



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS TEÓRICO DE LA FORMACIÓN DE PUENTES DISULFURO VECINALES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA:

JUAN CARLOS GARDUÑO JIMÉNEZ



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. NELLY MA. DE LA PAZ GONZÁLEZ RIVAS

ASESOR EXTERNO

DR. HORACIO REYES PÉREZ

2017

UAEMex

Tesis.

Restricciones de uso.

DERECHOS RESERVADOS ©.

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL.

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

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

JURADO ASIGNADO

1.-Dr. Joaquín Barroso Flores.

2.-Dra. Nelly María de la Paz González Rivas.

3.-Dra. María Fernanda Ballesteros Rivas.

Lugar donde se desarrolló el tema de investigación:

Centro Conjunto De Investigación En Química Sustentable UNAM-UAEMex.

Asesora del tema:

Dra. Nelly Ma. De la Paz González Rivas.

Sustentante:

Juan Carlos Garduño Jiménez.

DEDICATORIAS.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS.

Gracias a Dra. Nelly y al Dr. Horacio por el apoyo que me han brindado para lograr el desarrollo de la investigación así como por su tiempo y atención.

A mis padres por darme la vida y la educación sin los cuales esta tesis no podría haber sido escrita, así como por la educación estricta que recibí cuando niño ya que sin esta última jamás hubiera despertado mis habilidades académicas.

A mis hermanos porque sin ellos no hubiera podido ser lo que ahora soy dado que por ser el hermano mayor siempre es un problema debido a que debe de ser el ejemplo y de cierta manera regir el futuro de los menores.

A mis tíos y abuelos por haberme cuidado cuando niño y por el apoyo que recibí para al final poder terminar la licenciatura.

A mi novia Judith quien además de ser mi novia, es mi mejor amiga y compañera que en todo momento ha estado apoyándome.

A mi compañero Mike por el apoyo que me brindo, especialmente en el aspecto académico.

A mis amigos que, aunque son pocos, me ayudaron a seguir adelante especialmente cuando había trabajos por hacer y la oscuridad era larga. Especialmente a mi amiga Isabel a la que considero una hermana.

INDICE

1.- INTRODUCCIÓN.	7
2.- ANTECEDENTES.	8
2.1.- PUENTES DISULFURO.	17
2.2.- TEORÍA DE FUNCIONALES DE LA DENSIDAD (DFT).	27
3.- IMPORTANCIA DEL PROBLEMA.	40
4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	41
5.- OBJETIVOS.	41
5.1.- GENERALES.	41
5.2.- ESPECÍFICOS.	41
6.- SECCIÓN EXPERIMENTAL.	42
7.- RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.	45
7.1.- DIAGRAMA DE RAMACHANDRAN.	45
7.2.- ANÁLISIS DE LAS ENERGÍAS DE LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS MODELADAS Y REPORTADAS.	47
7.3.- ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LOS MODELOS	53
7.4.- ANÁLISIS DE LAS SUPERFICIES DE ENERGÍAS POTENCIALES (PES).	59
7.5.- ANÁLISIS DE LOS ÍNDICES DE FUKUI DE LOS MODELOS ESTUDIADOS.	69
8.- CONCLUSIONES.	76
9.- REFERENCIAS.	78

1.- INTRODUCCIÓN.

La cisteína es fundamental para la estabilidad y el plegamiento de las proteínas debido a que participa en la interacción de algunas proteínas con metales y en catálisis enzimática mediante la formación de puentes disulfuro aprovechando propiedades redox del par tiol-disulfuro¹. Los puentes disulfuro se encargan de regular alteraciones en el organismo como el envejecimiento celular y el desarrollo de enfermedades afectando ciclos celulares y procesos como la coagulación de la sangre, control de epítopes, uniones a zinc, etc^{26, 27}. En las bacterias y virus se emplean como llaves de entrada o salida de un compartimento celular a otro¹.

Los factores que intervienen en la formación de puentes disulfuro no están completamente comprendidos, sobre todo aquellos que se forman entre cisteínas vecinales debido a que rompen las reglas establecidas acerca de su formación y son considerados puentes disulfuro prohibidos^{26, 27}. En estudios previos^{11, 13, 17, 26, 27} han reportado que no se pueden formar puentes disulfuro entre residuos de cisteína vecinales sin que se produzcan tensiones estructurales dentro de la proteína, sin embargo, recientemente^{66, 67} se han encontrado estructuras proteicas con este tipo de puentes disulfuro.

En el presente trabajo se tiene la finalidad se realizar una investigación para tratar de comprender la formación de puentes disulfuro vecinales prohibidos por medio de la química computacional empleando Teoría de Funcionales de la Densidad³⁴ (DFT, por sus siglas en ingles). Se estudiará la reacción tioles-disulfuro, estudiando los parámetros de las energías potenciales, cambios energéticos estructurales e índices de reactividad.

PALABRAS CLAVE.

Puentes disulfuro, estabilidad, disulfuros prohibidos, cistina, DFT.

2.- ANTECEDENTES.

Las proteínas son entidades biológicas presentes en las células de los organismos descubiertas en 1838, estas presentan funciones específicas dependientes del número y del tipo de aminoácidos que las constituyen así como de las secuencias en las que se encuentren unidos, dicha unión se realiza por medio de un enlace peptídico¹.

Los aminoácidos fundamentales para la vida son α -aminoácidos, es decir, aquellos que en un solo carbono tienen un grupo carbonilo; un grupo amino; una cadena R (con excepción de la glicina donde el grupo R es hidrógeno y la prolina donde el grupo R forma un ciclo con el grupo amino); y un hidrógeno, lo cual origina que el carbono α sea quiral (figura 1). Esto provoca a su vez enantiómeros los cuales son ópticamente activos y con lo que adquieren diversas propiedades. En la naturaleza los aminoácidos son exclusivamente L-aminoácidos.¹

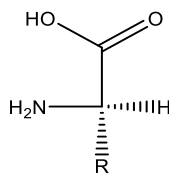


Figura 1: configuración absoluta de los aminoácidos (L)¹.

La clasificación de los aminoácidos se puede llevar a cabo considerando diversos criterios como su esencialidad, su destino metabólico, su cadena lateral (grupo R), el pI o punto isoeléctrico (pH en el cual la concentración de especies protonadas y desprotonadas se iguala) y el índice hidropático (escala que combina la hidrofobicidad y la hidrofiliidad de las cadenas laterales la cual es usada para predecir la tendencia de los aminoácidos a buscar un ambiente acuoso (valores negativos) o un ambiente hidrófobo (valores positivos)). La principal forma de clasificación está en función del grupo R (tabla 1 y figura 2)^{1, 3}.

Las cadenas laterales de los aminoácidos con grupos R no polares estabilizan las estructuras proteicas por medio de interacciones hidrofóbicas¹, estos aminoácidos denominados “hidrofóbicos” generalmente están dentro del núcleo de las proteínas mientras que los aminoácidos denominados “hidrofílicos” pueden interactuar con el

entorno ya sea con moléculas de agua o con residuos de aminoácidos polares con lo que se logra la estabilización de las proteínas.⁴

Tabla 1: Clasificación de los aminoácidos de acuerdo a su grupo R¹⁻³.

Grupo	Nombre	Abreviatura	pKa			pI	Índice Hidropático	Porcentaje en Proteínas
			COOH	NH ₃ ⁺	GRUPO R			
No Polares Alifáticos	Glicina	GLY	2.34	9.60	NA	5.97	-0.40	7.20
	Alanina	ALA	2.34	9.69	NA	6.01	1.80	7.80
	Prolina	PRO	1.99	10.96	NA	6.48	1.60	5.20
	Valina	VAL	2.32	9.62	NA	5.97	4.20	6.60
	Leucina	LEU	2.36	9.60	NA	9.98	3.80	9.10
	Isoleucina	ILE	2.36	9.68	NA	6.02	4.50	5.30
	Metionina	MET	2.28	9.21	NA	5.74	1.90	2.30
Aromáticos	Fenilalanina	PHE	1.83	9.13	NA	5.48	2.80	3.90
	Tirosina	TYR	2.20	9.11	10.07	5.66	-1.30	3.20
	Triptófano	TRP	2.38	9.39	NA	5.89	-0.90	1.40
Polares Sin Carga	Serina	SER	2.21	9.15	NA	5.68	-0.80	6.80
	Treonina	THR	2.11	9.62	NA	5.87	-0.70	5.90
	Cisteína	CYS	0.96	10.28	8.18	5.07	2.50	1.90
	Aspargina	ASN	2.02	8.80	NA	5.41	-3.50	4.30
	Glutamina	GLN	2.17	9.13	NA	5.65	-3.50	4.20
Con Carga Positiva	Lisina	LYS	2.18	8.95	10.53	9.74	-3.90	5.90
	Histidina	HIS	1.82	9.17	6	7.59	-3.20	2.30
	Arginina	ARG	2.17	9.04	12.48	10.76	-4.50	5.10
Con Carga Negativa	Aspartato	ASP	1.88	9.60	3.65	2.77	-3.50	5.30
	Glutamato	GLU	2.19	9.67	4.25	3.22	-3.50	6.30

Un aminoácido especial es la Cys, el cual es polar y con poca presencia dentro de las proteínas, pero con gran impacto⁴. En la conformación adecuada dentro de la proteína, puede formar puentes disulfuro con residuos de otra Cys con carácter covalente⁴, dicho

puede ser inter o intramolecular como se observa en la figura 3¹. Los aminoácidos se pueden unir entre sí por medio de un enlace peptídico originando polímeros peptídicos¹. Las proteínas fueron estudiadas por Linus Pauling y Robert Corey quienes son los pioneros de la cristalografía de proteínas⁴, observaron que el enlace péptidico era ligeramente más corto de lo que sería un enlace simple C-N, lo que les permitió deducir que poseía un carácter parcial de doble enlace⁵ concluyendo que los átomos que se involucran en el enlace peptídico se encuentran dentro del plano y debido a efectos de resonancia que existe entre oxígeno, carbono y nitrógeno dan origen a los ángulos ϕ y ψ del enlace peptídico que no permiten que exista un libre giro del enlace (figura 4).

Esta falta de libertad de giro supone restricciones en el número de conformaciones posibles de la cadena polipeptídica, que además está constituida por una serie de planos rígidos formados por los diferentes grupos peptídicos, quienes podrían adoptar diferentes posiciones unos con respecto a otros mediante giros de los enlaces sencillos que flanquean cada uno de estos planos⁴. Las configuraciones que se pueden adquirir son:

- cis: los dos $C\alpha$ se sitúan del mismo lado del doble enlace
- trans: los dos $C\alpha$ se sitúan a distinto lado del doble enlace.

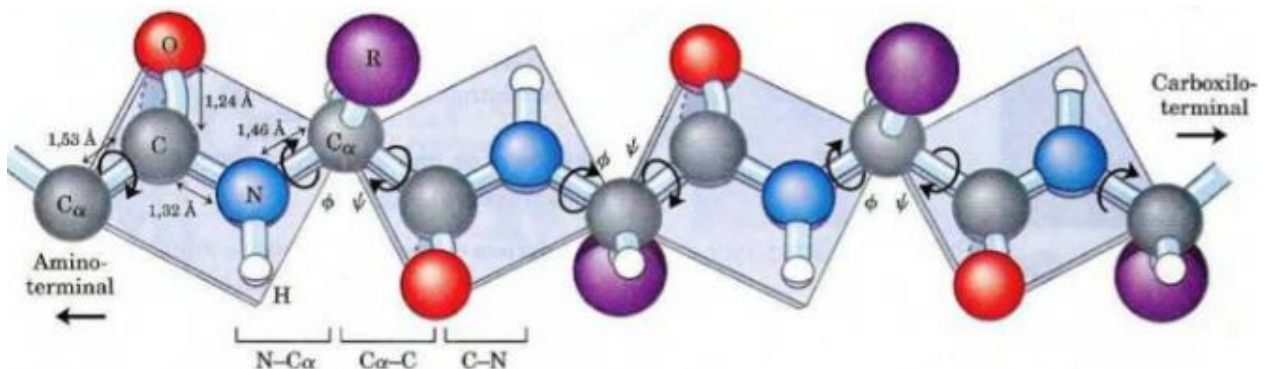


Figura 4: enlace peptídico dentro de un plano dando origen a los ángulos ψ y ϕ ⁸.

Se presenta un incremento en la polaridad del enlace peptídico debido al efecto de resonancia generando un momento dipolar, por lo que cada enlace peptídico participa en dos puentes de hidrógeno en donde uno de ellos actúa como donador de hidrógeno y el otro actúa como receptor de hidrógeno lo que contribuye al plegamiento tridimensional de las proteínas¹.

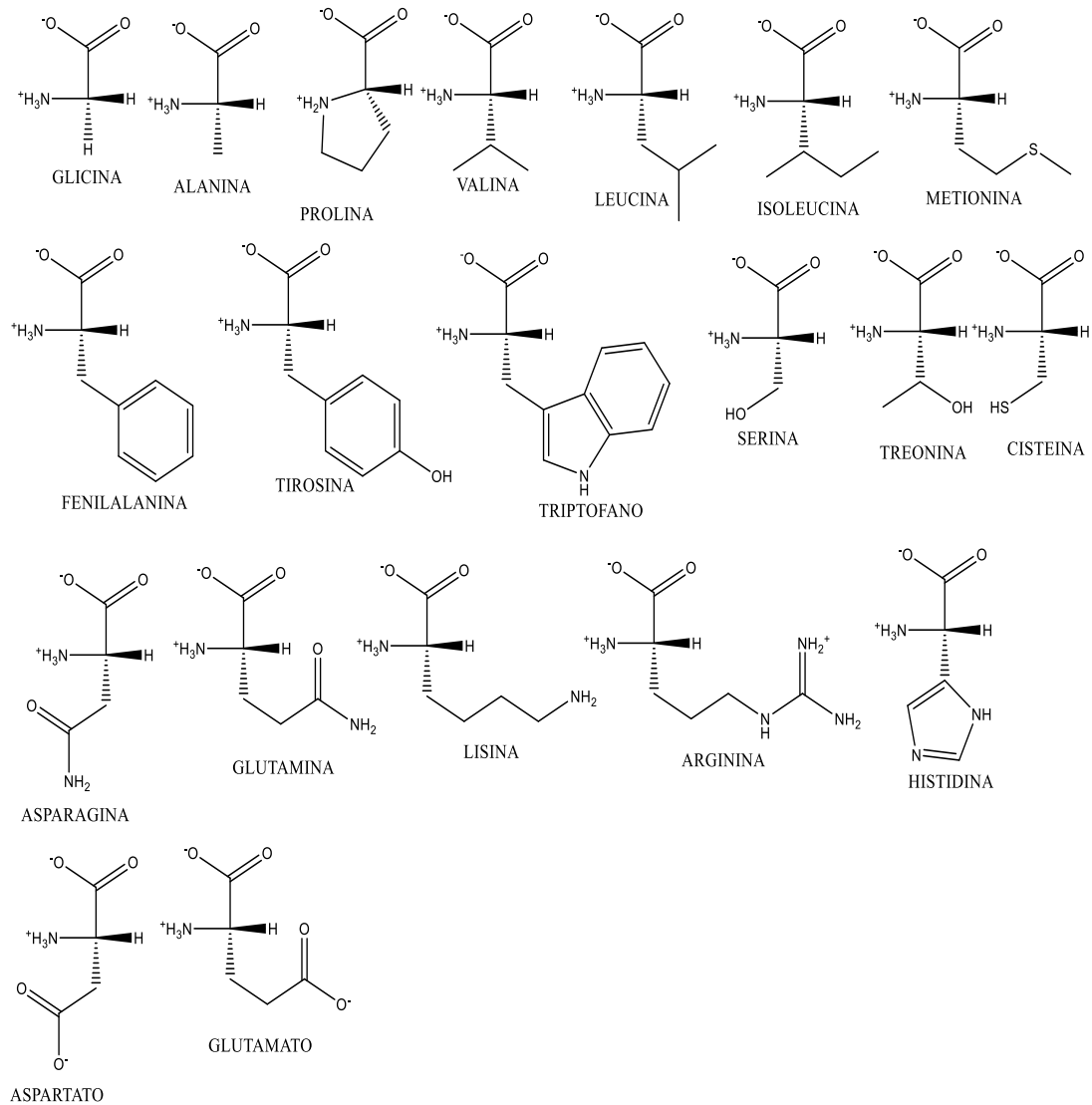


Figura 2: estructura de los aminoácidos.

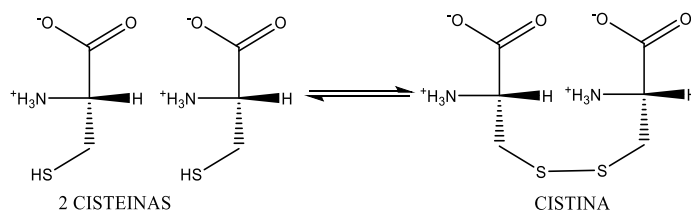


Figura 3: puentes disulfuro entre cisteínas¹.

Los valores que pueden adquirir ψ y ϕ se pueden representar por medio del gráfico de Ramachandran (figura 5) en el que se distinguen cuatro regiones, en color azul fuerte se

asignan los valores máximos permitidos, en azul claro los valores que se presentan usualmente mientras que las zonas de color amarillo pertenecen a valores "no permitidos" de los ángulos de torsión ya que dan lugar a impedimentos estéricos dentro de la estructura lo cual a su vez corresponden a los tipos de elementos estructurales mayoritarios presentes en las proteínas, es decir, la estructura β (cuadrante II) y la α -hélice (cuadrante I y III) a excepción de la glicina la cual puede presentar sus ángulos en el cuadrante IV^{6,16}.

Los polipéptidos presentan diversos tamaños lo cual no define propiedades ni funciones dentro del organismo debido a que existen proteínas pequeñas con funciones importantes. Las proteínas pueden estar constituidas por una sola cadena o por varias denominadas subunidades múltiples en donde sí al menos dos son iguales se llaman proteínas oligoméricas. Las unidades se pueden unir por interacciones no covalentes aunque existen algunas que están unidas por interacciones covalentes como la insulina donde sus subunidades están unidas por medio de un puente disulfuro. Algunas proteínas presentan grupos químicos diferentes denominados "grupos prostéticos" los cuales se unen a los aminoácidos originando proteínas conjugadas en donde el grupo prostético pueden ser lípidos, glúcidos o metales confiriendo a las proteínas funciones biológicas específicas.

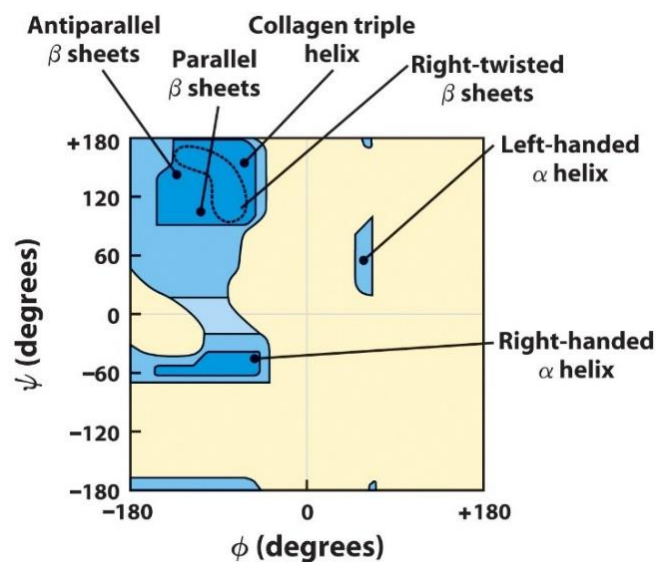


Figura 5: diagrama de Ramachandran¹⁵.

La conformación de las proteínas determina su función la cual puede ser enzimática, hormonal, receptora, transporte, reserva, defensa, estructura o movimiento¹ dependiendo del tipo de arreglo estructural que puede ser:

1. La estructura primaria es la secuencia que presentan los aminoácidos a lo largo de la cadena en donde se presentan interacciones débiles (4-30 kJ/mol) que estabilizan la estructura las cuales pueden ser enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals o puentes disulfuro.

2. La estructura secundaria es la conformación local que existe en una parte determinada del péptido conformada por espirales al azar, componentes, hélices α y hojas β que pueden tener ángulos ϕ y ψ de 60° y -50° respectivamente.
 - a) Hélices α : Están formadas por puentes de hidrógeno del grupo amida o amina con el oxígeno del grupo carbonilo en una serie de $n+4$ formando un cilindro en donde las partes de la cadena que quedan fuera del cilindro son las que interaccionan con el entorno, además, los 4 aminoácidos iniciales y finales de la hélice no presentan puentes de hidrógeno entre sí siendo fundamentales la presencia de Gly y Pro para dar esta conformación. Se construyen a favor de las manecillas del reloj favorecidas por contracciones estéricas, sin embargo, otras se construyen en contra debido a efectos provocados por la glicina. Presentan un dipolo con carga positiva en el grupo amino terminal y con carga negativa en el grupo carbonilo terminal lo que facilita su interacción con diversos iones o especies con diferente carga, por lo general están constituidos de 5 a 40 residuos con un promedio de 10 residuos (figura 6)¹.
 - b) Hojas beta: Formada por dos secuencias de polipéptidos que interaccionan a través de puentes de hidrógeno entre la primer línea de secuencia y la segunda dando lugar a sistemas paralelos o anti paralelos o una mezcla de ambos; los puentes de hidrógeno solo se forman con los hidrógenos del grupo amida ya que los hidrógenos del grupo amino pueden interaccionar con el grupo carbonilo de otra secuencia haciendo posible el crecimiento de la secuencia o con cualquier otra molécula polar, constituidos de 5 a 10 residuos. Las secuencias más

comunes son las anti paralelas debido a la estabilidad del puente de hidrógeno (figura 7)¹.

