esos aminoácidos libres derivados de las proteínas. (Nelson et al., 2014, p.76), (Lieberman y Marks, 2013, p.70), (McKee et al., 2014, párr.29).

Las proteínas pueden distinguirse con base en su número de aminoácidos (residuos de aminoácidos), en su composición o secuencia global de grupos aminoacilos. Las moléculas con pesos moleculares que van desde varios miles hasta varios millones de daltons (Da) se denominan polipéptidos. Aquellas con pesos moleculares bajos, que contienen menos de 50 aminoácidos, se denominan péptidos. El término proteína describe específicamente las moléculas con un contenido de más de 50 aminoácidos y con ello pesos moleculares muy altos. Cada proteína consta de una o de varias cadenas polipeptídicas (McKee et al., 2014, párr.4).

Todos los aminoácidos comunes son α -aminoácidos. Tienen un grupo carboxilo y un grupo amino unidos al mismo átomo de carbono; la diferencia entre los aminoácidos son sus cadenas laterales o grupos R, que varían en estructura, tamaño y carga eléctrica, y que influyen la solubilidad de los aminoácidos en agua. Además de estos 20 aminoácidos, hay muchos otros menos

comunes, algunos residuos modificados después de la síntesis de una proteína; otros son aminoácidos presentes en organismos vivos, pero no como constituyentes de proteínas; se asignan a los aminoácidos comunes abreviaturas de tres letras y símbolos de una letra, y se utilizan como abreviaturas para indicar la composición y la secuencia de aminoácidos en las proteínas (Lieberman et al., 2013, pp.70-72), (Nelson et al., 2014, p.76).

Figura 7. Estructura General de un Aminoácido



Nota: Nelson et al. (2014)

Para identificar los aminoácidos fue creado el código de tres letras, el cual es simple; las abreviaturas en general consisten en las tres primeras letras del nombre del aminoácido. También se creó un código de una letra, para simplificar aún más la identificación de los aminoácidos (Nelson et al., 2014, p.76).

En seis aminoácidos en el código de una letra (CHIMSV), su primera letra es única, la cual es su símbolo; para 5 aminoácidos (AGLPT) la primera letra no es única, pero se utilizaron para los aminoácidos más comunes en proteínas; para los otros cuatro, la letra utilizada es de acuerdo con la fonética (RFYW), y corresponden a: aRginina, Fenilalanina, tirosina del inglés tYrosine, triptófano del inglés tWiptophan. En los otros cuatro (DNEQ) se utilizaron letras encontradas en sus nombres o sugeridas, ácido aspártico del inglés asparDic, asparagiNa, glutámico del inglés glutamEke, glutamina del inglés Q-tamine. Sobraban pocas letras en el alfabeto, y la letra K fue elegida porque era la más cercana de L. En la tabla 1 se encuentran en resumen los símbolos para los aminoácidos y algunas de sus propiedades fisicoquímicas (Nelson et al., 2014, p.76).

Tabla 1. Símbolos y Algunas Propiedades Físicoquímicas de los Aminoácidos

Aminoácido	Abreviación/ símbolo	M_r^*	Valores de pK_a			pI	Índice de hidropatía [†]	Ocorrência em proteínas (%) [‡]
			pK_1 (—COOH)	pK_2 (—NH ₃ ⁺)	pK_R (grupo R)			
Grupos R alifáticos, apolares								
Glicina	Gly G	75	2,34	9,60		5,97	-0,4	7,2
Alanina	Ala A	89	2,34	9,69		6,01	1,8	7,8
Prolina	Pro P	115	1,99	10,96		6,48	-1,6	5,2
Valina	Val V	117	2,32	9,62		5,97	4,2	6,6
Leucina	Leu L	131	2,36	9,60		5,98	3,8	9,1
Isoleucina	Ile I	131	2,36	9,68		6,02	4,5	5,3
Metionina	Met M	149	2,28	9,21		5,74	1,9	2,3
Grupos R aromáticos								
Fenilalanina	Phe F	165	1,83	9,13		5,48	2,8	3,9
Tirosina	Tyr Y	181	2,20	9,11	10,07	5,66	-1,3	3,2
Triptofano	Trp W	204	2,38	9,39		5,89	-0,9	1,4
Grupos R polares, não carregados								
Serina	Ser S	105	2,21	9,15		5,68	-0,8	6,8
Treonina	Thr T	119	2,11	9,62		5,87	-0,7	5,9
Cisteína [§]	Cys C	121	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5	1,9
Asparagina	Asn N	132	2,02	8,80		5,41	-3,5	4,3
Glutamina	Gln Q	146	2,17	9,13		5,65	-3,5	4,2
Grupos R cargados positivamente								
Lisina	Lys K	146	2,18	8,95	10,53	9,74	-3,9	5,9
Histidina	His H	155	1,82	9,17	6,00	7,59	-3,2	2,3
Arginina	Arg R	174	2,17	9,04	12,48	10,76	-4,5	5,1
Grupos R cargados negativamente								
Aspartato	Asp D	133	1,88	9,60	3,65	2,77	-3,5	5,3
Glutamato	Glu E	147	2,19	9,67	4,25	3,22	-3,5	6,3

Nota: Nelson et al. (2014)

De todos los aminoácidos, excepto la glicina, el carbono α está ligado a cuatro grupos diferentes: un grupo carboxilo, un grupo amino, un grupo R y un átomo de hidrógeno; en la glicina, el grupo R es otro hidrógeno. El átomo de carbono en los aminoácidos es por esta razón un centro quiral. En consecuencia, del arreglo tetraédrico de los orbitales de unión alrededor del átomo de carbono α , los cuatro grupos diferentes pueden ocupar 2 arreglos espaciales únicos y, por lo tanto, los aminoácidos tienen 2 estereoisómeros posibles. Una vez que son imágenes especulares no superponibles entre sí, es lo que se conoce como enantiómeros (Lieberman et al., 2013, p.72).

Existen, además, 2 convenciones para identificar los carbonos en un aminoácido, lo que puede producir confusiones, y por ello es importante mencionarlo. Los carbonos adicionales en un grupo R se denominan comúnmente siguiendo el ordenamiento con letras griegas como β , γ , δ , y así sucesivamente, a partir del carbono α . Para las otras moléculas orgánicas en general, los átomos de carbono son simplemente numerados como C1 al carbono, con el sustituyente que contiene el átomo de mayor número atómico. En esa última convención, el carbono carboxílico de un aminoácido sería el C1 y el carbono sería el C2 (Nelson et al., 2014, p.77).

Cerca del total de compuestos biológicos con centro quiral ocurren naturalmente en solo una forma estereoisomérica, D o L. Los residuos de aminoácidos en moléculas proteicas que se encuentran en forma natural son exclusivamente estereoisómeros L. Los residuos de D-aminoácidos se han encontrado solo en algunos péptidos, por lo general pequeños, incluyendo algunos péptidos de paredes celulares bacterianas y ciertos antibióticos peptídicos. Para un sistema vivo, los isómeros D y L son totalmente diferentes. Las células tienen la capacidad de sintetizar específicamente los isómeros L de aminoácidos porque los sitios activos de enzimas son asimétricos, haciendo estereoespecíficas las reacciones por ellas catalizadas (Lieberman et al., 2013, p.72; Nelson et al., 2014, p.78).

Otro aminoácido adicional es la selenocisteína, que se considera el vigésimo primer aminoácido, y es un l- α -aminoácido que se encuentra en proteínas con funciones vitales. Los humanos tienen alrededor de dos docenas de selenoproteínas, incluyendo peroxidasas y reductasas, selenoproteína P, que circula en el plasma, y las yodotironinas deiodinasas que se encargan de convertir la prohormona tiroxina (T4) en la hormona tiroidea 3,3'5-triyodotironina (T3). En este caso, un átomo de selenio reemplaza el azufre en la cisteína; no es el producto de una modificación postraduccional, sino que es insertada directamente en un polipéptido en crecimiento durante la traducción (Lieberman et al., 2013, p.84; Nelson et al., 2014, p.81).

clasificación de los aminoácidos.

El conocimiento de las propiedades químicas es importante y puede simplificarse agrupando los aminoácidos en cinco clases con base en las propiedades de sus grupos R, en

particular por su polaridad o tendencia a interactuar con el agua en pH biológico cercano a pH 7,0. La polaridad de los grupos R varía ampliamente, de no polar e hidrofóbico (no hidrosoluble) al altamente polar e hidrofílico (hidrosoluble). Algunos son difíciles de caracterizar o no encajan bien en cualquier grupo, como lo son glicina, histidina y cisteína, y las atribuciones a determinados grupos son resultado de evaluaciones promediadas en vez de absolutas (Nelson et al., 2014, p.78).

aminoácidos no polares (alifáticos).

Los aminoácidos no polares contienen principalmente grupos R hidrocarbonados sin cargas positivas o negativas. Debido a su poca interacción con agua, estos aminoácidos tienen función importante en el mantenimiento de la estructura tridimensional de las proteínas. En este grupo se encuentran dos tipos de hidrocarburos en las cadenas R: las aromáticas y las alifáticas. Los aromáticos contienen estructuras cíclicas que los constituyen en una clase de hidrocarburos insaturados con nubes electrónicas π conjugadas. Alifático se refiere a hidrocarburos no aromáticos, como el metano y el ciclohexano. La glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y prolina poseen grupos R alifáticos (Lieberman et al., 2013, p.73; McKee et al., 2014, párr.11; Nelson et al., 2014, p.78).

aminoácidos aromáticos

Los aminoácidos que se agrupan dentro de esta clasificación son relativamente hidrofóbicos (apolares), entre ellos: Fenilalanina, tirosina y triptófano, con sus cadenas laterales aromáticas. Todos pueden participar en interacciones hidrofóbicas. El grupo hidroxilo en la tirosina puede formar enlaces de hidrógeno, esto es importante en algunas enzimas. La tirosina y el triptófano son más polares que la fenilalanina, debido al grupo hidroxilo de la tirosina y al nitrógeno del anillo indol del triptófano. El triptófano, la tirosina y, en menor medida, la fenilalanina, absorben la luz ultravioleta (Nelson et al., 2014, p.78).

aminoácidos polares.

Los aminoácidos polares poseen grupos funcionales capaces de formar enlaces tipo puentes de hidrógeno, interactúan con el agua, son hidrofílicos; entre este grupo se encuentran la serina,

treonina, tirosina, asparagina y glutamina. La serina, treonina y tirosina contienen un grupo hidroxilo polar, que les permite formar enlaces por puente de hidrógeno, un factor importante en la estructura proteínica. Los grupos hidroxilo cumplen además con otras funciones; un ejemplo es la formación del éster de fosfato de la tirosina, que es un mecanismo de regulación habitual. Además, los grupos hidroxilo de la serina y de la treonina son puntos de unión para los carbohidratos (Lieberman et al, 2013, p.74; McKee et al., 2014, párr.12; Nelson et al, 2014, p.80).

aminoácidos ácidos.

Los dos aminoácidos que poseen cadenas laterales con grupos carboxilo son el ácido aspártico y el glutámico; tienen carga negativa a pH fisiológico, por lo que suelen llamárseles aspartato y glutamato. La asparagina y la glutamina son derivados amida de estos aminoácidos ácidos respectivamente. Debido a que el grupo funcional amida es muy polar, la capacidad de formar enlaces por puente de hidrógeno de la asparagina y de la glutamina posee un efecto también importante en la estabilidad de proteínas (Lieberman et al., 2013, p.76; McKee et al., 2014, párr.13; Nelson et al., 2014, p.81).

aminoácidos básicos.

Los aminoácidos básicos tienen una carga positiva a pH fisiológico, razón por la cual pueden formar enlaces iónicos con los aminoácidos ácidos. La lisina posee un grupo amino, acepta un protón del agua para formar el ácido conjugado. En el aminoácido arginina que posee un grupo guanidino, tiene un rango de pK_a de 11.5 a 12.5 en proteínas; esto causa que siempre esté protonado a pH fisiológico y no actúa en las reacciones ácido-base. La histidina tiene un grupo imidazol en la cadena lateral; al ser base débil solo se ioniza parcialmente a pH 7, ya que su pK_a es aproximadamente 6; esta capacidad fisiológica para aceptar o donar protones como respuesta a los pequeños cambios en el pH tiene un papel importante en la actividad catalítica de muchas enzimas (Lieberman et al., 2013, p.76; McKee et al., 2014, párr.14; Nelson et al., 2014, p.81).

propiedades de los aminoácidos.

Los aminoácidos pueden funcionar como ácidos o bases, debido a los grupos amino y carboxilo; sumados a los grupos ionizables R de algunos aminoácidos, funcionan como ácidos; cuando un aminoácido sin un grupo R ionizable se disuelve en agua a pH neutro, permanece en solución como un ion bipolar, o zwitterión ("ion híbrido") proveniente del alemán, que puede actuar como ácido o base. Las sustancias con esta característica son anfotéricas. Un aminoácido simple, alanina, es un ácido diprótico cuando se encuentra completamente protonado; tiene dos grupos, el grupo COOH y el grupo NH^3 , y puede producir dos protones (Lieberman et al, 2013, p.72; Nelson et al., 2014, p.81).

Las curvas de titulación en los aminoácidos son útiles para describir lo que sucede con los grupos ionizables, el comportamiento a distinto pH de los grupos que tienen la capacidad de donar o aceptar protones, la especie predominante a cierto pH; se puede observar el punto de inflexión donde el pH es igual a la pKa, y se puede obtener, además, una medida cuantificable del pKa de los grupos ionizables; en general la pKa de cualquier grupo funcional se ve afectada por su entorno químico o fisiológico. En este caso, esta propiedad también es aprovechada frecuentemente, en los sitios activos de enzimas, para promover mecanismos de reacción desarrollados y adaptados que dependen de los valores de pKa modificados de grupos donantes y aceptores de protones en residuos específicos (Lieberman et al., 2013, pp.76-77; McKee et al., 2014, párr.24; Nelson et al., 2014, p.83).

Otra importante información que se puede obtener de una curva de titulación de un aminoácido es la relación entre su carga final y el pH de la solución. Un ejemplo de titulación de la glicina es el pH de 5,97; en el punto de inflexión entre las dos etapas en su curva de titulación, la glicina está presente, predominantemente en su forma Zwitterión, totalmente ionizada, pero sin carga eléctrica final. El pH característico en el cual la carga eléctrica final es cero se conoce como punto isoeléctrico o pH isoeléctrico (pI). Para la glicina, que no posee ningún grupo ionizable en su cadena lateral, el punto isoeléctrico es simplemente la media aritmética de los dos valores de pKa (Nelson et al., 2014, p.84).

Las propiedades similares que comparten los aminoácidos permiten realizar algunas generalizaciones resumidas de su comportamiento ácido-básico. Entre ellos todos los aminoácidos con un solo grupo α -amino, un solo grupo α -carboxilo y un grupo R no ionizable tienen curvas de titulación similares a la de la glicina. Estos aminoácidos tienen valores de pKa muy similares, pero no idénticos; las diferencias en estos valores de pKa reflejan los ambientes químicos impuestos por sus grupos R. Otra generalidad: los aminoácidos con un grupo R ionizable tienen curvas de titulación más complejas, con tres etapas que corresponden a las tres etapas posibles de ionización, si tienen 3 valores de pKa (Lieberman et al., 2013, pp.76-77; Nelson et al., 2014, p.83).

Una generalización importante que se puede realizar es que, bajo la condición general de contacto libre y abierto al ambiente acuoso, solo la histidina tiene un grupo R y cuenta con un pKa, normalmente encontrado en los líquidos intracelulares y extracelulares de la mayoría de los animales y bacterias (Nelson et al., 2014, p.85).

Péptidos

La unión de dos aminoácidos se puede dar de forma covalente por medio de una reacción de amida sustituida, denominada enlace peptídico (Figura 8), a fin de producir un dipéptido. Este enlace está formado por la eliminación de elementos de agua (deshidratación) del grupo α -carboxilo de un aminoácido y del grupo α -amino del otro; es por esta razón que también a los aminoácidos se les llama residuos, como se mencionó anteriormente. Los polipéptidos presentes en seres vivos pueden variar desde unos cuantos aminoácidos unidos hasta miles (Nelson et al., 2014, p.85).

Las estructuras de los péptidos son menos complejas que las de las moléculas proteínicas más grandes; poseen actividades biológicas distintas e importantes. Los péptidos son una clase de moléculas mensajeras y de señales que utilizan los organismos multicelulares para regular muchas de sus actividades biológicas. El mantenimiento dinámico entre los procesos opuestos, denominada homeostasis, mantiene un ambiente interno estable. Algunos ejemplos de péptidos son glutatión, que se encuentra en casi todos los seres vivos y es un donador de electrones que participa en biosíntesis y en procesos antioxidantes; la vasopresina y hormona antidiurética, que mantienen un efecto sobre la presión arterial; otro ejemplo es la oxitocina, que se produce para estimular la

hormonas tienen efectos muy importantes en bajas concentraciones, como en el caso de los vertebrados (Nelson et al., 2014, p.86).

Algunos venenos extremadamente tóxicos de setas (hongos), como la amanitina, también son péptidos pequeños, así como muchos antibióticos. Un ejemplo de un péptido sintético es el éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina, el edulcorante artificial más conocido como aspartame o NutraSweet. La longitud de todos los péptidos es muy variable; por ejemplo, el citocromo c humano tiene 104 residuos de aminoácidos ligados en una sola cadena; el quimotripsinógeno bovino tiene 245 residuos. En el extremo está la titina, constituyente de los músculos de vertebrados, que tiene aproximadamente 27.000 residuos de aminoácidos y masa molecular de cerca de 3.000.000 (Nelson et al., 2014, p.87).

Las Proteínas

La mayoría de las proteínas que existen en la naturaleza son mucho más pequeñas que la titina que tiene cerca de 27000 aminoácidos, por lo general contienen menos de 2.000 residuos de aminoácidos. Algunas proteínas consisten en una sola cadena polipeptídica, pero otras, denominadas proteínas multiméricas, tienen dos o más polipéptidos asociados de manera no covalente. Las cadenas polipeptídicas individuales en estas proteínas multiméricas pueden ser idénticas o diferentes. Si al menos dos son iguales se llaman oligoméricas, y las unidades idénticas que consisten una o más cadenas polipeptídicas se conocen como protómeros (Nelson et al., 2014, p.87).

Un ejemplo de lo anterior, mencionado por los autores, es la hemoglobina adulta, ya que cuenta con cuatro subunidades polipeptídicas: dos cadenas α idénticas y dos cadenas β idénticas, y todas las cuatro se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad α es pareada de modo idéntico con una subunidad β dentro de la estructura de la hemoglobina, de modo que puede ser considerada tanto un tetrámero de cuatro subunidades de polipéptidos como un dímero de protómeros α - β (Lieberman et al., 2013, p.77; Nelson et al., 2014, p.88).

Otros tipos de proteínas contienen dos o más cadenas polipeptídicas unidas por enlaces covalentes, como sucede en las 2 cadenas polipeptídicas de la insulina; en este caso los polipéptidos

individuales no se consideran subunidades, pero son llamados simplemente cadenas por permanecer unidas por estos enlaces covalentes como los puentes disulfuro. La composición de los aminoácidos de las proteínas también es muy variable. Los 20 aminoácidos comunes casi nunca se encuentran en cantidades iguales en las proteínas, ya que algunos aminoácidos pueden estar presentes solo una vez o no presentarse en una proteína, así como otros pueden estar presentes en gran cantidad (Nelson et al., 2014, p.88).

Se consideran proteínas simples, las cuales tienen solo residuos de aminoácidos presentes, sin ningún otro componente químico. Otros tipos de proteínas contienen componentes químicos relacionados de modo permanente, no únicamente compuestas de aminoácidos, y se llaman proteínas conjugadas. La parte que contiene otros componentes químicos distintos de aminoácidos en una proteína conjugada es normalmente llamada grupo prostético. Este tipo de proteínas puede ser clasificado con base en la naturaleza química de sus grupos prostéticos; por ejemplo, las lipoproteínas contienen lípidos, las glicoproteínas contienen grupos de azúcar y las metaloproteínas contienen un metal específico. Algunas proteínas contienen varios grupos prostéticos y cumplen un papel importante en la función biológica de la proteína (Lieberman et al., 2013, p.77; McKee et al., 2014, párr.54; Nelson et al., 2014, p.89).

funciones de las proteínas.

En los seres vivos y sus moléculas relacionadas, las proteínas son las que tienen las funciones más diversas. Por ello es importante mencionar las más conocidas funciones de estas moléculas. Una de ellas es la catálisis, por medio de enzimas, las cuales son proteínas que dirigen y aceleran miles de reacciones bioquímicas en procesos como la digestión, la captura de energía y la biosíntesis; en algunos casos estas enzimas pueden aumentar la velocidad de reacción de millón a billón de veces. Esta acción como catalizadoras la pueden realizar a pH y temperatura óptimas, dado que pueden inducir o estabilizar intermediarios de reacción (McKee et al., 2014, párr.43).

Algunas proteínas cumplen también un papel a nivel estructural; las moléculas que cumplen esta función suelen tener propiedades muy especiales, como el colágeno (el componente principal de los tejidos conjuntivos) y la fibroína (la proteína de la seda), que poseen una fuerza mecánica

significativa. La elastina, una proteína similar a la goma que se encuentra en las fibras elásticas, está presente en varios tejidos del organismo, como en los vasos sanguíneos y en la piel, cuya función debe cumplir con un cierto grado de elasticidad (McKee et al., 2014, párr.44; Nelson et al., 2014, p.75).

El movimiento es otra función importante de estas moléculas. Las proteínas participan en todos los movimientos celulares; se pueden mencionar, como ejemplo, la actina, la tubulina y otras proteínas que forman el citoesqueleto. Las proteínas del citoesqueleto son activas en la división celular, en la endocitosis, en la exocitosis y en el desplazamiento ameboso de los leucocitos, entre otros. (Nelson et al., 2014, p.75).

Las proteínas también pueden desempeñar un papel de defensa; gran variedad de proteínas son protectoras; un ejemplo a mencionar es la queratina, que se encuentra en las células de la piel, la cual ayuda a proteger al organismo contra los daños mecánicos y químicos. Las proteínas implicadas en la cascada de la coagulación, como el fibrinógeno y la trombina, impiden la pérdida de sangre cuando los vasos sanguíneos sufren una lesión. En la inmunidad celular los linfocitos producen las inmunoglobulinas (o anticuerpos) cuando organismos extraños, como las bacterias, invaden al organismo (McKee et al., 2014, párr.45), (Nelson et al., 2014, p.75).

La regulación es otra función de las proteínas, como sucede con la unión de una molécula hormonal peptídica o de un factor de crecimiento a los receptores en sus células diana, que modifica la función celular, y cumple una función regulatoria. Se pueden mencionar, como ejemplos de hormonas peptídicas, la insulina y el glucagón; ambos regulan la concentración sanguínea de glucosa. La hormona peptídica del crecimiento estimula el desarrollo y la división celular. Los factores de crecimiento son polipéptidos que controlan la división y la diferenciación de las células animales, y se pueden mencionar el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (McKee et al., 2014, párr.40).

Las proteínas también cumplen una función de transporte; muchas proteínas actúan como transportadoras de moléculas o de iones a través de las membranas o intercelulares; entre algunos ejemplos de proteínas transportadoras de membrana están la bomba Na^+/K^+ ATPasa y el

transportador de glucosa GluT. Otras proteínas transportadoras son la hemoglobina, que lleva oxígeno a los tejidos desde los pulmones, y las lipoproteínas LDL y HDL, que transportan los lípidos insolubles por el torrente sanguíneo; la transferrina y la ceruloplasmina son proteínas sanguíneas que transportan hierro y cobre respectivamente (McKee et al., 2014, párr.47; Nelson et al., 2014, p.75).

Una función importante de algunas proteínas es el almacenamiento de sustancias, pues determinadas proteínas actúan como reserva de nutrientes esenciales; unos claros ejemplos son la ovoalbúmina y la zeína en semillas. Además, en la respuesta y protección al estrés de origen abiótico, esta capacidad de respuesta es mediada por determinadas proteínas; por ejemplo, el citocromo P450, un grupo diverso de enzimas que se encuentran en los animales y en las plantas que habitualmente transforman a un gran número de contaminantes orgánicos tóxicos en derivados menos tóxicos, y la metalotioneína, una proteína intracelular con abundante cisteína que, por lo general, se encuentra en todas las células de los mamíferos, se une y secuestra metales tóxicos como el cadmio, el mercurio y la plata (McKee et al., 2014, párr.49).

Cuando las proteínas se exponen a temperaturas muy elevadas y otros tipos de estrés, se sintetizan en un tipo de proteínas chaperonas denominadas proteínas de choque térmico (HSPs), que promueven el plegamiento correcto de las que fueron afectadas y dañadas; si las proteínas presentan un daño grave o irreparable, las HSPs estimulan su degradación. Además, algunas de estas proteínas HSPs cumplen una función en el proceso normal de plegamiento proteínico. En el caso de protección por radiación, las células están protegidas por proteínas reparadoras de ADN (Lieberman et al., 2013, p.104; McKee et al., 2014, párr.97).

Las proteínas también se pueden clasificar por las semejanzas que presenten en las secuencias de aminoácidos y en su forma tridimensional general. Las familias de proteínas están formadas por moléculas relacionadas por su semejanza en la secuencia de los aminoácidos; en este caso dichas proteínas, con parentesco, comparten un ancestro común (homología). Dos familias de proteínas clásicas son la de las hemoglobinas, cuya función es el transporte de oxígeno en la sangre y la de las inmunoglobulinas, los cuales son anticuerpos producidos por el sistema inmunitario en respuesta a sustancias extrañas o antígenos, y en los casos donde las proteínas poseen una relación

distante se clasifican como superfamilias (Lieberman et al., 2013, p.79; McKee et al., 2014, párr.51).

Las proteínas pueden clasificarse de otras 2 maneras, debido a su variabilidad en su forma y composición. Las proteínas se clasifican en dos grupos principales, según su morfología, en proteínas fibrosas, las cuales son moléculas largas con forma de varilla que son insolubles en agua y físicamente resistentes; se puede mencionar como ejemplo de proteínas fibrosas, las queratinas de la piel, del pelo y de las uñas, que tienen funciones estructurales y protectoras. Las proteínas globulares son moléculas con formas esféricas compactas y en general hidrosolubles; por lo general estas proteínas globulares tienen funciones móviles; casi todas las enzimas tienen estructuras globulares; además, se pueden mencionar las inmunoglobulinas y las proteínas de transporte hemoglobina y albúmina, que es un transportador de ácidos grasos en la sangre (McKee et al., 2014, párr.53).

proteínas de la membrana celular

Las proteínas presentes en la membrana celular se pueden clasificar en 3 tipos, de acuerdo con sus asociaciones con dicha estructura. Se encuentran las proteínas periféricas, proteínas integrales, y proteínas anfitrópicas (Nelson et al., 2014, p.389).