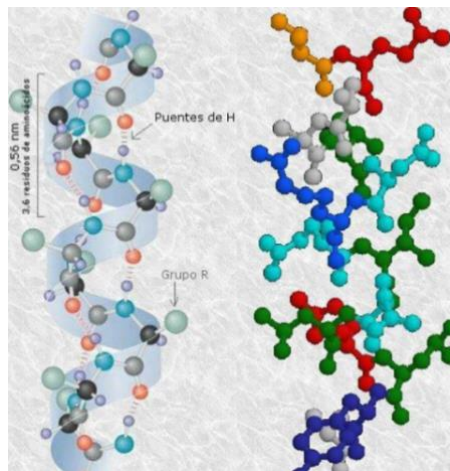


Figura 6: hélice α^1 .

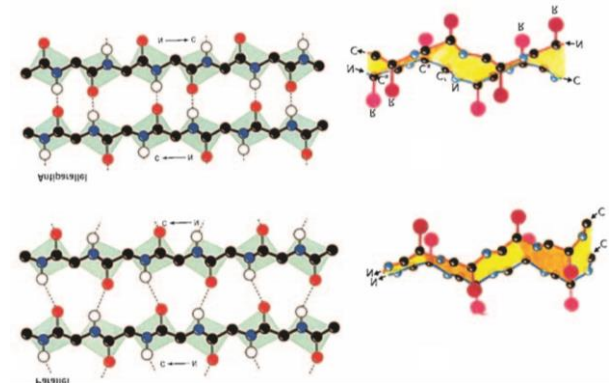


Figura 7: hojas β^1 .

c) Conectores: son secuencias de la estructura secundaria con valores de ϕ y ψ inusuales, establecen pocas interacciones, aunque presentan funciones reguladoras en las proteínas por lo que es común encontrar Gly y Pro en posición cis dando origen a:

- Loops/bucle: son trozos de la proteína que no forman parte de hélices α y láminas β , tienen la función de orientar y unir varios aminoácidos para establecer interacciones.
- Hairpin: donde se conectan hojas β anti paralelas adyacentes (2-3 aminoácidos).
- Turn: son puentes de hidrógeno que se forman entre el primer y el cuarto aminoácido para dar giro en una hélice.

d) Espirales al azar: no influyen significativamente en la formación de interacciones de la cadena, aunque se encuentran presentes.

3. Estructura terciaria: Arreglo estructural formada por medio de la interacción de estructuras secundarias a través de los sitios polares y apolares que la constituyen y

estabilizan. Las dos categorías principales de estructura terciaria de proteínas son la fibrosa y la globular:

- Las proteínas fibrosas son filamentos alargados de cadenas proteínicas que son insolubles en agua y con frecuencia presentan una función estructural de protección.
- Las proteínas globulares son esféricas y solubles en agua, aunque pueden formar dispersiones coloidales³.

4. Estructura cuaternaria: Es la unión de dos o más polipéptidos que se pueden asociar con otras macromoléculas para dar origen a estructuras con diversas funciones conocidos como oligómeros. Se clasifican de dos maneras de acuerdo al número y tipo de cadena polipeptídica: homo-oligómeros y hetero-oligómeros. La estructura cuaternaria se divide en dominios que son la combinación de estructuras secundarias y motivos que dan origen a una estructura terciaria.

Las fuerzas de atracción para la formación de estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas son los puentes salinos, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de VDW consideradas interacciones no covalentes con valores energéticos menores a 12 kJ/mol⁷, sin embargo, las interacciones más fuertes son las interacciones covalentes como los puentes disulfuro que pueden presentar una energía de enlace de entre 60 y 120 kJ/mol y son capaces de unir dos o más cadenas o de formar ciclos (figura 8)⁵. A pesar de que los enlaces covalentes tienen una mayor energía, las interacciones débiles son las que determinan la estabilidad de la molécula debido a que son muy numerosas³.

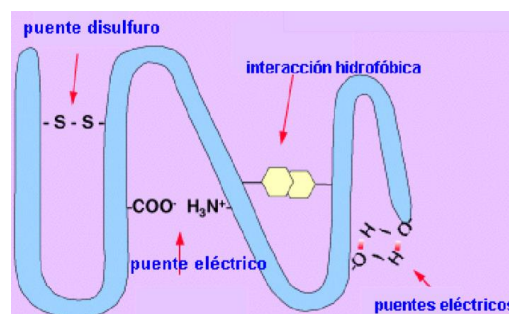


Figura 8: fuerzas de atracción que originan las estructuras terciarias y cuaternarias⁵.

Los tipos de interacciones antes mencionados son importantes debido a que gracias a ellos se pueden estabilizar las estructuras tridimensionales de las proteínas. La energía que existe en cada interacción se expresa en la tabla 2^{1,7}.

Tabla 2: Propiedades de interacciones de enlace de hidrógeno (A-H=hidrógeno ácido, B=base)^{1,7}.			
	Fuerte	Moderado	Débil
Interacción A-H.....B	Covalente	Parcialmente Electrostático	Electrostático
Energía de enlace (kJ/mol)	60 a 120	16 a 60	Menor a 12
Longitud de enlace (Å)			
H.....B	1.2 a 1.5	1.5 a 2.2	2.2 a 3.2
A.....B	2.2 a 2.5	2.5 a 3.2	3.2 a 4.0
Angulo (°)			
	175 a 180	130 a 180	90 a 150
Ejemplos			
	Dimeros en fase gas con ácidos o bases y complejos HF	Ácidos, alcoholes y estructuras biológicas	Enlaces C-H, N-H y enlaces π de O-H

2.1.- Puentes disulfuro.

Las proteínas que contienen aminoácidos con azufre dentro de su estructura tienen diversas propiedades como ayudar a mejorar la calidad del cabello, uñas y piel; favorecer la depuración de toxinas; y la secreción de bilis por parte del hígado. El azufre que se consume procede de los aminoácidos metionina y cisteína presentes en alimentos como el ajo, cebolla, col, coliflor y el brócoli. La presencia de estos aminoácidos se ha asociado con efectos para la salud, dado que la carencia de azufre en el organismo causa un retraso en el crecimiento, ya que está relacionado con la síntesis de proteínas que participan en esta función.

La cisteína presenta una abundancia del 3%⁸ siendo esencial en algunos procesos biológicos, el grupo tiol participa en diversas reacciones actuando como nucleófilo⁶ donde se presenta una oxidación suave originando cistinas con lo que se confiere estabilidad térmica a la proteína. Para que el proceso redox se lleve a cabo, dentro del entorno celular deben de existir condiciones básicas además de la presencia de otro azufre, este proceso puede ser catalizado por oxígeno y metales disueltos dentro del ambiente celular,¹⁰ sin embargo, dicha reacción es reversible si existen los componentes adecuados debido al bajo potencial de reducción que presenta en puente disulfuro en condiciones neutras. El puente disulfuro se puede llevar a cabo de manera intermolecular (en la misma cadena) o de forma intramolecular (figura 9)⁹.

El grupo tiol de la cisteína tiene una gran afinidad por iones metálicos que permiten el desarrollo de la vida como el hierro, zinc, cobre o níquel. Sin embargo, también forma parte de proteínas defensivas contra metales dañinos como el cadmio, mercurio y plomo debido a ese mismo comportamiento⁴. El azufre presenta una configuración electrónica ($3s^23p^4$) lo que le permiten adoptar estados de oxidación entre +6 y -2 y debido a esas características electrónicas, en las proteínas los tioles de las cisteínas constituyen el estado más reducido (-2)³. Por lo que en el ambiente intracelular los residuos de cisteína de las proteínas se encuentran involucradas en diversos procesos como lo son los ciclos celulares, las acciones hormonales, la replicación del ADN, transcripciones, meiosis, desarrollo embrionario temprano, reparación y ensamble de proteínas, así como la germinación de semillas, etc.⁸.

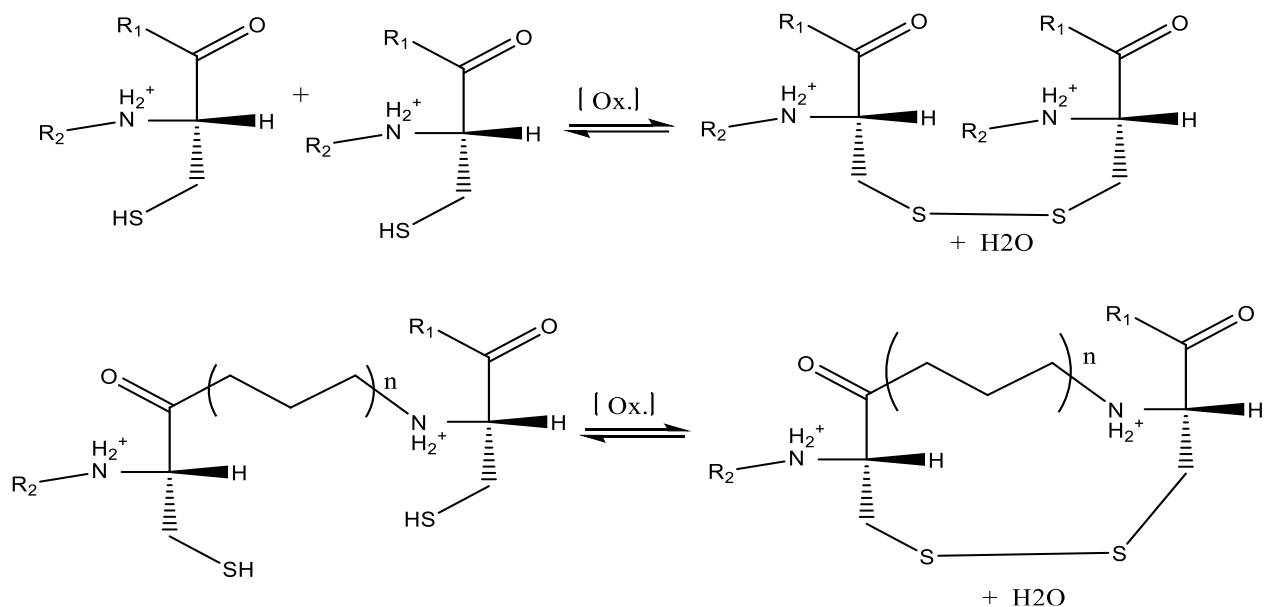


Figura 9: formación del puente disulfuro A) intramolecular B) intermolecular⁹.

Para que un organismo este vivo es necesario un conjunto de reacciones químicas las cuales se llevan a cabo bajo determinadas condiciones de pH y temperatura empleando enzimas como catalizadores que son consideradas proteínas, en algunas ocasiones presentan puentes disulfuro los cuales son determinantes en la formación de plegamientos y funciones. Muchas reacciones catalizadas por enzimas ocurren gracias a que en el sitio activo se encuentran cisteínas quienes pueden formar puentes disulfuro regulando funciones de las proteínas ya sea activándolas o inhibiéndolas².

El azufre al adoptar múltiples estados de oxidación puede generar varias especies que pueden ocasionar modificaciones reversibles o irreversibles dentro de la proteína, dichas especies son disulfuros, tiosulfenatos, S-glutationilación, ácido sulfénico, sulfenamidas, S-nitrosilación y persulfuros además de modificaciones irreversibles como lo son oxiácidos sulfénicos (RSOH), oxiácidos sulfínico (RSO₂H), los tiosulfenatos (disulfuro-S-monóxidos, RS(O)SR') y oxiácidos sulfónicos (RSO₃H)¹².

Tanto la oxidación a ácido sulfénico como la que conlleva la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína, son reversibles por agentes reductores, mientras que los otros dos estados de oxidación (ácidos sulfínico y sulfónico) no pueden ser

reducidos a cisteína; el ácido sulfénico es muy inestable por lo que generalmente se oxida por completo a ácido sulfínico, sulfónico o disulfuro inactivando a la enzima.

Los sistemas de regulación que involucran la formación/ruptura de puentes disulfuro en las proteínas son los conjuntos redox ferredoxina/tiorredoxina, NADP⁺/tiorredoxina²³ y glutarredoxina¹⁷ donde las tiorredoxinas presentan un papel central ya que son proteínas con una masa molecular de 12 kDa que se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y bacterias que dentro de su sitio activo presentan dos residuos de cisteína en una secuencia altamente conservada [-Tyr-Cys-Gly/Ala-Pro-Cys-]. La forma oxidada de la tiorredoxina contiene un puente disulfuro que puede ser reducido a dos tioles por el sistema ferredoxina o por el sistema NADP⁺/tiorredoxina.

Los procesos redox tiol/disulfuro extracelulares son importantes debido a que ayudan a reestructurar sistemas importantes para regular la activación y proliferación de células dentro del organismo debido a que su equilibrio redox es dinámico lo que lo hace ideal como sensor y switch redox estructural confirmando las funciones de la proteína⁸.

Un switch redox es un componente bioquímico que sufre un cambio redox reversible, controlando funciones biológicas activándolas o inhibiéndolas; permitiendo regular funciones como la transcripción, la actividad enzimática, la actividad de los canales de iones, unión de membranas, hemo-oxigenasas, etc. Un sensor redox es un switch que mide el potencial redox del entorno con los cuales la célula mantiene su homeostasis metabólica y los efectos de los cambios metabólicos bajo variadas condiciones redox así como de contrarrestar el estrés oxidativo¹⁴.

Para que una entidad biológica funcione como un switch redox debe presentar un potencial dentro del intervalo comprendido de -170 a -325 mV, que corresponde al que se encuentra en el ambiente intercelular, con lo que es posible el intercambio SH/SS dado que su potencial es aproximadamente -185 mV^{12,14}.

Los puentes disulfuros dentro del organismo regulan funciones como el envejecimiento celular, el desarrollo de algunas enfermedades (diabetes, Alzheimer y cáncer) dado que se producen bajo estrés oxidativo que causa una oxidación del disulfuro. Por otro lado, las bacterias y los virus emplean los puentes disulfuro como llaves de entrada o salida de un compartimento celular a otro que está regulada por el potencial dentro de la célula.

Otro ejemplo donde los disulfuros regulan los procesos biológicos son en las plantas donde las enzimas del cloroplasto reaccionan en función a la luz accionando o inhibiendo procesos siendo un ejemplo el ciclo de Calvin¹⁴.

En 1962, Anfinsen encontró que los disulfuros se pueden reducir produciendo la desnaturalización de la proteína con la adecuada oxidación regenerando su estructura original, sin embargo, también se pueden romper sin cambiar significativamente el comportamiento de las proteínas. El número de disulfuros en un monómero de proteína va de 0 a 16 aunque usualmente no hay más de 7 puentes disulfuro teniendo un promedio de 3 por cada proteína ya sea de manera intramolecular o intermolecular.

La formación de puentes disulfuro se da en su mayoría con una distancia menor a 24 residuos, siendo más frecuentes cuando existen de 10 a 14 residuos, aunque se han observado puentes con distancias de 2 residuos, denominados disulfuros locales. Por otro lado, se encuentran los disulfuros no locales los cuales se forman más allá de 45 residuos de distancia, dicho puente se encuentra cerca del N terminal del polipéptido en donde la distancia más lejana se aproximada a 129 residuos con lo que las proteínas se pueden estabilizar produciendo que la cisteína sea más reactiva por efecto del dipolo dentro de la cadena proteica.¹⁷

Las hojas β y las hélices α impiden en algunos casos la formación de dichos disulfuros de acuerdo a diversos criterios como se muestran a continuación¹¹⁻¹⁶:

- 1) Si dos cisteínas se encuentran en una misma hoja β o hélice α no pueden formar un puente disulfuro debido a impedimentos estéricos^{11, 16}.
- 2) Dos cisteínas de hebras de hojas β no adyacentes no pueden formar puentes S-S si están demasiado alejadas entre sí, incluso si se encuentran cerca la estructura prefiere no estar tensa¹¹.
- 3) No se pueden formar disulfuros entre cisteínas adyacentes dentro de una estructura primaria debido a que los carbonos α se encuentran muy cerca¹⁷.
- 4) Para que la formación del enlace S-S sea estable, el loop que interviene en la formación debe de tener una energía similar a 1×10^{-3} Kcal/mol.
- 5) No existe la formación de puentes disulfuro si las cisteínas están alejadas más de 150 residuos o entre cisteínas que se encuentran en diferentes dominos.

Después de un análisis se determinó que los ángulos para x_3 son $\pm 90^\circ$, x_2 puede adquirir diversos valores dependientes del entorno y x_3 son $\pm 60^\circ$ y 180° siendo más favorables a -60° (figura 10) con lo que se ha concluido que la formación de puentes disulfuro afecta los valores de los ángulos φ y ψ de la estructura mientras que la distancia entre los C α se encuentra en un intervalo de entre 4.6-7.4 Å teóricamente, aunque se ha encontrado que dichas distancias pueden estar entre 4.8-6.6 Å¹¹.

Los grupos sulfhidrilo pueden tener un mínimo de separación de 4.8 Å mientras que los puentes disulfuro pueden tener una separación de 2.08 Å¹¹, dichas longitudes están en función de la calidad de las fuerzas de VDW que se presenten en la estructura ya que si son de mala calidad (en caso del disulfuro), al entrar en contacto con un agente reductor se pueden desnaturalizar.

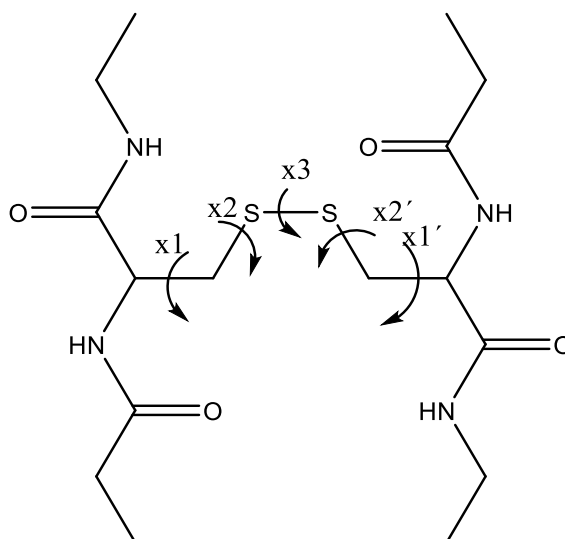



Fig. 10: representación de ángulos y distancias en la formación de puentes disulfuro¹¹.

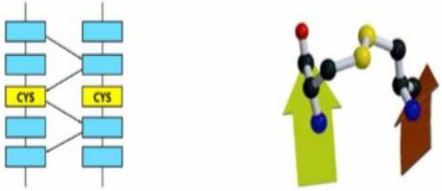
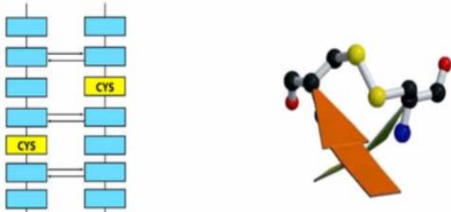

A pesar de los criterios establecidos para la formación de disulfuros, se han observado disulfuros que no se rigen por ellos, denominados “disulfuros prohibidos”, considerados un grupo metaestable constituido por una parte estructural y un switch redox sensible, con lo que adquieren las propiedades funcionales sobre determinados sistemas biológicos. Se encargan de estabilizar a la estructura proteica a pesar de que asumen grandes esfuerzos de ángulos de torsión; sobreesfuerzos de dos hebras para mantenerse juntas, así como la de torcer y cortar una hebra a la otra para acomodar el enlace disulfuro

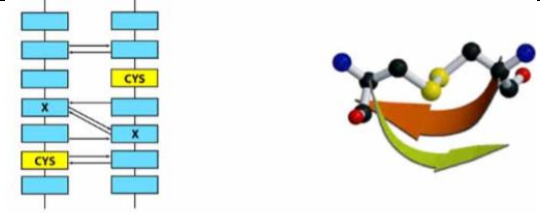
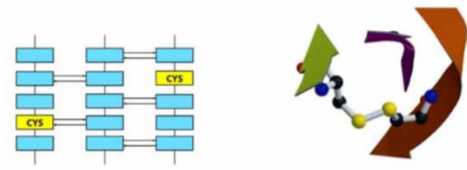
y que en consecuencia incrementan la energía torsional de la estructura proteica presentando actividad redox¹⁷.

Los puentes disulfuros prohibidos representan el 8% de los puentes disulfuro dentro de las proteínas, sus elevadas energías de torsión se deben a su conformación eclipsada, aunque también se presentan en otras conformaciones más estables como la de gancho o espiral¹⁷ y en la mayoría de los casos se presentan en los β -harpins^{17, 26}.

Los disulfuros prohibidos (Cross Strand Disulfide o CSD por sus siglas en ingles) están relacionados estrechamente con el ambiente celular, formando cuatro grupos principales (tabla 3)^{13, 17}. La abundancia inusual de disulfuros prohibidos apunta a un rol importante dentro de las estructuras que les permite existir y en consecuencia es de interés debido a que en diversos estudios^{66, 67} se ha encontrado que funcionan como switch redox en diversos sistemas biológicos tanto en células eucariotas como en virus y bacterias debido a que regulan procesos biológicos por medio del ciclo disulfuro-sulfhidrilo.¹⁷ Los puentes disulfuros prohibidos participan en funciones como la coagulación de la sangre¹⁸, en el sistema inmunológico²⁴ y como parte de agentes infecciosos. Además de proteínas que se piensa participan en diversos procesos como en el control de epítomos, funciones de membranas, tiolreductasas, ribonucleotido-reductasa, receptor interleucina, dominio del plasminogeno Kringle IV, receptor transferrin¹⁷.