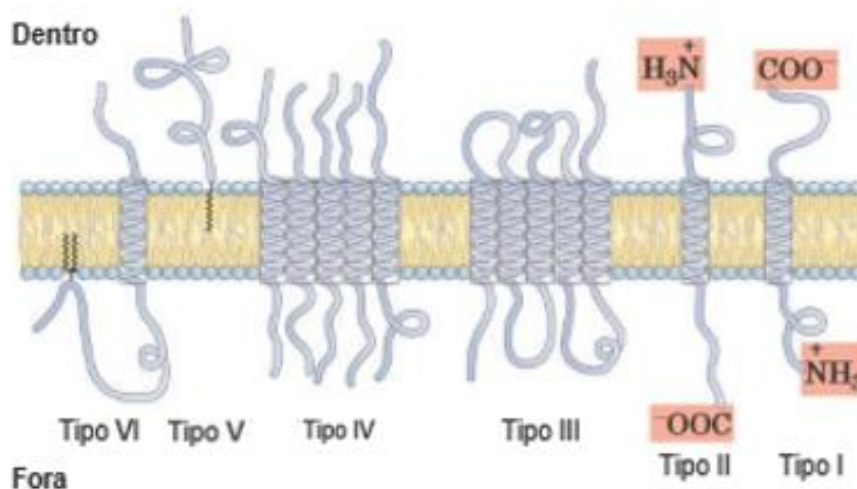
Las proteínas integrales de membrana celular están firmemente sujetas a la bicapa lipídica, siendo removibles sólo por agentes que interfieren con reacciones hidrofóbicas, como detergentes, solventes orgánicos, o agentes desnaturizantes. En el caso de proteínas periféricas se mantienen unidas a la membrana por interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno con dominios hidrofílicos de proteínas integrales y con grupos polares de los lípidos de membrana. Pueden ser liberadas por tratamientos relativamente blandos que interfieren con las interacciones electrostáticas o que rompen las conexiones de hidrógeno; como carbonato a pH alto. Las proteínas anfitrópicas se encuentran tanto en el citosol y en asociación con las membranas. Sus afinidades por las membranas resultan, en algunos casos, de las interacciones no covalentes de las proteínas con una proteína o lípido de membrana y, en otros casos, de la presencia de uno o más lípidos covalentemente ligados a la proteína anfitrópica (Nelson et al., 2014, pp.389-390).

proteínas transmembranales

Las proteínas integrales de la membrana contienen dominios transmembrana con cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos que interactúan con las porciones hidrófobas de los lípidos membranales, así se mantienen selladas. Las regiones hidrófilas de las proteínas se encuentran en el medio extracelular o en el citoplasma. Estas proteínas funcionan principalmente como canales o transportadores para el movimiento de compuestos a través de la membrana, como receptores para la unión de hormonas y neurotransmisores, o como proteínas estructurales (Lieberman et al., 2013, p.156).

En las proteínas de membrana plasmática conocidas, los acomodos espaciales de los dominios de las proteínas en la membrana se agrupan en encuadran en seis categorías (figura 9). Las proteínas de los tipos I y II tienen una única hélice transmembrana; el dominio N terminal está fuera de la célula en la proteína del tipo I y dentro en tipo II. Las proteínas del tipo III tienen múltiples hélices transmembrana en un solo polipéptido. En las proteínas del tipo IV, los dominios transmembrana de varios polipéptidos diferentes se agrupan para formar un canal a través de la membrana. Las proteínas del tipo V (no es transmembrana) son sostenidas en la bicapa en especial por lípidos ligados covalentemente, y proteínas del tipo VI poseen tanto hélices transmembrana y anclas lipídicas (Nelson et al., 2014, pp.389-390).

Figura 9. Tipos de Proteínas Integrales de Membrana



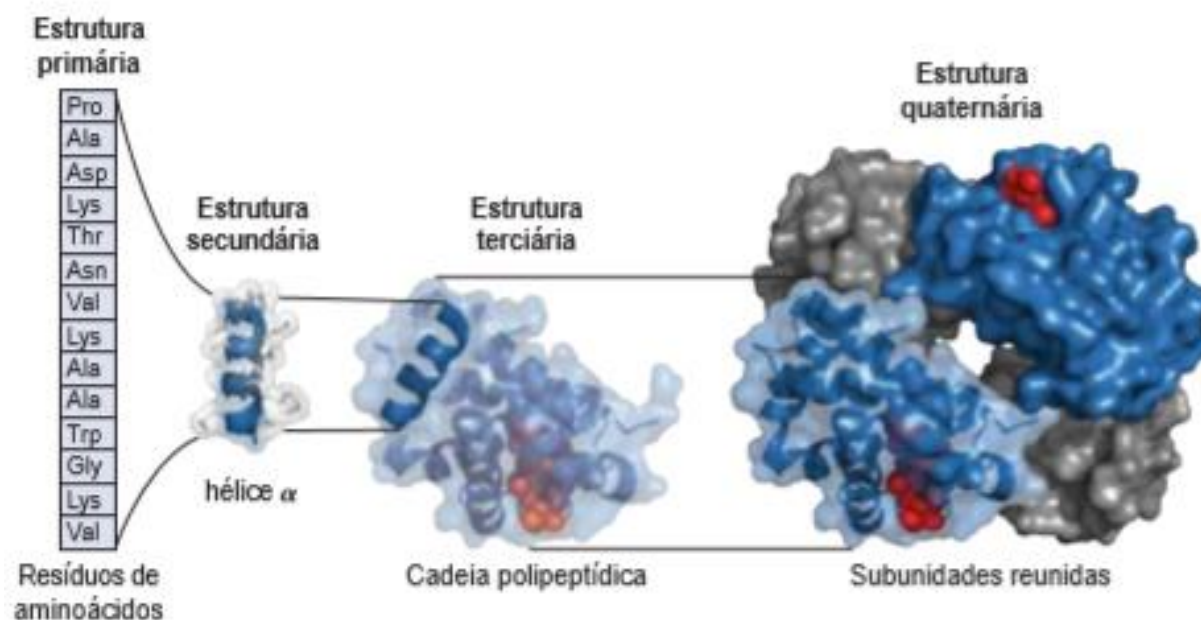
Nota: Nelson et al. (2014)

estructura de las proteínas.

La purificación de una proteína es generalmente solo un paso previo para un estudio bioquímico detallado de su estructura y función. Saber cuál es la función de una proteína, una enzima, hormona, una proteína estructural, un anticuerpo, sus diferencias químicas y sus propiedades, se explican con las distinciones estructurales más notables; por ello se describe la estructura de las proteínas. La estructura de grandes moléculas, como proteínas, puede ser descrita por su complejidad en niveles distintos, y agrupados tomando en cuenta un orden jerárquico conceptualizado; por lo general se describen cuatro niveles de estructura proteica (Nelson et al., 2014, p.96).

De manera general, la estructura primaria es una descripción de los enlaces covalentes, principalmente enlaces peptídicos y enlaces disulfuro, la unión de residuos de aminoácidos en una cadena polipeptídica es su estructura primaria, y el elemento más importante de la estructura primaria es la secuencia de residuos de aminoácidos. La estructura secundaria hace referencia a acomodos particularmente estables de residuos de aminoácidos, dando origen a patrones estructurales que se repiten en regiones específicas de un polipéptido. La estructura terciaria describe todos los aspectos conformacionales que engloba tridimensionalmente un polipéptido. Cuando una proteína tiene dos o más subunidades polipeptídicas, sus arreglos en el espacio se llaman estructura cuaternaria (Figura 10) (Lieberman et al., 2013, pp.88-90; McKee et al., 2014, párr.57; Nelson et al., 2014, pp.96-97).

Figura 10. Niveles de Estructuras de las Proteínas



Nota: Nelson et al. (2014)

estructura primaria.

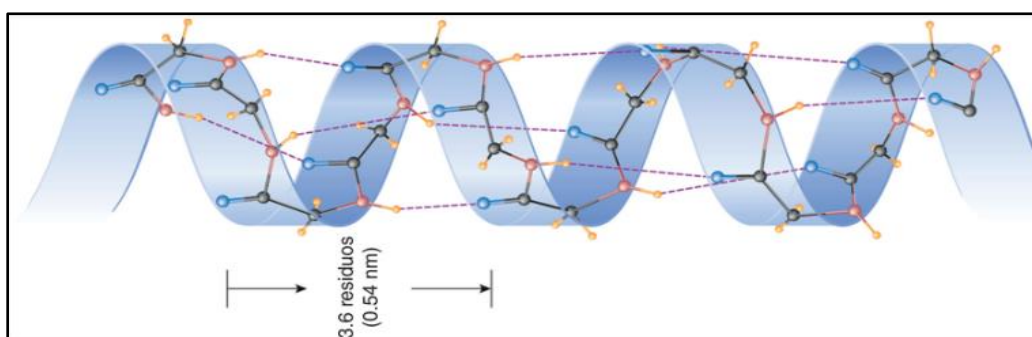
Cada polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos específica; las interacciones entre estos residuos de aminoácidos determinan la estructura tridimensional de la proteína, su función y relaciones con otras proteínas. Los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos semejantes y se han originado a partir de un mismo gen ancestral, se dice que son homólogos. Esto se ha utilizado para detectar relaciones genéticas entre distintas especies, como por ejemplo las homologías de secuencia de la proteína redox mitocondrial citocromo c, la cual es una molécula esencial para la producción de energía de muchas especies, y con ello se ha revelado una gran conservación de su secuencia. Se presume que los residuos de aminoácidos que son idénticos en las proteínas homólogas, que se denominan invariables, son esenciales para la función de una proteína (Lieberman et al., 2013, pp.88-90; McKee et al., 2014, párr.57; Nelson et al., 2014, pp.96-97).

estructura secundaria.

La estructura secundaria de los polipéptidos se conforma por varios patrones que se repiten. Entre los tipos de estructura secundaria que se observan con mayor frecuencia son la hélice α y la lámina plegada β . Estas dos últimas estructuras se estabilizan por enlaces por puente de hidrógeno entre los grupos carbonilo y amino en la estructura polipeptídica. Como los enlaces peptídicos son rígidos, los carbonos α son puntos de giro para la cadena polipeptídica. Varias propiedades de los grupos R, como el tamaño y la carga, unidos al carbono α influyen en los ángulos ϕ y ψ , y algunos aminoácidos incrementan o inhiben patrones específicos de estructura secundaria; muchas de las proteínas fibrosas están formadas casi por completo por patrones de estructura secundaria (Lieberman et al., 2013, pp.88-90; McKee et al., 2014, párr.64).

La α hélice es una estructura rígida en forma de “resorte” (Figura 11), que se origina cuando una cadena polipeptídica se enrolla en una conformación helicoidal dextrógira. Se forman enlaces por puente de hidrógeno entre el grupo amino de cada aminoácido y el grupo carbonilo del aminoácido que se encuentra cuatro residuos más adelante. Existen 3.6 residuos de aminoácidos por cada vuelta de la hélice, y la distancia entre los puntos correspondientes de cada vuelta es de 0.54 nm. Los grupos R de los aminoácidos se proyectan hacia afuera de la hélice (McKee et al., 2014, párr.65-66).

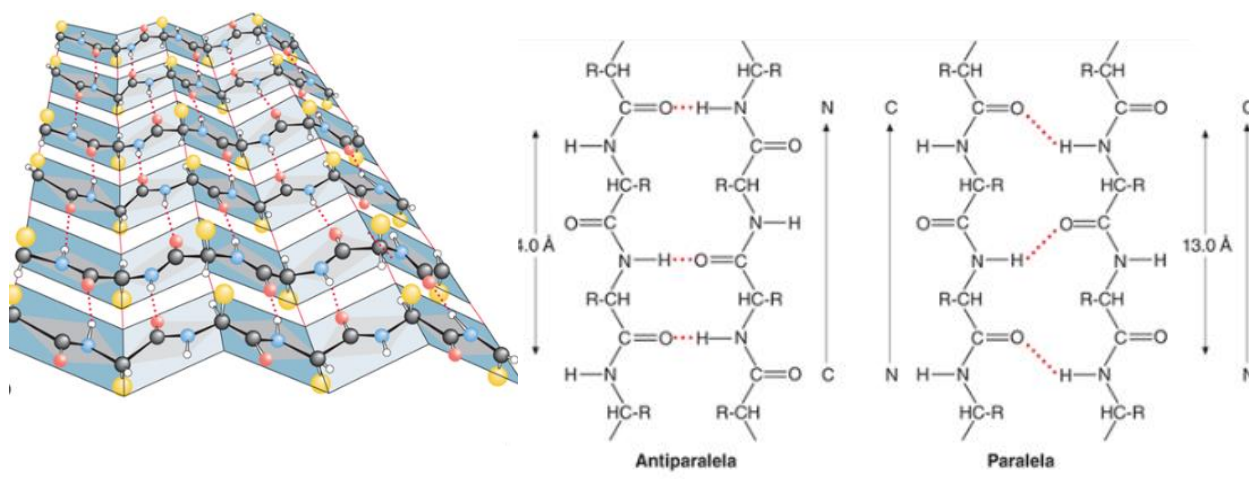
Figura 11. Estructura Secundaria α Hélice



Nota: McKee et al. (2014)

La otra estructura secundaria, las láminas plegadas β (Figura 12), se forman cuando se alinean dos o más segmentos de la cadena polipeptídica uno al lado del otro. Cada uno de los segmentos individuales se denomina cadena β . Al contrario de la α hélice que se encuentra enrollada, la cadena formada en las láminas β está extendida por completo, y son estabilizadas por enlaces puente de hidrógeno que se forman entre los grupos N-H y carbonilo del esqueleto polipeptídico de cadenas adyacentes. Las láminas plegadas β se pueden presentar en formas paralelas o antiparalelas. En las estructuras de láminas plegadas β paralelas, los enlaces por puente de hidrógeno de las cadenas polipeptídicas están dispuestos en la misma dirección; en las cadenas antiparalelas estos enlaces están en direcciones opuestas; algunas veces se pueden encontrar mezcladas láminas β paralelas y antiparalelas (Lieberman et al., 2013, p.91; McKee et al., 2014, párr.64).

Figura 12. Láminas Plegadas β , Paralela y Antiparalela, en Detalle Tipo Antiparalela (Color)



Nota: McKee et al. (2014)

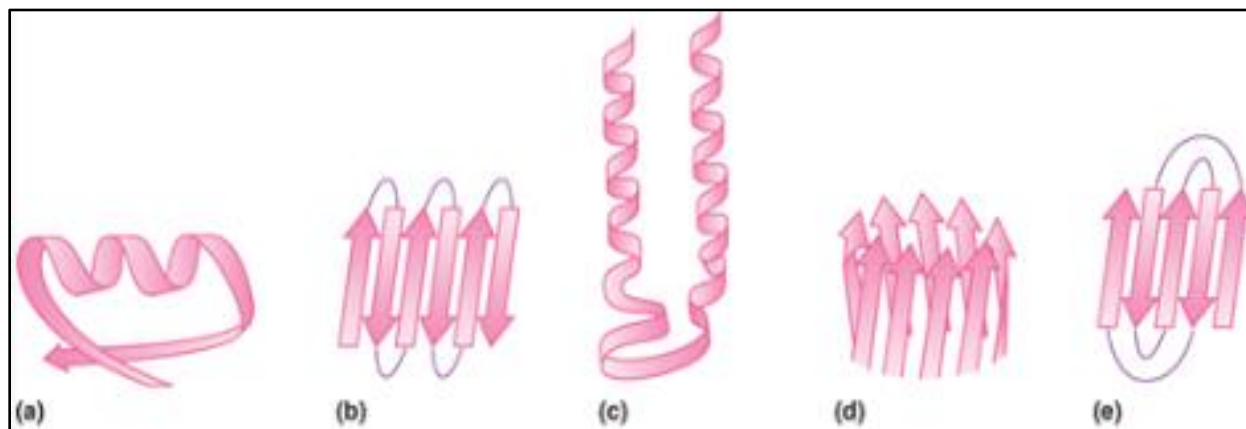
Las proteínas globulares contienen combinaciones de las estructuras secundarias α hélice y lámina plegada β ; a dichas combinaciones se les llama estructuras supersecundarias o motivos estructurales. Se pueden encontrar varios tipos como la unidad $\beta\alpha\beta$, consiste en dos láminas plegadas β paralelas que están conectadas mediante un segmento de α hélice, y contribuyen a su estabilidad las interacciones hidrófobas entre cadenas laterales no polares, que van desde la superficie de interacción de las cadenas β y de la α hélice (McKee et al., 2014, párr.60).

Cuando ocurre un cambio pronunciado en la dirección de los polipéptidos, esta estructura supersecundaria se llama bucles o asas; un ejemplo es el giro β , un tipo de asa encontrado a menudo, que es un cambio de dirección de 180° formado por cuatro aminoácidos, en el cual el oxígeno del carbonilo del primer aminoácido del asa forma un puente de hidrógeno con el hidrógeno de amida del cuarto residuo; lo anterior es común en residuos de glicina y de prolina en los giros β . Esto se debe a que la glicina no presenta grupo orgánico lateral, y esto contribuye a que una prolina contigua asuma una orientación cis en relación con el mismo lado del péptido y con ello formar un giro β en la cadena, el cual es común en proteínas con abundantes segmentos de α hélice. La prolina, además, impide la formación de la hélice, ya que altera la dirección de la cadena (Lieberman et al., 2013, pp.92-93; McKee et al., 2014, párr.62).

El meandro β , otra estructura supersecundaria, surge cuando están conectadas dos láminas β antiparalelas mediante aminoácidos polares y glicinas; con esto se da un fuerte cambio de dirección en la cadena polipeptídica, llamado también reverso o giro de horquilla. En el caso de las unidades $\alpha\alpha$, también llamadas hélice-lazo-hélice, ocurre cuando 2 regiones de α hélice sucesivas están distanciadas por una porción no helicoidal y se alinean paralelas por compatibilidad de las cadenas laterales. Se forman barriles β cuando varias configuraciones de lámina β se repliegan sobre sí mismas. Otro motivo estructural se denomina llave griega, la cual ocurre cuando una lámina β se enrolla sobre sí misma de manera que se forman pliegues alternos (Lieberman et al., 2013, p.93), (McKee et al., 2014, párr.63-65).

Figura 13. Estructuras Secundarias Derivadas

(a) unidades $\beta\alpha\beta$, (b) meandro β , (c) unidad $\alpha\alpha$, (d) barril β , y (e) llave griega. Las flechas señalan el extremo C.



Nota: McKee et al. (2014)

estructura terciaria.

La estructura terciaria hace referencia a las conformaciones espaciales globales y únicas que asumen las proteínas globulares cuando se pliegan en sus estructuras que hacen posible su actividad biológica, con sus grupos protésicos si se requiere. El plegamiento de una proteína es un proceso mediante el cual una secuencia de aminoácidos, recién sintetizados, adquieren una estructura tridimensional organizada, y esto es posible gracias a las interacciones que ocurren entre las cadenas laterales de la secuencia de aminoácidos (Lieberman et al., 2013, p.93; McKee et al., 2014, párr.67).

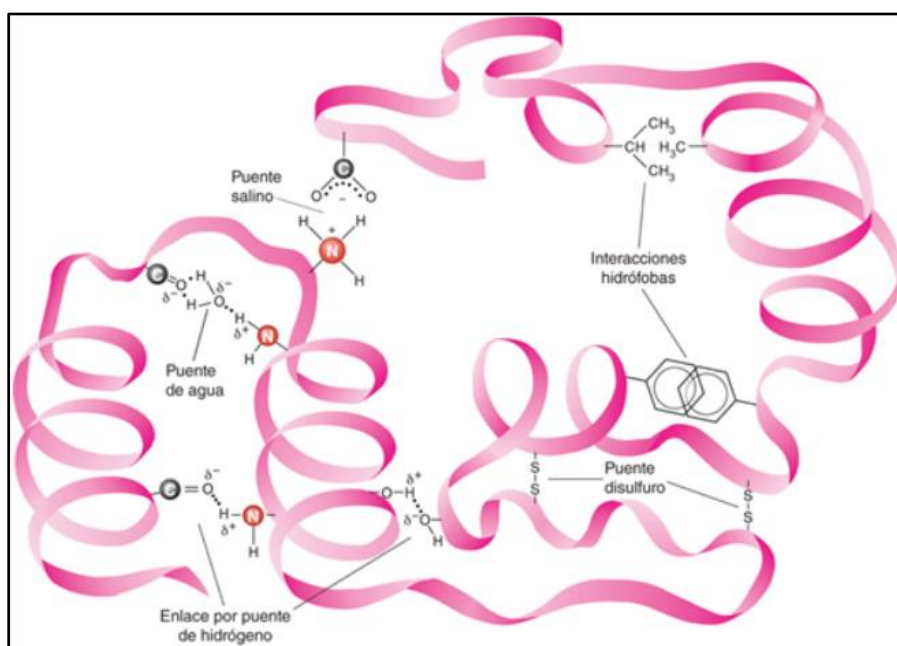
Las grandes proteínas globulares, que contienen más de 200 aminoácidos, generalmente están formadas por varias partes que se conocen como dominios, los cuales son porciones separadas desde el punto de vista de estructura, que cumplen una función determinada, como la unión de un ion o alguna molécula pequeña. Por lo general las proteínas cuentan al mínimo con dos dominios; la parte estructural central de cada dominio se conoce como pliegue; ejemplos de lo anterior son el pliegue Rossmann de unión a nucleótidos y el pliegue de las globinas. Los dominios se clasifican de acuerdo con la estructura supersecundaria central como α , β , α/β y $\alpha + \beta$ (McKee et al., 2014, párr.70).

interacciones que favorecen la estabilidad de la estructura terciaria.

Existen varias interacciones que contribuyen a la estabilidad de las proteínas (Figura 14); una de ellas es la de las interacciones hidrófobas; esto se favorece cuando ocurre plegamiento de la cadena polipeptídica, donde los grupos R hidrófobos se acercan debido al alejamiento del agua; después las moléculas de agua en el interior que están ordenadas y presentan solvatación se liberan hacia el exterior, lo que causa aumento en la entropía de moléculas de agua; esto es necesario, ya que es una fuerza impulsora requerida para el plegamiento proteínico (McKee et al., 2014, párr.72).

Contribuyen a la estabilidad de la estructura terciaria las moléculas de agua que tienen el interior de las proteínas plegadas, forman enlaces por puente de hidrógeno con la estructura del polipéptido, generan estabilidad, evitando interacciones internas. Las interacciones electrostáticas (puentes salinos) también brindan estabilidad a la estructura terciaria. Las interacciones electrostáticas más débiles, como ion-dipolo, dipolo-dipolo y de Van der Waals, contribuyen a la estabilidad, las cuales son significativas en el interior de la proteína plegada y entre las subunidades de las proteínas compuestas por varias cadenas, o en las interacciones de la proteína con su ligando. Los enlaces por puente de hidrógeno son interacciones importantes, se forman en el interior y exterior de la proteína, y los enlaces covalentes también pueden afectar la estructura de un polipéptido; los más importantes en la estructura terciaria son los puentes disulfuro (Lieberman et al., 2013, p.93; McKee et al., 2014, párr.75-83).

Figura 14. Interacciones que Favorecen la Estabilidad de la Estructura Terciaria



Nota: McKee et al. (2014)

estructura cuaternaria.

La estructura cuaternaria se refiere al arreglo espacial global de las subunidades que componen una proteína. La mayoría de las proteínas, con pesos moleculares elevados, tienen varias cadenas polipeptídicas; a cada porción polipeptídica se le llama subunidad, y como se mencionó antes, estas subunidades en las proteínas pueden ser idénticas o diferentes; cuando las proteínas presentan todas sus subunidades idénticas se conocen como oligómeros. Los oligómeros están formados a su vez por protómeros, que pueden estar formados por una o por varias subunidades, y muchas proteínas pueden tener 2 o 4 protómeros, que respectivamente se nombran dímeros y tetrameros (Lieberman et al., 2013, p.96).

Se formulan varias razones por las que las proteínas tengan varias subunidades; una de ellas es que sintetizar subunidades aisladas es más eficaz que aumentar la longitud de la cadena polipeptídica; además, en casos donde existan moléculas muy grandes, como ocurre con el colágeno, el recambio de porciones pequeñas desgastadas o dañadas puede realizarse de manera eficaz; por otro lado, las interacciones que ocurren entre subunidades pueden ser complejas, y con

ello poder regular la actividad biológica de la proteína, lo cual es de suma importancia (McKee et al., 2014, párr.85).

Las subunidades polipeptídicas se ensamblan y se mantienen unidas por interacciones que contribuyen a la estabilidad de la estructura. Como se mencionó antes, en el plegamiento proteico, el efecto hidrófobo es la interacción más importante, y esto se debe a que las superficies que se interconectan entre las subunidades son similares a las del interior de los dominios de las proteínas globulares, aunque en menor cantidad proteínas globulares. Aunque son menos numerosos, también los enlaces covalentes estabilizan de forma significativa determinadas proteínas con múltiples subunidades (Lieberman et al., 2013, p.96).

Las interacciones entre las subunidades pueden verse afectadas por la unión de los ligandos, en el caso del alosterismo, en el cual hay unión de un ligando en un sitio distinto al lugar activo y produce un cambio conformacional, que puede afectar la afinidad por otro; este efecto alostérico puede ser positivo o negativo según el incremento o disminución de la afinidad por otros ligandos. Estos cambios inducidos por ligandos se conocen como transiciones alostéricas, y los ligandos que las producen se denominan efectores o moduladores (McKee et al., 2014, párr.90).

En los últimos años, con base en estudios genómicos y de espectroscopia, se ha revelado que muchas proteínas no están estructuradas en cierto grado o totalmente. Las proteínas no estructuradas se conocen como proteínas intrínsecamente no estructuradas (IUP). Cuando no existe estructura determinada como tal en su totalidad, se usa el término proteínas originalmente desplegadas, donde la mayoría de estas proteínas son eucariotas, y en estos tipos de células más del 30% se encuentran desordenadas en cierto grado o totalmente, y en el caso de los dominios Archaea y Bacteria, cerca del 2% y del 4%, respectivamente (McKee et al., 2014, párr.93).

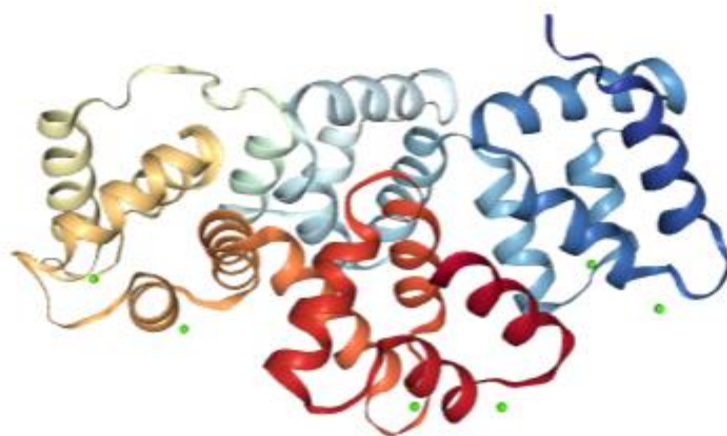
Anexina A1

La anexina A1 es una proteína importante regulada por glucocorticoides, que contribuye a la resolución de la inflamación a través de múltiples vías. Entre algunas de las acciones se puede citar que limita el reclutamiento de neutrófilos y la producción de mediadores proinflamatorios. Además, induce apoptosis de neutrófilos, modula el reclutamiento de los monocitos y aumenta la

eliminación de células apoptóticas por los macrófagos. Evidencia reciente apunta a que la anexina A1 también propicia a los macrófagos hacia un fenotipo de resolución, otra acción clave que permite que permite la homeostasis de los tejidos (Gavins et al., 2012, pp.1-2).

Las Anexinas son una superfamilia, compuesta por 13 miembros, agrupados por su estructura única y sitio de unión a Calcio (Ca^{+2}), que los hace accesibles a superficies de membrana negativamente cargadas. Dentro de esta familia se encuentra la proteína conocida como anexina A1 o lipocortina I, se identificó originalmente como una proteína activa inducida por glucocorticoides y que actuaba sobre la inhibición de la fosfolipasa A2 (PL- A2) y la prevención de la síntesis de eicosanoides; luego de múltiples experimentos se reconoció la propiedad de esta proteína como moduladora endógena de la inflamación (Amantéa et al., 2016, p.2).

Figura 15. Representación 3D de Anexina A1 en Presencia de Calcio, del Organismo *Sus scrofa* (PDB-ID: 1HM6)



Nota: Protein Data Bank (PDB). (2018)

Esta proteína se compone de 346 aminoácidos y está formada por cuatro secuencias repetitivas en la longitud completa, que se organizan alrededor de un tipo de núcleo, que representa la gran mayoría más del 80% del total de la proteína, dando a la proteína una forma de una rosquilla. A bajas concentraciones del ion Ca^{+2} , el dominio N-terminal está incrustado dentro de la conformación tipo dona, pero aumentos de este ion mayores a 1 mM, como ocurre en el plasma y otros fluidos biológicos, exponen esta región terminal, y este efecto puede promover la actividad biológica de la proteína (Gavins et al., 2012, p.1).

La anexina A1 se distribuye ampliamente en el cuerpo y se encuentra en los glóbulos blancos, las células madre estromales y los fluidos biológicos. En circulación, los granulocitos y los monocitos son la fuente celular principal de la anexina A1, siendo los neutrófilos la fuente predominante en los granulocitos. Los linfocitos tienen una expresión baja de anexina A1, junto con las células T, alrededor de 100 veces menos que los neutrófilos, mientras que las células B y las plaquetas son negativas para la expresión de anexina A. Las células epiteliales también son una fuente importante de la proteína en órganos como el pulmón, el intestino, y las células mesangiales del riñón son muy positivas en cantidad de anexina A1, así como el riñón en general (Perretti et al., 2009a, p.938).

Características antiinflamatorias de Anexina A1

Esta proteína regula el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de inflamación. Cuando existe un proceso inflamatorio, los neutrófilos se reclutan rápidamente en el tejido infectado o lesionado, pero estos polimorfonucleares (PMN) pueden causar efectos dañinos en los tejidos de, razón por la que se requiere una regulación ajustada en el sitio inflamatorio. Se asegura que una respuesta inflamatoria exacerbada o superada con altas concentraciones de neutrófilos puede ser causante de enfermedades inflamatorias crónicas, con lo cual regular la infiltración de leucocitos en el tejido es un proceso esencial para la resolución de la inflamación espontánea o farmacológica (Amantéa et al., 2016, p.2).

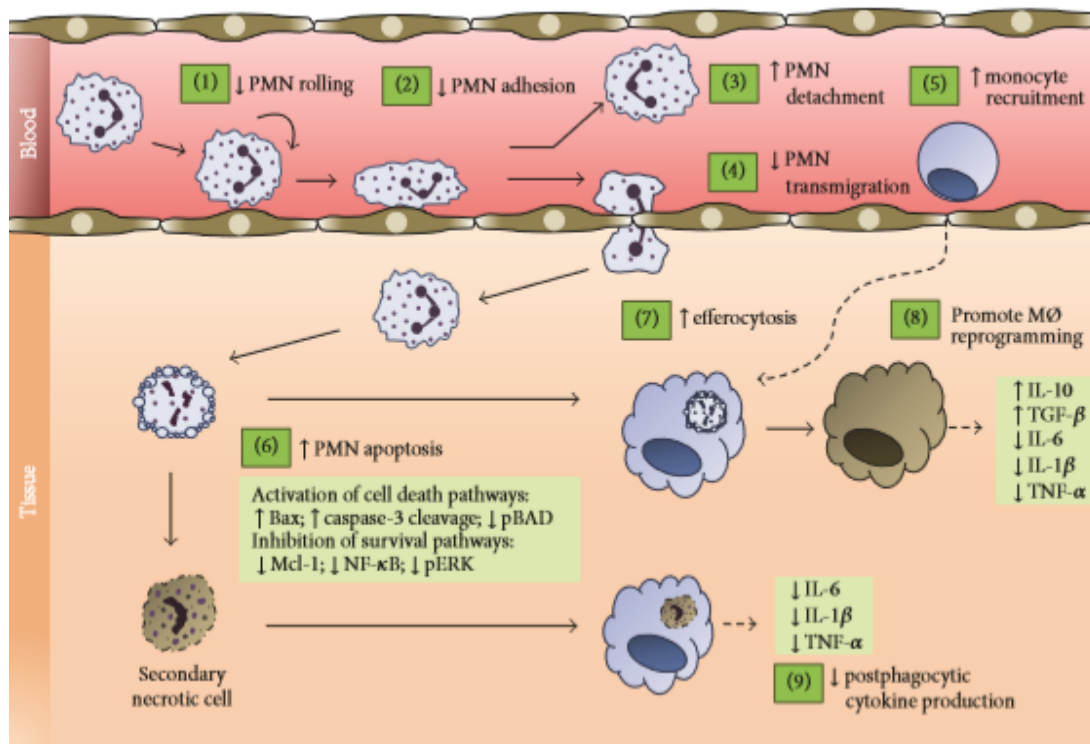
Otra acción de la anexina A1 induce apoptosis de neutrófilos; estos se producen en la médula ósea a partir de células madre mieloides, que a su vez proliferan, se diferencian en neutrófilos maduros y se liberan en circulación. Aunque en la actualidad la vida media circulatoria de los neutrófilos es de días, y no de horas como se pensaba, cuando hay inflamación la vía apoptótica constitutiva se retrasa por la acción de mediadores proinflamatorios locales, lo que resulta en un aumento de la vida media de estas células, lo que se contrarresta y se produce el efecto contrario con mediadores de resolución previa que incluyen anexina A1 y lipoxinas (Amantéa et al., 2016, p.6).

Anexina A1 induce el reclutamiento de monocitos y aumenta la eferocitosis. La fagocitosis realizada por macrófagos hacia neutrófilos apoptóticos desempeña un papel importante en la

resolución de la inflamación, ya que este proceso evita la activación excesiva de los neutrófilos y la exposición de los tejidos a los contenidos intracelulares de neutrófilos que pueden ocasionar lesiones, y se considera, por esta razón que el adecuado reclutamiento de monocitos de una forma no tan organizada, desde circulación a los lugares donde hay inflamación, es un punto crítico en la inflamación aguda, que permite la eliminación de los neutrófilos apoptóticos y con ello el proceso hacia la resolución de la inflamación (Perretti et al., 2009a, p.939).

La administración farmacológica de anexina A1, además de disminuir el reclutamiento de neutrófilos, disminuye su adhesión al endotelio, y produce un aumento del desprendimiento de células adherentes, así como la inhibición de la transmigración de los neutrófilos. La fagocitosis de neutrófilos apoptóticos por los macrófagos se acopla con la liberación de señales antiinflamatorias, incluida la transformación del factor de crecimiento β y niveles más bajos de citocinas proinflamatorias. Además, los estudios iniciales, realizados in vitro anexina A1 precipitada de leucocitos, demuestran que Anexina A1 previene la producción de citocinas proinflamatorias después de la fagocitosis de células necróticas secundarias, estos procesos se muestran en la figura 15. Esta característica funcional de la Anexina A1 proporciona un importante mecanismo a prueba de fallas que contrarresta las respuestas inflamatorias cuando falla la eliminación oportuna de las células apoptóticas (Amantéa et al., 2016, pp.6-8).

Figura 16. Eventos Celulares Asociados con los Efectos Antiinflamatorios y Proresolventes de la Anexina A1 y Péptidos Miméticos de la Región N Terminal



Nota: Amantéa et al. (2016)

Estudios recientes han reportado que la Anexina A1 presente en las células apoptóticas está involucrada en su eliminación por fagocitosis; esto pudo ser documentado gracias a la observación, utilizando tecnología proteómica diferencial, mostrando que la Anexina A1 se acumula en la parte externa de la membrana plasmática de linfocitos apoptóticos junto con fosfatidilserinas, y se requiere para la eliminación eficaz de las células apoptóticas, lo que sugiere un papel para Anexina A1 como intermediario entre las moléculas de fosfatidilserinas de las células apoptóticas y los fagocitos. En el 2007 se demostró que los neutrófilos apoptóticos liberan anexina A1, que actúa sobre los macrófagos induciendo la eliminación de células defectuosas (Amantéa et al., 2016, p.8).

Un aspecto importante, en esta proteína, es que los iones Ca^{+2} , además de mediar la unión a la membrana, también pueden inducir un cambio conformacional que conduce a la exposición del dominio N-terminal, que tienen actividad biológica; algunos estudios realizados sobre la

actividad biológica antiinflamatoria revelaron que las funciones prorresolutivas son realizadas por la porción N terminal única de la Anexina A1, pero también que los péptidos sintéticos de la región N terminal pueden imitar las propiedades antiinflamatorias de la proteína completa cuando se unen específicamente a los receptores de péptido formilo (FPRs) (Perretti et al., 2009a, p.937).

En contraste con la anexina A1 de tamaño completo, el péptido corto Ac2–26, derivado de Anexina A1, es capaz de activar todos los miembros de la familia FPR humana e inducir la heterodimerización FPR2/ALX-FPR1. Mediante estas observaciones y estudios realizados se cree que los péptidos pequeños sintéticos, que se asemejen a la anexina A1, podrían ejercer otras funciones y no actuar de la manera que se esperaría, como lo hace anexina A1 de tamaño completo, aunque un buen grado de selectividad por FPR2 se mantuvo por las secuencias antiinflamatorias más largas derivadas de los péptidos 12 al 50 (Amantéa et al., 2016, p.3).

El control mediado por glucocorticoides en el control de la transcripción del ARNm de anexina A1, se ha logrado estudiar *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. En un modelo *in vivo*, que utiliza ratas tratadas con metilprednisolona o con un 21-aminoesteroide, hubo un incremento en la expresión de anexina A1 en todas las áreas del cerebro, en comparación con los animales no tratados. El análisis *ex vivo* de macrófagos alveolares, obtenidos mediante lavado broncoalveolar, de pacientes con asma, sometidos a tratamiento con glucocorticoides, también mostró una mayor expresión de anexina A1 (Sheikh y Solito, 2018, p.2).

Degradación endógena de anexina A1

En situaciones donde ocurre inflamación, la proteína anexina A1 completa se puede degradar al escindirse por la proteinasa-3 y la elastasa de neutrófilos, que genera una isoforma luego de la escisión, la cual se cree que es inactiva, de igual manera que los péptidos de la región N terminal. Los principales sitios donde ocurre escisión en anexina A1 se encuentran en A11, V22 y V36. Otra investigación reveló que existe otro sitio de escisión en la posición 25; en la sustitución de los sitios donde se da escisión se han generado formas de anexina A1 y péptidos relacionados, resistentes contra la degradación endógena llamados, respectivamente, super AnxA1 (SAnxA1) y AnxA1 2-50 resistente a la rotura (CR-AnxA1 2-50) (Amantéa et al., 2016, p.2).

Receptores de Péptido Formilo Tipo 2 (FPR2)

El receptor FPR2 está presente en los neutrófilos humanos, eosinófilos, epitelio de las vías respiratorias, monocitos, macrófagos, células T, fibroblastos sinoviales y células epiteliales intestinales, así como las células Natural Killer humanas (NK) y las células linfoides innatas (ILC) (Duvall y Levy, 2015, p.149).

Anexina A1 ejerce muchas de sus acciones antiinflamatorias y proresolutivas por medio del receptor péptido formilo tipo 2, también llamado receptor de lipoxina A4 (FPR2/ALX). Este receptor, junto con FPR1 y FPR3, componen una familia de receptores acoplados a la proteína G de siete dominios transmembrana que comparten una homología de secuencia significativa. El receptor FPR2/ALX es compartido por una variedad de otros péptidos, proteínas y ligandos lipídicos, que median diversas funciones biológicas de importancia para la defensa del huésped y la inflamación. En estos receptores puede producirse interesantemente un agonismo por distintas moléculas endógenas, y generar acciones contrarias, ya que están asociados con la señalización tanto proinflamatoria como lo hace el amiloide sérico A y la catelicidina, y provocar una respuesta proresolutiva de la inflamación con anexina A1 y lipoxina A4 (Amantéa et al., 2016, pp.2-3).

Este receptor también fue activado por otro mediador antiinflamatorio endógeno, el lípido denominado lipoxina A4. La anexina A1 y la lipoxina A4 compiten por la unión a este mismo receptor. Estos datos apoyaron la interesante hipótesis de que al menos dos agonistas endógenos de antiinflamatorios podrían compartir un receptor específico acoplado a la proteína G. En un inicio se propuso esta idea como un objetivo en específico, de que existía una convergencia entre las clases más utilizadas de medicamentos como los glucocorticoides y la aspirina, ya que la anexina A1 y la lipoxina A4 se han asociado históricamente a algunos efectos farmacológicos producidos por esos medicamentos (Perretti et al., 2009a, p.941).

Este receptor FPR2/ALX ha sido evaluado de manera más completa por su farmacología antiinflamatoria, que incluye la capacidad de provocar la desactivación y desprendimiento de leucocitos, apoptosis leucocitaria, incremento de fagocitosis de células apoptóticas por fagocitos y regulación de COX-2. La interacción con distintos ligandos endógenos incluye: los modificados con glucocorticoides como proteína Anexina A1, el derivado de araquidonato, la lipoxina A4, el

péptido neuroprotector humanina y el péptido F2L. Además, la proteína amiloide sérica A (SAA), un derivado peptídico de beta-amiloide-A (denominado β A42) y el péptido Prion PrP106-126 son ligandos amiloidogénicos potentes para FPR2/ALX en el sistema nervioso periférico y central (Dufton et al., 2010, p.180).

Los agonistas FPR2/ALX pueden promover tanto la respuesta proinflamatoria (amiloide sérico A y Cateciclina), como prorresolutiva (AnexinaA1 y Lipoxina A4). La forma en que se promueve una respuesta proinflamatoria, o prorresolutiva, así como la duración e intensidad aún no se han comprendido por completo. Sin embargo, se ha descrito que los agonistas de este receptor requieren distintos dominios FPR2/ALX, para efectuar su acción. Mediante la utilización de células transfectadas y clones quiméricos de FPR1 Y FPR2, en 2012 se identificó que la señal mediada por anexina A1 involucra la región N-terminal y el dominio extracelular II de FPR2/ALX, mientras que el amiloide sérico A (SAA) interactúa con los dominios extracelulares I y II de FPR2. En el caso de lipoxina A4, se demostró que interactúa con el dominio III del receptor FPR2/ALX y el dominio transmembrana asociado (Amantéa et al., 2016, p.3).

Muchas proteínas diana de alto interés farmacéutico son receptores unidos a la membrana; un ejemplo es el de los receptores acoplados a proteína G (GPCR), y los intentos de obtener estructuras cristalizadas de estos receptores solo han tenido un éxito parcial. Aunque en este momento se han publicado veinticuatro estructuras de cristal GPCR de cuatro clases diferentes, el desarrollo de farmacóforos 3D basados en estructuras con estas estructuras sigue siendo un desafío (Georges et al., 2015, p.490).

Agonistas y Antagonistas de Receptores FPR2/ALX

La forma de pensamiento e investigación, en la actualidad, está orientada, por muchos laboratorios del mundo, hacia el estudio de los agonistas antiinflamatorios endógenos, que podría conducir a la identificación y el desarrollo de mejores terapias antiinflamatorias. Estos medicamentos deben caracterizarse por poseer menos efectos secundarios, ya que actuarán imitando la forma en que nuestro cuerpo realiza, de manera eficiente, la regulación de los complejos procesos inflamatorios (Perretti et al., 2009a, p.943).

El potencial terapéutico de los receptores FPR ha sido de gran interés, para investigadores o industriales, con un número cada vez mayor de productos sintéticos, y se están desarrollando agonistas mayormente para FPR2/ALX. La mayor especificidad de ligando inicialmente se logró por un gran número de variaciones de péptidos N-formilo con valor terapéutico limitado, pero resultó de utilidad para determinar atributos funcionales de estructura y conformación de los receptores; en esta misma línea se produjo el primer antagonista de la familia FPR por la sustitución del grupo formilo del péptido formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLF) con un grupo terciario butiloxi-carbonilo que conduce al grupo de moléculas llamadas derivados tert-butiloxicarbonilo (Dufton et al., 2010, p.184).

Los primeros ligandos identificados por su unión específica a la familia FPR fueron generados por un estudio en una biblioteca de péptidos de alto rendimiento, se obtuvo un hexapéptido (Trp-Lys-Tyr-Val-D-Met), también denominado WKYMVM o Péptido W; el cual se une al receptor FPR2/ALX con alta afinidad. Sin embargo, aunque tuvo potente actividad in vitro, induciendo el flujo de Ca^{2+} , induciendo la quimiotaxis y la producción de superóxido, el péptido W tiene muestra de poca promesa en entornos inflamatorios complejos en vivo. En cuanto a los antagonistas, su uso general es controversial, debido a los efectos dependientes de la concentración, cuando se utilizó la misma biblioteca de péptidos para generar el péptido WRW4, un antagonista de FPR2/ALX (Dufton et al., 2010, p.184).

Se ha informado que un compuesto llamado AR234245142, cuya estructura no fue divulgada, disminuye la hiperreactividad de vías respiratorias inducida por ovoalbúmina in vivo. También disminuyó la mortalidad en un modelo murino de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, lo que sugiere el uso de esta nueva serie de agonistas de FPR2/ALXR para el tratamiento del asma humana y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Corminboeuf et al., 2014, p.5).

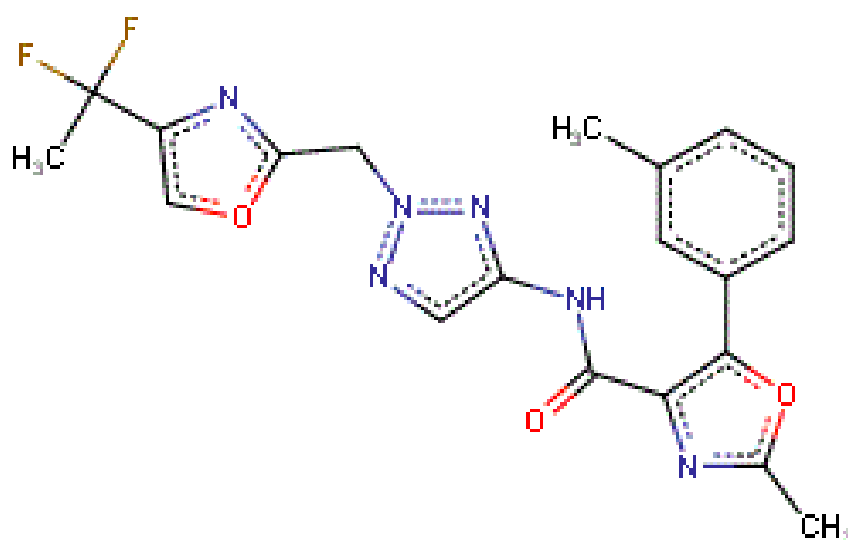
Aunque la mayoría de los agonistas de FPR2/ALX identificados son péptidos, el desarrollo de nuevas moléculas mediante síntesis orgánica, es un método más utilizado para la fabricación de nuevos fármacos; por esta razón, una serie de compuestos no peptídicos también está actualmente en desarrollo. La comercialización de derivados de péptidos “W”, mencionados antes, han sido

utilizados en distintas investigaciones, para la caracterización de la familia FPR, ha permitido la selección de propiedades de unión competitiva de nuevos compuestos para ser analizados utilizando citometría de flujo de alto rendimiento, con lo que se evaluó cerca de 25,000 moléculas pequeñas, y se obtuvieron varias moléculas que actuaban como agonistas y antagonistas de FPR1; moléculas que causan acción similar al antagonista FPR1 (3570-0208), y el antagonista FPR2/ALX (BB-V-115), lo cual genera información válida para investigar nuevas drogas (Dufton et al., 2010, p.184).

La compañía Amgen pudo identificar varios compuestos de pirazolona, en especial el compuesto 43 (C43), por cribado de alto rendimiento, el cual demostró tener una potente farmacología antiinflamatoria por la inhibición de quimiotaxis de neutrófilos mediada por fMLF e IL-8, *in vitro*, y además se obtuvo reducción de edema *in vivo*. Además, esta compañía sigue la línea de investigación en la evaluación de modificaciones de un núcleo de bencimidazol para generar otras moléculas específicas para FPR2/ALX, que producen respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias *in vitro*. Un estudio realizado con C43 demostró potentes actividades inhibitorias de tráfico de leucocitos en la inflamación aguda, y este efecto fue genuinamente mediado por FPR2 /ALX, ya que se no se mostró en ratones deficientes de este receptor (Dufton et al., 2010, p.184).

En el 2016, la compañía Actelion, hoy propiedad de Johnson & Johnson, implementó la fase 1 de desarrollo para el primer tipo de un potente antiinflamatorio agonista y selectivo FPR2/ALX llamado ACT-389949 (Figura 17), cuyo nombre IUPAC corresponde a (2-Metil-5-m-tolil-oxazol-4-ácido carboxílico {2-[4-(1,1-difluoro-etil)- oxazol-2-ilmetil]-2H-[1,2,3]triazol-4-il}-amida) (Stalder, et al., 2016, p.5).

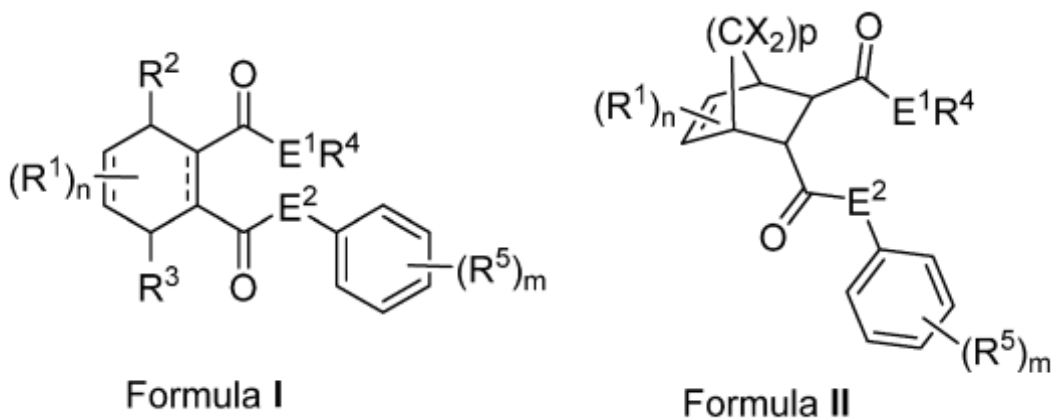
Figura 17. Molécula ACT-389949



Nota: The British Pharmacological Society (BPS) and The International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR), Guide to Pharmacology. (2018)

Allergan, otra compañía farmacéutica, parece ser uno de los más activos investigadores en el desarrollo de pequeñas moléculas agonistas para FPR2/ALXR, que inició en el 2011 con la publicación de una patente que cubren los agonistas o antagonistas de FPR2/ALXR, los cuales fueron llamados como fórmulas I y II (Figura 18), incluyen moléculas derivadas de cicloalquilo y cicloalquenil -1,2- ácido dicarboxílico. Estas poseen actividad agonista o antagonista para FPR2/ALXR. Se obtuvieron 90 compuestos con una concentración efectiva promedio (EC50), derivados de anilina y pueden ser cis-endo o cis-exo, de acuerdo con su acomodo espacial (Corminboeuf et al., 2014, p.8).

Figura 18. Moléculas Patentadas por la Compañía Allergan



Nota: Corminboeuf et al. (2014)

Medicamentos Biotecnológicos

Los medicamentos que se fabrican por biotecnología incluyen proteínas obtenidas por ingeniería genética, anticuerpos monoclonales producidos mediante la tecnología de la hibridoma, vectores para el transporte de material genético, fragmentos de anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, vacunas, ente otros. Estos fármacos presentan algunas características que los diferencian de los medicamentos tradicionales. Su estructura química es más compleja, ya que se trata con frecuencia de proteínas que contienen un número elevado de aminoácidos, su configuración, secuencia de estos, y algunas de esas proteínas requieren a otras proteínas para realizar que sea activa (Domínguez y Hurlé, 2006, p.113).

La farmacocinética es la parte de la farmacología que se encarga de estudiar los procesos por los cuales un fármaco atraviesa en el organismo; es decir, absorción, distribución, metabolismo y eliminación, lo anterior con el fin de comprender y controlar la acción terapéutica de los fármacos en el cuerpo humano; se debe conocer la cantidad de fármaco que alcanzará el sitio de acción y cuándo ocurrirá esto. La comprensión y utilización de los principios farmacocinéticos pueden incrementar la probabilidad de éxito terapéutico y reducir la aparición de efectos farmacológicos indeseables en el cuerpo (Brunton et al., 2018, p.17).

En la investigación farmacológica, la farmacocinética se puede utilizar para resolver casos clínicos concretos, como la detección de interacciones, biodisponibilidad, la implementación y diseño de regímenes de dosificación individualizados. La farmacocinética en la actualidad es de gran utilidad para todos los profesionales implicados en el desarrollo, evaluación y uso de los medicamentos, en especial interés para la profesión farmacéutica, aunque para su manejo se requiere un conocimiento profundo de terapéutica farmacológica, en el seguimiento clínico de los pacientes para una mejora en el tratamiento y sus requerimientos especiales (Domínguez et al., 2006, p.113).

En los últimos años, los medicamentos biotecnológicos, los cuales incluyen proteínas, péptidos, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos, así como oligonucleótidos antisentido y preparaciones de ADN, para terapia génica, han sido un importante objetivo de los esfuerzos de investigación y desarrollo en la industria farmacéutica. Se puede mencionar la Epoetina-a, abciximab, y trastuzumab, los cuales son ejemplos de medicamentos biotecnológicos muy exitosos que han revolucionado en distintas aplicaciones la farmacoterapia (Tang, Persky, Hochhaus y Meibohm, 2004, p. 2184).

Para el año 2013, se calculaba que los fármacos biotecnológicos representaban alrededor del 20% del total de medicamentos que alcanzan el mercado y el 50% de los nuevos fármacos en desarrollo. (Iglesias, González, Moreno y Tejerina, 2013, p.223). En la actualidad existen mas de 450 productos biotecnológicos aprobados por la Food & Drug Administration de los Estados Unidos (Food & Drug Administration [FDA], 2018).

Farmacocinética de los medicamentos obtenidos por biotecnología

En esta sección de los medicamentos obtenidos por biotecnología, se aborda los principios farmacocinéticos básicos, que incluyen la administración, distribución, metabolismo y eliminación (ADME).

vía de administración oral.

En la actualidad, la mayoría de los productos biotecnológicos se desarrollan como formulaciones parenterales por su baja a biodisponibilidad oral. La administración oral de péptidos

y proteínas, sin embargo, ofrece las ventajas de una administración sin dolor y un significativo ahorro en costos de salud. Aunque varios factores tales como la permeabilidad, estabilidad gastrointestinal, así como el tiempo de tránsito, pueden afectar la velocidad y el alcance de péptidos y proteínas por vía oral, el tamaño generalmente no se considera obstáculo; solo en algunos casos como la última limitante. Algunos fármacos polipeptídicos, como la ciclosporina y desmopresina, son disponible en formas de dosificación oral, y con ello se evidencia que dichos obstáculos de la vía oral pueden ser superados (Tang et al., 2004, p.2191).