Tabla 3: Disulfuros prohibidos ^{13, 17} .		
	Disulfuros prohibidos	Características
	Anti paralelos (aCSDs)	<p>Los (aCSDs) están formados por residuos de cisteínas en hoja β antiparalelas, están localizados en regiones donde no existen puentes de hidrógeno con espacios que se alternan con regiones donde se presentan puentes de hidrógeno a lo largo de la hebra (figura 11).</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">Fig. 11: aCSDs.</p>

Adyacentes	Paralelos (pCSDs)	<p>Las cisteínas se unen covalentemente en hojas beta paralelas, los puentes de hidrógeno paralelos existentes son los encargados de estabilizar la estructura (figura 12),</p>  <p>The diagram shows two parallel beta-strands, each with four blue rectangular blocks representing residues. Two yellow boxes labeled 'CYS' are positioned between the strands, connected by lines to the corresponding residues on both strands. To the right, a 3D ball-and-stick model shows two beta-strands (green and brown) with a disulfide bridge (yellow and black spheres) connecting them.</p> <p>Fig. 12: pCSDs.</p>
	Disulfuros diagonales anti paralelos	<p>El puente disulfuro se forma cuando la cisteína i de una hoja se une con la cisteína j, $j \pm 1$ y $j \pm 2$ de otra hoja adyacente de manera antiparalela, en este tipo de disulfuros no existe la presencia de puentes de hidrógeno (figura 13).</p>  <p>The diagram shows two antiparallel beta-strands, each with five blue rectangular blocks. Two yellow boxes labeled 'CYS' are positioned diagonally between the strands, connected by lines to the corresponding residues. To the right, a 3D ball-and-stick model shows two antiparallel beta-strands (orange and green) with a diagonal disulfide bridge (yellow and black spheres) connecting them.</p> <p>Fig. 13: aCSDs diagonales.</p>
	Disulfuros diagonales paralelos	<p>Similares a los disulfuros antiparalelos, pero de forma paralela caracterizados por presentar un alto giro de hebra (figura 14) siendo muy escasos.</p>  <p>The diagram shows two parallel beta-strands, each with five blue rectangular blocks. Two yellow boxes labeled 'CYS' are positioned diagonally between the strands, connected by lines to the corresponding residues. To the right, a 3D ball-and-stick model shows two parallel beta-strands (green and brown) with a diagonal disulfide bridge (yellow and black spheres) connecting them.</p> <p>Fig. 14: pCSDs diagonales.</p>
	Disulfuros β -flip	<p>Este puente se forma entre la cisteína i de una hoja y la cisteína j, $j \pm 1$, $j \pm 2$ y $j \pm 3$ de otra hoja adyacente, existen patrones inusuales de puentes de hidrógeno (figura 15).</p>

		 <p style="text-align: center;">Fig. 15: β-flip.</p>
No adyacentes	Puentes intercalados (JSDs)	<p>El disulfuro se forma entre hojas no adyacentes de forma intercalada uniendo el residuo cisteína i con el residuo de la cisteína k, $k\pm 1$, $k\pm 2$ y $k\pm 3$ (figura 16).</p>  <p style="text-align: center;">Fig. 16: CSDs intercalados.</p>
En una sola hoja o hélice	Disulfuros inter helicoidales (IHDs)	<p>Se encuentran en las familias de las transferrinas que se encargan del transporte del hierro en el flujo sanguíneo; las IHD son parte de las ribonucleótido reductasas que se encargan de regular el paso final de la síntesis de ADN donde las actividades catalíticas estas reguladas por el proceso redox que sufren los disulfuros.</p>
	Disulfuros a lo largo de una hoja (ASDs)	
	Vecinales ^{17,27}	<p>La formación de un puente disulfuro vecino se lleva a cabo en una estructura primaria donde se distorsionan los enlaces peptídicos de las cisteínas. Se tienen reportadas pocas estructuras con este tipo de puente, por ejemplo, la toxina de araña (atractoxina) y el methanol dehidrogenasa (MDH).</p>

En la tabla 4¹³ se presentan ejemplos de proteínas con puentes disulfuros prohibidos.

Tabla 4: Proteínas que presentan puentes disulfuro prohibidos¹³.				
Función		Proteína	Residuos	Tipo de disulfuro
Ciclo celular		CDC25B	426-473	pCSD
		GlmU	307-324	pCSD
		MurD	208-227	pCSD
		Ribonucleasa reductasa R2	268-272	IHD
Proteínas transportadoras		Retinol binding protein	120-129	β -flip
		Receptor transferrina	556-558	ASD
Entrada celular	Proteína de fusión del virus del dengue ¹⁷		92-116	aCSD
			185-285	aCSD
			3-30	pCSD
			60-121	β -flip
		Genotoxina Cdt	865-882	Diagonal antiparalelo
		Influenza neuraminidasa	498-513	Diagonal paralelo
		Influenza haemaglutina	A47-A274	pCSD
Coagulación de sangre		Co-aglutinina de víbora	498-513	Diagonal antiparalelo
		Factor de tejido	146-209	aCSD
Inmunitario	Receptor citoquina	Clase I de CBM (receptor eritropoyetina)	28-38	aCSD
		Clase II de CBM (factor de tejido)	186-209	aCSD
		Receptor de hormona de crecimiento	308-322	aCSD
		Interleucina 10-R	35-54	Diagonal antiparalelo
		HLA_DM en humanos	B-25-B35	aCSD

	Homólogos de MHC	MICA	C36-C41	aCSD
		RAE-1 β	A7-A26	aCSD
	Inmunidad innata	Lectina unida a fucosa ¹⁷	82-83	vecinal
		Defensina	5-20	intercalado

Poco es lo que se sabe sobre los disulfuros prohibidos estructuralmente y funcionalmente. Debido a la elevada energía que tienen, su formación pareciera no ser espontánea lo que ocasiona una suposición acerca de como se generan; dentro de las posibles explicaciones acerca de su formación es que se pudieran generar por una oxidación o reducción como parte del ciclo SH/SS parecido a la oxidación de las tiorredoxinas.

Un factor de gran interés que ayudaría a explicar la formación de disulfuros prohibidos es el potencial redox, lo que a su vez explicaría su actividad biológica como switch redox. El potencial redox del disulfuro prohibido depende de la conformación que adquiera la cadena o el ciclo que se forma entre residuos Cys ya sean adyacentes o no adyacentes, este a su vez modifica el potencial del buffer que se encuentre dentro del compartimento donde se encuentre el puente modificando la homeostasis del sistema. El potencial no solo depende de la conformación, sino que también del pKa, pH, cambio del ligando, energía torsional y entropía¹⁷.

2.2.- Teoría de funcionales de la densidad.

Es un procedimiento variacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, donde el funcional de la densidad electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica. Teoría de funcionales de la densidad (DFT por sus siglas en inglés) es capaz de obtener la energía y la distribución electrónica del estado fundamental trabajando con el funcional de la densidad electrónica en vez de la función de onda. La ventaja es que la densidad electrónica es una magnitud mucho más simple que la función de onda y por lo tanto más fácil de calcular además de que se puede emplear en sistemas más complejos²⁹⁻³². A mediados de 1960 se publicaron dos artículos fundamentales de la DFT, el de Hohenberg-Kohn³¹ y después el de Kohn-Sham³².

Las densidades electrónicas se denominan v -representable. El hamiltoniano H_N contiene una parte universal que consiste en el operador de energía cinética \hat{T} y el operador de energía de interacción electrón-electrón \hat{U} así como el operador no universal \hat{V}_e para la energía de interacción de los electrones con un potencial externo V_e que contiene el potencial electrostático de los núcleos y los potenciales de cualquier otra fuente externa al sistema, ver (1).

$$\hat{H}_N = \hat{T} + \hat{U} + \hat{V}_e \dots (1)$$

De acuerdo al teorema de Hohenberg-Kohn, la energía ($E[n]$) puede ser considerada un funcional de la densidad electrónica, ver (2).

$$E[n] = (\psi_N H_N \psi_N) = E[\psi_N] \dots (2)$$

El principio variacional de Rayleigh-Ritz junto con el teorema de Hohenberg-Kohn implican que $E[n]$ es un mínimo (E_G) a la densidad del estado fundamental n_G dando lugar al segundo teorema de Hohenberg-Kohn, ver (3).

$$E_G = \text{MIN}_n E[n] = E[n_G] \dots (3)$$

Posteriormente Kohn y Sham³² consideraron un sistema de electrones no interactuantes que se desplazan en un potencial externo V_{KS} , ver (4).

$$\varphi_N = \frac{1}{(N!)^{\frac{1}{2}}} \text{DET}\{\psi_i\}, i = 1 \dots N \dots (4)$$

El spin-orbital ortonormal $\psi_i(x), x = (r, s)$ (donde s es el spin) da lugar a la densidad electrónica la cual satisface la ecuación de Schöinger, ver (5).

$$n(r) = \sum_{i,s} |\psi_i(X)|^2 \dots (5)$$

La energía cinética y los funcionales de interacción electrón-electrón $T[n]$ y $U[n]$ se obtienen mediante la adopción de los valores esperados de \hat{T} y \hat{U} respectivamente.

$$E[n] = T[n] + U[n] + \int V_e(r)n(r)dr + V_{NN} \dots (6)$$

Los términos de 6 son rearrreglados para facilitar la derivación de V_{KS} con lo cual se obtiene 7.

$$E[n] = T_s[n] + U_H[n] + E_{XC}[n] + \int V_e(r)n(r)dr + V_{NN} \dots (7)$$

Donde $T_s[n]$ es el valor esperado de \hat{T} con la función de onda φ no interactuante, ver (8).

$$T_s[n] = \sum_{i=1}^N \left(\psi_i, \frac{p^2}{2m} \psi_i \right) \dots (8)$$

Se puede demostrar ser un funcional de n mediante la aplicación del procedimiento de Levy-Lieb²⁹ para el caso de no interacción mientras que $U_H[n]$ es la aproximación de Hartree para $(\psi, \hat{U}\psi)$ dada por:

$$U_H[n] = \int \frac{n(r)e^2n(r')}{|r-r'|} dr dr' \dots (9)$$

Donde $E_{xc}[n]$ es el funcional de correlación de intercambio dada por:

$$E_{XC}[n] = T[n] - T_s[n] + U[n] - U_H[n] \dots (10)$$

En un estado basal no degenerado de la interacción de sistema, $E[n]$ es estacionaria o mínima con respecto a la variación en n . Al variar n , la igualdad de n entre los sistemas interactuantes y no interactuantes es mantenida, por lo cual 5 satisface la interacción de n . Así la variación en la interacción n es generada por la variación en la no interacción ψ_i sujeta a la restricción de ortogonalidad.

El potencial de Kohn-Sham V_{KS} está dada por:

$$V_{KS}(r) = V_e(r) + V_H(r) + V_{XC}(r) \dots (11)$$

Donde $V_H(r)$ es el potencial de Hartree que está dado por:

$$V_H[n] = \int \frac{e^2 n(r')}{|r-r'|} dr' \dots (12)$$

Y el potencial de intercambio de correlación $V_{XC}(r)$ está dado por:

$$V_{XC}[r] = \frac{\delta E_{XC}[n]}{\delta n(r)} \dots (13)$$

Hohenberg y Kohn³¹ señalan que el problema para encontrar la energía de un sistema de N electrones siendo N un número entero fue abordada por medio de la relajación de la restricción a través de una transformación de Legendre de $E[n]$ para el potencial $\Omega[n]$ donde la $E_G = \text{MIN}_N E[n]$ estaba sujeta a la restricción $N = \int n(r) dr$.

$$\Omega[n] = E[n] - \mu N \dots (14)$$

Y al minimizar $\Omega[n]$, se obtiene el potencial químico que es una propiedad global que caracteriza la tendencia de los electrones a escapar desde un sistema en equilibrio y que de manera formal es el multiplicador de Lagrange asociado con la constante de restricción de la normalización del principio variacional de DFT³⁴ que integra la densidad electrónica con respecto a N ^{44, 45} que a su vez está relacionado con la electronegatividad de Mulliken a través de la expresión $\mu = -\chi$ ³⁹ por lo 14 se convierte en 15:

$$\mu = \frac{\delta E[n]}{\delta n} = \frac{dE(N)}{dN} \dots (15)$$

Esa relajación de la restricción con la consecuente variación arbitraria de n implica que $E[n]$ es arbitraria, es decir, N es fraccionario. Lo anterior parecería estar claro en la igualdad de 15 donde $E(N)$ es la energía del estado basal de N electrones, la derivación se define por 16 y se puede observar que N es entero pero que $N+\Delta N$ no lo es.

$$\frac{dE}{dN} = \lim_{\Delta N \rightarrow 0} \frac{E(N+\Delta N) - E(N)}{\Delta N} \dots (16)$$

En 1980 se proporcionó la base para la Teoría de Reactividad Química (CRT por sus siglas en inglés) siendo importante para la química y en conjunto con DFT dan lugar a lo que se denomina "DFT conceptual" originándose los conceptos centrales de CRT [potencial químico (μ) o electronegatividad y la dureza (η)]^{29, 35, 36, 37}.

Tanto μ como η son definidos mediante la diferenciación de la energía total con respecto al número de electrones; μ por 15 mientras que η puede ser entendida como una resistencia a la transferencia de carga del sistema, es decir, la resistencia a la redistribución de los electrones que posee una molécula³⁹ definida por 17, puede ser relacionada con la diferencia de energía (gap) entre el orbital más altamente ocupado y el más bajo desocupado.

Tanto μ y η son propiedades globales del sistema dependientes de N y $v(r)$.

$$\eta = \frac{d\mu}{2dN} = \frac{d^2E(N)}{2dN^2} \dots (17)$$

Tanto μ y η así como otros parámetros de reactividad química requieren del conocimiento del funcional de la densidad para un número fraccionario de N .

De lo anterior se deduce el teorema de Janak²⁹ originando la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{dE}{dN} = \varepsilon_{M+1} \dots (18)$$

Por lo que η también está dada por:

$$\eta = \frac{d\varepsilon_{M+1}}{2dN} \dots (19)$$

Y por medio del teorema de Hellmann-Feynman²⁹ se convierte en:

$$\eta = \frac{\left(\psi_{M+1}, \frac{dV_{KS}}{dN} \psi_{M+1}\right)}{2} \dots (20)$$

Y haciendo uso de las matemáticas adecuadas se obtiene:

$$\frac{dV_{KS}(r)}{dN} = \int \frac{\delta V_{KS}(r)}{\delta n(r')} \frac{dn(r')}{dN} dr' \dots (21)$$

Donde el primer factor de la integral de 21 es la interacción de Kohn-Sham.

$$f(r, r') = \frac{\delta V_{KS}(r)}{\delta n(r')} \dots (22)$$

El segundo factor es la función de Fukui introducido por Parr y Yang en 1984^{38, 50}. El objetivo de la teoría de reactividad química es predecir o interpretar las reactividades de átomos, moléculas o sistemas en respuesta a un estímulo químico cuantificado por varios índices de reactividad.

Los índices de reactividad fueron empíricos hasta que Pauling introdujó la escala empírica para la electronegatividad χ con el fin de cuantificar la tendencia para donar o aceptar electrones²⁹ y posteriormente Mulliken³⁹ señaló que la electronegatividad está dada por:

$$\chi_m = \frac{I+A}{2} \dots (23)$$

Donde I es la energía de ionización y A es la afinidad electrónica de donde se concluye que no habría transferencia de carga entre las especies que tienen la misma χ_m y el flujo de electrones debería de ir hacia las especies donde χ_m es mayor, aunque señalo una desproporción, la cual indica que una transferencia de carga entre sistemas similares no se produciría si $I-A > 0$. El potencial químico es igual al negativo de la electronegatividad con lo que da lugar al potencial químico discreto χ_d y la dureza discreta η_d .

$$E(N) = E(M) + \mu_d(N - M) + \frac{\eta_d(N-M)^2}{2} \dots (24)$$

$$\mu_d = \frac{(E(M+1)-E(M))+(E(M)-E(M-1))}{2} = -\frac{I+A}{2} = -\chi_m \dots (25)$$

$$\eta_d = \frac{E(M+1)+E(M-1)-2E(M)}{2} = \frac{I-A}{2} \dots (26)$$

Para todas las especies η_d es positiva debido a una consecuencia aun no probada del principio de exclusión Pauli y de la naturaleza de la interacción electrón-electrón. Las nociones de que $\mu = \frac{dE}{dN}$ ²⁹ y $\eta = \frac{d^2E}{dN^2}$ ^{36, 37} al igual que la hibridación²⁹, la polarizabilidad³⁷, la disposición de carga y enlace de Mulliken³⁹, el principio ácido-base duro y blando de Pearson³⁷, el principio de máxima dureza¹³ y el concepto de orbital frontera de Fukui^{38, 50} dieron lugar a la cimentación profunda de DFT. Más tarde otros índices como la regio y estereoselectividad³⁵, las reglas de Woodward-Hoffman³⁵, aromaticidad³⁵, etc se introdujeron estudiándose cuantitativamente²⁹ y conceptualmente trayendo como consecuencia un mejor entendimiento acerca de la reactividad química.

Los índices de reactividad son denominados descriptores químicos de la reactividad clasificados en globales, locales y no locales^{29, 52}.

- ✓ Globales: en la cual una derivada es tomada de una cantidad global tal como la energía total con respecto a una variable como lo es el potencial químico, la dureza y la suavidad (S) ^{29, 35, 36, 37, 52, 53}.
- ✓ Locales: en la que una derivada es tomada de una cantidad local como la densidad con respecto a una variable global, ejemplo de un índice local son las funciones de Fukui^{38, 50} así como a la suavidad local (s)⁵².
- ✓ No locales: en la que un derivado funcional es tomado de una cantidad local con respecto a otra cantidad local como lo es la interacción de Kohn-Sham y la susceptibilidad isoelectrónica o suavidad, ver (27).⁵²

$$\chi(r, r') = -\frac{\delta n(r)}{\delta V_e(r')} \dots (27)$$

Los descriptores μ , η , la filicidad (ω) y S muestran la reactividad de las moléculas como un todo, sin embargo, para estudiar la reactividad y selectividad de sitio es necesario el uso de descriptores locales como las funciones de Fukui o la suavidad local (s) ^{50, 53}.

Los descriptores locales como la función de Fukui (FF), la filicidad (ω) y la blandura local (s(r)) son propiedades que explican la selectividad en una región de una molécula⁵³ por lo que al expresar la densidad electrónica en términos de spin-orbitales de Kohn-Sham y teniendo en cuenta la derivada con respecto a N, así como al aplicar la relación de Maxwell al μ se pueden definir las funciones de Fukui.^{33, 38, 43}

$$f(r) = \left(\frac{\delta \rho(r)}{\delta N} \right)_{v(r)} = \left(\frac{\delta \mu}{\delta v(r)} \right)_N \dots (28)$$

Aunque debido a una discontinuidad de N, la función de Fukui se define en dos tipos de acuerdo a sus derivadas las cuales se pueden aproximar por la izquierda o por la derecha dando lugar al número de electrones ($N=N_0$) ^{33, 38, 43}.

$$f^+(r) = \left(\frac{\delta \rho(r)}{\delta N} \right)_{v(r)}^+ \dots (29)$$

$$f^-(r) = \left(\frac{\delta \rho(r)}{\delta N} \right)_{v(r)}^- \dots (30)$$

Los dos tipos de funciones de Fukui se encargan de describir el comportamiento de un sustrato al entrar en contacto con un agente nucleofílico o electrofílico y a su vez generan

una tercera función de Fukui que describe el uso de radicales dentro de las reacciones químicas^{33, 38, 43}.

$$f^0(r) = \frac{f^+(r)+f^-(r)}{2} \dots (31)$$

Entre mayor sea el valor de los índices de Fukui, mayor será la reactividad. Los índices de Fukui dan lugar a los orbitales moleculares frontera más un término corregido que incluye los efectos de relajación del orbital⁴⁴.

Los orbitales frontera se clasifican en tres (HOMO, SUMO y LUMO que son acrónimos de Highest Occupied Molecular Orbital, Singly Occupied Molecular Orbital y Lowest Unoccupied Molecular Orbital por sus siglas en inglés, respectivamente) donde la diferencia de energía entre HOMO y LUMO es denominada energía de banda prohibida “gap HOMO-LUMO”; el HOMO es similar a la banda de valencia mientras que el LUMO es similar a la banda de conducción pero en este caso para compuestos orgánicos mientras que el SOMO es un orbital ocupado por un solo electrón⁴⁴.

El cálculo de las funciones de Fukui no se puede realizar de manera simple por lo que una solución es tomar la aproximación de diferencias finitas entre las densidades electrónicas totales $N = N_0$ y $N = (N_0 \pm 1)$.

Existen diversos sistemas que pueden ser usados para calcular los descriptores moleculares evitando la estimación aproximada de derivados los cuales introducen números fraccionales de ocupación desde el teorema de Janak para producir cambios infinitesimales en el número de electrones⁴⁵ obteniéndose una representación tridimensional de las funciones, por lo que se necesita la integración de la función de Fukui a lo largo de la porción de espacio que podría atribuirse a un determinado átomo perteneciente a una molécula, lo que lleva a la condensación de las funciones de Fukui⁴⁶, este procedimiento es análogo a la condensación de la densidad electrónica de los átomos lo cual conduce a la asignación de cargas atómicas a través de análisis de la población o de partición de la densidad⁴⁵.

De manera análoga se puede calcular la suavidad local (s_k^+) de la molécula con 32.⁵³

$$s_k^+ = f_k^+ S \dots (32)$$

Donde S es la suavidad global y f_k^+ es la función de Fukui^{33, 38, 43} mientras que el índice de electrofilicidad local (filicidad)^{53, 54} se calcula a partir de 33.

$$\omega_k^+ = f_k^+ w \dots (33)$$

Donde ω es la electrofilicidad global y f_k^+ es la función de Fukui, este concepto fue introducido por Chattaraj^{47, 48} para analizar las reacciones entre electrófilos y nucleófilos con el fin de predecir el sitio más electrofílico en una molécula⁵³. Se sabe que la reactividad intra e intermolecular se puede explicar en términos de $f(r)$ o $s(r)$ por lo que recientemente se dedujo una conexión entre $f(r)$ y $s(r)$ originándose un descriptor denominado “descriptor atómico” (DA) definido como $(sf)_k^\alpha$ ^{53, 55}.

$$(sf)_k^\alpha = (f_k^\alpha)^2 S \dots (34)$$

Donde $\alpha = \pm 0$ el cual se refiere al ataque nucleofílico, electrofílico o radical; de manera análoga se ha propuesto un nuevo descriptor denominado “descriptor atómico de filicidad”, asociado con la condición de normalización de la función de Fukui⁵³ definido como:

$$(\omega f)_k^\alpha = (f_k^\alpha)^2 W \dots (35)$$

Donde, $\alpha = \pm 0$ se refieren al ataque nucleofílico, electrofílico y radical respectivamente.