La vía de administración oral no se considera para los péptidos y las proteínas en general como una buena vía de administración, pues es causa de una baja biodisponibilidad, aproximadamente 1%, y esto se debe a la vulnerabilidad de estos compuestos al medio fuertemente ácido del estómago, a degradación producida por las peptidasas intestinales y, además, a su escasa permeabilidad, debido al gran tamaño molecular, la carga eléctrica y la elevada polaridad. La mayoría de estos medicamentos biotecnológicos están dentro de la clase III del sistema de clasificación biofarmacéutica (alta solubilidad, baja permeabilidad); en pocos casos pertenecen a la clase IV (baja solubilidad, baja permeabilidad), y una excepción de algún fármaco está dentro de la clase I (alta solubilidad, alta permeabilidad), en general presentan alta solubilidad y permeabilidad baja (Lin, 2009, p.662).

vía de administración pulmonar.

La vía de administración pulmonar es una alternativa a la vía oral para la administración de péptidos y proteínas, destinadas tanto a conseguir una acción local a nivel de sistema respiratorio como para ejercer una acción sistémica. El uso de biomoléculas por esta vía de administración inició en los años 70, cuando al utilizar insulina en forma de aerosol se comprobó que ocurría una absorción parcial de esta. Para obtener un efecto local sobre las vías respiratorias, el medicamento debe alcanzar de forma eficiente la superficie a través del flujo aéreo, penetrando o incluso atravesando la barrera mucosa para alcanzar su lugar de acción (Domínguez et al., 2006, p.115).

La administración por inhalación de agentes biotecnológicos tiene la ventaja de fácil administración, la presencia de una gran área de superficie mayor a 75 m² disponible para la

absorción, alta vascularización, y evita el metabolismo de primer paso. Esta vía de administración ha sido ampliamente estudiada con el fin de mejorar continuamente la deposición del fármaco en aerosol en la región alveolar altamente perfundida, para facilitar la absorción máxima del medicamento. Algunos inconvenientes que se pueden mencionar, para esta vía, incluyen la presencia de ciertas proteasas en el pulmón y los posibles efectos locales de los agentes inhalados en los tejidos pulmonares, como factores de crecimiento y citoquinas; el peso molecular para la distribución después de ingreso por los pulmones se ha discutido, pero no se considera relevante (Tang et al., 2004, p.2190).

Con el avance de los últimos años, se han controlado mejor las variables que afectan esta vía de administración; se utilizan agentes mucolíticos como dornasa- α y las antiproteasas como inhibidores leucoproteasa y proteínasa α 1. Existe una relación inversa entre el peso molecular del fármaco y la difusión a través del moco; inicia desde los 30 kDa, se puede afectar por sustancias como la mucina, ADN, entre otras, y por enzimas. Los factores que aumentan la difusión son la superficie efectiva de tensoactivos y el incremento en el tiempo de retención de las partículas. Las moléculas pequeñas se absorben por difusión pasiva o transporte mediado por receptores; los péptidos pequeños, con un peso inferior a 40 kDa, pueden absorberse por transporte paracelular, para pesos mayores por medio de transcitosis, a veces mediada por receptores de membrana. La absorción puede variar con valores de concentraciones máximas de 10-30 minutos para pequeños péptidos solubles, hasta varias horas si son proteínas grandes (Domínguez et al., 2006, p.115).

vía de administración nasal.

La administración intranasal, para medicamentos biotecnológicos, ofrece una fácil administración; llega el medicamento a una superficie enriquecida por una red vascular y linfática, evitando metabolismo de primer paso. Varios fármacos biotecnológicos, incluidos calcitonina, oxitocina, análogos LH-RH, hormona del crecimiento, interferones, e incluso vacunas han sido estudiados para su administración por esta vía. En general, los polipéptidos con un peso molecular de hasta 2 kDa son activos a través de la vía intranasal; en el caso de péptidos con pesos de 2 a 6 kDa, requieren la adición de promotores para alcanzar una biodisponibilidad adecuada. Algunas limitaciones de la vía intranasal incluyen alta variabilidad asociada con el lugar de absorción, el

sistema de administración, cambios de secreción mucosa y el aclaramiento mucociliar, así como pacientes con alergia, fiebre del heno o resfriado común en sujetos seleccionados (Tang et al., 2004, p.2190).

La vía nasal puede utilizarse para la administración de péptidos y proteínas destinadas a ejercer efectos locales y sistémicos. Para moléculas pequeñas formadas por alrededor de 10 aminoácidos, la biodisponibilidad puede alcanzar el 100% en algunos casos; en el caso de moléculas de 25 aminoácidos o más, se produce una disminución muy pronunciada de la biodisponibilidad, hasta el 1% o incluso valores inferiores. Las limitantes de la vía nasal para la administración de biomoléculas pueden verse aumentadas con la incorporación de agentes viscosizantes, que aumentan su tiempo de contacto con la mucosa, y moléculas bioadhesivas, que incrementan la permeabilidad (Domínguez et al., 2006, p.115).

vía de administración intravenosa.

La administración intravenosa de medicamentos biotecnológicos ofrece la ventaja de evitar la degradación presistémica, logrando así la mayor biodisponibilidad. La administración en bolo o infusión continua no siempre puede proporcionar un perfil de concentración-tiempo deseado, dependiendo del medicamento. Los inconvenientes de la vía subcutánea e intramuscular son una biodisponibilidad potencialmente menor que se debe, en menor medida, a variables como el flujo sanguíneo local, el trauma de la inyección, la degradación de proteínas en el lugar de la inyección y las limitaciones de la absorción en la circulación sistémica, relacionadas con el tamaño y difusión efectivos de los poros capilares (Tang et al., 2004, p.2189).

vía de administración subcutánea.

La administración subcutánea sigue considerándose una vía primordial para la administración de péptidos y proteínas en la terapéutica, ya que la vía oral falta mucho por descubrir para poder utilizarla mejor con sus limitaciones. El sistema linfático desempeña una función importante en la absorción de macromoléculas cuando se administran por vía subcutánea, ya que la extravasación y reabsorción de proteínas plasmáticas son con frecuencia referidas como

transporte convectivo, porque el transporte de proteínas se asocia con el movimiento del agua (Lin, 2009, p.665).

Al administrar, vía subcutánea, un producto biotecnológico, puede suceder que la molécula llegue a circulación sistémica a través de los capilares sanguíneos o a través de vasos linfáticos. Además, parece haber una relación lineal entre el peso molecular de un producto biotecnológico entre algunos rangos determinados, y la cantidad de la dosis absorbida por los vasos linfáticos. Las macromoléculas mayores de 16 kDA son mayormente absorbidas por los linfáticos, los menores de 1 kDA se absorben mayormente en circulación sanguínea, y esto es de suma importancia en objetivos terapéuticos para células linfoides (interferones e interleucinas) (Tang et al., 2004, p.2189).

Las limitaciones que surgen de la administración por vía parenteral de productos biotecnológicos que presentan un rápido aclaramiento, han ocasionado promover el desarrollo de distintas acciones que contrarrestan dichos procesos, como modificar el perfil farmacocinético y, en consecuencia, facilitar la administración de estos agentes terapéuticos. Esto se ha logrado mediante cambios estructurales, por conjugación con diversos polímeros, además con hiperglicosilación de las proteínas y con el desarrollo de formulaciones parenterales de liberación controlada, en el caso de la conjugación de péptidos y proteínas con polímeros, con especial interés en tratamientos contra el cáncer (Domínguez et al., 2006, p.116).

vía de administración transdérmica.

La administración transdérmica de medicamentos biotecnológicos ofrece varias ventajas, ya que evita la degradación metabólica y química en el tracto gastrointestinal. También evade metabolismo de primer paso por el hígado, y proporciona liberación constante del agente biotecnológico. Los métodos para la administración transdérmica incluyen la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia (sonoforesis), y la aplicación de un sistema eléctrico de bajo nivel (iontoforesis); estos incrementan la permeabilidad de la piel a los agentes iónicos (Tang et al., 2004, p.2191).

distribución de los productos biotecnológicos en el organismo.

Cuando los péptidos y proteínas ingresan a la circulación, se transportan, atraviesan la pared vascular y llegan a los tejidos para realizar su acción farmacológica. Para actuar sobre su receptor, estos medicamentos utilizan generalmente dos vías. Una de estas es por extravasaciones de péptidos y fármacos proteínicos de la circulación sanguínea al espacio intersticial; la otra vía es la difusión de los fármacos a través de la matriz extracelular hacia el receptor celular. Por esta razón, el endotelio vascular y el intersticio son barreras significativas para la distribución de los fármacos peptídicos y su receptor; aunque la distribución es limitada y lenta, los fármacos proteicos pueden alcanzar los tejidos diana, donde ejercen su actividad farmacológica. Generalmente los medicamentos proteínicos tienen un tiempo de circulación prolongado en la sangre, y esto compensa la lenta distribución del fármaco (Lin, 2009, p.667).

Se considera que el volumen de distribución de un fármaco está determinado en gran medida por sus propiedades fisicoquímicas, unión a proteínas y su dependencia de los procesos de transporte activo. Muchos estudios sobre volumen de distribución de productos biotecnológicos se aclaran con compuestos radiomarcados, proteínas radiomarcadas que se utilizan, por lo general, para evaluar dianas específicas de medicamentos u órganos principales de eliminación. Como la mayoría de las proteínas terapéuticas son de gran tamaño, su volumen aparente de distribución suele ser pequeño y está limitado al volumen del espacio extracelular, debido a la poca movilidad al paso alterado a través de membranas. La captación tisular activa y unión a proteínas extra e intracelulares puede, sin embargo, aumentar sustancialmente el volumen de distribución de los fármacos de péptidos y proteínas (Tang et al., 2004, p.2192).

metabolismo de los productos biotecnológicos en el organismo.

Los péptidos pueden degradarse por peptidasas, se clasifican en: endopeptidasas, que rompen los enlaces peptídicos dentro del péptido, y las exopeptidasas, que catalizan la eliminación de uno o dos aminoácidos del extremo N o del extremo C de un péptido. Cada peptidasa parece tener su propia especificidad de escisión de los péptidos. Para las proteínas existen dos mecanismos principales de degradación: la vía lisosomal y la vía mediada por ubiquitina. Cuando se da

degradación de componentes celulares por medio del lisosoma se llama autofagocitosis; de manera análoga, las proteínas terapéuticas y los anticuerpos monoclonales, se degradan por vía lisosomal mediante endocitosis por medio de receptores específicos o pinocitosis no específica. Las proteínas extracelulares captadas por una vesícula interna de la membrana plasmática se procesan en el endosoma y luego se envían al lisosoma (Lin, 2009, p.674).

La ubiquitina es una pequeña proteína altamente conservada compuesta de 76 aminoácidos que se encuentra en todas las células eucariotas. La degradación una proteína mediada por ubiquitina se puede ver como proteólisis de dos pasos. Primero, la proteína defectuosa se marca formando un enlace covalente con las ubiquitinas. Una vez que varias moléculas de ubiquitina se unen a una única molécula de proteína por enlaces covalentes (poliubiquitinadas), es reconocida por un proteasoma 26S aguas abajo, que se encuentra en el núcleo y el citoplasma, donde la proteína marcada se degrada (Lin, 2009, p.676).

El proteasoma 26S es un complejo proteolítico multifuncional dependiente de ATP, que consiste en un núcleo proteolítico, compuesto por el proteasoma 20S, intercalado entre dos complejos reguladores 19S. El proteasoma 20S contiene al menos dos sitios activos similares a la quimotripsina, dos similares a la tripsina y dos similares a la caspasa. Las proteínas dañadas se vuelven poliubiquitinadas y normalmente son degradadas por los proteasomas. Sin embargo, las proteínas poliubiquitinadas pueden escapar de la degradación proteasomal debido a la agregación de proteínas. Estas proteínas agregadas se reconocen por una proteína citoplásmica, histona desacetilasa 6 (HDAC6) y se degradan a través de la vía de ubiquitina-agresiva. La vía de la ubiquitina y la vía de la ubiquitina-agresiva trabajan en conjunto para destruir las proteínas poliubiquitinadas (Lin, 2009, p.676).

eliminación de los productos biotecnológicos en el organismo.

La semivida de los productos biotecnológicos puede ser diversa; puede predecirse dependiendo de la función biológica que cumplen; las hormonas tienen vidas medias cortas, y los anticuerpos monoclonales pueden durar semanas. Las vías de eliminación no metabólica, como la excreción renal o biliar, son despreciables para la mayoría de los péptidos y proteínas, con

excepciones de algunos péptidos y proteínas, como la inmunoglobulina A y el octreótido, que se excretan en la bilis. Cuando ocurre excreción biliar de péptidos y proteínas, por lo general luego se produce un metabolismo de estos compuestos en el tracto gastrointestinal (Tang et al., 2004, p.2193).

La gran parte de péptidos y proteínas en el plasma son hidrosolubles, la filtración glomerular puede ser importante en la eliminación de péptidos y proteínas, por su tamaño molecular. La filtración glomerular de estos depende de factores como el tamaño, la forma y la carga del compuesto. Por las limitaciones en tamaño de poro en glomérulos, se considera que con un tamaño molecular de menos de 10 kDa, puede ser filtrada libremente por glomérulo, mientras para proteínas con un peso molecular mayor de 60 kDa será muy limitado. Para moléculas con pesos entre 10 y 60 kDa, la carga y la forma de la molécula son parámetros determinantes en la filtración. Las proteínas biotecnológicas tienen una vida media larga de horas o días, son más estable que los péptidos; por esto, el aclaramiento renal puede contribuir significativamente, si su peso molecular es más bajo que el poro efectivo de la filtración glomerular, entre 80 y 100-Å de diámetro (Lin, 2009, p.676).

Las enzimas proteolíticas, como las proteasas y las peptidasas, están disponibles en todo el cuerpo; por ello el metabolismo intensivo de péptidos y proteínas no se limitan al hígado, los riñones y el tejido gastrointestinal, también incluyen la sangre y otros tejidos corporales. La eliminación que ocurre en sangre periférica puede afectar gran parte de los fármacos peptídicos y proteicos. La endooligopeptidasa se aisló originalmente y se caracterizó en tejidos nerviosos para hidrolizar varios neuropéptidos, incluidos los péptidos que contienen encefalina (Tang et al., 2004, p.2194).

El hígado también puede tener una función relevante en el metabolismo de los péptidos y las proteínas, algunas de las cuales se degradan en ese órgano. La insulina se degrada al parecer por una endopeptidasa que actúa en la proteólisis de esta hormona internalizada en varios sitios, y la actividad endosomal es el resultado de una proteasa de ácido aspártico llamada catepsina. La proteólisis de glucagón también se ha atribuido a las formas de membrana de las catepsinas B y D, y para proteínas más grandes, como t-PA cuyo peso es aproximadamente de 65 kDa, varios

procesos de transporte mediados por receptores en el hígado pueden facilitar su absorción y su metabolismo posterior. Según evidencia otro receptor de membrana en el hígado, los receptores de lipoproteína de baja densidad (LPR) se relacionan con favorecer el aclaramiento general de t-PA (Tang et al., 2004, p.2195).

Química Medicinal *In Silico*

La química medicinal no incluye únicamente moléculas, estructuras y diseño, sino que también estudia actividades farmacológicas. La potencia de una molécula varía según su estructura; por ello se analiza la relación estructura-actividad (SAR); esta es otra subdisciplina que se encarga de estudiar la capacidad de una molécula para representar cualquier actividad farmacológica. El diseño de drogas *in silico* es una técnica novedosa que se emplea en el diseño de moléculas mediante el uso de software asistido por computadora, y que contribuye a obtener moléculas de calidades superiores y más potentes (Singla, 2015, p.971).

La farmacología del último siglo ha funcionado a través de investigación científica, con la capacidad de establecer relaciones cualitativas o semicuantitativas entre la estructura molecular y la actividad de modo de desarrollo, mediante pensamiento e invención con conocimiento e hipótesis, y estas ideas se han comprobado usando herramientas de farmacología tradicionales, como los modelos *in vivo* e *in vitro*. En los últimos años los métodos computacionales (*in silico*), se han aplicado al desarrollo y comprobación de hipótesis farmacológicas. Estos métodos incluyen bases de datos, relaciones cuantitativas estructura-actividad, farmacóforos, modelos de homología y enfoques de modelado molecular, además aprendizaje automático, extracción de datos, herramientas de análisis de redes y herramientas de análisis de datos que se desarrollan por medio de computadoras (Ekins, Mestres y Testa, 2007, p.9).

El papel de la química medicinal es más prominente en los pasos uno y dos del desarrollo de fármacos; el primero es de descubrimiento, que consiste en la elección del objetivo terapéutico, ya sea un modelo bioquímico, celular o *in vivo*; y la identificación o descubrimiento y producción de nuevos principios activos que interactúan con el objetivo seleccionado. El segundo paso es de optimización, que se ocupa de la mejora de un compuesto activo; la optimización principalmente toma en cuenta el aumento de la potencia, la selectividad y la disminución de la toxicidad. Sus

características son el establecimiento de relaciones de actividad de estructura, idealmente basadas en una comprensión del modo de acción molecular (Georges et al., 2015, p.5).

El diseño de medicamentos *in silico*, junto a la química medicinal, ha creado un desarrollo conjunto de investigación, principalmente por las técnicas utilizadas como la basada en ligandos, la cual se utiliza para aislar las estructuras requeridas. Al utilizar estas técnicas estratégicas, hay altas posibilidades de ofrecer un elevado rendimiento en la selección, y con ello discriminar una gran cantidad de moléculas en mucho menos tiempo. Con estas herramientas se crean opciones maravillosas para el desarrollo de nuevos fármacos, ya que puede ayudar en el desarrollo de moléculas de fármacos nuevas, seguras, eficaces y potentes (Singla, 2015, p.971).

Los métodos *in silico* se utilizan principalmente, junto con la generación de datos *in vitro*, tanto para crear el modelo como para probarlo. Estos, se utilizan en el descubrimiento y optimización de nuevas moléculas con afinidad por un objetivo, la clarificación de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad, así como características fisicoquímicas. La selección y clasificación de moléculas en grandes bibliotecas químicas, de acuerdo con su probabilidad de afinidad por determinado objetivo, generalmente se denominan con el nombre de detección virtual (cribado o “screening”), lo que puede considerarse como un intento de extender el concepto de relación cuantitativa de estructura y actividad (QSAR). Las técnicas experimentales de detección de alto rendimiento (HTS) se han complementado con los métodos de detección virtual, lo cual es utilizado por las compañías farmacéuticas (Ekins et al., 2007, p.9).

En los distintos análisis, ya sean *in silico*, bioquímicos o celulares, al elegir un compuesto se realiza hacia un objetivo en específico independiente o ligado a una patología. Los compuestos que muestran un cierto grado de unión al objetivo, o que media alguna señal funcional con su unión, se conocen como “hits”. Estos hits pueden elevarse al grado de hit validado, si la identidad y la pureza del compuesto, junto con el resultado del ensayo se confirman en una determinación de actividad con distintas variables. Después de la obtención del compuesto antes mencionado, se espera desarrollar lo que se conoce como “lead”, el cual es un compuesto o conjunto de compuestos con actividad y selectividad comprobadas mediante un screening, y además cumplen con algunos criterios como la originalidad, la patentabilidad y la obtención accesible (Georges et al., 2015, p.5).

Con los procesos descritos, se espera que la variación molecular se afine, y los parámetros fisicoquímicos sean adecuados para ADME. Este lead el cual es optimizado (“optimized lead”) o también conocido como candidato preclínico; si no presenta toxicidad en modelos celulares y animales, pasa a ser un candidato clínico, el cual, si supera las pruebas de eficacia y seguridad en humanos, así como las limitaciones para su comercialización, se convierte en una nueva entidad farmacéutica (“new drug entity”). No existe fármaco ideal en el mundo real, pero debe tener un óptimo relativo, en general desarrollar medicamentos con perfiles de efectos secundarios diferentes a comercializados para la misma indicación terapéutica (Georges et al., 2015, p.5).

Descriptorios utilizados en la investigación *in silico*

La predicción de afinidad, también llamado “scoring”, es una función que se aplica a la mejor postura energética o a las mejores poses encontradas para cada molécula, y con la comparación de las puntuaciones de afinidad para diferentes moléculas, se obtiene su orden de clasificación relativo. El supuesto del cual se parte es, para una molécula dada, la mejor postura, según la puntuación de afinidad, se encuentra entre los distintos números de posiciones guardadas identificadas con la puntuación de acoplamiento (Kroemer, 2007, p.313).

El acoplamiento molecular, conocido también como “Docking”, intenta predecir la posición nativa, la orientación y la conformación más estable de unión (modo de unión) de un ligando de molécula pequeña dentro del sitio de unión de una macromolécula dirigida. Con esto se obtiene comprensión básica de las interacciones que tienen lugar entre el ligando y su receptor; el docking o acoplamiento facilita la estimación de afinidad antes de la síntesis, así como a las técnicas de optimización del ligando. Los sistemas de acoplamiento iniciaron en la década de los 80; se continúan investigando intensivamente, y hoy en día se considera una herramienta muy útil en el descubrimiento de fármacos. Un ejemplo de programas que se utilizan para docking es Autodock (Zoete, Grosdidier y Michielin, 2009, p.239).

Los estudios cuantitativos de relaciones estructura-actividad (QSAR) son importantes dentro de la química moderna. En estos análisis QSAR, uno o más indicadores moleculares están relacionados con la actividad molecular mediante un análisis estadístico; su objetivo principal es crear modelos estadísticos a través de los cuales es posible predecir la actividad biológica de nuevos

compuestos que no se han utilizado aun por medio de la interpretación de su actividad y optimizar los compuestos. Para desarrollar un modelo QSAR, se requiere la selección de una base de datos de compuestos con actividades biológicas conocidas, el cálculo de descriptores moleculares, el desarrollo de un modelo estadístico que relacione actividad con los descriptores calculados, y por último una evaluación del modelo generado con un conjunto de pruebas (Vilar, Cozza y Moro, 2008, p.1555).

El número y tipo de descriptores moleculares es grande y variado; por esto, es muy importante seleccionar los más relevantes y modelar el efecto biológico. Se pueden clasificar de acuerdo con la dimensionalidad de representación química a partir de la cual se calculan. Los descriptores unidimensionales codifican propiedades como peso molecular, la refractividad molar y el coeficiente de partición octanol/agua, ofreciendo una justa reflexión del tamaño, la forma y la lipofilidad de las moléculas; algunos de estos se asocian con el carácter farmacológico y frecuentemente en ecuaciones QSAR son descriptores biológicos también. Los descriptores 2D se calculan desde representaciones topológicas moleculares, y se conocen generalmente como 2D-QSAR, y su uso se establece en predicción de propiedades fisicoquímicas como para proporcionar estimaciones cuantitativas de los efectos biológicos (Ekins et al., 2007, p.11).

Los descriptores 3D se obtienen directamente de la estructura 3D de las moléculas; a diferencia de los métodos descritos antes, se conocen como métodos 3D-QSAR. Este tipo de descriptores dependen de la conformación molecular utilizada; por ello muchos métodos 3D-QSAR necesitan que las moléculas estén alineadas antes de construir el modelo; debido a esto surgieron varias técnicas y enfoques para alinear moléculas, como a través de la flexibilidad de superposición o por el acoplamiento de compuestos en un sitio activo de la proteína, donde se dispone de información estructural determinada experimentalmente sobre la proteína diana (Ekins et al., 2007, p.11).

Desarrollo *In Silico* de Proteínas

Para una proteína formada por 200 aminoácidos, existen 20^{200} posibles acomodos distintos de la secuencia de los residuos; mediante el proceso evolutivo solo una muy pequeña parte ha sido utilizada. El diseño de *novo proteínas* estudia las secuencias completas, su acomodo en el espacio,

mediante los principios físicos que subyacen en el plegamiento de proteínas. Hasta el momento, casi toda la ingeniería de proteínas ha implicado la modificación de proteínas naturales; en la actualidad, para enfrentar los desafíos actuales en biomedicina y nanotecnología, debería ser posible diseñar nuevas proteínas funcionales desde cero (Huang, Boyken y Baker, 2016, p.320).

El diseño de proteínas y péptidos se refiere a cambiar la disposición de los aminoácidos para crear una proteína o péptido completamente nuevo; esto incluye el diseño y la estructura 3D, o para adaptarse a una plantilla estructural predefinida y diseñar solo la secuencia. El enfoque más común aceptado para el diseño racional es la modificación local de una proteína preexistente o el ajuste de una secuencia de aminoácidos en un pliegue de proteína dado. El uso de estructuras predeterminadas evita dificultades en predicción de los pliegues de una secuencia desconocida. Las proteínas terapéuticas para un objetivo conocido pueden diseñarse mediante dos enfoques: el primero, identificando proteínas que tienen un pliegue complementario al objetivo, y modificar o cambiar algunos residuos para facilitar la unión, y el segundo enfoque es buscar o diseñar una secuencia que asemejaría el pliegue complementario y exhibiría capacidades de unión (Roy, Nair, Sen, Soni y Madhusudhan, 2017, p.34).

En el caso de estudio de una macromolécula biológica por técnicas computacionales, el primer paso es generar un modelo que permita definir las posiciones de los átomos en el espacio respecto a un sistema de coordenadas cartesianas. Este modelo se obtiene a partir de técnicas experimentales como son la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o la cristalografía de Rayos X. De todas formas, cabe aclarar que, en aquellos casos donde no hay posibilidad de obtener la estructura por estos métodos, es factible la realización de un modelo que permita, a partir de una estructura conocida, armar el conjunto de coordenadas de una nueva molécula por medio de un trabajo basado en la homología de las secuencias de aminoácidos que las componen (Córsico, Falomir, Franchini y Scaglia, 2013, p.138).

El acoplamiento proteína-proteína en realidad es anterior al de moléculas pequeñas (proteína-ligando), ya que el concepto de acoplamiento proteico introducido en un principio por algunos científicos se extendió posteriormente a la interacción entre macromoléculas y ligandos pequeños. El análisis de la flexibilidad en el proceso de unión se considera más fácil con moléculas

pequeñas, e implica un costo computacional considerable, y el estudio de acoplamiento de moléculas pequeñas es una de las investigaciones más activas en el descubrimiento de medicamentosa *in silico*. La mayoría de los algoritmos actuales de acoplamiento de proteínas se han desarrollado como derivados del experimento de evaluación crítica de la predicción de interacciones (CAPRI), lo cual es una colaboración de toda la comunidad que ha acelerado el desarrollo de métodos computacionales de acoplamiento de proteínas (De Ruyck, Blossey y Lensink, 2016, p. 4).