Descomponer a la densidad electrónica molecular en sus componentes atómicos se puede lograr mediante diferentes métodos que conducen a resultados significativamente diferentes e interpretaciones químicas engañosas⁴⁵. Por otra parte, no es fácil elegir el método más adecuado en función de argumentos teóricos por lo que existen esquemas de cargas diferentes que se utilizan para calcular propiedades de los átomos en moléculas, por ejemplo, el análisis de población de Mulliken (MPA)⁴⁹, el análisis demográfico natural (NPA)⁴⁵, métodos basados en la matriz de densidad y de partición Hirshfeld (HP)⁴⁵.

El problema de DFT radica en que para conocer las energías y densidades en estado basal se necesita conocer el funcional de intercambio-correlación el cual es desconocido por lo que se tienen que realizar aproximaciones por medio de funcionales aproximados que se descomponen para obtener el funcional de intercambio y el de correlación.

Algunos funcionales de intercambio son^{56, 57}.

- S: Slater.
- XA: $X\alpha$ (Slater)
- B: Becke.
- PW91: Perdew y Want.
- mPW: PW modificado por Adamo and Barone.
- G96: Gill.
- PBE: Perdew, Burke y Ernzerhof.
- O: Handy.
- TPSS: Tao, Perdew, Staroverov y Scuseria.
- BRx: Becke.
- PKZB: Perdew, Kurth, Zupan y Blaha.
- wPBEh (HSE): Heyd, Scuseria y Ernzerhof.
- PBEh: revisión Ernzerho.

Los funcionales de energía de correlación son locales con corrección de auto-correlación los cuales incluyen una corrección de gradiente meta-GGA y locales con correlación para densidades multireferenciales^{56,57}, por ejemplo:

- VWN, VWN5: Vosko Wilk Nusair.
- PL: Perdew Local.
- LYP: Lee, Yang, y Parr.
- P86: Perdew.
- B95: Becke con corrección del gradiente τ .
- BRC : Krieger-Chen-Iafrate-Savin.
- KCIS: Becke-Roussel.
- PKZB: Perdew, Kurth, Zupan y Blaha.

Los funcionales híbridos combinan los fundamentos de Hartree-Fock con los de DFT para obtener mejores aproximaciones al realizar cálculos acerca del comportamiento fisicoquímico de la estructura, por ejemplo: ⁵⁶⁻⁵⁸

- B3LYP : Becke Three Parameter Hybrid Functional
- LYP-local.
- PBE1PBE (PBE0): El híbrido de PBE.
- X3LYP: Xu y Goddard.
- O3LYP: Híbrido de Cohen y Handy.
- B98: Híbrido del B97.

- B971, B972: híbrido de Tozer et al. sobre B97.
- mPW1PW91, mPW1LYP, mPW1PBE, mPW3PBE.
- BMK: Boese y Martin, funcional híbrido τ -dependiente.
- M06, M06HF, M062X: Híbridos de Truhlar and Zhao, 06, 08.
- tHCTHhyb: Híbrido de tHCTH, 02.
- APF, APFD: Austin-Frisch-Petersson, sin y con dispersión.
- SOGGA11X: Truhlar.
- PBEh1PBE: híbrido de PBE.
- TPSSh: híbrido de TPSS.
- HSEH1PBE (HSE06), OHSE2PBE (HSE03), OHSE1PBE: Heyd-Scuseria-Ernzerhof.
- wB97, wB97X, wB97XD: Head-Gordon et al.
- LC-wPBE: Corrección de Hirao et al. a wPBE.
- CAM-B3LYP: Yanai, Tew y Handy.
- HISSbPBE: Híbrido de HISS.
- M11, M11L M12SX, MN12SX: Nuevos híbridos del grupo de Truhlar.

Para determinar la energía de intercambio-correlación, los funcionales se apoyan de conjuntos de base los cuales son descripciones matemáticas de los orbitales en un sistema molecular donde las aproximaciones más exactas son basadas en conjuntos de base más grandes conocidos como Gaussian Type Orbitals (GTO, por sus siglas en inglés).

Existen cuatro tipos de conjuntos de base GTO básicos^{59, 60}:

- 1) Conjuntos de bases mínimos: se utilizan sólo las funciones imprescindibles para representar todos los electrones del sistema empleando una función base por cada orbital atómico ocupado en el estado fundamental de cada átomo. La desventaja es que carecen de flexibilidad para describir cambios en los orbitales atómicos cuando hay enlaces químicos pero permiten que exista una flexibilidad en el tamaño del átomo. En estos conjuntos de base, el mismo número de primitivas de Gauss comprenden orbitales de núcleo y de valencia.
 - H y He: una función s (1s) (total 1).

- Elementos del segundo período: dos funciones (1s y 2s) y un conjunto de tres funciones p (p_x , p_y , p_z) (total 5).
 - Elementos del tercer período: tres funciones (1s, 2s y 3s), y dos conjuntos de tres funciones p (2p y 3p) (total 9).
- 2) Doble y triple Z donde existen dos o tres gaussianas primitivas contraídas por cada orbital atómico permitiendo que exista flexibilidad en el tamaño del átomo.
 - 3) Funciones de base extendida donde dos o más funciones de base con distinto coeficiente describen cada orbital ocupado (p, d, f). en las que los orbitales internos se describen con una combinación lineal de funciones y los orbitales de valencia se presentan mediante más de una combinación de funciones.
 - ✓ 3-21G: cada e^- de la capa interna se describe con una combinación lineal de tres gaussianas primitivas contraídas mientras que cada e^- de la capa de valencia se describe con dos funciones, una interna formada por una combinación lineal de dos gaussianas primitivas contraídas y una externa con una gaussiana primitiva contraída difusa.
 - ✓ 6-31G: cada e^- de la capa interna se describe con seis gaussianas primitivas contraídas mientras que cada e^- de la capa de valencia se describe con dos funciones, una interna formada por una combinación lineal de tres gaussianas primitivas contraídas y una externa con una gaussiana primitiva contraída difusa.
 - 4) Funciones de base de valencia desdoblada polarizada donde a los conjuntos de base mínima se incluyen funciones de polarización (funciones con el mismo número cuántico principal pero correspondiente a un número cuántico angular superior) para poder describir correctamente los cambios de densidad electrónica de un átomo en una molécula permitiendo flexibilidad en la forma del átomo.
 - ✓ 6-311G (d) \equiv 6-311G*: cada e^- de la capa interna se describe con una combinación lineal de seis gaussianas primitivas mientras que cada e^- de la capa de valencia se describe con tres funciones, una formada por combinación lineal de tres gaussianas primitivas y otra combinación lineal de dos gaussianas

primitivas polarizadas. A cada átomo diferente al hidrógeno se le añaden 6 orbitales d o 10 orbitales f.

- ✓ 6-311G (d, p) \equiv 6-311G^{**}: cada e⁻ de la capa interna se describe con una combinación lineal de seis gaussianas primitivas mientras que cada e⁻ de la capa de valencia se describe con tres funciones, una formada por combinación lineal de tres gaussianas primitivas y otra combinación lineal de tres gaussianas primitivas polarizadas. A cada átomo diferente al hidrógeno se le añade un conjunto de orbitales d o f mientras que a cada átomo de hidrógeno se le añade un conjunto de orbitales 2p 6 orbitales d o 10 orbitales f.

5) Funciones de base de valencia polarizadas difusas las cuales presentan el mismo número cuántico angular que las funciones de la capa de valencia siendo más extendidas en el espacio, es decir, son funciones gaussianas con exponentes pequeños que se presentan en sistemas donde la distribución electrónica se encuentra expandida permitiendo que exista flexibilidad en el tamaño de los átomos con r grandes.

- ✓ 6-311+G (d) \equiv 6-311+G^{*}: cada e⁻ de la capa interna se describe con una combinación lineal de seis gaussianas primitivas mientras que cada e⁻ de la capa de valencia se describe con tres funciones, una formada por combinación lineal de tres gaussianas primitivas y otra combinación lineal de dos gaussianas primitivas polarizadas. A cada átomo diferente al hidrógeno se le añade un conjunto de orbitales d o f y un conjunto de fusiones difusas (s, px, py, pz)
- ✓ 6-311++G (d, p) \equiv 6-311++G^{**}: cada e⁻ de la capa interna se describe con una combinación lineal de seis gaussianas primitivas mientras que cada e⁻ de la capa de valencia se describe con tres funciones, una formada por combinación lineal de tres gaussianas primitivas y otra combinación lineal de dos gaussianas primitivas polarizadas. A cada átomo diferente al hidrógeno se le añade un conjunto de orbitales d o f y un conjunto de fusiones difusas (s, px, py, pz) mientras que para cada hidrógeno se le añade un conjunto de orbitales 2p y una gaussiana difusa tipo s.

La principal ventaja de DFT es que las ecuaciones son más simples de resolver que las ecuaciones de la mecánica cuántica u otras aproximaciones por lo que permiten tratar sistemas más grandes, calcular más propiedades, realizar simulaciones con pocos miles de átomos y para métodos más sofisticados, sus resultados se utilizan como punto de partida. La función de onda de un sistema de N electrones tiene $3N$ variables para cualquier sistema sin importar su tamaño con lo que se logra disminuir el costo computacional permitiendo la deducción de estructuras moleculares y el cálculo de frecuencias vibracionales, cálculo de diversas energías (ionización, afinidad electrónica, excitación), cálculo de frecuencias poblacionales, momentos dipolares, Intensidades de IR, espectroscopia RAMAN, cálculo de desplazamientos químicos en RMN, constantes de acoplamiento nucleares spin-spin y modelado de cúmulos de sistemas enlazados por puentes de hidrógeno^{56, 57}.

3.- IMPORTANCIA DEL PROBLEMA.

Existe poca información acerca de estructuras que presentan puentes disulfuros prohibidos, ya que por la elevada energía que adquieren no deberían de existir ni tampoco la posibilidad de su formación. Sin embargo, se sabe que se pueden generar como parte del ciclo redox del grupo sulfhidrilo en la cisteína parecido a la oxidación de las tiorredoxinas²⁶. Algunos medios para poder comprender la formación de disulfuros prohibidos son los descriptores moleculares empleados por Teoría de Funcionales de la Densidad³³ (DFT por sus siglas en inglés) así como el potencial redox en condiciones experimentales con los cuales sería posible explicar sus funciones, propiedades y características dentro de una estructura proteica. El potencial redox del disulfuro prohibido y la energía que este adquiere depende de la conformación de la cadena o el ciclo que se forma durante la formación del puente entre residuos Cys sean adyacentes o no adyacentes afectando condiciones intracelulares modificando la homeostasis del sistema, aunque no solo depende de la conformación sino también del pKa, pH, cambio del ligando, energía torsional y entropía¹⁷.

Comprender la formación de los puentes disulfuro vecinales al igual que sus propiedades fisicoquímicas es fundamental, debido a que al obtener más información se puede realizar modificaciones estructurales para evaluar la facilidad con que los residuos de cisteína pueden formar puentes disulfuro y elucidar de esta manera el papel que juegan en el mantenimiento de la estructura de muchas proteínas con fines biotecnológicos o farmacológicos⁸.

Una rama que ha tenido éxito trabajando con puentes disulfuro es la ingeniería de disulfuros que ha demostrado su utilidad para aplicaciones biotecnológicas como la fluorescencia, biosensores para monitorear potenciales redox en la mitocondria y células cancerígenas así como el incremento de la actividad enzimática,¹⁰ pero con resultados poco favorables por lo que con el fin de tener mejores resultados se hará uso de la química computacional empleando DFT para predecir reactividades y de esta manera tener una orientación más clara.

4.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Los aminoácidos adyacentes unidos a la cistina en forma oxidada o reducida afectaran la reactividad de los azufres presentes en la estructura?

¿Afectara el arreglo estructural de los modelos la reactividad de los grupos sulfhidrilo o del puente disulfuro, respectivamente?

5.- OBJETIVOS.

5.1.- Generales.

- ✓ Analizar y explicar la formación de puentes disulfuro vecinales empleando Teoría de Funcionales de la Densidad, por medio del funcional híbrido PBE0, así como la base 6-31++G** usando como modelo base el ciclo redox de una cistina. Además de observar el efecto de los aminoácidos vecinales.

5.2.- Específicos.

- ✓ Determinar las estructuras de energía mínima de los confórmeros estructurales propuestos para el análisis.
- ✓ Realizar una búsqueda bibliográfica acerca de estructuras con puentes disulfuro vecinales para determinar su energía.
- ✓ Determinar la energía potencial y las funciones de Fukui de cada estructura analizada.
- ✓ Determinar distancia y energía de enlace azufre-azufre de las estructuras oxidadas, así como la distancia entre azufres de las estructuras reducidas.
- ✓ Obtener la diferencia energética de los pares tioles-disulfuro.
- ✓ Obtener un diagrama de Ramachandran integrado por los modelos estudiados.

6.- SECCIÓN EXPERIMENTAL.

Los modelos de las estructuras analizadas se construyeron con el programa Avogadro 8.1⁷⁰, los cálculos computacionales se realizaron utilizando el programa NWChem⁶¹ por medio del funcional híbrido PBE0⁵⁸ y la base con funciones polarizadas y difusas denotada con 6-31++G**⁵⁶. A las geometrías obtenidas se les cálculo las frecuencias para determinar si se encontraban en un estado mínimo de energía, posteriormente fueron extraídas por medio del programa Gabedit⁶², y se construyeron las superficies de energía potencial^{63, 64} de cada modelo empleado, la información obtenida fue extraída y analizada por medio del programa Chimera-Debug Open GL⁶⁵.

Se calcularón las funciones de Fukui con los mismos parámetros que las superficies de energía potencial y posteriormente analizadas con el programa Chimera-Debug Open GL⁶⁵ manteniendo la geometría del sistema neutro para el sistema catiónico y aniónico variando la multiplicidad y la carga.

Se extrajeron dos modelos de estructuras reportadas en la base de datos Protein Data Bank^{66, 67, 68} y fueron extraídas por medio del programa Cn3D 4.3⁶⁹, posteriormente editadas por medio de Avogadro 8.1⁷⁰ para proceder con la metodología que se empleó en las estructuras propuestas.

El modelo inicial que se construyó fue cistina en forma oxidada y el segundo modelo fue la reducida a las que posteriormente se les adicionó sustituyentes (figura 17 A, B, C, D). Los grupos R con los que se realizó la sustitución fueron los aminoácidos Gly y Lys construyendo las permutaciones correspondientes.

A continuación, se muestran las denotaciones de las estructuras modelos establecidas y de igual manera, las se extrajeron de estructuras reportadas en PDB⁶⁸.

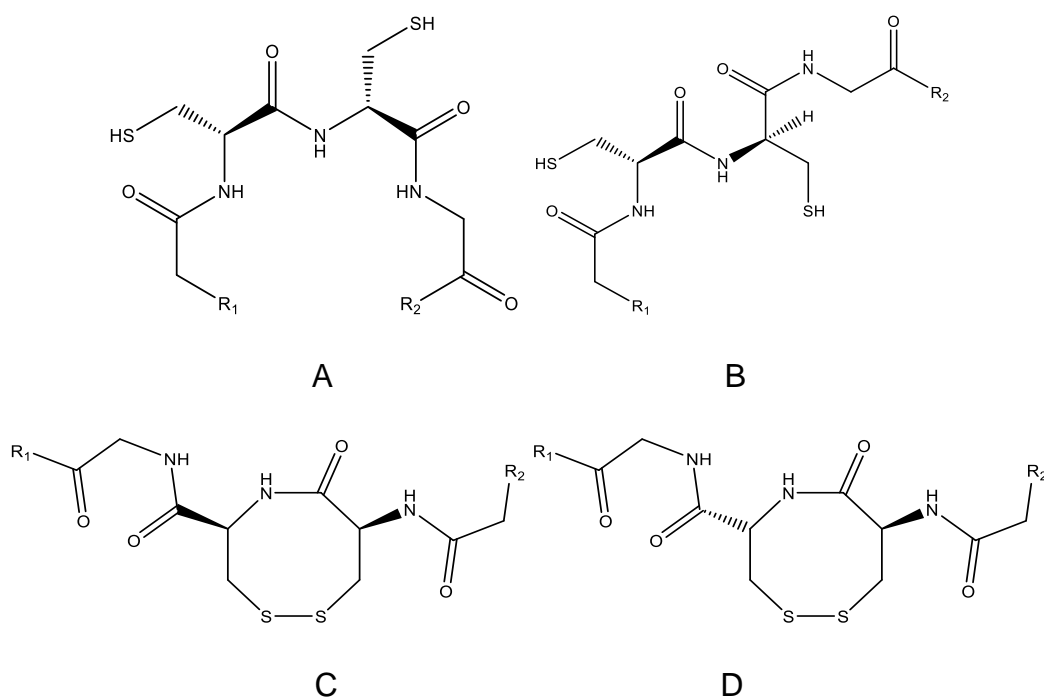


Figura 17: cistina en forma reducida en posición cis y trans (A y B) y cistina en forma oxidada cis y trans (C y D).

TABLA 5: Simbología de estructuras estudiadas.			
Estructura	Nombre	Estructura	Nombre
A	Cys-Cys reducido	Ñ	trans Lys-Cys-Cys-Lys oxidado
B	Cys-Cys reducido	O	cis Lys-Cys-Cys-Lys reducido
C	Cys-Cys oxidado	P	trans Lys-Cys-Cys-Lys reducido
D	cis Gly-Cys-Cys-Gly reducido	Q	cis Lys-Cys-Cys-Lys oxidado
E	trans Gly-Cys-Cys-Gly reducido	R	trans Lys-Cys-Cys-Lys oxidado
F	cis Gly-Cys-Cys-Gly oxidado	S	cis Gly-Cys-Cys-Gly reducido

G	trans Gly-Cys-Cys-Gly oxidado	T	trans Gly-Cys-Cys-Gly reducido
H	cis Lys-Cys-Cys-Gly reducido	U	cis Lys-Cys-Cys-Gly reducido
I	trans Lys-Cys-Cys-Gly reducido	V	trans Lys-Cys-Cys-Gly reducido
J	cis Lys-Cys-Cys-Gly oxidado	W	cis Gly-Cys-Cys-Lys reducido
K	trans Lys-Cys-Cys-Gly oxidado	X	trans Gly-Cys-Cys-Lys reducido
L	cis Gly-Cys-Cys-Lys reducido	Y	cis Lys-Cys-Cys-Lys reducido
M	trans Gly-Cys-Cys-Lys reducido	Z	trans Lys-Cys-Cys-Lys reducido
N	cis Gly-Cys-Cys-Lys oxidado		
EXTRAIDAS PDB^{66, 67}			
1DL0 oxidado	3EDH oxidado	1DL0 reducido	3EDH reducido

7.- RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.

Las estructuras modeladas que se presentan se construyeron con centros quirales de configuración absoluta $S^{1,3}$ dado que son las que se presentan principalmente en la naturaleza¹.

Los grupos R que se emplearon para construir los modelos fueron Gly y Lys debido a que la glicina es un aminoácido pequeño lo que lo vuelve importante ocasionando que la proteína puede adquirir diversas conformaciones mientras que Lys presenta propiedades como la adsorción de calcio y el tratamiento contra algunos padecimientos del organismo como el envejecimiento y el cáncer en conjunto con la cistina por lo que Lys pudiera influir sobre la actividad redox de la misma^{1,8,14,12}. Las estructuras de cada uno de los modelos empleados para el estudio se encuentran en la tabla 5 y en la sección 6.

7.1.- Diagrama de Ramachandran.

Se construyó el diagrama de Ramachandran para predecir la ubicación de los modelos propuestos (figura 19) realizando cinco grupos; el primer grupo esta comprendido por las estructuras A, B y C (color naranja), el segundo grupo esta comprendido por las estructuras extraídas de PDB (color gris), el tercero son las estructuras D a la R (color amarillo), el cuarto son las estructuras S a la Z (color azul) y el quinto son las estructuras extraídas de PDB en estado reducido (color verde).

El diagrama de Ramachandran permite analizar la calidad de los modelos evaluando los ángulos diedros ψ y ϕ de cada uno de los aminoácidos, indica si los residuos presentan ángulos diedros que sean estéricamente favorables para los diferentes elementos de la estructura secundaria (hélices α , láminas β , giros, etc.). El cuadrante superior izquierdo representa las láminas β , el cuadrante superior derecho e inferior izquierdo las hélices α que giran a la izquierda y derecha respectivamente.

La relación de los ángulos diedros ψ y ϕ muestra que las estructuras propuestas se encuentran en zonas donde no se presentaría un arreglo estructural secundario de acuerdo a lo dispuesto por Ramachandran *et. al.*¹⁵ debido a que la mayor parte de los puntos se encuentran en los cuadrantes I y IV con excepción de los que pertenecen a los

residuos Gly que se pueden presentar en el cuadrante IV¹⁵. De acuerdo al diagrama de Ramachandran de las estructuras (figura 19), algunas estructuras propuestas (figura 19) se presentarán en los *loops* dentro de la estructura proteica dado que tanto los puntos de las estructuras extraídas de PDB^{66, 67} como de las estructuras se encuentran en el cuadrante IV lo cual es congruente con lo que dispuso Thornton¹¹.