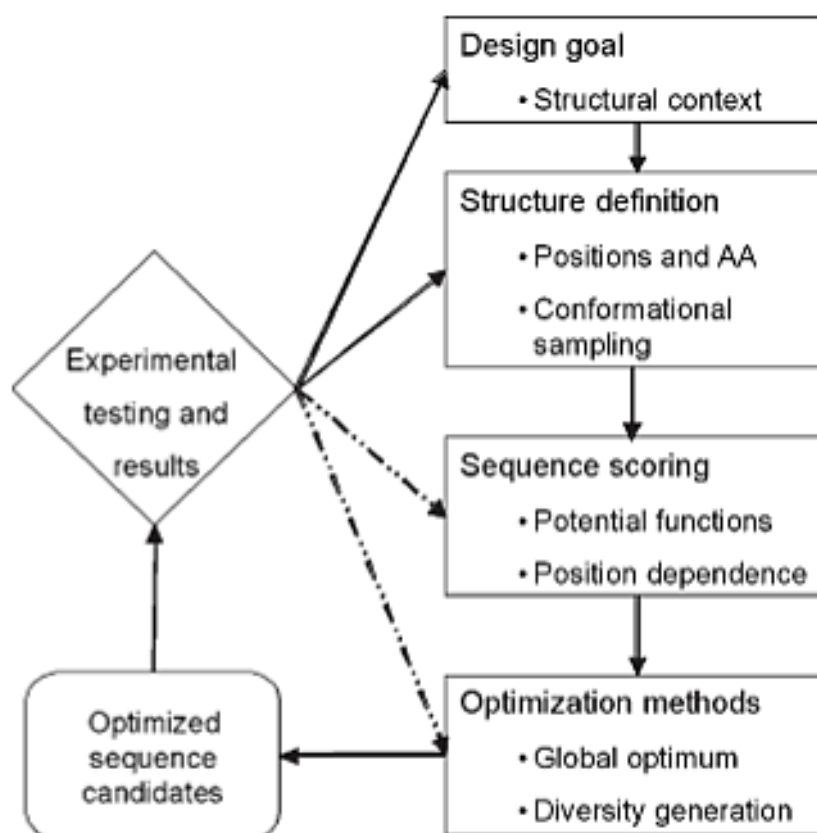
El esquema del proceso para el diseño de la proteína *in silico* consta de cuatro pasos, que son:

1. Definir el objetivo de diseño en un contexto de biología estructural.
2. Definir la variación estructural y conformacional que se probará.
3. Aplicar funciones de puntuación para diferenciar las posibles secuencias.
4. Búsqueda de la diversidad de secuencia definida en los pasos 1 y 2 para las secuencias de puntuación óptimas (Dahiyat, 2006, p. 361).

El objetivo de diseño funcional de proteínas *in silico* define una región de la proteína a manipular, así como un conjunto molecular para el cálculo, como los complejos de receptores o sustratos. La definición de la estructura proporciona los detalles de las posiciones de los residuos, los tipos de aminoácidos y la variación conformacional considerada para cada cadena lateral; el scoring de la secuencia se realiza calculando las energías de interacción de la cadena lateral utilizando las funciones descritas, específicas para cada región de la proteína. Luego se generan las secuencias con la mejor energía de interacción, seguido de pruebas experimentales. El éxito o el fracaso de las secuencias diseñadas no solo sirven para mejorar el diseño de proteínas en particular, sino también para mejorar las funciones de scoring y el rendimiento en métodos de optimización (Dahiyat, 2006, p. 361).

Es necesaria una mayor cantidad de estructuras activadas e inactivadas en 3D, cuando la estructura 3D de una proteína diana y el sitio de unión están disponibles, se pueden desarrollar modelos predictivos basados en estructuras para agonistas y agonistas inversos, respectivamente. En ausencia de la estructura 3D de una proteína de interés o una conformación biológicamente relevante, el diseño del ligando se puede realizar mediante el uso de un método basado en el farmacóforo, pero pueden presentarse problemas importantes. Esto se basa en el supuesto de que varios ligandos se unen al mismo sitio de unión de la proteína. Por lo tanto, se puede identificar una superposición flexible, que representa el patrón de interacción del sitio de unión con los ligandos (Georges et al., 2015, p. 414).

Figura 19. Procedimientos para Desarrollo de Proteínas *In Silico*



Nota: Dahiyat. (2006)

Sitios de unión o receptores (objetivo macromolecular)

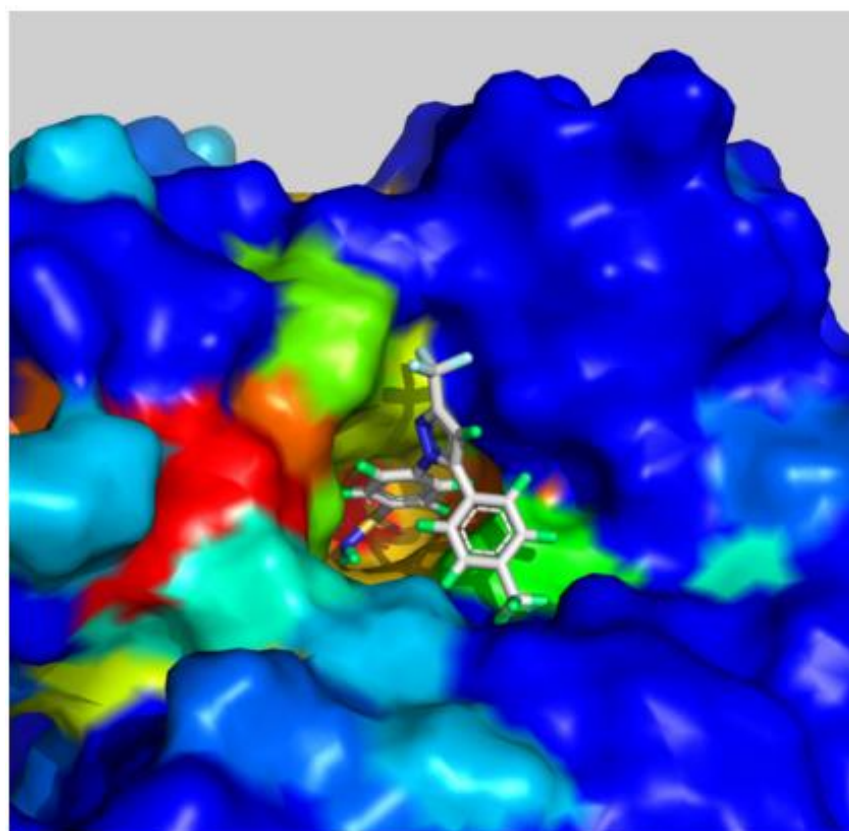
La comprensión de los sitios de unión de proteínas es la base del diseño de drogas. Un sitio de unión (“binding site”) es una región en una proteína donde otra molécula interactúa, puede ser la interfaz de una interacción proteína-proteína, una región donde se une un cofactor ligando, o un sitio catalítico de una enzima en la que una molécula se escinde o modifica. Una molécula de fármaco intencionalmente afecta la función de una proteína in vivo, por lo que debe unirse en una región que se superponga con la del ligando natural, para obtener una acción deseada, o en un sitio alostérico que afecta la forma del sitio de unión del ligando natural. Se considera una proteína como fármaco si un ligando, con propiedades similares a un medicamento, se puede unir con una alta afinidad, y si la modificación de la función de la proteína afecta positivamente a un estado de enfermedad (Ludington, 2015, p.145).

Conocer la estructura tridimensional de una proteína diana, así como la identificación de su sitio de unión, proporciona un punto de inicio ideal para el diseño racional de medicamentos, lo cual sucedió con la publicación de la estructura tridimensional de la proteasa del VIH y la posterior creación de inhibidores. Los datos estructurales genómicos han crecido con las estructuras cristalizadas disponibles para las proteínas, ampliando el conocimiento del espacio estructural de las proteínas, con los nuevos procedimientos, como en el caso de una importante clase farmacéutica de proteínas de membrana conocidas como receptores acoplados a proteínas G (Adams et al., 2014, p.326).

La interacción de una droga con un objetivo macromolecular envuelve el proceso de unión (“binding”). Usualmente, la unión se desarrolla en un área específica de la macromolécula (Figura 20), la cual se identifica como el sitio de unión (“binding site”). Por lo general se representa como un orificio en la superficie de la macromolécula, lo que permite a la droga adentrarse en la estructura del objetivo macromolecular. Algunas drogas experimentan una interacción permanente con el sitio de unión por medio de un enlace covalente, el cual tiene una fuerza de 200 a 400 kJ/mol. Sin embargo, la mayoría de las drogas interaccionan mediante formas débiles, conocidas como enlaces intermoleculares, y ninguno de estos enlaces iguala a la fuerza de un enlace covalente. (Graham, 2013, p.4).

Las interacciones electrostáticas que ocurren entre las moléculas se conocen como fuerzas intermoleculares, incluyen enlaces electrostáticos o iónicos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, interacciones dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas. Al ser enlaces débiles, se forman y luego se rompen, por lo que se produce un equilibrio entre la droga al estar unida o no con su objetivo. Sin embargo, las fuerzas de unión que proveen dichos enlaces son lo suficientemente fuertes para mantener la interacción por cierto periodo necesario y que se produzca un efecto; el tiempo de unión depende del número de enlaces intermoleculares involucrados. (Graham 2013, p.4).

Figura 20. Ejemplo de Sitio de Unión (Binding Site) Celecoxib Unido al Sitio Activo de Anhidrasa Carbónica II



Nota: Adams et al. (2011).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se describe lo referente a los procedimientos para llevar a cabo el estudio experimental *in silico*, se detalla el método utilizado, las variables que se esperan cuantificar, la recolección de los datos y el análisis de resultados fundamentales para el cumplimiento de los objetivos y dar respuesta a la interrogante formulada en el planteamiento del problema.

Enfoque

El enfoque de la presente investigación es de tipo cuantitativo, debido a la utilización de diversas variables que logran ser medibles a determinado tiempo. Además, se requiere de instrumentos para la recolección de los datos, los cuales son traducidos en datos numéricos y tabulados, generando así resultados con la aplicación de la estadística y deben ser interpretados con la finalidad de resolver el problema planteado. Por esta razón, como mencionan Hernández, Fernández y Baptista (2014), el enfoque cuantitativo es una aproximación en la que intenta probar una hipótesis con base en el análisis de resultados obtenidos en la medición de las variables.

Método

El método de la investigación es de tipo experimental *in silico*, ya que, como indican Hernández, Fernández y Baptista (2014): “La esencia de esta concepción de experimento es que requiere la manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles resultados” (p. 129). Este trabajo requiere la utilización de programas computacionales (“software”) para poder realizar distintos análisis, y obtener resultados cuantificables luego de distintas pruebas y modificaciones; en este caso será para determinar distintas características de una proteína diseñada *in silico*.

Variables

A continuación, se presentan las variables que se pretenden determinar y cuantificar por medio del estudio *in silico*, su respectivo concepto e instrumento por utilizar. Con dichas variables y su cuantificación se pretende obtener los resultados más relevantes del estudio realizado y cumplir con los objetivos previstos de la investigación. Una variable se define

como una propiedad que puede fluctuar y cuya variación es susceptible a medirse u observarse (Fernández, et al., 2014, p. 105).

Tabla 2. Variables de la Investigación

Variable	Definición conceptual	Definición operacional e instrumental
Péptidos desarrollados <i>in silico</i> resistentes a escisión	El diseño de proteínas y péptidos se refiere a cambiar la disposición de los aminoácidos para crear una proteína o péptido completamente nuevo; esto incluye el diseño y la estructura 3D, o para adaptarse a una plantilla estructural predefinida y diseñar solo la secuencia (Roy et al., 2017, p.34).	Modificación de Anexina A1 <i>in silico</i> , y visualización de las proteínas mediante software Chimera versión 1.13.
Composición porcentual de distintos aminoácidos en mejor ligando peptídico	Las proteínas pueden distinguirse con base en su número de aminoácidos (residuos de aminoácidos), en su composición o secuencia global de grupos aminoacilos (McKee et al., 2014, párr.4).	Determinación mediante cálculos porcentuales y visualización de la secuencia del péptido, además mediante la herramienta ProtParam.
Número de átomos de mejor ligando y peso molecular	Es la suma de las masas atómicas de cada uno de los átomos que componen una molécula de un compuesto (Chang et al., 2008, p.215).	Determinación por medio de software en línea ProtParam.

Punto isoelectrico de mejor ligando	El pH característico en el cual la carga eléctrica final es cero se conoce como punto isoelectrico o pH isoelectrico (pI) (Nelson et al., 2014, p.84).	Determinación por medio de software ProtParam, y herramienta en línea Protein-sol.
Tipo de interacciones moleculares con receptor modelado.	Las fuerzas intermoleculares incluyen enlaces electrostáticos o iónicos, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, interacciones dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas (Graham 2013, p.4).	Visualización por medio de Software Chimera versión 1.13.
ΔG (Cambio de energía de Gibbs) energía global de unión de los péptidos con el receptor	Cantidad termodinámica, definida: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S \leq 0$, es un proceso a temperatura y presión constante. Signo igual indica equilibrio y el signo menor que indica un proceso espontaneo (Chang et al., 2008, p.975).	Obtención de datos a través de simulación de acople molecular con software Autodock Vina, implementado en software PyRX.
Promedio de Hidropatía (GRAVY)	Sumatoria de índice hidropático de cada aminoácido y división del total de aminoácidos (Walker, 2005, pp. 571-607).	Calculo mediante plataforma Protparam, además de cálculo de porcentaje de aminoácidos polares.

Solubilidad <i>in silico</i> del mejor ligando peptídico	Se predice que cualquier valor de solubilidad escalado mayor a 0.45 tendrá una solubilidad más alta que la proteína de E. (Niwa et al 2009).	Mediante herramienta en línea Protein-sol.
--	--	--

Instrumentos y técnicas

Los instrumentos utilizados para el desarrollo de la investigación, el análisis de las variables y obtención de resultados cuantificables incluyen computadores con los requerimientos de hardware y software necesarios de acuerdo con lo solicitado para la funcionalidad de cada programa utilizado. Así como la utilización de herramientas en línea vía internet, las cuales se disponen como softwares libres, en este caso se utilizaron plataformas específicas para el análisis de proteínas. Por otra parte, se utilizaron bases de datos con información de proteínas, como estructuras y las secuencias de aminoácidos de estas.

Además de la utilización de programas computacionales, se utilizaron bibliotecas electrónicas (bases de datos), con información referente a estructura de proteínas, enzimas y secuencias de aminoácidos.

Protein data bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>, 2018), es una base de datos electrónica, ha servido como uno de los mayores depósitos de información sobre las estructuras 3D de proteínas, ácidos nucleicos y ensamblajes complejos. La organización Worldwide PDB (wwPDB) administra el archivo de PDB y garantiza que la PDB esté disponible de forma gratuita y pública para la comunidad global.

Universal Protein Resource (Uniprot) (<https://www.uniprot.org>, 2018), es un recurso integral para la secuencia de proteínas y los datos de anotación. Las bases de datos de UniProt son la base de conocimiento Uniprot (UniProtKB), los grupos de referencia de Uniprot (UniRef) y el archivo de UniProt (UniParc). Se desarrolló en colaboración entre el Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI), el Instituto Suizo de Bioinformática SIB y el Recurso de Información de Proteínas (PIR).

la herramienta en línea Blast-p del Centro Nacional de Información para Biotecnología U.S. (NCBI), es una herramienta básica de búsqueda de alineación local (The Basic Local Alignment Search Tool “BLAST”) encuentra regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias de bases de datos y calcula la importancia estadística de las coincidencias. BLAST se puede utilizar para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>, 2018).

Se utilizo la base de datos en línea para enzimas Braunschweig Enzyme Database (BRENDA), el cual es uno de los principales sitios de colección de datos funcionales de enzimas disponibles para la comunidad científica. Está disponible de forma gratuita a través de Internet (www.brenda-enzymes.org, 2018). Con esta base de datos se obtuvo la información de los sustratos específicos (aminoácidos) que son escindidos por la proteinasa 3 y la neutrófilo elastasa, que de acuerdo a la literatura degradan a Anexina A1, y con ello realizar las sustituciones para crear una proteína más resistente y estable.

El programa computacional Chimera 1.13 (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>, 2018), es un programa computacional desarrollado por el recurso para la bioinformática, la visualización y la informática en la Universidad de San Francisco, California; es un software para la visualización y el análisis interactivo de estructuras moleculares y datos relacionados, incluyendo mapas de la densidad, ensamblajes supramoleculares, alineaciones de la secuencia, resultados del acoplamiento, trayectorias y conformacional de Conjuntos. Se pueden generar imágenes y animaciones de alta calidad. Chimera incluye documentación completa y varios tutoriales, y puede ser descargado gratuitamente para uso académico, gubernamental, sin fines de lucro y personal, UCSF ChimeraX (o simplemente ChimeraX) es el programa de visualización molecular de próxima generación de la RBVI, que sigue a UCSF Chimera (Pettersen et al; 2004, pp. 1605-1612).

PyRX, otro programa utilizado (<https://pyrx.sourceforge.io>, 2018), es un software de detección virtual para el descubrimiento computacional de medicamentos que se puede usar para examinar bibliotecas de compuestos contra posibles objetivos de medicamentos. PyRx permite evaluación virtual desde cualquier plataforma. PyRx incluye un asistente de acoplamiento con una

interfaz de usuario fácil de usar que lo convierte en una herramienta valiosa para el diseño de medicamentos asistido por computadora. También incluye una funcionalidad química similar a una hoja de cálculo y un potente motor de visualización que son esenciales para el diseño de fármacos basado en la estructura.

Autodock Vina (<http://autodock.scripps.edu/>, 2018), es un programa abierto sin fines de lucro para realizar acoplamientos moleculares. Fue diseñado e implementado por el Dr. Oleg Trott en el laboratorio de gráficos moleculares en el Instituto de investigación Scripps. Este programa mejora significativamente la precisión promedio de predicciones de enlaces en comparación con Autodock 4, de acuerdo con las pruebas realizadas por los desarrolladores en sus pruebas prácticas de adiestramiento del uso del software utilizado en el desarrollo de Autodock 4; además, ha sido comparado con otros programas que se distribuyen comercialmente y se considera un fuerte competidor (Trott y Olson, 2010, pp.455-456).

Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org>, 2018) es un servidor de modelado de homología de estructura de proteínas completamente automatizado, accesible a través del servidor web ExPASy (<https://www.expasy.org>, 2018), o del programa DeepView (Swiss Pdb-Viewer) (<https://spdbv.vital-it.ch>, 2018). El objetivo de este servidor es hacer que el modelado de proteínas sea accesible para todos los investigadores de ciencias de la vida en todo el mundo; con esta herramienta se pueden obtener estructuras por homología sin tener una estructura cristalizada de la proteína (Waterhouse, et al., 2011).

ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>, 2018) es una herramienta en línea vía internet, del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB), que permite el cálculo de varios parámetros físicos y químicos para una proteína determinada almacenada en Swiss-Prot o TrEMBL (<https://web.expasy.org/docs/swiss-prot>, 2018), además para una secuencias de proteínas ingresada por usuarios. Los parámetros computados incluyen el peso molecular, pI teórico, composición de aminoácidos, composición atómica, coeficiente de extinción, vida media estimada, índice de inestabilidad, índice alifático y promedio general de hidropatía (GRAVY) (Gasteiger et al; 2005, pp.571-607).

La plataforma Protein-Sol (<https://protein-sol.manchester.ac.uk>, 2018) es un conjunto simple, en línea vía internet sin fines de lucro de la universidad de Manchester, para realizar cálculos teóricos y algoritmos predictivos para comprender la solubilidad y la estabilidad de las proteínas. El software puede predecir la solubilidad en función de las propiedades de secuencia de una proteína o, dada una estructura, calcula la distribución superficial de la carga y la hidrofocidad, así como la estabilidad predicha a 91 diferentes combinaciones de pH y fuerza iónica (Hebditch, Carballo, Charonis, Curtis, y Warwicker, 2017, pp.3098-3100).

Procedimiento de Recolección y Análisis de los Datos

En este segmento se describen los procedimientos utilizados para la determinación de las variables y la manera de recopilar los datos de las pruebas realizadas *in silico*, así como la descripción de lo que se espera realizar con un orden secuencial de las distintas determinaciones, la utilización de los distintos programas computacionales, y lo que se pretende obtener en cada intento experimental.

Obtención y análisis de la estructura cristalizada de Anexina A1

Se analizaron las distintas estructuras de la familia de las anexinas, con la finalidad de determinar las variaciones en su estructura, realizar comparaciones y observar las regiones N terminales de cada una de las proteínas. De acuerdo con la bibliografía consultada, las diferencias entre las distintas anexinas determinan su función, estas diferencias se dan en el extremo amino, y en la longitud de las proteínas, con esto se evaluó la posibilidad de trabajar con similitudes o regiones que sean iguales en otras anexinas. El análisis se llevó a cabo realizando una alineación básica de la secuencia (blast) comparada con la Anexina A1, la herramienta en línea Blast-p (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>, 2018).

La estructura cristalizada de la proteína Anexina A1 humana será obtenida por homologación de estructura, a partir de la anexina A1 del organismo *Sus scrofa* (PDB ID: 1HM6), ya que no se cuenta con una estructura cristalizada de anexina A1 humana en las bibliotecas electrónicas de proteínas como Protein Data Bank (PDB), o UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/P04083>, 2018).

La Anexina A1 es un ligando endógeno del receptor FPR2, con la propiedad antiinflamatoria prorrresolutiva de la inflamación; de esta proteína, según la bibliografía, la parte más activa con acciones antiinflamatorias que se une al receptor FPR2 y provoca el agonismo esperado es la porción N terminal. La visualización de estructuras 3D de las proteínas y la porción N terminal de la Anexina A1 que se aisló *in silico* y se le realizaron distintos análisis y caracterizaciones de propiedades con el uso del software Chimera 1.13 (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>, 2018).

Modificación del péptido obtenido de Anexina A1

La porción N terminal de la Anexina A1 homologada será aislada *in silico*, para obtener una proteína más pequeña con buena capacidad de unión con distintas propiedades a la proteína completa Anexina A1, se tomaron en cuenta los datos reportados en la literatura sobre los sitios de escisión endógena, para evitar la degradación del péptido desarrollado mediante modificaciones de estos sitios de escisión. Se desarrollaron péptidos de distintas longitudes, con sustituciones de aminoácidos en los sitios de escisión, para crear teóricamente una proteína más resistente a degradación endógena, todo ello con el software Chimera 1.13 (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>, 2018).

Obtención de la estructura del receptor FPR2

En la actualidad no se cuenta con alguna estructura cristalizada del receptor FPR2; se deberá realizar una estructura del receptor FPR2 basada en la homología de secuencias de aminoácidos de una estructura conocida a partir del receptor de leucotrienos (PDB ID: 5X33), el cual, si cuenta con una estructura cristalizada y es un receptor acoplado a proteína G heptahelicoidal, al igual que el receptor FPR2. En aquellos casos donde la posibilidad de obtener la estructura cristalizada se ve frustrada, es factible la realización de un modelo que permita, a partir de una estructura conocida, armar el conjunto de coordenadas y simular la estructura de una nueva molécula, por medio de un trabajo basado en la homología de las secuencias de aminoácidos que las componen (Córsico, Falomir, Franchini y Scaglia, 2013).

Lo anterior se desarrolló a través del servidor en línea Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org>, 2018), con el cual se obtuvo una estructura del receptor FPR2 con base en la homología de secuencia de aminoácidos.

Simulación del acople molecular (Docking)

La estructura del receptor FPR2 creado por homología, junto con cada uno de los péptidos desarrollados *in silico*, se les realizó el análisis de acople molecular (Docking), se llevó a cabo a través del software Autodock Vina (<http://autodock.scripps.edu/>, 2018); con ello se espera obtener la configuración de acople más favorable que se podrá visualizar, la energía global del proceso y seleccionar el péptido desarrollado que se vea favorecido para realizar la unión con el receptor con el indicador de menor energía de unión (energía libre de Gibbs) en KJ/mol, calculado con los parámetros del software y luego de identificar los mejores resultados de la simulación del anclaje molecular se podrán determinar las propiedades fisicoquímicas del péptido.

Determinación de propiedades fisicoquímicas del péptido seleccionado

El péptido desarrollado, que luego del Docking molecular presentó mejor capacidad de unión y favorecido por la menor energía global de unión, se analizó con otros softwares para determinar las propiedades fisicoquímicas descritas anteriormente en las variables, como lo son el peso molecular, el número de aminoácidos, hidrofobicidad, punto isoeléctrico, todo esto con el programa computacional ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>, 2018).

La solubilidad se determinó teóricamente *in silico*, mediante la herramienta digital Protein-sol, la cual realiza comparaciones con la solubilidad de otras proteínas en bases de datos disponibles. Esta herramienta realiza comparaciones con solubilidades predichas de otras proteínas en especial de *E. coli*, en base a la secuencia de aminoácidos conocidos. De acuerdo con un estudio de Niwa et al, en el año 2009, se obtuvo una escala de solubilidad experimental, la cual incluye los parámetros de la herramienta Protein-sol. (<https://protein-sol.manchester.ac.uk>, 2018).

CAPITULO IV: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Obtención de la Estructura de la Anexina A1

Los miembros de la familia de Anexinas fueron analizados mediante comparaciones de secuencias de aminoácidos, para determinar las similitudes en las regiones N-terminales. El análisis se llevó a cabo realizando una alineación básica de la secuencia (blast) comparada con la Anexina A1, la herramienta en línea Blast-p (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2018) del Centro Nacional de Información para Biotecnología de U.S. (NCBI).