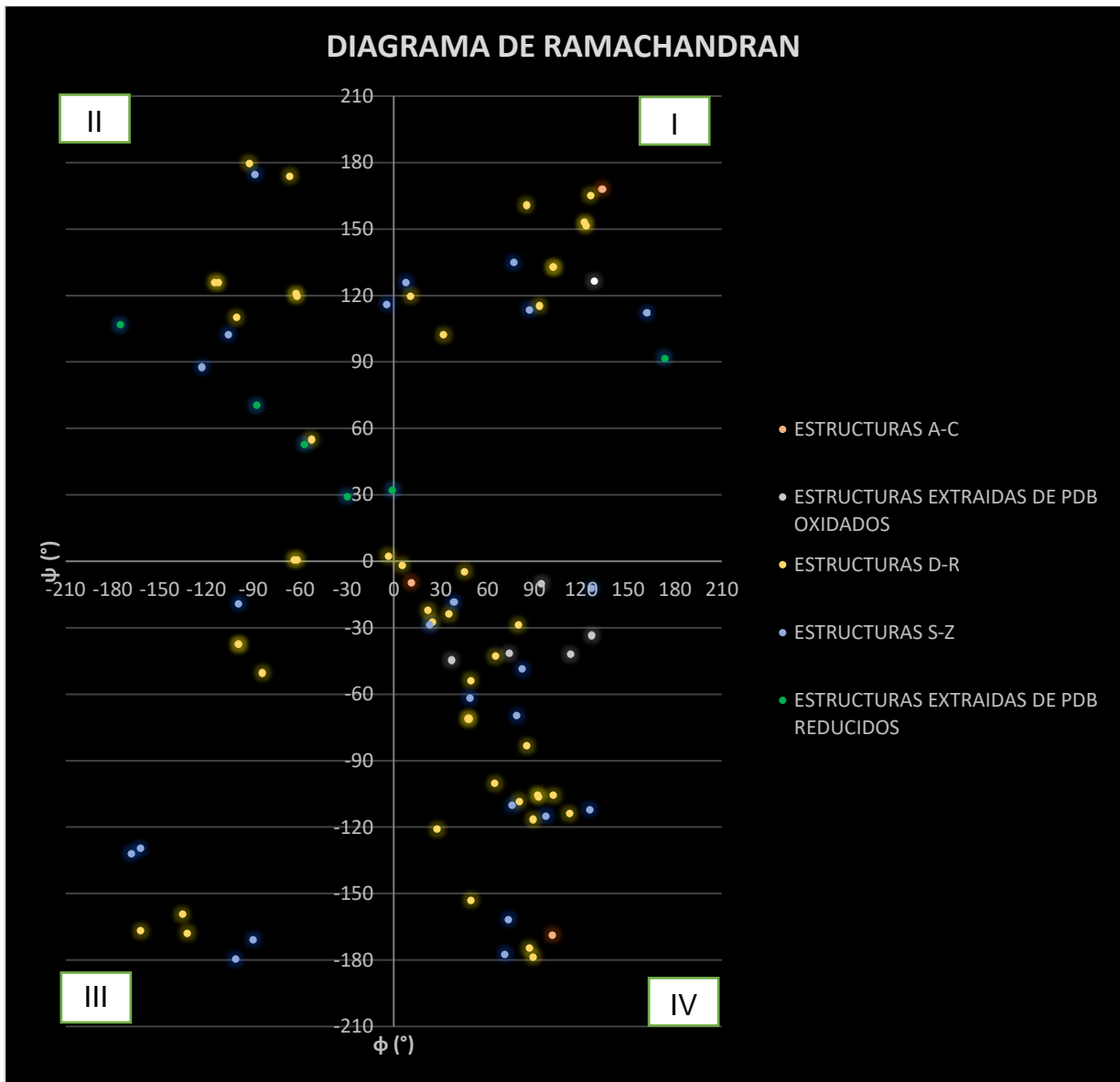


Figura 19: Gráfico de Ramachandran donde se muestra la relación de ángulos diedros ϕ vs ψ de las estructuras estudiadas (ver tabla 5 para complementar información).

Por otro lado, algunos puntos se encuentran en el cuadrante II y III donde surge la posibilidad de que las estructuras propuestas se encuentren en hojas β siendo estas las más probables seguidas de las hélices α rompiendo así las reglas dispuestas por Thornton¹¹.

7.2.- Análisis de las energías de las diferentes estructuras modeladas y reportadas.

Las energías potenciales que se calcularon para las estructuras A, B y C se muestran en la tabla 6, se observa que las estructuras A y B son más estables que la estructura C producto de efectos estructurales. Entre las estructuras A y B, la más estable es aquella donde los grupos tioles están más lejos entre sí (estructura B) debido a su estado energético más bajo contrario a lo que sucede cuando los grupos tioles están más cerca (estructura A) donde las energías de interacción de Van Der Waals, las energías de torsión, de enlace y de ángulo⁷¹ son mayores provocando que la estructura sea menos estable siendo esta la razón por la cual se originan los puentes disulfuro prohibidos^{11, 13, 27}. Un factor que influye en la estabilidad de las estructuras son las condiciones entrópicas¹ debido a que en estado oxidado, los grados de libertad son menos que en estado reducido lo que provoca que la molécula presente menos movilidad originando que se almacene una mayor cantidad de energía.

di-tiol	A	-8.58×10^5
	B	-8.58×10^5
Disulfuro	C	-8.57×10^5

En la tabla 7 se muestran las energías de las estructuras D a Z y de las estructuras que se extrajeron de la base de datos PDB donde cada una de las energías corresponden a un estado mínimo de acuerdo al cálculo de frecuencias realizado, por lo que se espera que dichas estructuras existan dependiendo de las características de una determinada estructura proteica. Con los valores energéticos de los modelos propuestos y los extraídos de la bibliografía se realizó una comparación observándose que los valores

energéticos son muy similares siendo las estructuras propuestas más estables en algunos casos con lo cual se logró realizar una discriminación entre las estructuras que se puedan presentar.

Tabla 7: Energías de las estructuras con sustituciones (Kcal/mol).		
D / E	-1.11 x 10 ⁶	-1.12 x 10 ⁶
F / G	-1.11 x 10 ⁶	-1.12 x 10 ⁶
H / I	-1.25 x 10 ⁶	-1.25 x 10 ⁶
J / K	-1.25 x 10 ⁶	-1.25 x 10 ⁶
L / M	-1.25 x 10 ⁶	-1.25 x 10 ⁶
N / Ñ	-1.25 x 10 ⁶	-1.25 x 10 ⁶
O / P	-1.38 x 10 ⁶	-1.38 x 10 ⁶
Q / R	-1.38 x 10 ⁶	-1.38 x 10 ⁶
S / T	-1.12 x 10 ⁶	-1.12 x 10 ⁶
U / V	-1.25 x 10 ⁶	-1.25 x 10 ⁶
W / X	-1.25 x 10 ⁶	-1.25 x 10 ⁶
Y / Z	-1.38 x 10 ⁶	-1.38 x 10 ⁶
ESTRUCTURAS EXTRAIDAS DE PDB^{66, 67}		
1DL0 oxidado	-1.22 x 10 ⁶	NA
3EDH oxidado	-1.19 x 10 ⁶	NA
1DL0 reducido	-1.22 x 10 ⁶	NA
3EDH reducido	-1.19 x 10 ⁶	NA

Como se mencionó en la metodología, las estructuras A a R se construyeron con una determinada conformación espacial y las estructuras S a Z se optimizaron a partir de pasar del estado oxidado al estado reducido a la cistina donde se observa que al pasar a este estado, ambas estructuras presentan una conformación cis lo cual está apoyado por estudios previos^{11, 14} que hacen referencia que para que los puentes disulfuro puedan existir, la conformación debe ser necesariamente cis siendo esta la causa por la cual

todas las estructuras en estado reducido y en posición cis presentan una mejor estabilidad que en posición trans. Además, no existe una diferencia significativa cuando los aminoácidos sustituyentes son los mismos pero al ser diferentes, se nota una preferencia hacia la posición cis. En estado oxidado existe una preferencia por la posición cis cuando los aminoácidos sustituyentes son iguales, no así cuando son diferentes dado que la posición preferente es trans debido a que de esta manera se compensa la elevada energía torsional que adquiere la estructura ya que de esta forma los grupos R presentan una menor cantidad de impedimentos estéricos lo cual ayuda a estabilizar a la estructura siendo esta la razón principal por la cual las estructuras S a Z se estabilizan en posición cis mientras que estructuras F, G, J, K, N, Ñ, Q y R se estabilizan en posición trans (ver tabla 7) siendo la excepción la estructura J y K donde J en posición cis es más estable que K en posición trans.

Los datos que se encuentran en la tabla 8 muestran que la posición cis en estado reducido es favorecida por completo, además, se puede visualizar que las estructuras A a R optimizadas no son un estado mínimo global, sino que corresponden a un mínimo local dado que al optimizar las estructuras S a Z, se obtiene otra conformación en posición cis donde la ubicación espacial de los átomos es diferente.

Un factor que influye en la estabilidad de los modelos propuestos son los sustituyentes, para visualizar este efecto se construyeron las estructuras H a Ñ con las que se puede deducir que las estructuras en estado reducido y en posición cis tienden a ser más estables cuando el aminoácido unido por parte del grupo amino terminal de la cistina presenta una cadena más larga que el aminoácido que se encuentra unido por parte del grupo carbonilo terminal de la cistina mientras que la posición trans es la menos estable.

Para el estado oxidado en posición cis hay una mayor estabilidad cuando el aminoácido unido por el grupo amino terminal de la cistina presenta una cadena más corta que el aminoácido que se encuentra unido por el grupo carbonilo terminal de la cistina mientras que en posición trans se presenta una inversión de estabilidad siendo la conformación más estable aquella donde el aminoácido unido por parte del grupo amino terminal de la cistina presenta una cadena más larga que el aminoácido que se encuentra unido por los grupos carbonilos tal como lo muestran los valores energéticos de la tabla 8.

Tabla 8: Diferencias energéticas de los conformeros (Kcal/mol).	
Estructuras	Cis-Trans
D-E	-1.09
F-G	-0.07
H-I	-0.07
J-K	-7.66
L-M	-7.83
N-Ñ	18.42
O-P	-3.82
Q-R	10.78
S-T	-8.56
U-V	1.26
W-X	-3.58
Y-Z	9.95

También se puede notar que las estructuras en conformación cis S, U, W, y Y son más estables que los modelos F, J, N y Q mientras que las estructuras en conformación trans T, V, X y Z son más estables que las estructuras G, K, Ñ y R (tabla 9).

Tabla 9: Diferencias energéticas de los conformeros (Kcal/mol).		
Estructura	Configuración	
	Cis	Trans
F-S	1.35	NA
G-T	NA	8.82
J-U	27.89	NA
K-V	NA	26.56
N-W	15.70	NA
Ñ-X	NA	11.45
Q-Y	14.93	NA
R-Z	NA	1.17

El objetivo de las diferencias energéticas de la tabla 10 es mostrar que entre el estado oxidado y el estado reducido de los modelos propuestos existe una menor barrera

energética que en los modelos extraídos de la bibliografía^{66, 67} a pesar de que presentan efectos estéricos y elevadas energías torsionales^{11, 17, 27} por lo que se aporta una evidencia más acerca de la existencia de estas estructuras dentro de estructuras proteicas.

Tabla 10: Diferencias energéticas entre estructuras cerradas/abiertas en conformación cis y trans (Kcal/mol).		
	Disulfuro-ditiol	
Estructura	Cis	Trans
F-D	759.50	NA
G-E	NA	758.48
J-H	762.43	NA
K-I	NA	770.02
N-L	784.95	NA
Ñ-M	NA	758.70
Q-O	774.98	NA
R-P	NA	760.38
F-S	758.15	NA
G-T	NA	749.66
J-U	734.55	NA
K-V	NA	743.46
N-W	769.26	NA
Ñ-X	NA	747.26
Q-Y	760.0	NA
R-Z	NA	759.22
ESTRUCTURAS EXTRAIDAS DE PDB^{66, 67}		
1DL0 ox – 1DL0 red		798.90
3EDH ox – 3EDH red		796.58

Las diferencias energéticas son similares a las que presentan las estructuras reportadas. Por otro lado, la barrera energética que se presenta entre las estructuras oxidadas y reducidas es muy pequeña lo cual es de gran apoyo para llevar a cabo el ciclo redox. Las diferencias energéticas entre las estructuras F-D, G-E, J-H y K-I permiten construir una noción más sólida acerca de que existe influencia de los grupos R para que exista una transición más favorable del estado oxidado al reducido o viceversa dado que cuando el grupo R de cadena más larga se encuentra unido por el grupo carbonilo, la diferencia

energética entre el estado oxidado y reducido es menor mientras que cuando se encuentra ese mismo grupo unido por el grupo amino, la transición de estado es menos favorable debido a que la barrera energética es más amplia²⁷.

En la tabla 11, se muestran las diferencias energéticas de las estructuras propuestas en estado oxidado así como de las estructuras que se extrajeron de PDB^{66, 67} tomando como punto de referencia el enlace azufre-azufre donde se consideró como energía inicial a la que se determinó del sistema optimizado y la energía final aquella que se calculó en estado reducido donde se observa que las diferencias energéticas de los modelos propuestos se encuentran dentro del intervalo de las diferencias energéticas de los modelos de las estructuras reportadas con excepción de la estructura R lo cual es consecuencia del arreglo estructural que presenta.

Tabla 11: Energías de enlace S-S (Kcal/mol).	
Estructuras	ΔE
C	25.91
F	25.71
G	25.88
J	25.60
K	24.95
N	26.41
Ñ	24.46
Q	27.13
R	-166.40
ESTRUCTURAS EXTRAIDAS DE PDB^{66, 67}	
1DL0	27.75
3EDH	24.78

7.3.- Análisis estructural de los modelos

Las distancias de los enlaces peptídicos se encuentran dentro del intervalo descrito en la bibliografía para los aminoácidos, el cual puede variar de 1.3 a 1.4 Å¹ (tabla 12). En estado oxidado para las estructuras analizadas, la longitud de enlace peptídico es mayor que cuando se encuentran en estado reducido debido a efectos estéricos y a la elevada energía torsional que adquieren los enlaces por lo que para compensar esto, el solapamiento de los átomos disminuye provocando que la longitud de enlace entre los átomos que están involucrados dentro del ciclo se incremente algunas décimas de Å en comparación con el estado reducido⁷².

Una característica fundamental que se ha observado para la transición del estado oxidado al estado reducido sea posible es que en estado reducido la longitud entre los átomos de azufre sea de 4.8 Å¹¹ como distancia máxima por lo que solo algunas estructuras optimizadas cumplen con esta característica (tabla 12).

En el caso de las estructuras oxidadas, las longitudes de enlace azufre-azufre se encuentran en un intervalo entre 2.06 y 2.07 Å (tabla 12) las cuales están acorde a lo que se encuentra establecido en la bibliografía^{11,17}, sin embargo, difieren ligeramente de las longitudes que presentan las estructuras extraídas de la bibliografía donde la longitud de enlace azufre-azufre es de alrededor de 2.02 Å lo que indica que las estructuras propuestas son más reactivas debido a que el solapamiento entre los átomos de azufre es menor por lo que al estar en contacto con agentes reductores, la reducción sería inevitable dependiendo de la ubicación del puente disulfuro⁵¹, del pKa de la proteína⁷², del potencial redox del ambiente celular y de aspectos conformacionales de la proteína^{10, 14, 17, 22, 23, 26}.

Tabla 12: Características estructurales.				
Estructuras	Distancia SS	Distancias de enlaces peptídicos (Å)		
		Primer enlace	Segundo enlace	Tercer enlace
A	8.583	1.350	NA	NA
B	4.189	1.372	NA	NA

C	2.066	1.381	NA	NA
D	8.625	1.348	1.357	1.348
E	9.082	1.360	1.351	1.348
F	2.063	1.357	1.374	1.367
G	2.065	1.354	1.366	1.376
S	6.180	1.339	1.368	1.366
T	4.203	1.354	1.360	1.379
H	7.677	1.355	1.344	1.452
I	9.251	1.356	1.348	1.348
J	2.061	1.372	1.358	1.355
K	2.062	1.452	1.361	1.351
U	5.778	1.371	1.360	1.356
V	3.854	1.352	1.370	1.367
L	9.236	1.353	1.353	1.345
M	9.271	1.344	1.348	1.357
N	2.051	1.374	1.402	1.366
Ñ	2.068	1.356	1.351	1.361
W	6.212	1.369	1.357	1.338
X	4.682	1.365	1.353	1.371
O	9.160	1.343	1.351	1.368
P	9.064	1.338	1.345	1.363
Q	2.052	1.363	1.396	1.372
R	2.074	1.359	1.366	1.340
Y	6.297	1.340	1.359	1.389
Z	9.064	1.462	1.356	1.361
ESTRUCTURAS EXTRAIDAS DE PDB^{66, 67}				
1DL0 oxidado	2.020	1.311	1.305	1.322
3EDH oxidado	2.023	1.327	1336	1.321
1DL0 reducido	4.166	1.367	1.350	1.364
3EDH reducido	4.120	1.349	1.353	1.351

Tabla 13: Características estructurales.					
Estructuras	DISTANCIAS S-H Y S-C (Å)				Puentes H₂
	S-H¹	S-C	S-C	S-H²	
A	1.343	1.814	1.818	1.345	NA
B	1.346	1.819	1.823	1.345	NA
C	NA	1.833	1.834	NA	NA
D	1.345	1.818	1.819	1.346	NA
E	1.345	1.818	1.818	1.346	NA
F	NA	1.819	1.818	NA	NA
G	NA	1.826	1.828	NA	NA
S	1.345	1.821	1.822	1.345	1.729
T	1.347	1.817	1.829	1.344	NA
H	1.354	1.820	1.819	1.346	1.677; 1.989
I	1.346	1.817	1.820	1.350	1.981
J	NA	1.823	1.827	NA	1.764
K	NA	1.818	1.822	NA	1.891
U	1.348	1.821	1.821	1.349	NA
V	1.346	1.817	1.838	1.349	1.890
L	1.346	1.818	1.819	1.346	1.641
M	1.346	1.817	1.818	1.346	1.991
N	NA	1.837	1.816	NA	NA
Ñ	NA	1.818	1.822	NA	1.744; 1.927
W	1.347	1.817	1.825	1.364	1.702
X	1.345	1.817	1.823	1.352	1.986
O	1.354	1.821	1.828	1.343	1.657
P	1.346	1.817	1.817	1.346	1.998; 1.668
Q	NA	1.837	1.816	NA	NA
R	NA	1.839	1.847	NA	1.684
Y	1.347	1.815	1.823	1.364	NA
Z	1.346	1.818	1.821	1.346	1.998; 1.668

ESTRUCTURAS EXTRAIDAS DE PDB ^{66, 67}					
1DL0 oxidado	NA	1.811	1.813	NA	NA
3EDH oxidado	NA	1.791	1.789	NA	NA
1DL0 reducido	1.348	1.822	1.826	1.352	NA
3EDH reducido	1.346	1.814	1.816	1.345	NA
<p>S-H¹: se encuentra ubicado cerca del enlace peptídico originado a partir del grupo amino terminal de la cistina (fig. 20 a y b).</p> <p>S-H²: se encuentra ubicado cerca del enlace peptídico originado a partir del grupo carbonilo terminal de la cistina (fig. 20 a y b).</p>					

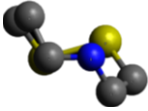
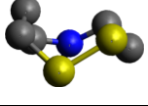
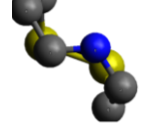
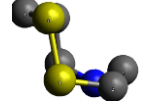
Para poder lograr la estabilidad, dentro de algunas estructuras se presentarán puentes de hidrógeno existiendo 1 ó 2 interacciones (tabla 13) lo cual depende del arreglo estructural que presentan^{3, 9} ya sea en posición cis o trans. De acuerdo a lo que se tiene establecido en la bibliografía^{3, 9}, los puentes de hidrógeno presentan una interacción estándar, es decir, tienen la suficiente fuerza para dar estabilidad a la molécula (tabla 14)^{3, 9}.

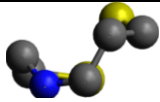
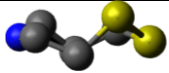
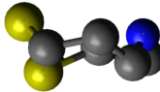
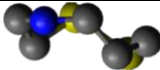
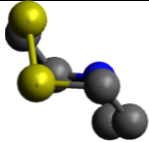
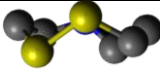
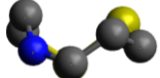
Átomos	Distancia (Å)
F-H.....F	2.4
O-N.....H	2.8
O-H.....O	2.7
N-H.....N	3.1
N-H.....S	2.9
Fuerte	1.2-1.5
Estándar	1.5-2.2
Débil	2.2-3.2

La poca estabilidad que presentan las estructuras en estado oxidado se debe a impedimentos estéricos y a elevadas energías torsionales que presentan observándose distintos tipos de interacciones o arreglos aumentar la estabilidad de las estructuras formando anillos de ocho miembros y/o formas similares a los que presentan los isómeros de un ciclooctano, entre los cuales pueden ser Boat-chair (BC), Corona (Crown) que se

encuentra en equilibrio con Twist-Chair-Chair (TCC), Boat- Boat (BB), Twist- Boat-Chair (TBC), Twist- Boat (TB), Boat (B), Chair-Chair (CC), Twist-Chair (TC) y Chair (C) siendo los más estables BC, Crown y BB en donde las tensiones de ángulo, de ángulo diedro así como las que se producen de interacciones de VDW son menores, sin embargo esto no es absoluto dado que dependerá del entorno en el que se encuentren debido a que los cambios de temperatura o presión afectan a las conformaciones^{71, 73}.