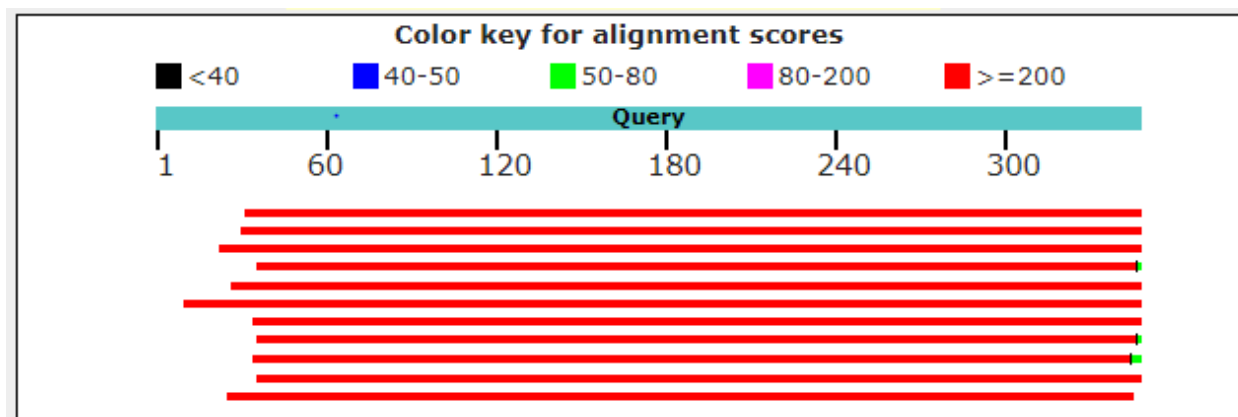
Tabla 3. Información Obtenida por Alineaciones Básicas de Secuencias de Las 12 Anexinas en Comparación con la Anexina A1, Realizado Utilizando Blastp

Anexina	% identidad en relación con Anexina A1	Inicio de similitud de aminoácidos con AnxA1	Inicio relacionado de aminoácidos en AnxA1	Cantidad de aminoácidos	Aminoácidos sin coincidencia en AnxA1
ANXA2	55	20	32	339	136
ANXA3	50	7	31	323	159
ANXA4	46	2	27	319	173
ANXA5	44	9	36	320	172
ANXA6	45	257	36	673	167
ANXA7	46	179	36	488	166
ANXA8	44	2	11	327	188
ANXA9	37	25	26	345	202
ANXA10	40	11	36	324	97
ANXA11	47	165	23	505	179
ANXA13	45	8	35	316	170

Nota: Elaboración propia. (2018)

Figura 21. Grafico Comparativo de Alineaciones de las Distintas Anexinas Humanas

La barra celeste (Query) hace referencia a la Anexina A1 completa



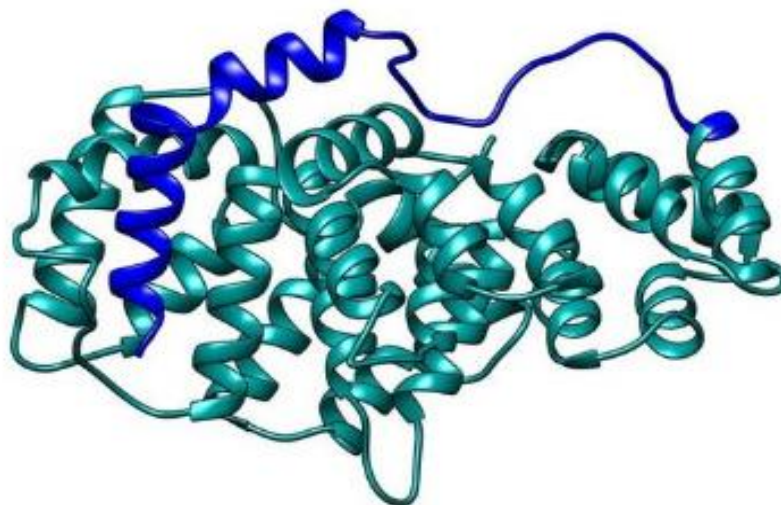
Nota: Blastp. (2018)

Los datos anteriores demuestran que las diferencias en estructura de la región N terminal, así como en la longitud de las secuencias de aminoácidos, son determinantes en sus funciones, y ninguna tiene una similitud elevada con la anexina A1. Ninguna de las Anexinas humanas analizadas muestra similitud en esa región terminal, con relación a Anexina A1 y no funcionan como péptidos de interés las regiones N terminales de las demás Anexinas. Por esta razón se utiliza estrictamente una proteína Anexina A1 y se modifica a partir de ella para obtener un derivado más pequeño que actúe sobre los receptores FPR2, sin perder las propiedades antiinflamatorias utilizando, la región N terminal de Anexina A1, de acuerdo con la bibliografía tiene la interacción con los receptores FPR2, y realiza una señalización proresolutiva de la inflamación (Perretti y Dalli, 2009, p.937), por esta razón es de interés solo la región terminal.

La estructura cristalizada de la proteína Anexina A1 humana, no se encuentra disponible en las bibliotecas electrónicas de estructuras; sin embargo, si existe la estructura cristalizada de Anexina A1 del organismo *Sus scrofa*, el código del depósito electrónico Protein Data Bank (PDB ID: 1HM6) (Figura 22). La proteína utilizada del organismo *Sus scrofa*, difiere de la humana en muy pocos aminoácidos, tienen 90% de similitud, misma cantidad de aminoácidos, 346, esto se analizó realizando una comparación o alineación de la secuencia de los aminoácidos (blast), esto

permite obtener un modelo estructural de la proteína humana utilizando como referencia la proteína homóloga de *Sus scrofa*.

Figura 22. Estructura Cristalográfica de Anexina A1 del Organismo *Sus Scrofa* (Región Terminal En Azul), Visualizada con Software Chimera Versión 1.13



Nota: PDB. (2018)

Al realizar un Blastp para comparar las regiones N terminales de las Anexinas A1 de humano y de *Sus scrofa*, se observa una similitud de un 92%, de las cuales para 48 aminoácidos existe una variación de 4 aminoácidos, de los cuales solo 1 de las posiciones, presenta una sustitución no conservativa del aminoácido 27, correspondiente a Serina, en el organismo *Sus scrofa* corresponde a glicina.

Las demás variaciones corresponden a sustituciones conservativas, ya que los aminoácidos sustituidos presentan propiedades químicas similares, las cuales ocurren en el aminoácido 15, para humano corresponde un ácido glutámico, comparado con un ácido aspártico para la secuencia de *Sus scrofa*, en el aminoácido 22 para humano corresponde valina, en *Sus scrofa* se mantiene isoleucina, la variación en aminoácido 23 para humanos corresponde glutamina y lisina para *Sus scrofa*. Las comparaciones de las secuencias de las regiones N terminales de las Anexinas A1 de humano y de *Sus scrofa*, se observan en la figura 23.

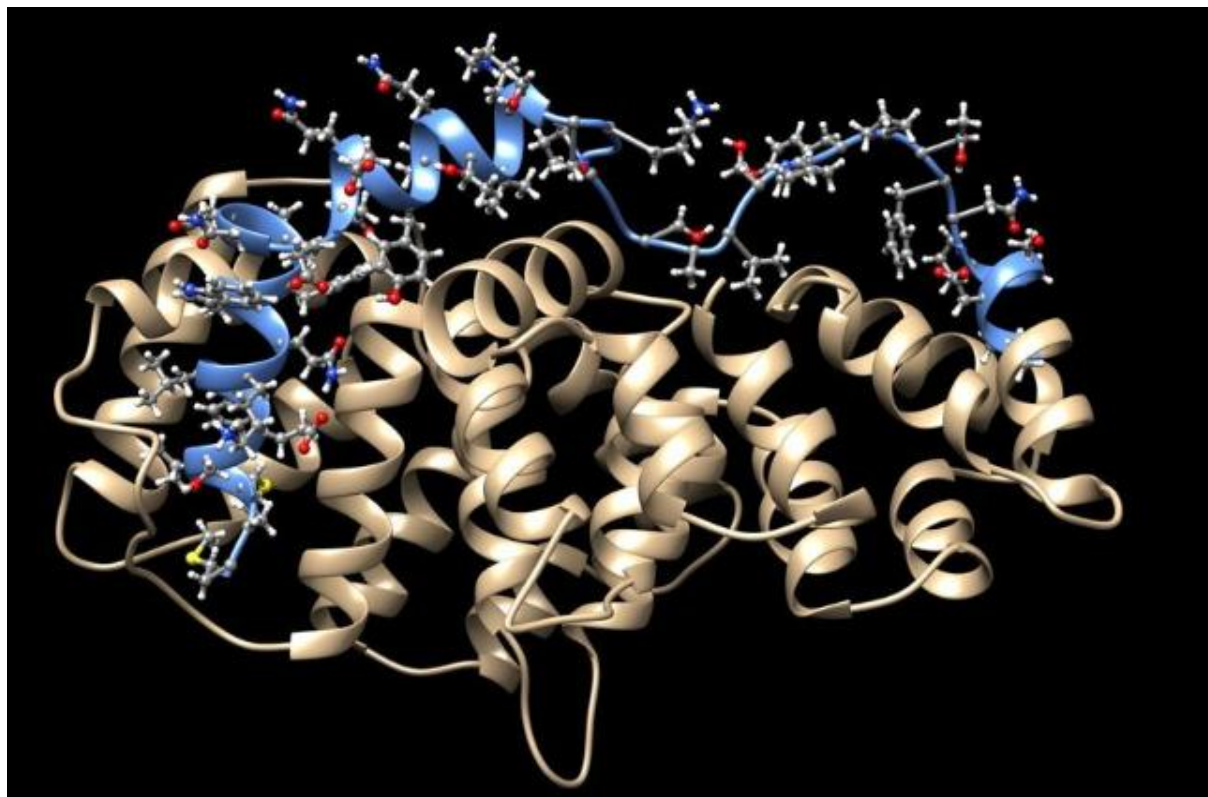
Figura 23. Alineación Básica de Secuencias (Blast) de Aminoácidos para Anexinas A1 de Humano (Query) y *Sus Scrofa* (Sbjct), Primeros 48 Aminoácidos de Región N Terminal

Range 1: 1 to 48 Graphics				▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
95.5 bits(236)	4e-34	Compositional matrix adjust.	44/48(92%)	47/48(97%)	0/48(0%)
Query	1	MAMVSEFLKQAWFIE	NEEQEYVQTVK	SSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDV	48
		MAMVSEFLKQAWFI+	NEEQEY++TVK	SSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDV	
Sbjct	1	MAMVSEFLKQAWFID	NEEQEYIKTVK	SSKGGPGSAVSPYPTFNPSSDV	48

Nota: Blastp. (2018)

La estructura de Anexina A1 humana, se construyó por homología de la secuencia de aminoácidos (Figura 24), a partir de la proteína homóloga de *Sus scrofa*, con la utilización de la herramienta Swiss-model, con la finalidad de poder aislar *in silico* la región N terminal de la Anexina A1 humana.

Figura 24. Estructura de la Anexina A1 Humana Construida por Homología de Secuencia de Aminoácidos Utilizando la del Organismo *Sus Scrofa* como Plantilla



Nota: Swiss-model. (2018)

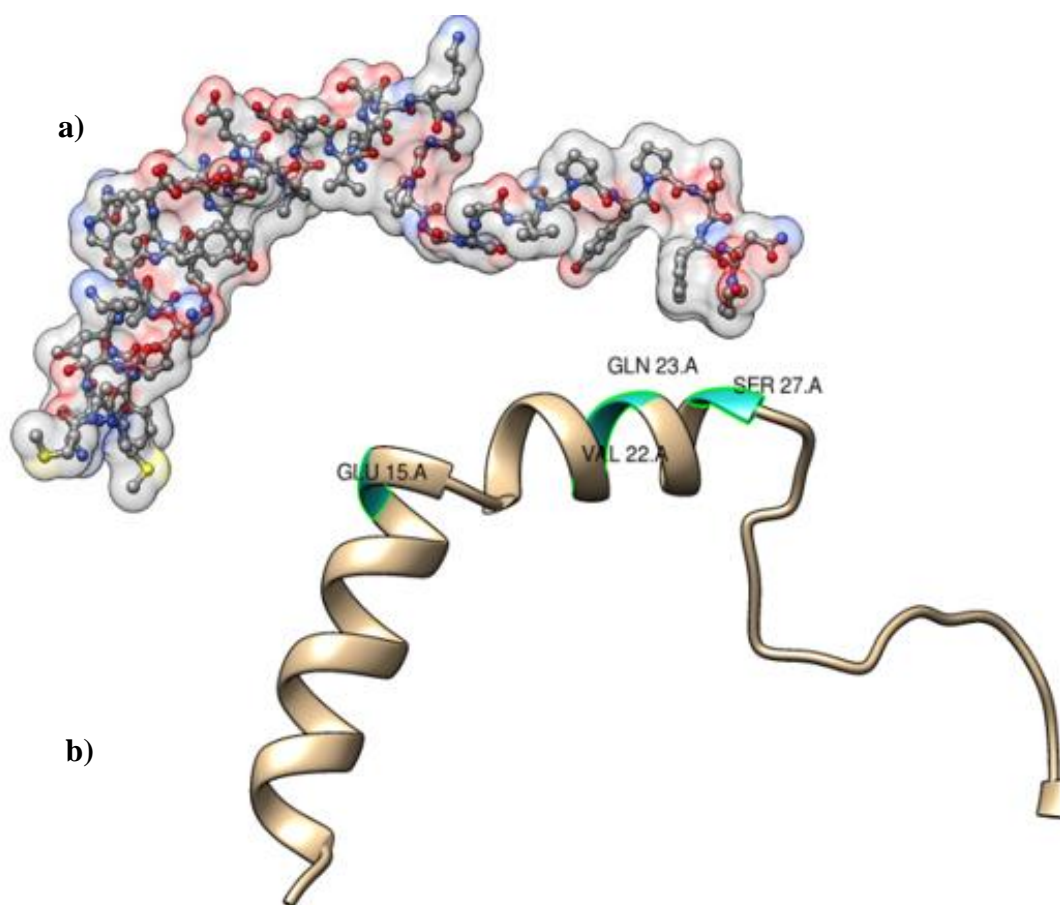
Modificación de la Región N Terminal de la Anexina A1 Humana

La estructura de Anexina A1 humana construida por homología de la secuencia de aminoácidos, fue modificada *in silico*, se aisló la región N terminal de la proteína (Figura 25a), utilizando el software Chimera versión 1.13, se utilizaron 44 aminoácidos de la región N terminal, esto debido a que las publicaciones científicas de respaldo recientes, indican que esta región está conformada por ese número de aminoácidos, y que esta porción de la proteína es la que realiza las acciones antiinflamatorias características de la Anexina A1 (Kastin, 2013, p.632).

La proteína endógena completa presenta cuatro sitios de escisión en la región N terminal, los cuales han sido identificados mediante distintos experimentos. Estos sitios de escisión corresponden a la alanina en la posición 11, y los residuos 22, 25 y 36 que corresponden a valinas (Amantéa et al., 2016, p.2), como se muestra en la figura 25b.

Figura 25. Región N Terminal de Anexina A1

- a) Región N terminal Anexina A1 homologada, composición atómica y superficie molecular (44 aminoácidos que conforman el péptido aislado)
- b) Región N terminal homologada aislada en vista simplificada 3D (sitios reemplazados en verde)



Nota: Elaboración propia mediante el uso de software Chimera versión 1.13

La región N terminal fue modificada para obtener una proteína de menor peso molecular, mejores características farmacocinéticas y resistente a escisión al menos de manera *in silico*, en comparación con la anexina A1 humana silvestre de tamaño completo.

Debido a algunas restricciones estructurales como la rigidez de los enlaces peptídicos y los límites permitidos de los valores de los ángulos ϕ y ψ , de determinados aminoácidos no favorecen la formación de la hélice α , como ejemplo, el grupo R de la glicina, el cual es un átomo de hidrógeno, es tan pequeño que la cadena polipeptídica puede ser demasiado flexible. La prolina tiene un anillo rígido que impide que gire el enlace del nitrógeno y carbono α , y la prolina no tiene grupo N-H disponible para formar los enlaces por puente de hidrógeno dentro de la cadena, también las secuencias de aminoácidos con grandes cantidades de aminoácidos cargados como glutamato y el aspartato y con grupos R de gran tamaño como triptófano son también incompatibles con las estructuras de la hélice α (McKee, T., y McKee, J., 2014, párr. 64).

Las sustituciones de los aminoácidos donde ocurre escisión en la región N terminal de la Anexina A1, fueron realizadas considerando al máximo la posibilidad de no alterar las propiedades fisicoquímicas de esta porción de la proteína, por lo que de acuerdo a la bibliografía consultada los aminoácidos que son identificados por las enzimas que realizan la degradación de la proteína en las posiciones descritas antes son aminoácidos de alaninas en su mayoría y un aminoácido de valina, estos residuos son no polares, por lo que se analizó la posibilidad de sustituir por otro aminoácido no polar, y tomando en cuenta las características de las proteasas en su reconocimiento de residuos específicos, con ello realizar una sustitución resistente a escisión.

Tabla 4. Proteasas que Degradan Anexina A1 y Residuos como Sustratos Específicos

Proteasa	Aminoácidos como sustratos	Tipo de reacción
Proteinasa 3	Alanina, Valina	Hidrolisis de enlace peptídico
Neutrófilo elastasa	Valina, Alanina	Hidrolisis de enlace peptídico

Nota: Elaboración propia basado en Braunschweig Enzyme Database (BRENDA). (2018)

La proteasa neutrófilo elastasa (hNE) es probablemente la más potente y además abundante de las serinas proteasas, su especificidad es relativamente alta para valina, alanina, e isoleucina, en la posición P1 de los sustratos (Fu, Thorpe, Akula, Chahal, yHellman, 2018, p.1).

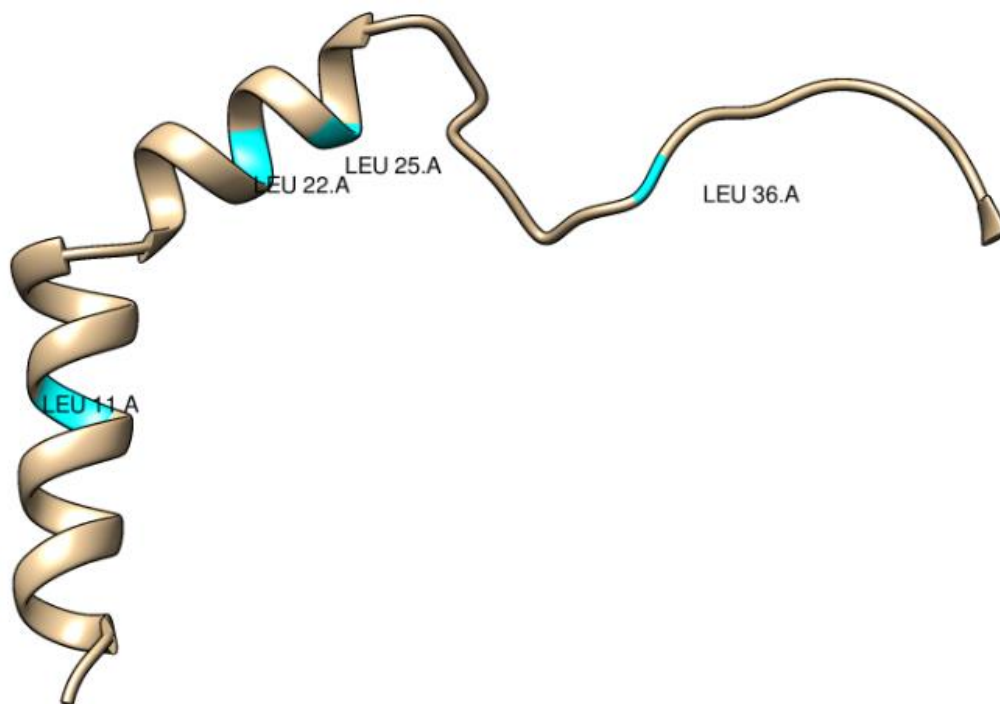
De acuerdo con las consideraciones mencionadas y la especificidad de las enzimas por los aminoácidos alanina y valina, las posiciones de residuos donde ocurre escisión, fueron sustituidos por el aminoácido Leucina, este aminoácido es no polar no es preferido por las enzimas, se conservan las propiedades fisicoquímicas de la región N terminal, ya que es un cambio equivalente por otro aminoácido no polar.

La glicina no es una buena elección para cambio, ya que no forma estructuras α hélice con facilidad. Además, la leucina es más frecuente en las proteínas que su similar el aminoácido isoleucina, por esta razón se consideró como opción de cambio la leucina. Por otra parte, con el fin de no alterar las características bioquímicas de la proteína ya que la valina y alanina son aminoácidos apolares, se considera que una sustitución por grupos que aumenten su solubilidad puede afectar la unión al receptor FPR2.

Con las sustituciones mencionadas se podría obtener un péptido resistente a escisión endógena (Figura 26), provocando un mayor tiempo de vida media activo y posiblemente interactuar con los receptores FPR2, se espera que el péptido desarrollado *in silico* pueda actuar realizando un agonismo sobre los mismos provocando una respuesta prorresolutiva de la inflamación sobre las células involucradas.

Figura 26. Región N Terminal de Anexina A1 Modificada *In Silico* Resistente a Escisión y Secuencia de Aminoácidos Sin Modificación

MAMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTFNP



Nota: Elaboración propia mediante software Chimera versión 1.13

Desarrollo de Derivados Peptídicos de la Región N Terminal de Anexina A1 Humana

Se desarrollaron *in silico* varios péptidos derivados de la región N terminal de la Anexina A1 humana, luego de las modificaciones descritas anteriormente, por medio del software Chimera versión 1.13. La porción N terminal aislada de 44 aminoácidos de esta proteína, con las sustituciones de los sitios de escisión, planteó la posibilidad de desarrollar péptidos *in silico* de distintas longitudes de acuerdo con la cantidad de aminoácidos, resistentes a escisión. Se utilizaron péptidos compuestos por 44, 40, 36, 32 y 28 residuos de aminoácidos respectivamente, tomando en cuenta además que se considera a la región N terminal de la Anexina A1 según las referencias utilizadas, una cantidad de 44 aminoácidos.

Otra consideración para los tamaños de los péptidos desarrollados, es que cada estructura secundaria α hélice, se compone de aproximadamente 3.6 residuos de aminoácidos como fue descrito en el capítulo II, y cada una de estas α hélices que conforman la región N terminal de la porción aislada *in silico* puede tener una interacción importante sobre el receptor FPR2, por esta razón el péptido formado de 44 residuos de aminoácidos se tomó como base y se aislaron *in silico* péptidos cada vez más pequeños con una diferencia de 4 aminoácidos entre cada uno.

Tabla 5. Péptidos Desarrollados y Modificaciones Contenidas

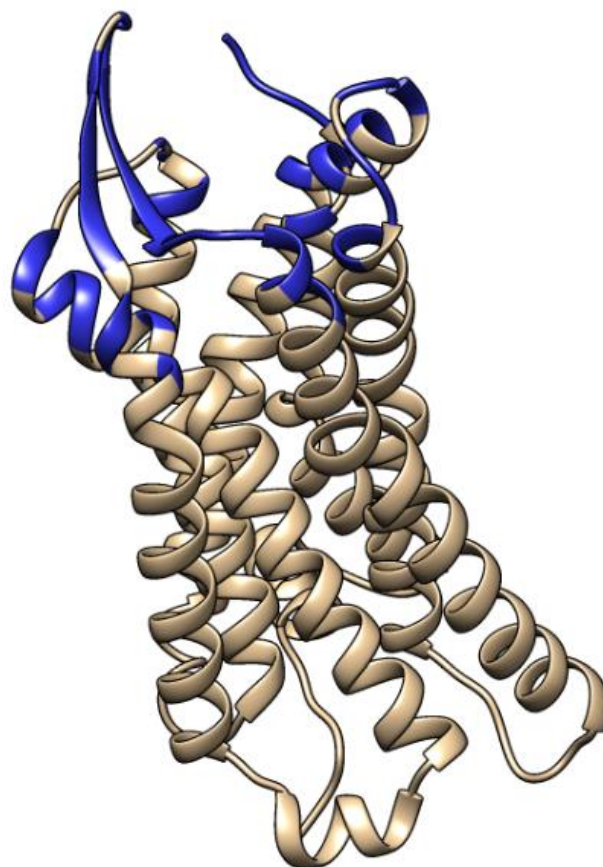
Nombre del péptido	Cantidad de Aminoácidos	Posiciones de Leucinas contenidas por sustituciones
Péptido 1	44	11, 22, 25 y 36
Péptido 2	40	11, 22, 25 y 36
Péptido 3	36	11, 22, 25 y 36
Péptido 4	32	11, 22 y 25
Péptido 5	28	11, 22 y 25

Nota: Elaboración propia. (2018)

Obtención del Receptor FPR2 por Homología de Secuencias

La estructura del receptor FPR2 fue creada por homología de la secuencia de aminoácidos, tomando el receptor de leucotrienos (PDB ID: 5x33), como una plantilla para la creación, ya que es un receptor acoplado a proteína G y además es heptahelicoidal al igual que el receptor FPR2. A través de la plataforma Swiss-model, se obtuvo la estructura en formato PDB, para descarga y su visualización de modelado. Con esta estructura homologada por secuencia de aminoácidos para el receptor FPR2 (Figura 27), junto con los péptidos desarrollados se realizó el análisis de acople molecular (docking) en el software Autodock Vina implementado en el programa computacional PyRX.

Figura 27. Receptor FPR2 Humano Desarrollado por Homología de Secuencias de Aminoácidos Utilizando al Receptor de Leucotrienos como Plantilla (PDB ID: 5X33)



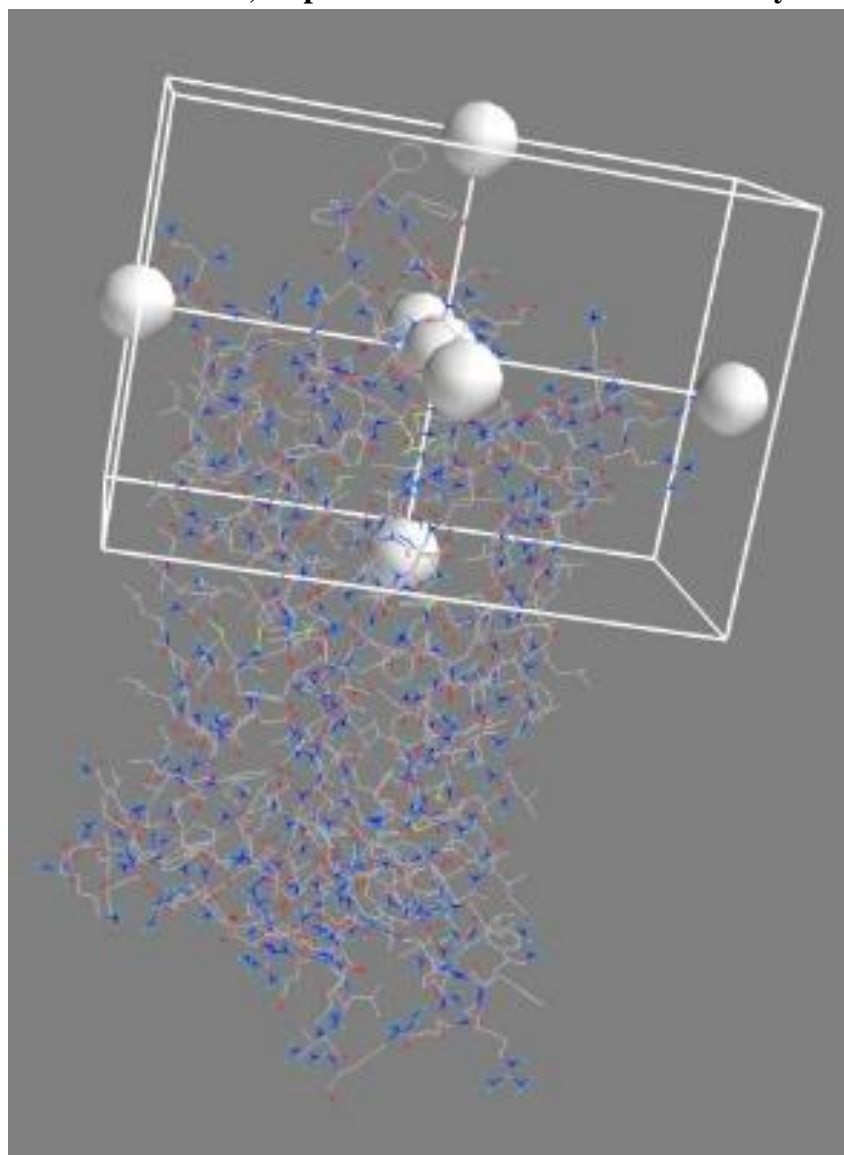
Nota: Swiss-model. (2018)

Acople Molecular (Docking)

El análisis de acople molecular se desarrolló entre el receptor FPR2 modelado, y los péptidos desarrollados resistentes a escisión, realizando un análisis del acomodo más favorable para cada uno de los péptidos desarrollados (Tabla 5) y estableciendo como objetivo macromolecular la porción extracelular del receptor con la herramienta Autodock Vina, implementada dentro del programa computacional PyRX para definir el sitio de acople

El sitio de la posible interacción del ligando proteico con el receptor se estableció (Figura 28), utilizando las porciones extracelulares reportadas en la bibliografía, y en bases de datos como Uniprot, con ello las porciones extracelulares del receptor fueron identificadas, y se delimito el sitio en el cual se llevaría a cabo la simulación de acople molecular, el sitio delimitado por medio del software Autodock Vina, se conoce como grid box.

Figura 28. Delimitación del Área de Interacción (Gridbox) por medio de Herramienta Autodock Vina, Implementada Dentro del Software Pyrx



Nota: Autodock Vina. (2018)

Resultados de acople molecular

Luego del análisis *in silico* de acople molecular para cada uno de los péptidos de los péptidos desarrollados junto con el receptor respectivo, se realizó una comparación para determinar cuál de los ligandos peptídicos mostraba una mayor afinidad y facilidad de unión con el receptor *in silico* (Tabla 6). EL péptido 5 mostró la mejor capacidad de unión según el resultado de la simulación de la energía global de unión con el receptor FPR2 modelado (Figura 29).

Tabla 6. Energía Global De Unión al Receptor FPR2 para los Distintos Péptidos Desarrollados

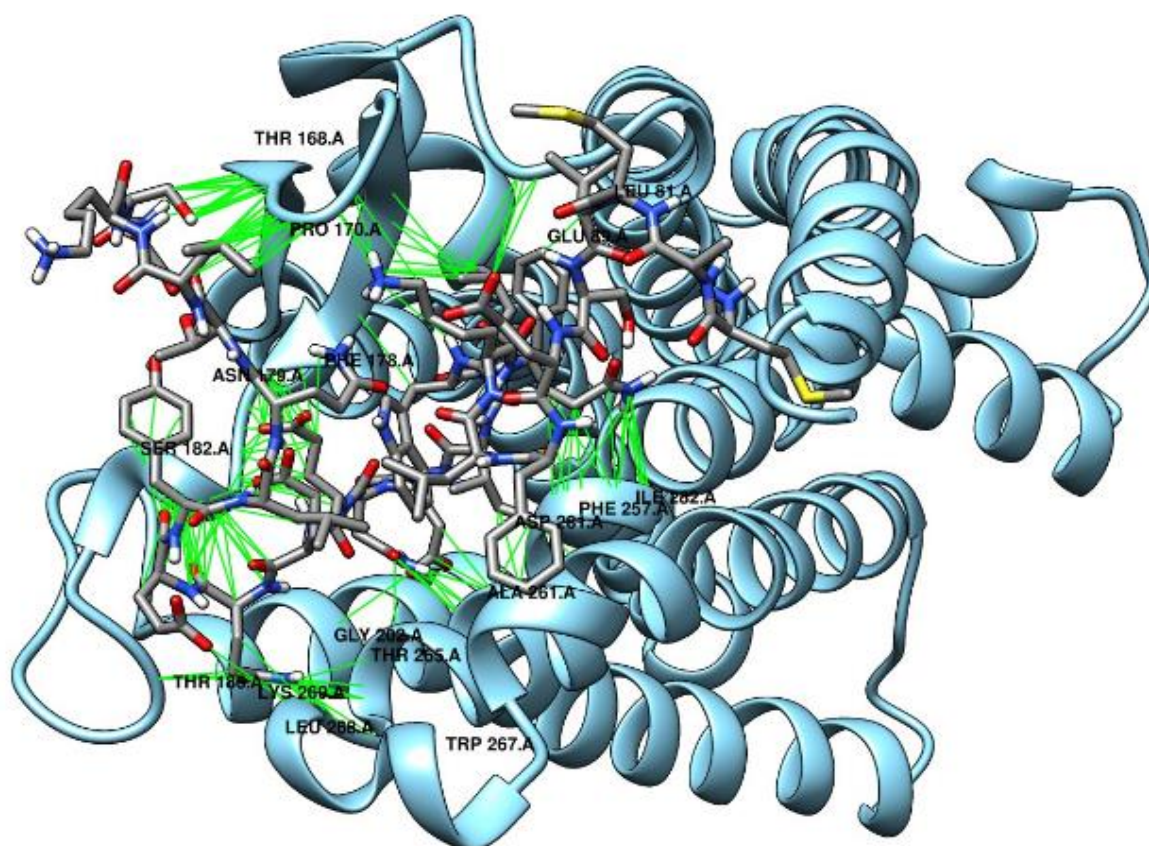
Nombre del péptido	Cantidad de Aminoácidos	ΔG (kJ/mol)
Péptido 1	44	-3.2
Péptido 2	40	-3.8
Péptido 3	36	-4.3
Péptido 4	32	-5.8
Péptido 5	28	-6.5
Péptido 5 sin modificaciones	28	-6.0

Nota: Elaboración propia. (2018)

además estar determinado por una determinada longitud del péptido, influyendo en la respuesta antiinflamatoria que se podría desencadenar, por lo que de ser posible debería determinarse si péptidos con mayor longitud realizan un agonismo más pronunciado en modelos animales.

Las interacciones del ligando con el receptor, y su unión por medio de fuerzas intermoleculares predichas mediante simulación de acople molecular, se observan con detalle en la figura 30, en su mayoría estas interacciones moleculares del ligando proteico y su unión al receptor de manera predictiva están compuestas por puentes de hidrogeno, y en menor grado por interacciones hidrofóbicas (π - π).

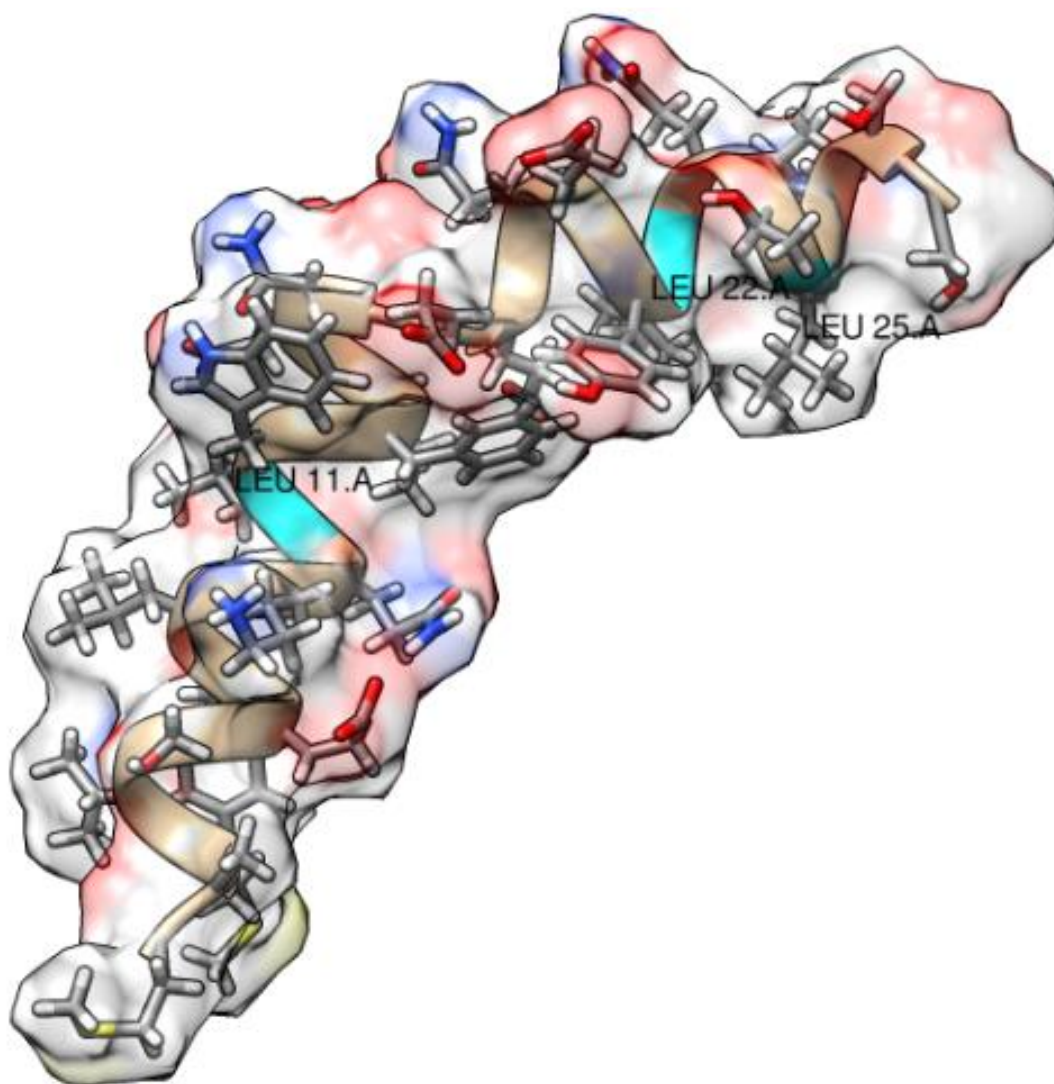
Figura 30. Posibles Fuerzas Intermoleculares Determinadas por Predicción, Implicadas en la Unión Ligando – Receptor



Nota: Chimera versión 1.13. (2018)

Figura 31. Péptido 5 (28 Aminoácidos), Mejor Ligando *In Silico*, y su Respectiva Secuencia de Aminoácidos

chain A 1 MAMVSEFLKQ L W F I E N E E Q E Y L Q T L K S S



Nota: Elaboración propia mediante software Chimera versión 1.13

Propiedades Físicoquímicas Determinadas *In Silico* para el Mejor Ligando

Mejor ligando: péptido 5 (28 aminoácidos)

Numero de átomos: 477

Formula del compuesto: C₁₅₅H₂₃₇N₃₅O₄₈S₂

Peso molecular: 3422.91 g/mol (3.4229 kDa)

Punto isoeléctrico teórico (pI): a un pH de 4.32.

Promedio de hidropatía: -0.339

Nota: ProtParam. (2018)

Tabla 7. Frecuencia de los Aminoácidos en el Péptido 5 (Mejor Ligando)

Aminoácido	Frecuencia en el péptido	Porcentaje en péptido
Ala (A)	1	3.6%
Asn (N)	1	3.6%
Gln (Q)	3	10.7%
Glu (E)	5	17.9%
Ile (I)	1	3.6%
Leu (L)	4	14.3%
Lys (K)	2	7.1%
Met (M)	2	7.1%
Phe (F)	2	7.1%
Ser (S)	3	10.7%
Thr (T)	1	3.6%
Trp (W)	1	3.6%
Tyr (Y)	1	3.6%
Val (V)	1	3.6%

Nota: Elaboración propia. (2018)

Tabla 8. Composición Atómica del Péptido

Elemento	Símbolo	Cantidad de átomos
Carbono	C	155
Hidrógeno	H	237
Nitrógeno	N	35
Oxígeno	O	48
Azufre	S	2

Nota: Elaboración propia. (2018)

Análisis de propiedades fisicoquímicas

Con base en las propiedades fisicoquímicas obtenidas *in silico* para el péptido 5 de 28 aminoácidos, se pueden hacer distintos análisis y conclusiones de forma teórica sobre sus propiedades desde varios puntos de vista farmacéuticos.

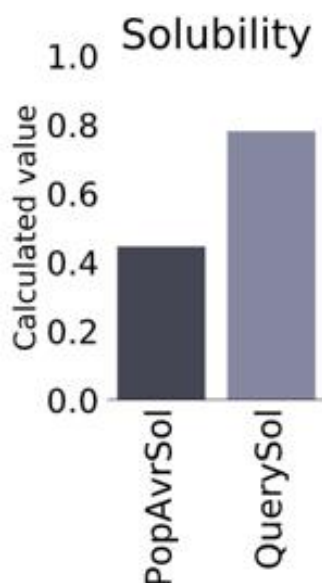
Las propiedades fisicoquímicas para la farmacocinética del péptido indican que es un péptido con peso de 3,4229 kDa, el cual podría ser administrado por vía inhalatoria e inclusive por vía nasal con uso de promotores de absorción. Este péptido debido a su peso molecular teóricamente puede ser filtrado por glomérulos renales. Esto se determinó teóricamente de acuerdo a las investigaciones que se detallan en el capítulo II sobre la farmacocinética de los productos obtenidos por biotecnología.

La solubilidad del péptido fue determinada *in silico* por medio de la plataforma en línea Prot-sol. El resultado indica un valor de 0.781 en la escala de predicción, se predice que cualquier valor de solubilidad escalado mayor a 0.45 tendrá una solubilidad más alta que la proteína de *Escherichia coli* (PopAvrSol) soluble promedio del conjunto de datos de solubilidad experimental, y cualquier proteína con un valor de solubilidad de menor escala se predice que será menos soluble, por esta razón el péptido 5, es soluble teóricamente. El valor en la escala (Querysol), es la solubilidad predeterminada para el péptido 5 (Figura 32).

Figura 32. Predicción de acuerdo con el Índice de Solubilidad para Péptido 5

En la imagen la barra QuerySol representa el péptido 5, la barra PopAvrSol es la referencia de proteínas solubles de *Escherichia coli*

Protein: >Protein-sol-calculation
Predicted scaled solubility (0-1): 0.781
pI: 4.210



Nota: Protein-sol. (2018)

El 58% de los aminoácidos presentes en el péptido 5 son polares, lo que respalda la predicción de solubilidad anterior, y a pesar de haber modificado la secuencia de aminoácidos de la porción N terminal de la Anexina A1 para obtener este péptido resistente a escisión teóricamente, el péptido 5 mantiene solubilidad adecuada.

El índice de hidropatía, también llamado Grand average of hidropathy (GRAVY), obtenido de -0.339, es un promedio de la sumatoria total del índice hidropático de cada uno de los aminoácidos del péptido 5 y dividido entre el número total de aminoácidos (28), las proteínas identificadas con una puntuación GRAVY dentro de 0 y -1.2, son hidrofílicas, mientras que las

proteínas hidrofóbicas con puntuación GRAVY > 0 , son hidrofóbicas (Huang, H; Chen, W; y Wu, J, 2014, p. 10169).

El péptido 5 de manera teórica, y de acuerdo a sus características analizadas *in silico*, podría circular en sangre y presentar hidrofiliidad, además en una eventual síntesis del péptido 5 podrían realizarse pruebas *in vitro*, con ello comparar los resultados obtenidos por los 2 medios, si la solubilidad es poca, podrían sustituirse los aminoácidos donde ocurre escisión por aminoácidos polares con carga para aumentar su solubilidad, y analizar la posible afectación en la interacción con el receptor FPR2.

Posible Obtención del Péptido 5

Uno de los objetivos planteados, es determinar la posibilidad de obtención del mejor ligando peptídico, con métodos actuales de síntesis, se realizó luego de conocer las características y longitud del péptido que mostró mejor capacidad de unión *in silico*, esto para el péptido 5 conformado por 28 aminoácidos. Hay tres maneras de obtener un péptido: por purificación a partir de tejidos es una técnica difícil y poco rendimiento, ingeniería genética; y el otro método es síntesis química directa.

Síntesis química en fase sólida

El principal avance en esta tecnología de síntesis química directa fue brindado por R. Bruce Merrifield en 1962, su innovación permitió sintetizar un péptido mientras lo mantenía conectado a un extremo de un soporte sólido. El soporte es un polímero insoluble (resina) contenido dentro de una columna, similar al utilizado en cromatografía, los péptidos se pueden construir solo uniendo un aminoácido a la vez, y realizando reacciones repetitivas como un ciclo, en cada uno de estos ciclos se utilizan grupos protectores para evitar reacciones indeseadas (Nelson et al, 2014, p.102).

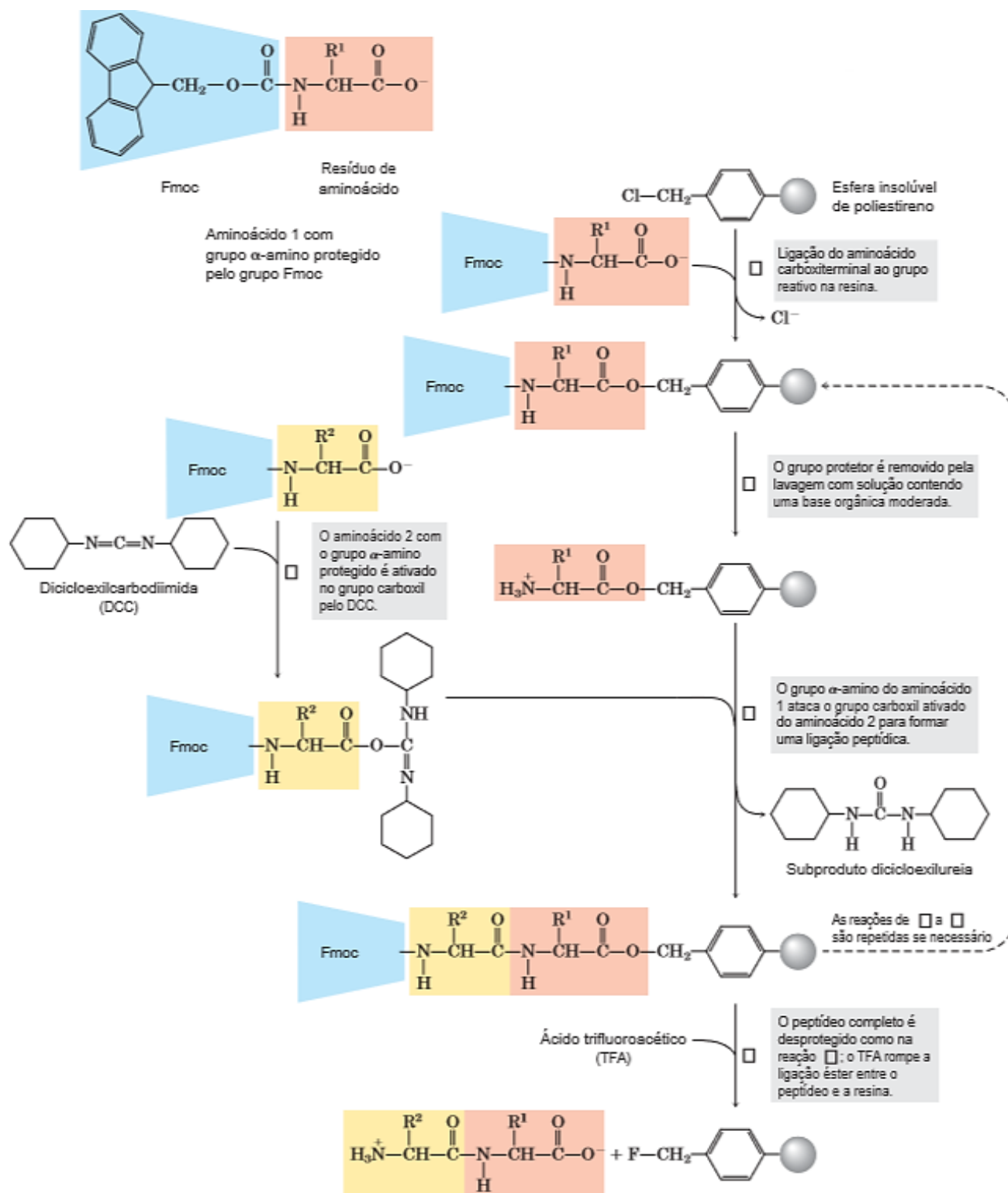
En la actualidad la síntesis de péptidos químicos es automatizada. Una limitación importante del proceso es la eficiencia de cada ciclo químico, varía desde la producción total de péptidos de varias longitudes, cuando el rendimiento por adición de cada nuevo aminoácido es del 96,0% al 99,8%. La reacción incompleta en un ciclo de reacciones puede generar impurezas, como péptidos más cortos en el siguiente ciclo. La química se ha optimizado y permitir la síntesis de

proteínas de 100 residuos de aminoácidos en pocos días con rendimiento razonable, es importante mencionar que esta increíble obtención de aminoácidos es superada por procesos biológicos, donde 100 residuos pueden ser sintetizados en 5 segundos en una bacteria (Nelson et al, 2014, p.103).

En la síntesis en fase sólida, el material de partida a transformar se encuentra unido a un soporte sólido, polimérico e insoluble en solventes orgánicos, también conocido como resina, por lo que en este caso el producto de la reacción estará unido a este soporte sólido. Una simple filtración elimina todo aquello que no sea el producto unido a la resina. Cuando se realizan varias reacciones químicas tradicionales, un problema suele ser la diferente reactividad de los distintos sustratos empleados; la síntesis en fase sólida puede mejorar este inconveniente ya que permite el uso de varios equivalentes de reactivo, llevando el equilibrio hacia los productos y, por lo tanto, mejorando el rendimiento de las reacciones más difíciles. El exceso de reactivo agregado no representa ningún problema pues se elimina por una simple filtración (Furlan, R; y Mata, E, 2012, p.21).

Actualmente, la síntesis en fase sólida de péptidos utilizando cloruro de fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) (Figura 33), es el método de elección para la síntesis de péptidos, se venden bloques de construcción Fmoc de muy alta calidad están disponibles a bajo costo debido a las economías de escala que surgen de la producción actual de muchos péptidos terapéuticos por Fmoc, muchos derivados con modificaciones están disponibles comercialmente, causa que el acceso sintético a una amplia gama de derivados peptídicos sea sencillo. El número de péptidos sintéticos que ingresan a los ensayos clínicos ha crecido de manera continua durante la última década, y los avances recientes en la tecnología Fmoc en fase sólida, surgen en respuesta a la creciente demanda de la química y la farmacología (Behrendt, White y Offer, 2016, p.4).

Figura 33. Esquema de Síntese de Merrifield



Nota: Nelson et al. (2014)

Síntesis de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes son las que se expresan mediante un proceso de construcción por clonación molecular en un sistema biológico, por lo general estas se expresan en sistemas biológicos en los que naturalmente no existe su síntesis, por lo que es una información genética nueva que se expresa empleando la maquinaria biosintética presente en la célula que contiene el preparado. La producción de proteínas recombinantes ha abierto una gran frontera para la obtención de organismos productores que sintetizan proteínas recombinantes de interés biotecnológico, Se ha documentado la clonación de genes de proteínas de importancia médica como la insulina, la somatostatina y la eritropoyetina, entre otros, lo que ha permitido el inicio de una nueva era de la industria farmacéutica en la que los fármacos, proteínas recombinantes, se producen por sistemas de crecimiento en biofábricas (Gómez, Barón, Canaval, 2012, p.3)

El uso de proteínas terapéuticas o biofármacos en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas o deficiencias hereditarias, se ha venido implementando desde hace 30 años. Las proteínas terapéuticas son producidas en sistemas heterólogos *in vitro* mediante tecnología de ADN recombinante. Actualmente, se desarrollan nuevos y mejores sistemas de expresión, implementando nuevos plásmidos, adición de elementos genéticos del gen adicional y optimización de codones (Gamboa y Trujillo, 2014, p.87)

La elección del microorganismo para producir la proteína de interés depende especialmente de las características fisicoquímicas de la proteína a producir. Los sistemas procariotes expresan proteínas solubles o en forma de agregados intracelulares o cuerpos de inclusión, sin plegamiento, lo que implica su estructuración *in vitro*. Los sistemas eucariotas introducen modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, eliminación de la metionina inicial y ruptura proteolítica de un precursor, entre otros, una similitud de las proteínas recombinantes a las endógenas, un modelo muy utilizado es el de *Escherichia coli* es uno de los modelos más simples para la producción de proteínas recombinantes (Gamboa y Trujillo, 2009, p.87).

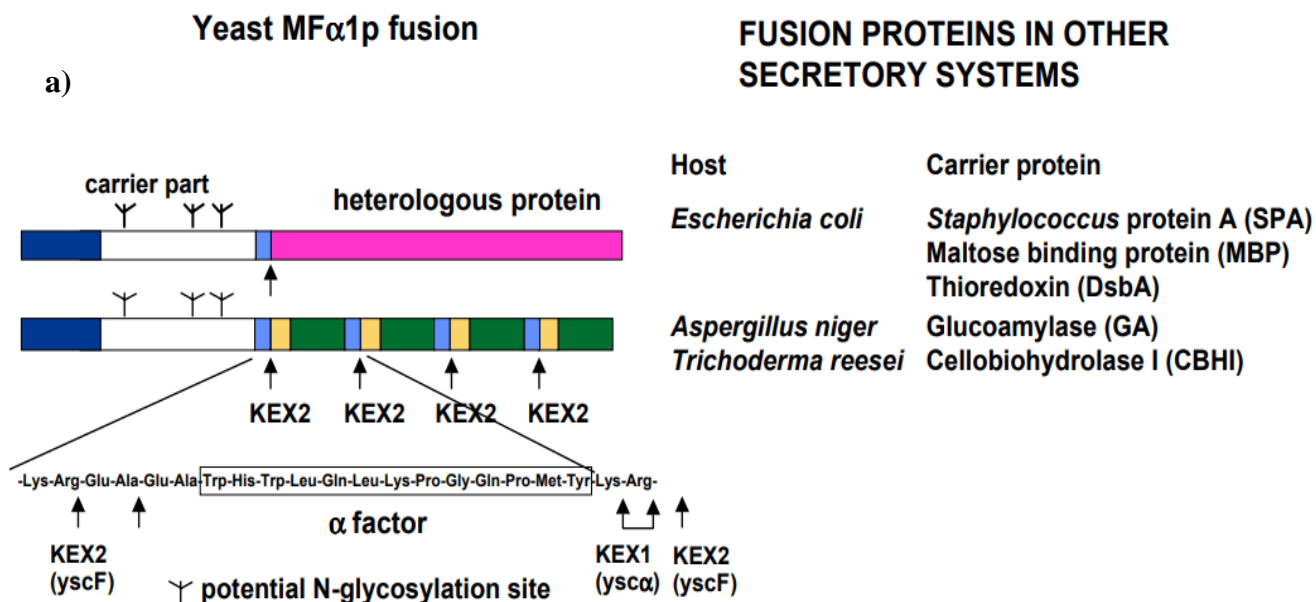
Las levaduras desempeñan un papel central en la biotecnología industrial y en la investigación genética básica, en los últimos años se ha visto una expansión del rol tradicional en la fabricación de alimentos y vinos a uno de producción química industrial y de proteínas. Esta

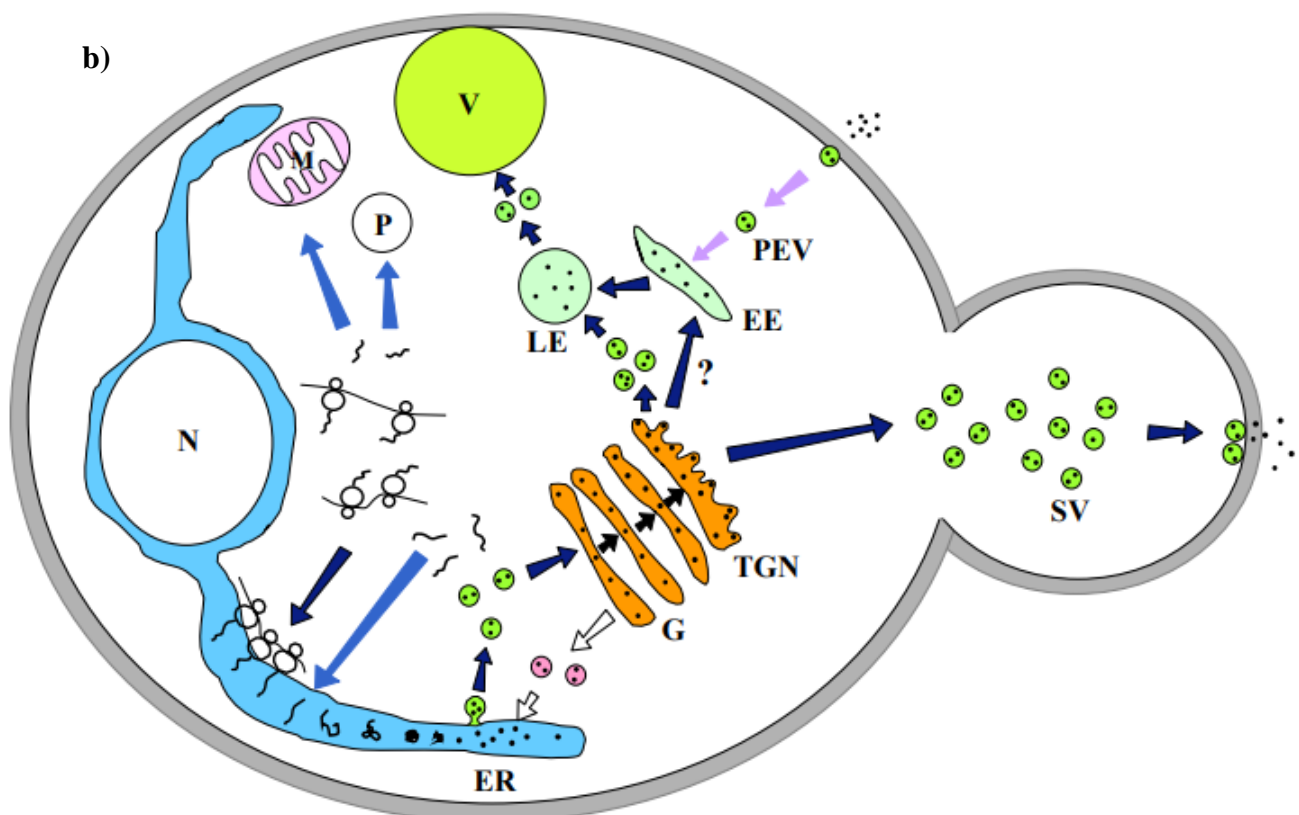
transición debido a la versatilidad de manipulación de este organismo y programarlo para muchas funciones, ha visto la disponibilidad de secuencias genómicas, la síntesis barata de ADN, las tecnologías de ensamblaje rápido y la nueva capacidad para comprender las partes sintéticas y convertirlas en vías complejas (Alper, Kang y Siewers, 2015, p.1).