Las estructuras F, J y K en el actual estudio presentan la conformación BC, por otro lado, las estructuras N, Ñ y Q adquirieron la conformación TCC mientras que las estructuras D y R adquirieron la conformación C siendo estas ultimas las estructuras menos estables acorde a lo que se ha mencionado anteriormente; también existe efecto del sustituyente dado que cuando el sustituyente con cadena más larga se encuentra unido por medio del carbonilo terminal de la cistina, la estructura adquiere una conformación de BC mientras que cuando el sustituyente con cadena más larga se encuentra unido por medio del grupo amino terminal de la cistina, la conformación que adopta es TCC (fig. 17 a y b). Las estructuras con conformación BC y TCC tienen un arreglo similar al que presentan las estructuras reportados por lo que se llega a la suposición que estos son los que se presentarían con mayor probabilidad dentro del organismo.

Estructuras	Conformación	Ubicación espacial
C	Chair	
F	Boat Chair	
G	Chair	
J	Boat-Chair	

K	Boat-Chair	
N	Twist-Chair-Chair	
N̄	Twist-Chair-Chair	
Q	Twist-Chair-Chair	
R	Chair	
ESTRUCTURAS EXTRAIDAS DE PDB^{66, 67}		
1DL0	Twist-Chair-Chair	
3EDH	Boat Chair	

7.4.- Análisis de las superficies de energías potenciales (PES).

Las superficies de energías potenciales (PES's) indican la distribución de la carga como consecuencia de la distribución de la densidad electrónica por lo que son de gran ayuda para predecir el comportamiento químico de las moléculas, razón por la que para cada una de las estructuras se realizó este estudio teniendo como objetivo ver si la conformación y los sustituyentes influían en la reactividad de los grupos sulfhidrilo y tiol de las estructuras presentadas. Las estructuras F, G, J, K, N, Ñ, Q y R se obtuvieron rompiendo el puente disulfuro de los modelos oxidados por lo que ambos adquirieron la conformación cis. El análisis cualitativo en las estructuras estudiadas va desde el color rojo intenso que indica un potencial negativo hasta el color azul intenso que indica un potencial positivo.

Las PES de las estructuras A y B (figura 20) muestran que la conformación de las estructuras afecta de manera importante el potencial electrostático de los grupos tiol debido a que entre más lejos estén estos grupos entre sí (estructura A), el grupo que se encuentra cercano al grupo carbonilo terminal tendrá una potencial negativo mientras que el que se encuentra cerca del grupo amino terminal tendrá un potencial positivo lo cual podría dar lugar a la formación del puente disulfuro. Por otro lado, entre más cerca se encuentren los grupos tiol (estructura B), presentará un potencial más negativo el grupo sulfhidrilo cercano al grupo carbonilo terminal. En estado oxidado (estructura C) se presenta un potencial negativo en la zona del ciclo donde los dos azufres presentan un potencial similar neutro. En las estructuras A, B y C se observa que la zona donde se encuentran los grupos amino terminales hay un potencial positivo mientras que la zona donde se encuentra los grupos carbonilos terminales existe un potencial negativo sugiriendo que en esta zona de la molécula se llevaría a cabo el primer paso para la formación del puente disulfuro^{12, 19}.

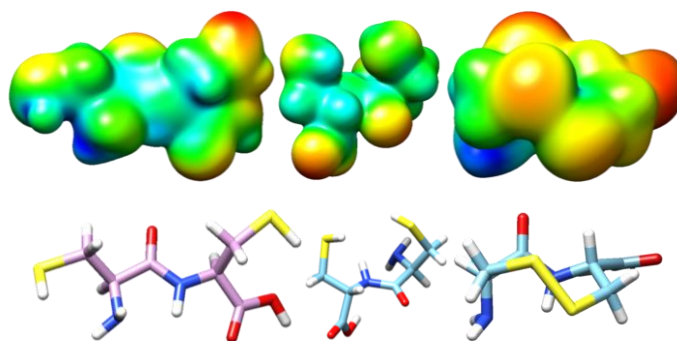


Figura 20: modelos A, B y C.

Las PES de las estructuras extraídas de PDB^{66, 67} en estado oxidado (figura 21) muestran que el potencial negativo se encuentra ubicado sobre el ciclo mientras que el potencial positivo está ubicado en los grupos carbonilos y aminos, sin embargo, pareciera ser que sobre los azufres no existe una influencia importante por parte de los sustituyentes o del ciclo para que puedan llevar a cabo su reducción. El estudio de las PES en estado reducido (figura 21) de las estructuras extraídas de PDB^{66, 67} muestra que los grupos tioles no son influenciados significativamente por el arreglo estructural o por los sustituyentes. En estado oxidado, los grupos R se encuentran mejor estabilizados en posición trans mientras que en estado reducido los grupos R se encuentran mejor estabilizados en posición cis lo cual esta acorde a las energías de estabilización y a las PES's que se obtuvieron anteriormente.

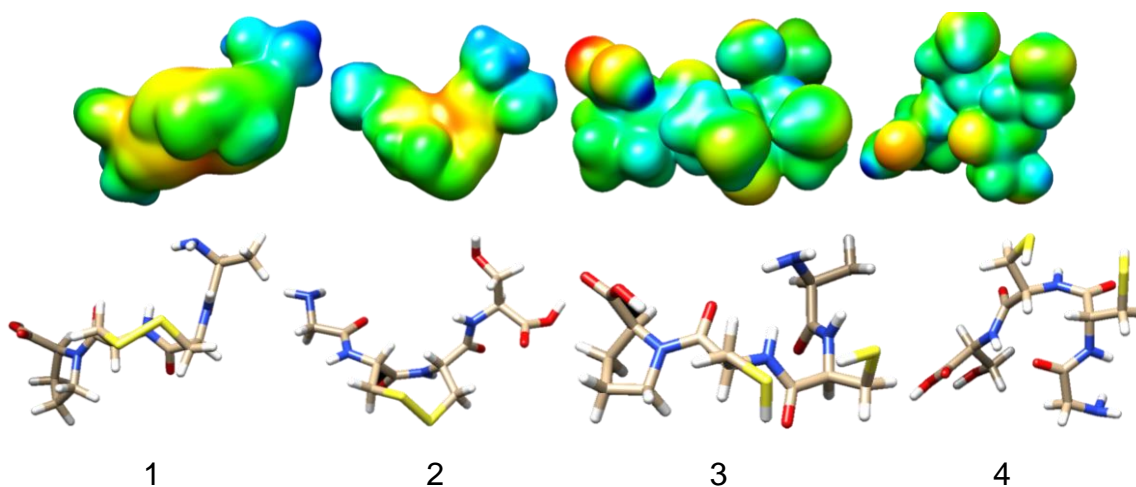


Figura 21: estructura 1DL0 oxidada y reducida (1 y 3 respectivamente) y estructura 3EDH oxidada y reducida (2 y 4 respectivamente).

En la figura 22 se muestran las PES de las estructuras D y E donde se observa que existe un potencial positivo cerca del grupo carbonilo terminal mientras que en la zona del grupo amino terminal presenta un potencial negativo lo que influye de manera significativa en los grupos tioles debido a que en la estructura D, el grupo tiol que se encuentra cercano al grupo amino terminal presenta un potencial negativo mientras que el tiol de lado contrario presenta un potencial positivo lo cual difiere de la estructura E donde ambos grupos tioles presentan un potencial similar siendo ligeramente más negativo aquel que se encuentra cerca del grupo amino terminal.

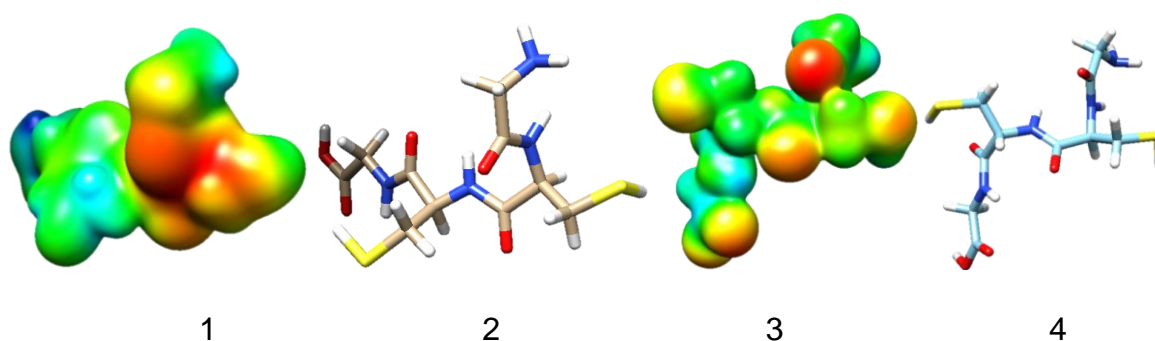


Figura 22: modelo D (1 y 2); modelo E (3 y 4).

En la figura 23 se muestran las PES de las estructuras F, G, S y T donde se puede visualizar que en las estructuras G y T existe un potencial positivo ubicado sobre el grupo carbonilo terminal mientras que en donde se encuentra el grupo amino terminal presenta un potencial negativo lo cual influye de forma importante en el puente disulfuro, sobre todo cuando los grupos R se encuentran en la estructura G donde se observa que ambos azufres presentan un potencial positivo mientras que en la estructura T ambos presentan un potencial neutro.

En estado reducido, las estructuras S y T presentan el mismo patrón que en estado oxidado, es decir, existe un potencial positivo donde se encuentra el grupo carbonilo terminal mientras que en la zona del grupo amino terminal presenta un potencial negativo aunque a diferencia de las estructuras F y G; en el modelo S se presentan varias zonas con un potencial positivo mientras que en la estructura T sucede el caso contrario lo cual

influye en el potencial de los grupos sulfhidrilo debido a que el grupo tiol cercano al grupo amino terminal presenta un potencial más negativo que el otro grupo sulfhidrilo unido al grupo carbonilo terminal.

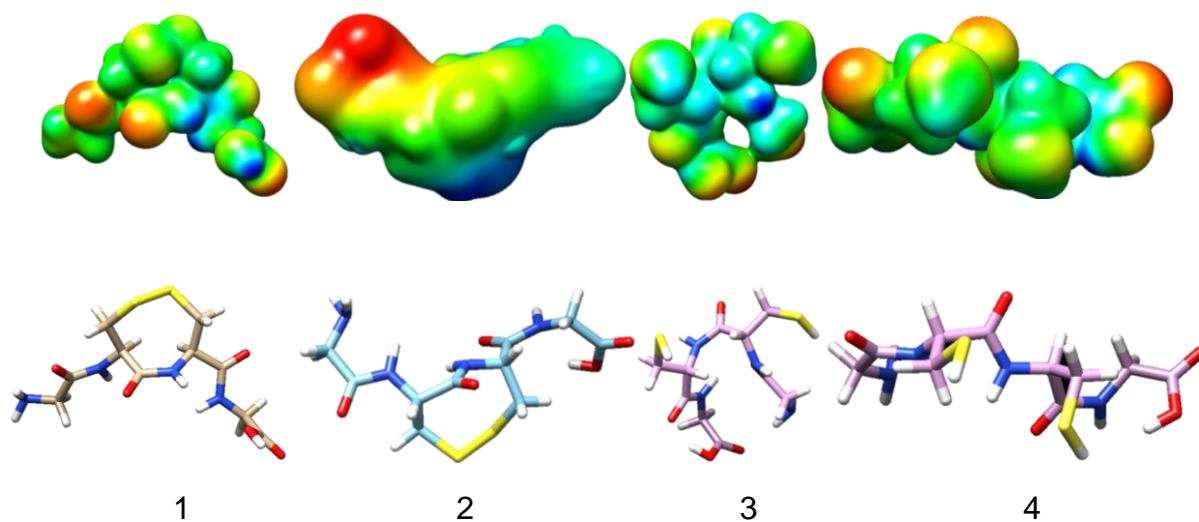


Figura 23: modelos F (1), G (2), S (1) y T (4).

Comparando las estructuras D y S, se observa que la distribución de las PES es más uniforme en la estructura S dado que no existen zonas con potenciales altamente positivos o negativos como sucede en la estructura D donde el potencial negativo se desplaza hacia el grupo amino terminal, sin embargo, este último es más estable debido a que su energía de estabilización es menor (tabla 7) dado que las energías de interacción de VDW así como las de torsión (ángulos θ y ángulos diedros) y las energías de enlace se minimizan de una mejor manera mientras que en el modelo D no lo hacen de manera efectiva por lo que como resultado de eso, las energías potenciales de los grupos sulfhidrilo se incrementan.

En las PES de las estructuras H e I (figura 24) se puede notar que la influencia del sustituyente está en función del potencial que presentan las estructuras debido a que en la estructura I existe un potencial positivo sobre Lys y un potencial negativo sobre Gly mientras que en la estructura H sucede lo contrario, es decir, el potencial positivo se encuentra en la zona de Gly lo cual influye de manera importante en las PES's de los grupos sulfhidrilos ya que son más reactivos los de la estructura I que los de la estructura

H lo cual es congruente con las energías de estabilización (tabla 7); se puede observar que en la estructura I, el grupo tiol más reactivo es el que se encuentra cercano a Gly mientras que en la estructura H, el más reactivo es aquel que se encuentra cercano a la Lys.

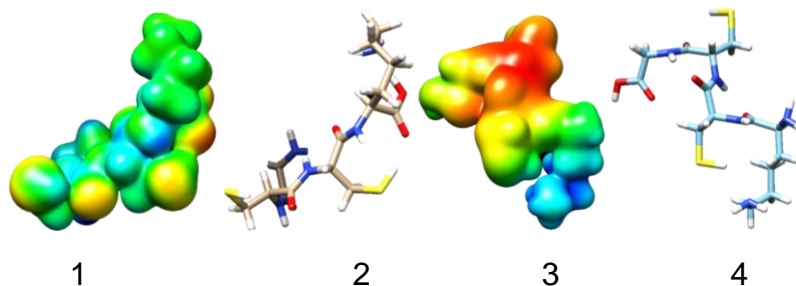


Figura 24: modelo H (1 y 2); modelo I (3 y 4).

Las PES de las estructuras J y K (figura 25) muestran que en estado oxidado, la estructura J presenta potenciales negativos y positivos más notorios que en la estructura K debido a que Gly presenta un potencial positivo más marcado que Lys mientras que en la estructura K no se observan cambios importantes en las PES, sin embargo, el arreglo conformacional influye en las PES's del puente disulfuro debido a que en la estructura K existe un potencial más negativo sobre estos átomos que el potencial que se observa sobre los mismos átomos de la estructura J lo cual está relacionado con la reactividad y por consiguiente con su energía de estabilización donde se observa que la estructura K presenta una mayor energía que el modelo J.

En estado reducido, la PES de la estructura U es más positiva que en la estructura V; en la estructura U se observa que existe un potencial positivo en Gly y en la estructura V se observa que el potencial positivo está sobre Lys por lo que el arreglo estructural es un factor que influye en las PES's. En la estructura V, los grupos sulfhidrilos presentan una PES's neutra debido a que esta estructura se encuentra más empaquetada logrando así una mejor estabilización mientras que los grupos tioles de la estructura U presentan un potencial más negativo debido a que la estructura U no se logra estabilizar con puentes

de hidrógeno lo que afecta a la energía de estabilización por lo cual es menos estable que la estructura V (tabla 7).

Comparando las estructuras H y U, se observa que la distribución de las PES's es más uniforme en la estructura U mientras que la estructura H presenta PES's con zonas donde los potenciales positivos y negativos están muy marcados lo cual provoca que la estructura U sea más estable (tabla 7), la razón por la cual existe tal diferencia se debe a que la estructura U presenta un arreglo estructural más empaquetado lo que provoca que la interacción entre los átomos sea lo que favorece a una mejor distribución de la energía potencial afectando a su energía de estabilización mientras que en el modelo H no sucede esto lo que provoca que haya una menor estabilización dado que no se presentan interacciones para incrementar la energía potencial de los grupos tioles volviéndolos más reactivos.

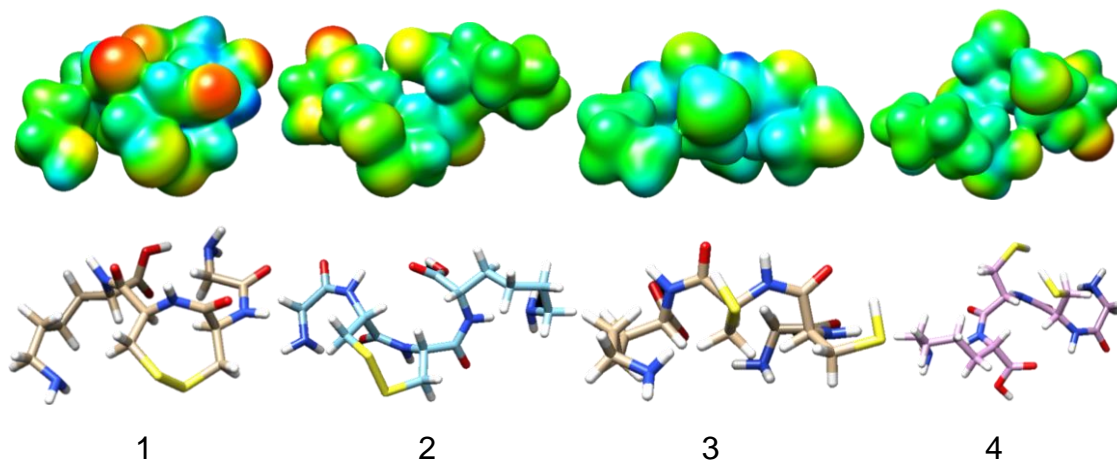


Figura 25: modelo J (1), K (2), U (3) y V (4).

Las PES's de las estructuras L y M muestran que el arreglo estructural influye considerablemente en sus potenciales químicos dado que en la estructura L se observa que en la zona donde se encuentra la cistina existe un potencial negativo mientras que en la zona donde están se encuentran los grupos carbonilos y aminos terminales, el potencial es positivo lo cual es similar al comportamiento que presentan las estructuras reportadas en estado oxidado, sin embargo, la estructura M tiene una mejor distribución

de las PES's siendo positiva la zona donde se encuentra Gly lo cual influye de manera importante en el potencial de los grupos sulfhidriilo ocasionando que los que están en la estructura L sean más reactivos que los de la estructura M. En la estructura L, el grupo tiol que se encuentra cercano a Lys es más reactivo que el que se encuentra del lado de Gly lo cual sucede también para la estructura M en menor grado (figura 26).

Al comparar las estructuras L y M con las estructuras H e I, se puede notar que la distribución de las PES's cambia con respecto a la configuración y a la ubicación de los sustituyentes ya que la estructura I presenta un mayor desplazamiento de las energías potenciales lo cual es contrario a lo que pasa en la estructura M mientras que en las estructuras L y H se observa una mayor diferencia en los potenciales, lo anterior se debe a efectos producidos por la ubicación espacial de los sustituyentes así como por el arreglo estructural lo cual influye en la estabilidad de la molécula ya que se observa que al estar empaquetada la estructura, esta se puede estabilizar mejor (tabla 7) teniendo como consecuencia el incremento de la energía potencial de la molécula.

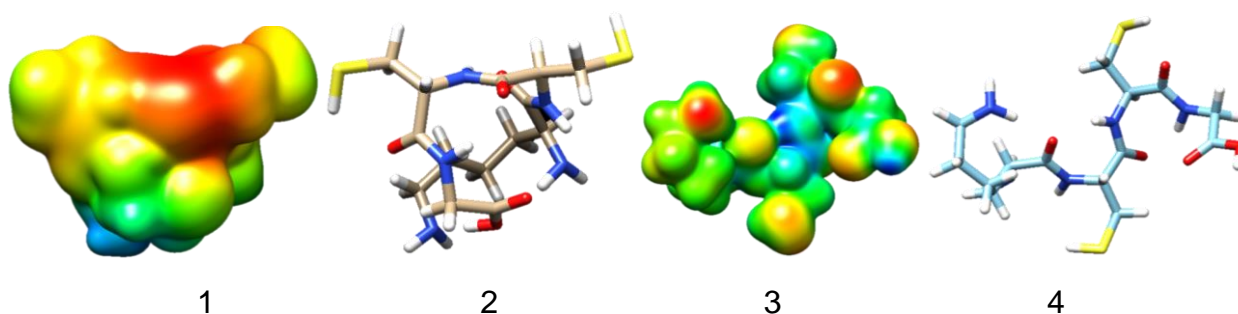


Figura 26: modelo L (1 y 2) y modelo M (1 y 2).

En la figura 27 se observan las estructuras N, Ñ, W y X donde las estructuras N y Ñ muestran que la ubicación de los sustituyentes respecto al ciclo afectan de manera importante las PES's de las estructuras ya que en la estructura N, la estructura presenta una superficie potencial neutra mientras que en la estructura Ñ presenta una superficie potencial positiva lo cual se debe al arreglo estructural ya que la estructura N, está más compactada compensando deficiencias de energía potencial mientras que en la estructura Ñ no sucede esto debido a la lejanía de los átomos lo cual afecta la estabilidad ocasionando que en la estructura N sea más estable que la estructura Ñ de acuerdo a

los valores energéticos de la tabla 7 y que influyen de manera importante en las PES's alrededor del puente disulfuro.

En la estructura Ñ, el puente disulfuro presenta una PES más positiva que en la estructura N lo que afecta a la reactividad frente algún agente oxidante o reductor. En estado reducido, tanto la estructura W como X presentan un potencial similar, pero al visualizar el entorno de los grupos sulfhidrilos se puede observar que los grupos tioles de la estructura W presentan un potencial más positivo que la estructura X debido a que el potencial positivo de los tioles se ve compensado por átomos vecinos lo cual no sucede con la estructura W lo cual influye de manera directa en la reactividad hacia la formación del puente disulfuro.

Comparando las estructuras L y M con las estructuras W y X, se observa que en estos últimos la distribución de las PES's es más positiva por lo que son menos estables que las estructuras L y M (ver tabla 6), la razón por la cual existe tal diferencia se debe a que las estructuras L y M presentan un arreglo estructural más empaquetado lo que provoca que exista una mejor distribución de la energía potencial mientras que en las estructuras W y X no sucede esto lo cual afecta la energía potencial de los grupos tioles ya que en las estructuras L y M, los grupos tioles presentan una superficie negativa mientras que en las estructuras W y X presentan una superficie positiva lo cual influye de manera importante al momento de llevar a cabo la formación del puente disulfuro.

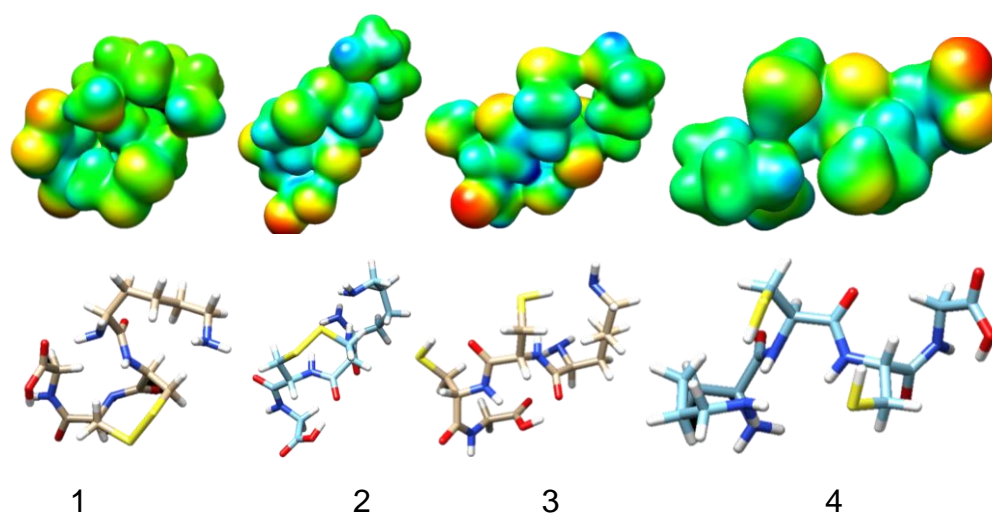


Figura 27: modelo N (1), Ñ (2), W (3) y X (4).

La figura 28 muestra la estructura P donde densidad electrónica se encuentra concentrada alrededor de la cistina notándose más sobre el enlace peptídico que se origina entre las cisteínas mientras que la deficiencia de densidad se produce sobre las cadenas de Lys siendo más deficiente aquella Lys que no presenta el grupo carbonilo libre debido a la forma en la que se encuentra unida la otra Lys dado que esta presenta dos átomos de nitrógeno por uno de oxígeno mientras que la Lys mas neutra presenta tres átomos de oxígeno por uno de nitrógeno lo que provoca que en la primera Lys la densidad se encuentra desplazada hacia el centro de la estructura por efectos de electronegatividad así como por el arreglo estructural.

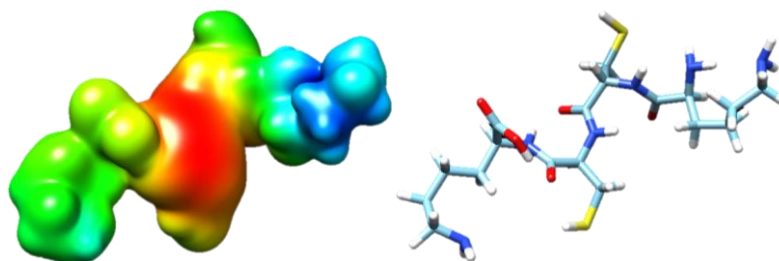


Figura 28: modelo P.

En la figura 29 se muestran los PES's de las estructuras Q, R, Y y Z; en las estructuras Q y R se observa que la densidad electrónica esta desplazada sobre los ciclos quedando deficiente de esta las cadenas de Lys presentando un mayor efecto la estructura Q dado que la densidad electrónica está más concentrada en torno al ciclo lo cual influye de manera importante la reactividad de los azufres ya que los azufres que están en la estructura Q presentan una mejor disposición de densidad electrónica que los azufres que se encuentran en la estructura en R lo cual está relacionado con el estado energético de cada una de las estructuras (tabla 7) ya que es más estable la estructura Q. El desplazamiento de las densidades hacia los ciclos se debe a efectos conformacionales y a que dentro del anillo existen átomos electronegativos provocando a su vez una desprotección de los grupos R tal como sucede con las estructuras extraídos de PDB (figura 21) por lo que se puede considerar que de acuerdo a las PES's, estas las

estructuras presentarían un comportamiento similar al que presentan las estructuras reportados dentro de una determinada estructura proteica.

En estado reducido, la PES en las estructuras Y y Z son similares presentando algunas zonas más positivas que otras, en ambas se observa que existe un potencial positivo más notorio alrededor de cistina provocado por efectos estructurales para poder estabilizarse de mejor forma lo cual provocó que las PES's de los grupos sulfhidriilo sean más positivas que en estado oxidado siendo más neutra la PES de la estructura Y debido a que de esta manera la estructura presenta un mayor número de interacciones logrando una mejor estabilización que la estructura Z, tal como muestran los valores energéticos de la tabla 7 lo que trae como consecuencia que esta última sea más reactiva frente agente oxidantes.

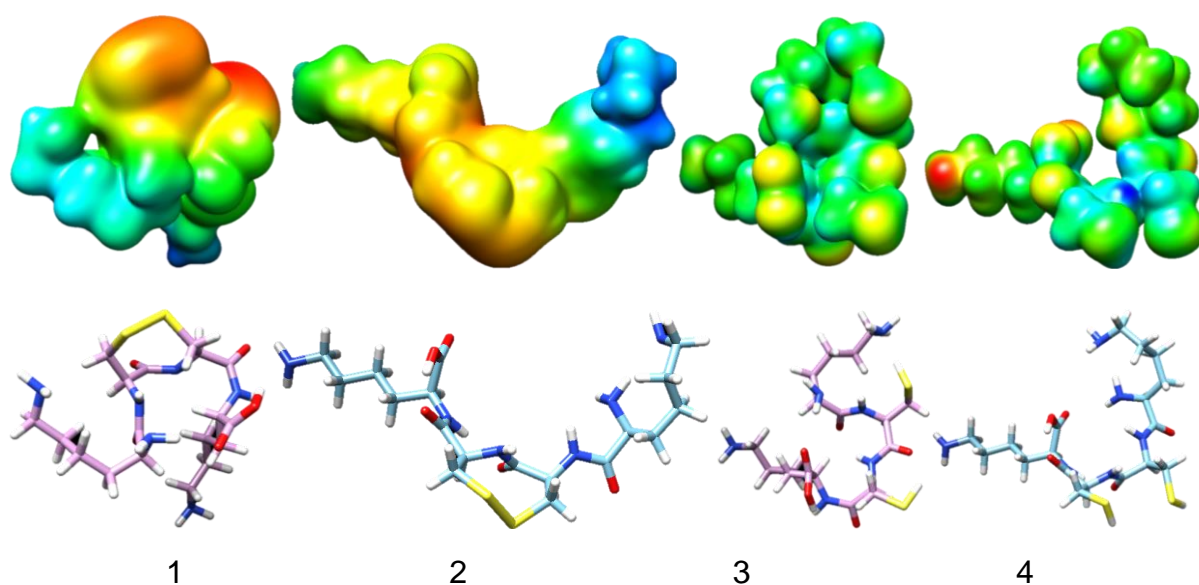


Figura 29: modelo Q (1), R (2), Y (3) y Z (4).

7.5.- Análisis de los índices de Fukui de los modelos estudiados.

El análisis de las funciones de Fukui ayuda a visualizar la reactividad de una molécula frente a nucleófilos o electrófilos en función de la densidad ya sea agregando o eliminando un electrón. De las estructuras propuestas se determinaron los índices de Fukui teniendo como objetivo principal visualizar como la reactividad de los grupos tioles o disulfuro en las estructuras propuestas cambiaba de acuerdo al arreglo estructural. Para facilitar la interpretación de la reactividad de los modelos se hizo uso de los índices de Fukui duales que son la resta del índice positivo y negativo donde las zonas rojas intensas son aquellas donde existe una mayor probabilidad de que se produzca un ataque nucleófilico, es decir, que la molécula ceda un electrón mientras que en las zonas azules intensas es la probabilidad de que se produzca un ataque electrófilico, es decir, que la molécula acepte un electrón.

En la figura 30 se muestran los índices de Fukui de las estructuras A, B y C donde se observa que el arreglo estructural influye en la facilidad de aceptar o ceder un electrón por parte de la molécula. En las estructuras A y B se observa que los átomos de azufre pueden ceder o aceptar electrones debido a efectos de la geometría del azufre la cual es tetraédrica presentando 2 enlaces formales y dos pares de electrones libres⁷² para actuar como nucleófilo y que debido a su geometría también existe un “espacio” que le permite actuar como electrófilo dado que además presenta los orbitales “3p vacíos” por lo cual puede aceptar electrones.

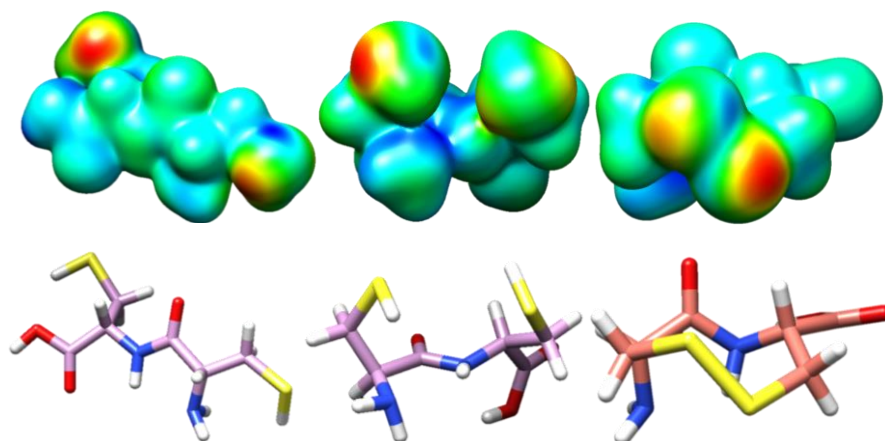


Figura 30: modelos A, B y C.

Los índices de Fukui de la estructura B muestran que el que presenta un comportamiento como nucleófilo es el azufre que se encuentra cerca del grupo carbonilo terminal mientras que el otro azufre presenta un comportamiento como electrófilo producido por efectos conformacionales, así como aspectos elementales del azufre⁷².

Los índices de los fukui de las estructuras extraídas de PDB^{66, 67}(figura 31) en estado oxidado muestran que el azufre cercano a Gly en el puente disulfuro de la estructura 1DL0 es menos estable mientras que el otro azufre es más estable debido a efectos producidos por Pro dado que esta desplaza un poco la disponibilidad electrónica que presenta el azufre disminuyendo su reactividad. Por otro lado, los azufres que conforman el modelo 3EDH son más estables siendo el nitrógeno del grupo amino terminal el átomo nucleófilico y el hidrógeno del grupo carbonilo el átomo electrófilo. En estado reducido, en la estructura 1DL0 se observa que ambos azufres son susceptibles a sufrir un ataque nucleófilico siendo más reactivo el tiol cercano a Pro mientras que en la estructura 3EDH ambos azufres presentan características nucleófilicas siendo más notorias sobre el grupo tiol que se encuentra cercano a Gly.

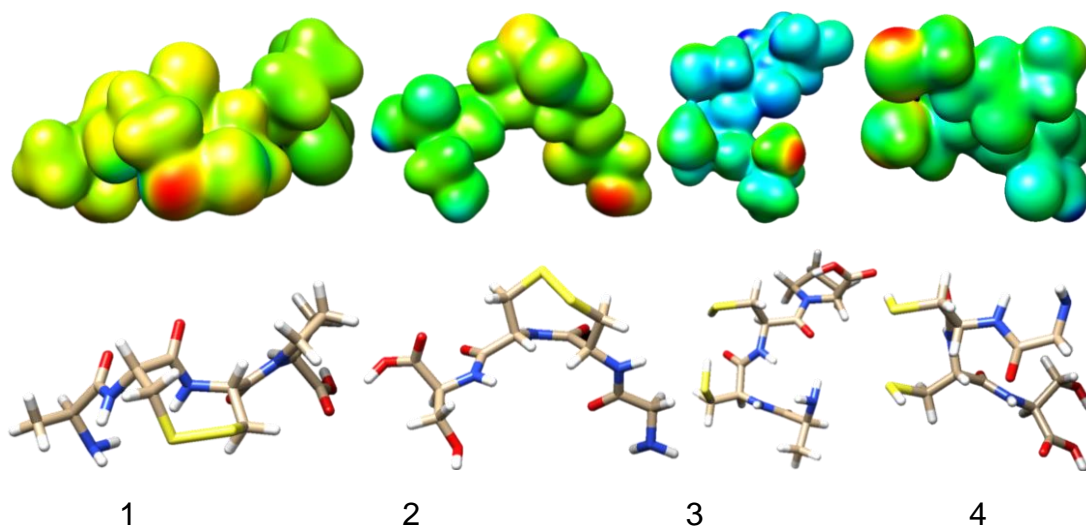


Figura 31: estructura 1DL0 oxidada y reducida (1 y 3 respectivamente) y estructura 3EDH oxidada y reducida (2 y 4 respectivamente).

En la figura 32 se visualizan los índices de Fukui para las estructuras D y E donde se observa que no existe gran diferencia sobre el comportamiento nucleófilico que presentan los grupos tioles si se encuentran en posición cis o trans ya que las zonas rojas de las superficies sobre los azufres son similares.

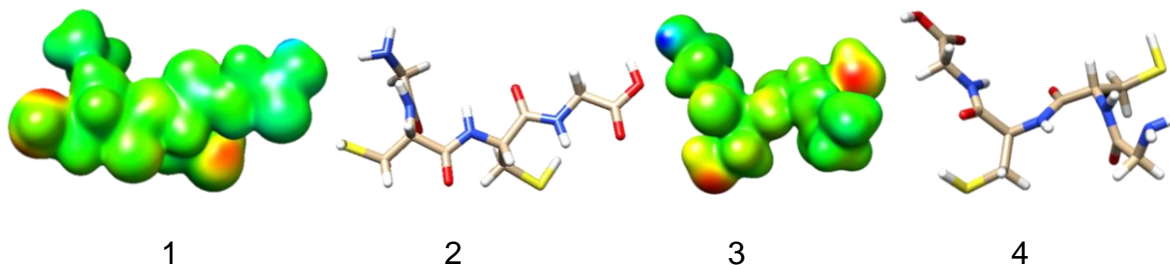


Figura 32: modelo D (1 y 2); modelo E (3 y 4).

Los índices de Fukui para la estructura F (figura 33) muestra que los azufres son más susceptibles a sufrir un ataque nucleófilico que los azufres de las estructura G (figura 33) los cuales son capaces de realizar un ataque nucleófilico. En estado reducido, los grupos sulfhidrilo de la estructura T presentan una mejor reactividad que la estructura S siendo el grupo tiol cercano al grupo NH_2 terminal el que actúa como nucleófilo mientras que otro actúa más como electrófilo lo cual no sucede en la estructura F donde se observa que ambos grupos tioles presentan la capacidad para aceptar electrones.

Las estructuras D y E difieren significativamente de los modelos S y T dado que estos últimos presentan mejores propiedades nucleofílicas lo cual se debe a las características estructurales que influyen en la reactividad capacidad de los grupos tioles.

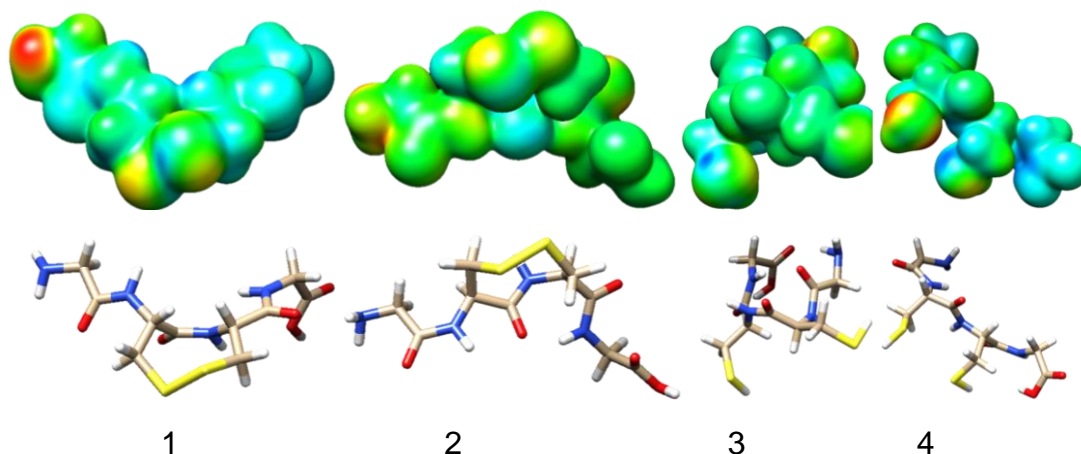


Figura 33: modelo F y G (1 y 2); modelos S y T (3 y 4).

En la figura 34 están representados los índices de Fukui para las estructuras H e I donde se observa que el grupo tiol cercano al grupo carbonilo terminal presenta mejor comportamiento donador siendo mas marcado en la estructura I debido a que presenta una mayor disposición a donar electrones debido a efectos del sustituyente.

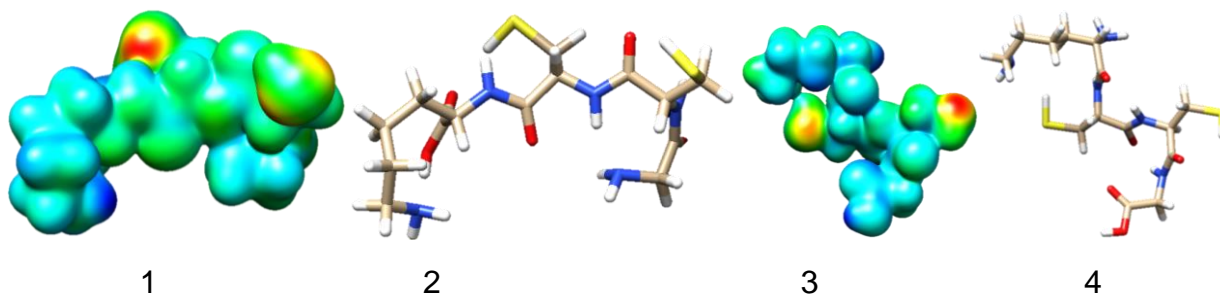


Figura 34: modelo H (1 y 2); modelo I (3 y 4).

En los índices de Fukui de las estructuras J y K (figura 35) se observa que el puente disulfuro, el azufre que presenta características tanto donadoras comoceptoras es el que se encuentra cercano a Lys en la estructura J mientras que en la estructura K, el azufre que mejor presenta dichas características es el que se encuentra cercano a Gly lo cual se debe a las propiedades estructurales del azufre⁷².

En estado reducido, el grupo sulfhidrilo que presentan mayor carácter nucleófilico es el que se encuentra cercano a Gly tanto en la estructura U como en la estructura V. Al comparar la estructura H con la estructura U los cuales presentan una isomería cis con

diferente ubicación espacial de los grupo R, se observa que los índices de Fukui son diferentes apoyando la idea acerca de que el arreglo estructural influye de manera importante en la reactividad de los grupos sulfhidrido y de la estructura en general.

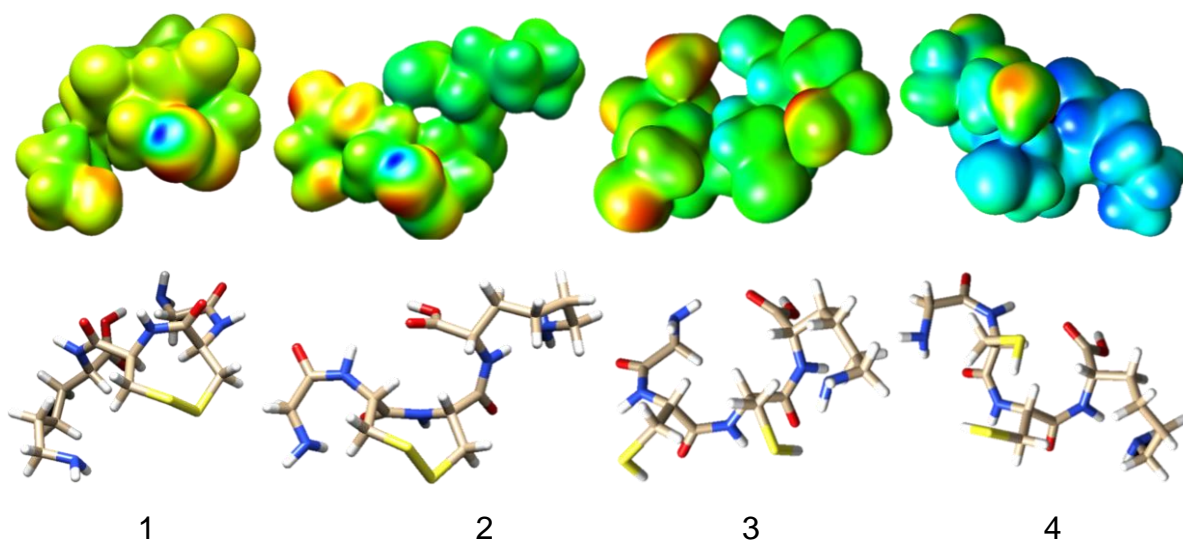


Figura 35: modelo J (1), K (2), U (3) y V (4).

Los índices de Fukui para las estructuras L y M (figura 36) describen que el grupo tiol que presenta mejores características nucleófilicas es el que se encuentra cercano a Gly observándose más reactivo el que se encuentran en la estructura L mientras que los grupos tiol cercanos a la Lys presentan un comportamiento electrofílico lo cual es ideal para la formación de los puentes disulfuro. Al comparar los índices de las estructuras L y M con las estructuras U y V, se observa que el arreglo estructural y la forma en que el sustituyente se une a la cistina afecta la reactividad de los grupos sulfhidrilos.