Estas capacidades incorporan los principios centrales del campo emergente de la síntesis biológica (Figura 34). En los últimos años, la biología sintética de la levadura ha comenzado a surgir. Mientras que muchos de los primeros avances se han realizado en *Escherichia coli*, el campo de la biología sintética de la levadura se está convirtiendo rápidamente en algo propio. Las capacidades de síntesis rápida, incluido el aprovechamiento de la recombinación homóloga de levadura, pueden reemplazar la clonación tradicional y permitir el ensamblaje del circuito combinatorio (Alper, Kang y Siewers, 2015, p.1).

Figura 34. Esquema de la Síntesis de Proteínas Recombinantes en Levaduras

- Estrategia de fusión para obtener mejor plegamiento y secreción
- Vía secretora de la levadura





Nota: Toikkanen. (2014)

Con los métodos mencionados antes para síntesis de péptidos, los métodos presentan diferencias importantes, existen ventajas en cada uno de los métodos expuestos, en comparación con el otro. La síntesis en fase sólida requiere el uso de la resina polimérica, mas el uso de reactivos y mayor duración de tiempo para construir un péptido, además el uso de disolventes y reactivos puede ser a la larga un motivo de contaminación química, por lo cual la química se orienta hoy en día hacia una química verde.

Por otro lado, la síntesis de proteínas recombinantes requiere mayor inversión inicial, reactivos, cepas bacterianas o de levaduras, la producción de péptidos incluso proteínas completas de elevados pesos moleculares se pueden sintetizar, con precisión y con la conformación tridimensional sin variaciones, en pocos minutos, y sin riesgo de contaminación por uso de disolventes y resinas. Por esta razón una buena opción para la síntesis del péptido 5, sería por proteínas recombinantes en levaduras por la versatilidad de este microorganismo de acuerdo con la bibliografía consultada, para la reprogramación para síntesis de proteínas recombinantes.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Se obtuvo un péptido derivado de Anexina A1, modificado por métodos *in silico*, que lo hacen al menos, teóricamente, resistente a escisión. Este péptido podría presentar, además, mejores propiedades farmacocinéticas en comparación con la proteína parental, ejerciendo una acción agonista sobre los receptores FPR2 promoviendo una resolución de la inflamación por inhibición sobre la respuesta celular y el reclutamiento de neutrófilos. Con esto de acuerdo con el objetivo específico numero

El péptido modificado que mejor capacidad de unión al receptor FPR2 modelado, fue el de una longitud de 28 aminoácidos, sus propiedades fisicoquímicas fueron determinadas para obtener un mejor conocimiento del péptido que podría desarrollarse y obtenerse, aprovechando las herramientas tecnológicas para la predicción de propiedades fisicoquímicas.

La posible obtención o síntesis del péptido modificado se describió, por medio de procesos de síntesis en fase sólida conocida como síntesis de Merrifield como una opción para síntesis de péptidos menores a 50 aminoácidos se considera una buena opción, se describió además otra posible obtención por medio de proteínas recombinantes utilizando levaduras como medio para síntesis y sus ventajas.

Se obtuvo un receptor FPR2 construido por homología de las secuencias por medio de la plataforma Swiss-prot, utilizando como plantilla un receptor de leucotrienos el cual es también un receptor acoplado a proteína G, del cual sí existe una estructura cristalizada que funciona como una buena plantilla para crear sobre este el receptor FPR2.

El receptor modelado puede tener algunas diferencias estructurales en relación con la identidad del receptor FPR2 en la superficie celular de neutrófilos, eosinófilos, células T y macrófagos. Sin embargo, se sabe que la región N terminal es la responsable de la actividad antiinflamatoria prorresolutiva de la Anexina A1, por lo que a pesar de pequeñas variaciones que pueda tener el receptor modelado, el péptido desarrollado puede tener una buena interacción con

dicho receptor por su especificidad a pesar de los cambios realizados en los sitios de escisión endógena por el aminoácido Leucina.

Se describió de modo general las propiedades farmacocinéticas de los productos biotecnológicos, y con esto el péptido que presentó mejor capacidad de unión *in silico*, teóricamente se pudo proponer una vía de administración, de acuerdo con su peso molecular y propiedades fisicoquímicas analizadas *in silico*.

Recomendaciones

En una eventual disponibilidad de la estructura cristalizada del receptor FPR2, sería ideal realizar un análisis de acople molecular, y determinar nuevamente la capacidad de unión de los péptidos modificados de la región N terminal de la anexina A1 humana.

Podrían desarrollarse, *in silico*, nuevos péptidos de la región N terminal de la anexina A1, con sustituciones de aminoácidos en los sitios de escisión reportados, con otras características fisicoquímicas y que demuestren una adecuada capacidad de unión al receptor y que puedan resistir la degradación endógena teóricamente por las proteasas. La solubilidad calculada *in silico* del péptido desarrollado que presento mejor capacidad de unión, fue relativamente buena de acuerdo con los parámetros determinados en comparación con otras proteínas, elevada, sin embargo, podrían hacerse sustituciones en los sitios de escisión por aminoácidos polares con cargas positivas, logrando aumentar la hidrofiliidad.

En una eventual síntesis del péptido podría determinarse su estabilidad *in vitro*, así como su solubilidad, a modo de obtener resultados experimentales y comparar dichos datos, con los obtenidos *in silico*, con esto podría determinarse propiedades para la proteína que son aproximaciones teóricas calculadas *in silico*.

En un eventual ensayo *in vitro*, evidenciar si la fosforilación puede afectar la interacción con el receptor FPR2, de lo cual existe desconocimiento sobre su función en la actualidad, ya que podría ocurrir fosforilación en intracelular de la proteína Anexina A1, o inclusive extracelular afectando la función de la proteína, en este caso podría sustituirse el o los aminoácidos donde ocurre fosforilación si el caso fuera para provocar una inactivación de esta proteína.

Referencias

- Adams, R; Worth, C; Guenther, S; Dunkel, M; Lehmann, R; y Preissner, R. (2012). Binding sites in membrane proteins – Diversity, druggability and prospects: *European Journal of Cell Biology*, 91, 326–339.
- Alper, H; Kang, H; y Siewers, V. (2015). Yeast synthetic biology: new tools to unlock cellular function: *FEMS*, 15 (1), 1-1.
- Amantéa, M; Vago, J; Martins, M y Pires, L. (2016). Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance: *Journal of Immunology Research*, 2016 (1), 1-13.
- Behrendt, R; White, P; y Offer, J. (2016). Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis: *Journal of Peptide Science*, 22 (1), 4-27.
- Berman, H; Westbrook, J; Feng, Z; Gilliland, G; Bhat, T; Weissig, H; Shindyalov, I; Bourne, P. (2000). The Protein Data Bank *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242.
- Brunton, L.; Chabner, B.; y Knollman, B. (2018). *Goodman y Gildman Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México: McGraw-Hill.
- Chang, R. (2008). *Fisicoquímica*. México: McGraw-Hill.
- Corminboeuf, O; y Leroy, X. (2014). FPR2/ALXR Agonists and the resolution of inflammation: *Journal of medicinal Chemistry*, 58 (2), 537–559.
- Córsico, B; Falomir, L; Franchini, G; y Scaglia, N. (2013). *Análisis estructural y funcional de Macromoléculas*. Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata.

- Dahiyat, B. (2006). In Silico protein design. fitting sequence onto structure: *Bioinformatics and Drug Discovery*, 316, 359-374.
- Dallakyan, S; Olson, A. (2015). Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx: *Methods Mol Biol*, 1263:243-250.
- De Ruyck, J; Brysbaert, G; Blossey, R; y Lensink, M. (2016). Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel: *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 2016 (9), 1-11.
- Domínguez, A; y Hurlé, G. (2006). Farmacocinética de los medicamentos obtenidos por biotecnología: *Biotecnología Aplicada a la Salud Humana*, 9 (1), 113-121.
- Dufton, N; y Perretti, M. (2010). Therapeutic anti-inflammatory potential of formyl-peptide receptor agonists: *Pharmacology & Therapeutics*, 127 (2), 175-188.
- Duvall, M; y Levy, B. (2015). "DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation". *European Journal of Pharmacology*, 785: 144–55.
- Ekins, S; Mestres, J; y Testa, B. (2007). In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling: *British Journal of Pharmacology*, 152, 9–20.
- Fu, Z; Thorpe, M; Akula, S; Chahal, G; y Hellman, L. (2018). Extended Cleavage Specificity of Human Neutrophil Elastase, Human Proteinase 3, and Their Distant Ortholog Clawed Frog PR3—Three Elastases With Similar Primary but Different Extended Specificities and Stability: *Front Immunol*, 9; 2387-2399.
- Furlan, Ricardo, and Ernesto Mata. *Química combinatoria: metodologías combinatorias con la generación de diversidad molecular*, FCE - Fondo de Cultura Económica, 2012. ProQuest Ebook Central, <http://ebookcentral.proquest.com/lib/biblioui/asp/detail.action>.

- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server: The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, pp. 571-607.
- Galofré, J. (2009). Manejo de los corticoides en la práctica clínica: Revista Médica Universidad de Navarra. 1 (53), 9-19.
- Gamboa, R; y Trujillo, M. (2009). Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano: Medigraphic, 4 (3), 87-91.
- Gavins, F.; y Hickey, M. (2012). Annexin A1 and the regulation of innate and adaptive immunity: Frontiers in immunology. 354 (3), 1-8.
- Georges, C., Aldous, D., Raboisson, P., y Rognan, D. (2015) The Practice of Medicinal Chemistry. United Kingdom, United States: Elsevier.
- Giralt, E; Albericio, F; y Jiménez, J. (2004). Péptidos y la industria farmacéutica: Anales de la Real Sociedad Española de Química, 2 (1), 10-16.
- Gómez, S.; Gutiérrez, A.; y Valenzuela, E. (2007). Corticoides: 60 años después, una asignatura pendiente: Rev. Cienc. Salud. Bogotá. 5 (3), 58-69.
- Gómez, G; Barón, G, Y Canaval, H. (2012). Producción de proteínas recombinantes: Revista Colombiana de Menopausia 8 (3), 1-7.
- Graham, P. (2013). An Introduction to Medicinal Chemistry. U.K.: Oxford University Press.
- Grossman, S; y Porth, C. (2014). Porth Fisiopatología: Alteraciones de la salud conceptos básicos. España: Lippincott Williams & Wilkins.
- Harding, S; Sharman, J; Faccenda, E; Southan, C; Pawson, A; Ireland, S; Gray, A; Bruce, L; Alexander, S; Anderton, S; Bryant, C; Davenport; A, Doerig, C; Fabbro, D; Levi-Schaffer, F; Spedding, M; y Davies. (2018). The IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology in 2018:

updates and expansion to encompass the new guide to Immunopharmacology. *Nucl. Acids Res.* 46 (1), 1091-1106.

Hebditch, M; Carballo, M; Charonis, S; Curtis, R; Warwicker, J. (2017). Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence: *Bioinformatics*, 33 (19), 3098–3100.

Huang, P; Boyken, S; y Baker, D. (2016). The coming of age of de novo protein design: *NATURE*, 537 (15), 320-327.

Huang, H; Chen, W; y Wu, J. (2014). Total protein extraction for metaproteomics analysis of methane producing biofilm: the effects of detergents: *International journal of molecular sciences*, 15 (6), 10169-10184.

Iglesias, M; González, J; Moreno, U; y Tejerina, T. (2013). Desarrollo y Regulación de Medicamentos Biotecnológicos: Actualidad En Farmacología Y Terapéutica, 11 (4), 223-228.

Kao, W; Gu, R.; Jia, Y., Wei, X.; Fan, H.; Harris, J; y Yang, G. (2014). A formyl peptide receptor agonist suppresses inflammation and bone damage in arthritis: *British Journal of Pharmacology*. 171, 4087-4096.

Kastin, A. (2013). *Handbook of Biologically Active Peptides*. U.S: Academic Press Elsevier.

Kirpotina, L.; Khlebnikov, A.; Schepetkin, I.; Ye, R.; Rabiet, Jutila, M.; Quinn, T. (2009). Identification of Novel Small-Molecule Agonists for Human Formyl Peptide Receptors and Pharmacophore Models of Their Recognition. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*, 77. 159-170.

Kroemer, R. (2007). Structure-based drug design: docking and scoring: *Current Protein and Peptide Science*, 8, 312-328.

Kumar, V; Abbas, A; y Aster, J. (2015). *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*. España: Elsevier.

- Lieberman, M; y Marks, A. (2013). *Bioquímica médica básica. Un enfoque clínico*. España: Lippincott Williams & Wilkins.
- Lin, J. (2009). Pharmacokinetics of biotech drugs: peptides, proteins and monoclonal antibodies: *Current Drug Metabolism*, 10 (1), 661-691.
- Ludington, J. (2015). Protein Binding Site Analysis for Drug Discovery Using a Computational Fragment-Based Method: *Methods in Molecular Biology*, 1289, 145-154.
- McKee, T; y McKee, J. (2014). *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*. México: McGraw-Hill.
- Mahajan, A; Rawat, A, Bhatt, N; y Chauhan, M. (2014). Structural modification of proteins and peptides: *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 48 (3), 34-47.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility: *J. Computational Chemistry* 2009, 16: 2785-91.
- Nathan, C; y Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation: *Cell*, 140, 871-882.
- Navarro, R.; Newson, J.; Silveira, V.; Farrow, S.; Gilroy, D., y Bystrom, J. (2009). A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties: *The Journal of Immunology*. 184, 1516-1525.
- Nelson, D; y Cox, M. (2014). *Principios de bioquímica de Lehninger*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Niwa, T; Ying, B; Saito, K; Jin, W; Takada, S; Ueda, T; y Taguchi, H. (2009). Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of *Escherichia coli* proteins: *PNAS*, 106 (11), 4201-4206.

- Perreti, M; y D'Acquisto, F. (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation: *Nature Reviews (Immunology)*, 9 (1), 62-68.
- Perretti, M; y Dalli, J. (2009). Exploiting the Annexin A1 pathway for the development of novel anti-inflammatory therapeutics: *British Journal of Pharmacology*.158, 936-946.
- Pettersen, E; Goddard, T; Huang, C; Couch, G; Greenblatt, D; Meng, E; y Ferrin, T. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis: *J Comput Chem*. 25(13), 1605-1612.
- Rabasco, A. (2014). *Farmacocinética básica*. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana.
- Rodwell, V; Bender, D; Botham, K; Kennelly, P; y Weil, A. (2016). Harper. *Bioquímica ilustrada*. México: McGraw-Hill.
- Roy, A; Nair, S; Sen, N; Soni, N; y Madhusudhan, M. (2017). In silico methods for design of biological therapeutics: *Methods (Elsevier)*, 131, 33-65.
- Serra, H.; Roganovich, J.; Rizzo, L. (2012). Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional de lo molecular al uso clínico: *Revista de Medicina (Buenos Aires)*, 72, 158-170.
- Schetkin, I.; Kirpotina, L.; Khlebnikov, A.; Leopoldo, M.; Lucente, E.; Lacivita, E.; De Giorgio, P.; Quinn, T. (2013). 3-(1*H*-indol-3-yl)-2-[3-(4-nitrophenyl) ureido] propanamide enantiomers with human formyl-peptide receptor agonist activity: Molecular modeling of chiral recognition by FPR2. *Biochemical Pharmacology*, 85. 404-416.
- Schomburg I., Jeske L., Ulbrich M., Placzek S., Chang A., Schomburg D. (2017). The BRENDA enzyme information system-From a database to an expert system: *J Biotechnol.*, 261,194-206.
- Sheikh, M; y Solito, E. (2018). Annexin A1: uncovering the many talents of an old protein: *International Journal of Molecular sciences*, 1045 (19), 1-20.

- Singla, R. (2015). In Silico drug design and medicinal chemistry: Current Topics in Medicinal Chemistry, 15 (11), 971-972.
- Sogawa, Y.; Shimizugawa, A.; Ohyama, T.; Maeda, H.; Hirahara, K. (2009). The pyrazolone originally reported to be a formyl peptide receptor (FPR) 2/ALX selective agonist is instead an FPR1 and FPR2/ALX dual agonist: Journal of Pharmacological Sciences, 111, 317-321.
- Stalder, A; Lott, D; Strasser, D, Cruz, H; Krause, A; Groenen, P; y Dingemanse, J. (2016). Biomarker-guided clinical development of the first-in-class antiinflammatory FPR2/ALX agonist ACT-389949: British Journal of Clinical Pharmacology, 83 (3), 476-486.
- Tang, L; Persky, A; Hochhaus, G; y Meibohm, B. (2004). Pharmacokinetic aspects of biotechnology products: Journal of Pharmaceutical Sciences, 93 (9), 2184-2203.
- Toikkanen, J. (2014). Expression of proteins in yeast systems: VTT Biotechnology. <http://www.biocenter.helsinki.fi/biotechgs/media/toikkanen>.
- Trott, O., y Olson, A. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. Journal of Computational Chemistry, 31(2): 455–461. DOI:10.1002/jcc.21334.
- Valencia, P; y Áncer, J. (2014). Patología. España: McGraw-Hill.
- Vandewalle, J.; Luybaert, A.; De Bosscher, K.; Libert, C. (2018). Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids: Trends in Endocrinology & Metabolism, 1 (29), 42-49.
- Vilar, S; Cozza, G; y Moro, S. (2008). Medicinal Chemistry and the Molecular Operating Environment (MOE): Application of QSAR and Molecular Docking to Drug Discovery: Current Topics in Medicinal Chemistry, 8, 1555-1572.
- Winther, M.; Dahlgren, C.; Forsman, H. (2018). Formyl peptide Receptors in mice and men: similarities and differences in recognition of conventional ligands and modulating lipopeptides: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 122 (2), 191-198.

Wagner, J. (2010). *Farmacocinética clínica*. Barcelona: Reverté.

Ye, R; Boulay, F; Wang, J; Dahlgren, C; Gerard, C; Parmentier, M; Serhan, C; y Murphy, P. (2009). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the Formyl Peptide Receptor (FPR) Family: *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*, 61 (2), 119-161.

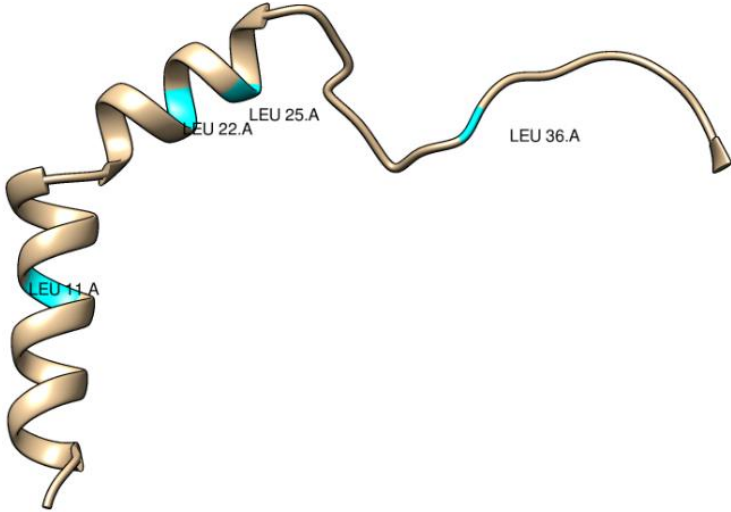
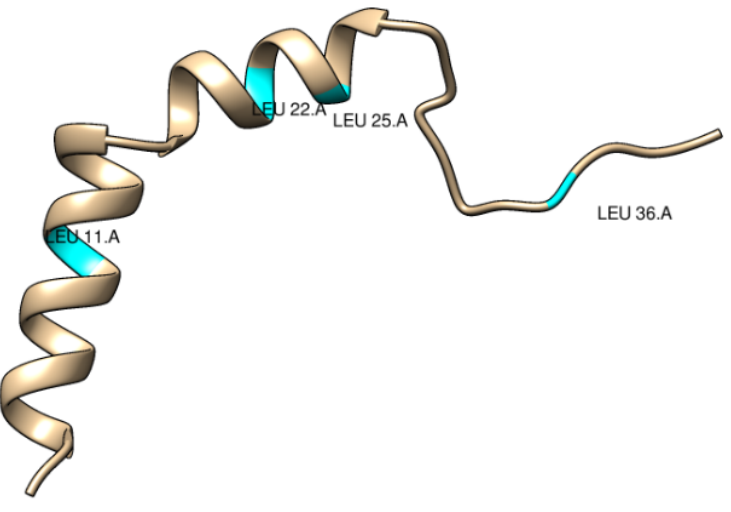
Zhang, J; y Madden, T. (1997). "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation": *Genome Res*, 7, 649-656.

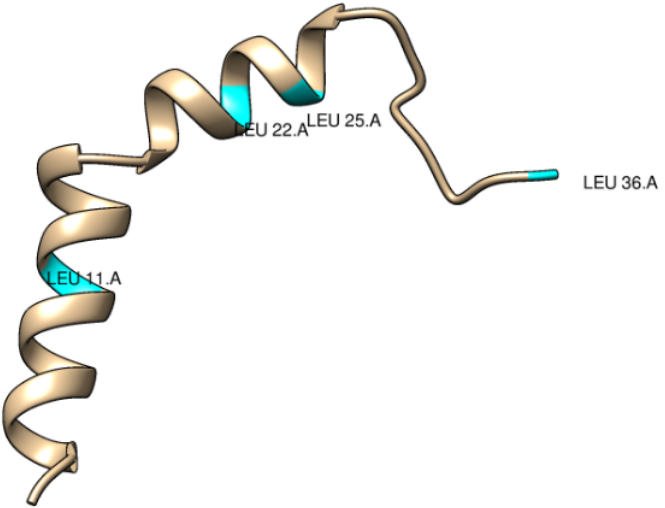
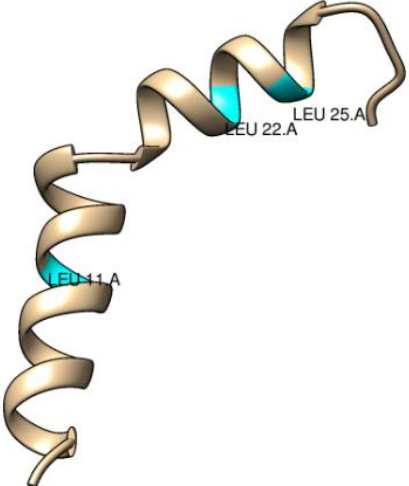
Zoete, V; Grosdidier, A; y Michielin, O. (2009). Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design: *J. Cell. Mol. Med*, 13 (2), 238-248.

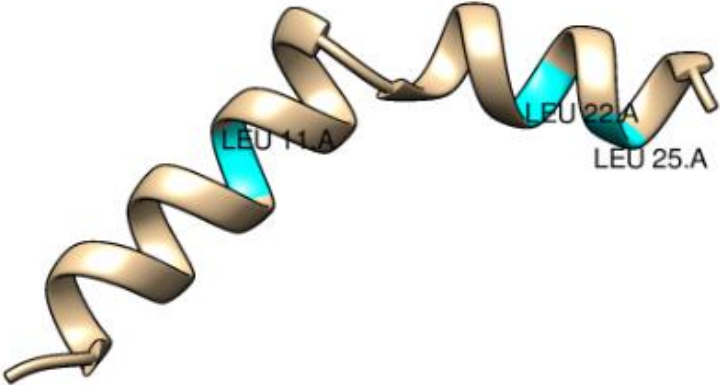
Apéndices**Apéndice A. Residuos involucrados en la interacción en sitio de unión**

Leu-81	Ser-182	Trp-267
Glu-89	Thr-186	Leu-268
Thr-168	Gly-202	Lys-269
Pro-170	Phe-257	Asp-281
Phe-178	Ala-261	Ile-282
Asn-179	Thr-265	

Apéndice B. Estructura de los péptidos desarrollados y energía global de unión al receptor modelado

Péptido desarrollado	Cantidad de aminoácidos	Energía global de unión (ΔG) kJ/mol
<p data-bbox="467 604 597 640" style="text-align: center;">Péptido 1</p>  <p data-bbox="180 674 906 1182">A 3D ribbon diagram of Peptide 1, shown in a tan color. The peptide chain is highlighted in cyan at several points, corresponding to residues LEU 11.A, LEU 22.A, LEU 25.A, and LEU 36.A. The structure shows a complex fold with multiple alpha-helices and loops.</p>	44	-3.2
<p data-bbox="467 1236 597 1272" style="text-align: center;">Péptido 2</p>  <p data-bbox="180 1314 906 1822">A 3D ribbon diagram of Peptide 2, shown in a tan color. The peptide chain is highlighted in cyan at several points, corresponding to residues LEU 11.A, LEU 22.A, LEU 25.A, and LEU 36.A. The structure shows a complex fold with multiple alpha-helices and loops, similar to Peptide 1 but with a different overall conformation.</p>	40	-3.8

<p style="text-align: center;">Péptido 3</p> 	36	-4.3
<p style="text-align: center;">Péptido 4</p> 	32	-5.8

<p style="text-align: center;">Péptido 5</p> 	28	-6.5
---	-----------	-------------