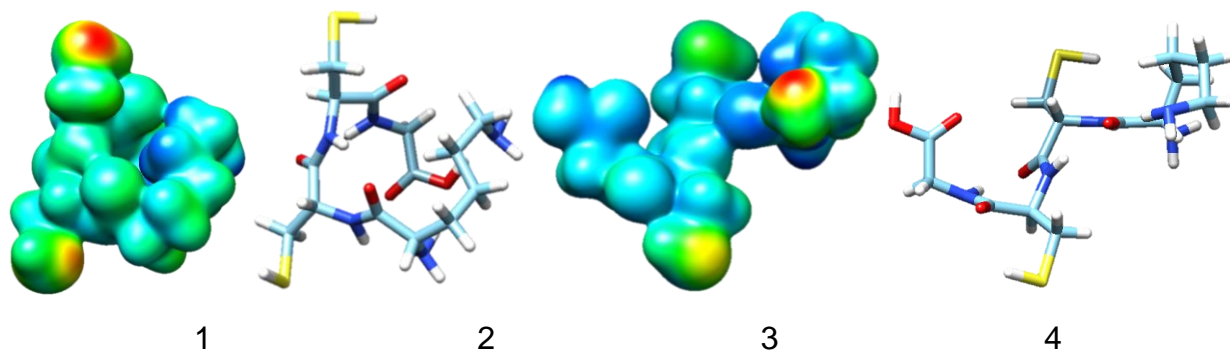


Figura 36: modelo L (1 y 2) y modelo M (1 y 2).

Los índices de Fukui para las estructuras N, \tilde{N} , W y X se muestran en la figura 37. En las estructuras N y \tilde{N} , los descriptores sobre los átomos de azufre en la estructura N difieren de los de la estructura \tilde{N} dado que estos presentan una mejor reactividad debido a que el azufre que se encuentra cercano a Lys actuaría como nucleófilo mientras que el otro actuaría como un electrófilo lo cual no sucede con los átomos de azufre de la estructura N. En las estructuras W y X se observa que los grupos tioles presentan diferentes reactividades teniendo mejores propiedades nucleófilicas los sulfhidrilos que se encuentran en la estructura X donde el tior cercano a Lys es electrófilico y el otro azufre cercano a la Gly presenta un comportamiento nucleofílico; lo mismo pasa con los grupos sulfhidrilos que se encuentran en la estructura W.

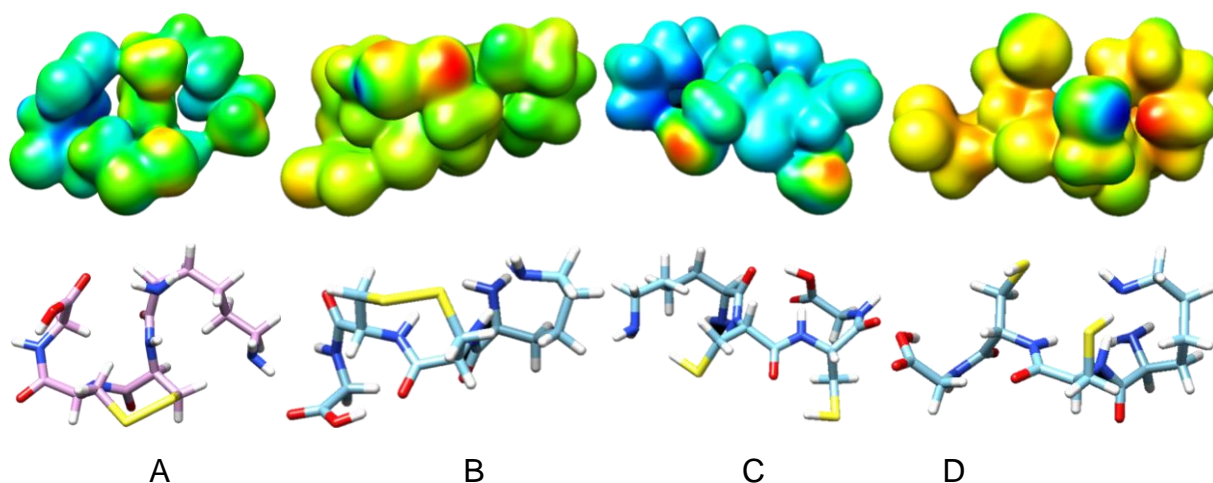


Figura 37: modelo N (1), \tilde{N} (2), W (3) y X (4).

De los índices de Fukui de las estructuras O y P (figura 38) se puede visualizar que los grupos sulfhidrilo de la estructura O son más nucleófilos mientras que los que están en la estructura P son más electrófilos lo cual está relacionado con el acomodo estructural, así como el tipo de sustituyentes que se presentan dentro de la estructura. Al comparar las estructuras O y P con las estructuras E y F así como con las estructuras J y K se observa que el tipo de sustituyente afectan los descriptores de Fukui ya que, si estos son diferentes, un grupo sulfhidrilo presentaría un comportamiento nucleófilico mientras que el otro grupo sulfhidrilo presentaría un comportamiento electrofílico y si son iguales los sustituyentes, la reactividad es similar tal como se puede observar con las estructuras D y E.

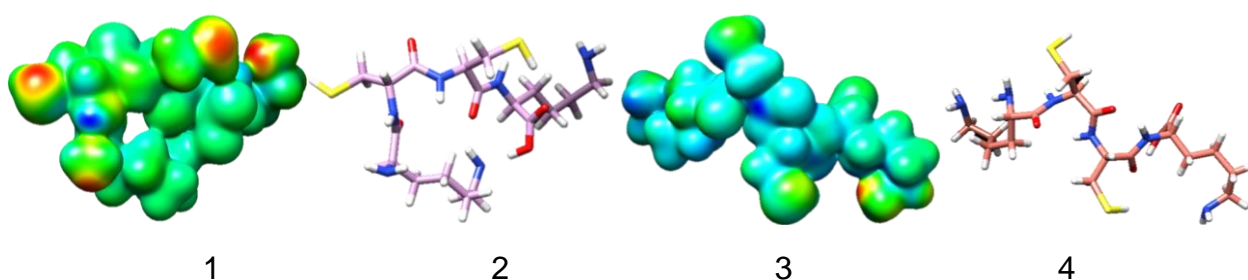


Figura 38: modelo O (1 y 2) y P (3 y 4).

Los descriptores de Fukui de la estructura Q (figura 39) muestran que ambos sulfuros son neutros alrededor del enlace azufre-azufre pero son susceptibles a un ataque electrofílico por el lado opuesto al enlace mientras que para la estructura Y, ambos sulfhidrilos presentan propiedades nucleófilas teniendo un comportamiento similar a la estructura P.

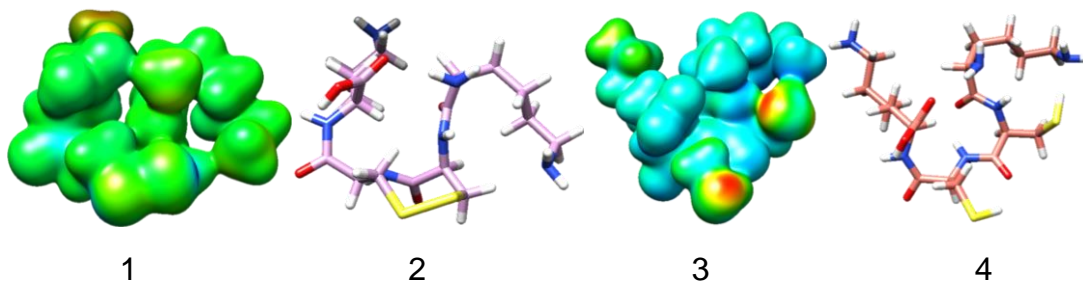


Figura 39: modelo Q (1 y 2) y modelo Y (3 y 4).

8.- CONCLUSIONES.

Los datos obtenidos han delimitar la información acerca de como actuarían los grupos tioles o los puentes disulfuro dentro de una proteína debido a que cuando los grupos tioles se encuentran lejos entre sí, ambos presentan una reactividad similar mientras que cuando los sulfhidrilos se encuentran cerca, uno presenta propiedades nucleófilicas superiores con respecto al otro lo que es de relevancia debido a que de esta manera seria posible iniciar el ciclo redox tiol-disulfuro. Por otro lado, en el puente disulfuro cuando los sustituyentes son iguales, los átomos de azufre presentan índices de Fukui muy similares no así cuando se presentan sustituyentes diferentes lo cual permitiría llevar a cabo su reducción.

Las superficies de energía potencial de las estructuras estudiadas no presentan un patrón que permita predecir su comportamiento frente a un agente reductor o a un agente oxidante debido a que esta depende de cómo se unen los sustituyentes, el tipo de sustituyentes, así como el arreglo estructural.

De acuerdo a los datos obtenidos del grafico de Ramachandran, así como del análisis que se realizó al comparar las estructuras reportados con las estructuras propuestos, se llegó a la conclusión que algunas estructuras propuestas no se presentarían en zonas como las hojas β y hélices α , sino en los loops de las estructuras proteicas.

La energía de estabilización de las estructuras en estado oxidado y reducido está en función de las interacciones de puentes de hidrógeno, interacciones de VDW, energías de enlace así como de las energías de torsión siendo estas últimas consideradas primordialmente para el estado oxidado ya que de esta manera se justifica porque no debería de ser posible la formación del puente dado que al formarse, los átomos interaccionan de forma más cercana lo que incrementa la tensión entre las interacciones de los átomos y por consecuencia se adquiere una elevada energía.

La formación de puentes disulfuro es desfavorable de acuerdo a lo que ah sido reportado previamente¹⁰⁻¹⁷, sin embargo, después de haber analizado e interpretado la información recabada por el presente estudio, se aportan más evidencias acerca de la formación de los puentes disulfuro prohibidos dado que las PES's y los índices de Fukui señalan que

la reactividad de los dos grupos tioles y de los dos átomos que constituyen el puente disulfuro son diferentes por lo que el ciclo redox SH/SS se puede llevar a cabo influyendo de manera importante el arreglo estructural, siendo esencial que la distancia de los grupos sulfhidrilos sea menor a 4.8 \AA^{11} para la formación del puente, por lo que de los modelos propuestos, solo las estructuras B, T, V y X son las que cumplen con las características necesarias para que el ciclo redox se lleve a cabo además de que las energías de estabilización de las estructuras T, V y X son muy similares a las de las estructuras extraídas de PDB.

9.- REFERENCIAS.

1. **Nelson D.** *Lehninger: Principios De Bioquímica*. Cuarta Edición.
2. **Santos J.** (2009). *Proteínas: Estructuras Fascinantes*. Buenos Aires, Argentina Ministerio De Educación. Instituto Nacional De Educación Tecnológica.
3. **Carey F.** (2006). *Química Orgánica*. Sexta Edición Mexico Mc Graw Hill.
4. **Crichton R.** (2008). *Biological Inorganic Chemistry and Introduction*. Italia Elsevier
5. <http://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/enlace-disulfuro>. Consultado el 28 de febrero 2016.
6. <Http://Www.Ehu.Eus/Biomoleculas/Peptidos/Pep2.Htm> 22. Consultado el 29 de marzo 2016.
7. **Steed J.** (2009). *Supramolecular Chemistry*. Segunda Edición. UK. WILEY
8. **González-Segura L.** (2003). El Papel De Los Residuos De La Cistina En La Estructura Y Función De Las Proteínas. *Rev. 2* (1). 2-10.
9. **Wade L.** (2004). *Química Orgánica*. Quinta Edición Madrid España Pearson: Prentice Hall.
10. **Aran M.** (2009). Reevaluación De Los Residuos Cisteína. En El Señalamiento Redox. *Revista Química Viva*. 8 (3). 162-184.
11. **Thornton J.** (1981). Disulphide Bridges In Globular Protein. *Journal Molecular Biological*. 151. 261-287.
12. **Candice E.** (2013). Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology and Tools for Discovery. *Chemical Reviews*. 113 4633-4679.
13. **Wouters M.A.** (2007). Forbidden Disulfides: Their Role As Redox Switches. *Current Protein And Science*. 8. 484-495.
14. **Ragsdale W.** (2011). Thiol/Disulfide Redox Switches In The Regulation Of Heme Binding To Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*. 14 (6) 1039-1047.
15. **Ramachandran G. N.** (1967). Conformation Of Polypeptides And Proteins. 283-437.
16. **Richardson J.** (1981). The Anatomy And Taxonomy Of Protein Structure. *Advances In Protein Chemistry*. 34.167-339.
17. **Wouters M.A.** (2010). Disulfides as Redox Switches: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxidants & Redox Signaling*. 12 (1) 53-91.

18. **Ahamed J.** (2006). Disulfide Isomerization Switches Tissue Factor From Coagulation To Cell Signalin. *PNAS*. 103 (38). 13932-13937.
19. **Åslund F.** (1987). Redox Potentials of Glutaredoxins and Other Thiol-Disulfide Oxidoreductases of the Thioredoxin Superfamily Determined By Direct Protein-Protein Redox Equilibrio. *The Journal Of Biological Chemistry*. 272 (49). 30780-30786.
20. **Bennett M.** (2000). Crystal Structure of the Hereditary Haemochromatosis Protein Hfe Complexed With Transferrin Receptor. *Nature*. 403 (6). 46-53.
21. **Burns J.** (1990). Predicting the Stability of Cyclic Disulfides by Molecular Modeling: "Effective Concentrations" In Thiol-Disulfide Interchange and the Design of Strongly Reducing Dithiols. *Journal American Chemical*. 112 (17). 6296-6303.
22. **Fan S.** (2009). Conformational Changes in Redox Pairs of Protein Structure. *Protein Science*. 18. 1745-1765.
23. **Go Young-Mi** (2008). Redox Compartmentalization in Eukaryotic Cells. *Biochimica Et Biophysical*. 1780.1272-1290.
24. **Mathias L.** (2002). Disulfide Exchange in Domail 2 of Cd4 Is Required For Entry of Hiv-I. *Nature*. 3 (8). 717-731.
25. **Moulaei T.** (2007). Atomic-Resolution Crystal Structure of the Antiviral Lectin Scytovirin. *Protein Science*. 16. 2756-2760.
26. **Wouters M.** (2003). Cross-Strand Disulphides In Cell Entry Proteins: Poised To Act. *Wiley Interscience*. 26. 73-79.
27. **Carugo O.** (2003). Vicinal Disulfure of Turns. *Protein Engineering*. 16 (9) 637-639
28. **Haworth N.L.** (2007). Evaluating The Stability Of Disulfide Bridges In Proteins: Atorsional Potential Energy Surface Fordiethyl Disulfide. *Molecular Simulation*. 33 (6). 476-484.
29. **Cohen M; Wasserman A.** (2003). New Developments In Density-Functional Theory. *Gazzetta Chimica Italiana*. 1 A 40.
30. **Hartree.** (1927). The Wave Mechanics Of An Atom With A Non-Coulomb Central Field. Part I. Theory And Methods. *Mathematical Proceedings Of The Cambridge Philosophical Society*. 24 (1) 89--110.

31. **Hohenberg P.** (1964). In homogeneious Electron Ga. *Physical Review*. 136 (3b). 864-871.
32. **Kohn W.; Sham L.J.** (1965). Self-Consistent Equations Including Exchange And Correlation Effects. *Physical Review*. 140 (4). 1133-1138.
33. **Parr R.** (1995). Density-Functional Theory Of The Electronic *Annu. Rev. Phys. Chern.* 46. 721-728.
34. **Kohn W.; Becke D.; Parrg.** (1996). Density Functional Theory Of Electronic Structure. *Journal Physical Chemistry*. 100 (31). 12974-12980.
35. **Geerlings P.; Proft F.; Langenaeker W.** (2003). Conceptual Density Functional Theory. *Chemical Reviews*. 103 (5). 1793–1873.
36. **Parr R.; Pearson R.** (1983). Absolute Hardness: Companion Parameter to Absolute Electronegativity. *Journal American Chemical Society*. 105 (26). 7512-7516.
37. **Pearson R.** (1988). Absolute Electronegativity and Hardness: Application to Inorganic Chemistry. *Inorganic Chemistry*. 27 (4). 734-740.
38. **Parr R.; Yang W.** (1984). Density Functional Approach to the Frontier-Electron Theory of Chemical Reactivit. *Journal American Chemical Society*. 106 4049-4050.
39. **Mulliken R.** (1934). A new Electroaffinity Scale; Together With Data on Valence States and on Valence Ionization Potentials and Electron Affinities. *Journal Of Chemical Physics*. 2. 782-793.
40. **Pearson R.** (1987). Recent Advances In The Concept Of Hard And Soft Acids And Bases 64 (7). 561-567.
41. **Moncada J.L.** (2008). Caracterización De La Reactividad Intrínseca De Los Halobencenos En El Modelo Conceptual De La Teoría De Funcionales De La Densidad (Tfd). *Quim. Nova*. 31 (5). 1255-1258.
42. **Parr R.** (1999). Electrophilicity Index. *Journal Chemical Society* 121 9 1922-1924
43. **Parr R.** (1982). Legendre Transforms And Maxwell Relations In Density Functional Theory. *Journal Physical Chemistry* .77 (1) .399-407.
44. **Yang W.; Parr R.; Puccib R.** (1984). Electron Density, Kohn-Sham Frontier Orbitals, And Fukui Functions. *Journal Physical Chemistry*. 81 (6). 2862-2863.

45. **Berger G.** (2013). Using Conceptual Density Functional Theory To Rationalize Regioselectivity: A Case Study On The Nucleophilic Ring-Opening Of Activated Aziridines. *Computational And Theoretical Chemistry*. 1010 11-18.
46. **Yang W.; Mortierl W.** (1986). The Use of Global and Local Molecular Parameters for the Analysis of the Gas-Phase Basicity of Amines. *American Chemical Society*. 108 (19). 5708-5711.
47. **Chattaraj P.; Sarkar U.; Ranjan D.** (2006). Electrophilicity Inde. *Chemical Reviews* 106 (6) 2065–2091.
48. **Chermette H.** (1998). Chemical Reactivity Indexes In Density Functional Theory. *Journal Of Computational Chemistry*. 20 (1). 129-154.
49. **Mulliken R.** (1955). Electronic Population Analysis on Lcao-Mo Molecular Wave Functions. *The Journal Of Chemical Physics*. 23 (10). 1833-1840.
50. **Parr R.; Yang W.** (1989). *Density–Functional Theory Of Atoms And Molecules* Oxford University
51. **Haworth N.L.; Feng L.L.; Wouters M.A** (2006). High Torsional Energy Disulfides: Relationship Between Cross-Strand Disulfides And Right-Handed Staples. *Journal Of Bioinformatics And Computational Biology*. 4 (1). 155–168.
52. **Vivas R.; Zapata J.** (2008). Theoretical Study of the Reactivity of Conformations and Configurations of Omega-3 Fatty Acids through Descriptors of Molecular Reactivity Using the Density Functional Theory (Dft). *Revista Colombiana De Quimica*. 37 (2). 2145-160.
53. **López J; Ensuncho A.; Robles J.** (2013). Descriptores Globales Y Locales De La Reactividad Para El Diseño De Nuevos Fármacos Anticancerosos Basados En Cis-Platino (II) 36 (9). 1308-1317.
54. **Chattaraj P.; Maiti B.; Sarkar U.** (2003). Philicity: A Unified Treatment of Chemical Reactivity and Selectivity. *The Journal Of Physical Chemistry*. 107 (25) 1973-4975
55. **Kolandaivel P.; Praveena G.; Selvarengan G.** (2005). Study of Atomic And Condensed Atomic Índices For Reactive Sites Of Molecules. *Journal Chemical Science*. 117 (5). 591-598.
56. <http://web.ua.es/cuantica/docencia/CCEM/node1.html>. Consultado el 15 de abril 2016.

57. http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/k_dft.htm. Consultado el 29 de abril 2016.
58. **Adamo C; Barone V.** (1999). Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *Journal Of Chemical Physics*. 110 (13). 6158-6170.
59. **Schuchardt K.; Didier B.** (2007). Basis Set Exchange: A Community Database for Computational Science. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 47 (3). 1045-1052.
60. **FELLER D.** (1996). The Role of Databases in Support of Computational Chemistry Calculations. *Journal of Computational Chemistry*. 17 (3). 1571-1586.
61. http://www.nwchem-sw.org/index.php/Main_Page. Consultado el 29 de mayo 2016.
62. <http://gabedit.sourceforge.net/>. Consultado el 29 de mayo 2016.
63. **Kim M.** (2015). Improved DFT Potential Energy Surfaces Via Improved Densities. *The Journal Of Physical Chemistry Letters*. 6 (19). 3802–3807.
64. **Fernandez M.** (1988). Analysis of Potential Energy Surfaces. *Journal Chemical Education*. 65 (8). 665-667.
65. <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>. Consultado el 29 de junio 2016.
66. **Shu Q.** (2011). The Structure of Spider Toxin Huwentoxin-II with Unique Disulfide Linkage: Evidence for Structural Evolution. *Potein Science*. 11 245–252.
67. **Sweeney M.** (2008). Structural Basis for the Substrate Specificity of Bone Morphogenetic Protein 1/Tolloid-Like Metalloproteases. *Journal Molecular Biological* 284. (1). 228–239.
68. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Consultado el 29 de agosto 2016.
69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3dinstall.shtml>. Consultado el 29 de septiembre 2016.
70. http://avogadro.cc/wiki/Main_Page. Consultado el 09 de noviembre 2016.
71. **Jeffrey P.** (1993). Cyclooctane Conformational Analysis via Mechanical and Computational Models. *Journal Of Chemical Education*. 70 (12). 988-990.
72. **Huheey** (1993). *Inorgánica: Principios de estructura y reactividad*. Cuarta edición. Mexico. Oxford University.

73. **Rocha W.** (1997). Abinitio Conformational Analysis of Cyclooctane Molecule.
Journal Of Computational Chemistry. 19 (5). 52-534.