

Universidad Autónoma de Baja California



Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Síntesis y Caracterización de Bradiquinina

TESIS

Que para obtener el título de Licenciatura de

QUÍMICO INDUSTRIAL

Presenta:

Mendias Sánchez Lorena Yajaira

Tijuana, B.C., México

6 de Diciembre, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

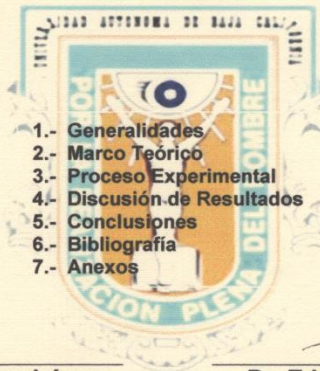
Síntesis y Caracterización de Bradiquinina

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Tijuana, Baja California
13 /11/ 2013

C. Lorena Yajaira Mendias Sánchez
Pasante de Química Industrial
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la Opción: **TESIS** es propuesto por el **M.C. Manuel Arturo Martínez López** quién será responsable de la calidad de trabajo que usted presenta, referido al tema: **"Síntesis y Caracterización de Bradiquinina"**, el cual deberá desarrollar de acuerdo con el siguiente orden:



- 1.- Generalidades
- 2.- Marco Teórico
- 3.- Proceso Experimental
- 4.- Discusión de Resultados
- 5.- Conclusiones
- 6.- Bibliografía
- 7.- Anexos

M.C. Manuel Arturo Martínez López
Asesor

Dr. Eduardo Rogel Hernández
Asesor Adjunto

Dr. José Heriberto Espinoza Gómez
Asesor Adjunto

Q. Noemí Hernández Hernández
Sub- Directora

Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA



Contenido

Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
Lista de abreviaturas	8
Agradecimientos	9
Resumen.....	10
Capítulo 1. Generalidades.....	11
1.1 Introducción	11
1.2 Objetivos	23
Capítulo 2. Marco Teórico	24
2.1 Bradiquinina y calidina y sus antagonistas.....	24
2.2 Antecedentes Históricos	24
2.3 Síntesis y metabolismo de cininas	26
2.4 Receptores de bradiquinina	30
2.5 Funciones y propiedades farmacológicas de las calicreínas y las cininas.	33
2.6 Aplicaciones terapéuticas potenciales	38
2.7 Antagonistas de receptores	39
2.8 Perspectivas	40



Capítulo 3. Proceso Experimental.....	41
3.1 Sustancias y disoluciones a utilizar.....	41
3.2 Procedimiento.....	42
3.3 Diagrama de Flujo (Síntesis).....	45
3.3 Diagrama de Flujo (Separación).....	46
Capítulo 4. Discusión de Resultados.....	47
4.1 Resultados de Análisis por Espectrometría de Masas.....	47
4.2 Resultados de Análisis de Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (HPLC)	48
4.3 Resultados de Análisis de Espectroscopia Infrarrojo.....	49
Capítulo 5. Conclusiones.....	51
Capítulo 6. Bibliografía.....	52
Capitulo 7. Anexos.....	54
7.1 Espectros Infrarrojo de los aminoácidos presentes en el péptido de la base de datos con estructuras.....	54
Arginina.....	54
Serina.....	54
Prolina.....	55
Fenilalanina.....	55
Glicina.....	56



7.2 Estructuras de los compuestos utilizados en el procedimiento	56
Resina RinkAmide	56
Grupo Fmoc.....	56
Diclorometano.....	57
Dimetilformamida	57
Piperidina.....	57
H-hidroxibenzotriazol	57
Diisopropilcarbodiimida	57
Acido Trifluoroacetico	57
3,6-dioxa-1,8-octanoditiol.....	58
Triisopropilsilano.....	58
Eter metil terbutilico	58
Acetonitrilo	58
Acido acético.....	58
Acetona.....	58



Índice de figuras

Figura	Título	Pág.
Fig. 1.1	Representación general de los aminoácidos mostrando las formas iónicas que predominan a pH 7	9
Fig. 1.2	Estereoquímica de la alanina	9
Fig. 1.3	Estructuras de los aminoácidos más frecuentemente encontrados en las proteínas	13 y 14
Fig. 1.4	Formación del enlace peptídico	17
Fig. 1.5	Las estructuras resonantes de la unión peptídica dan por resultado un grupo plano bidimensional	19
Fig. 2.1	Esquema de la producción y catabolismo de la cinina.	29
Fig. 3.1	Columna empacada con resina	40
Fig. 3.2	Disolución del aminoácido	40
Fig. 3.3	Aminoácidos utilizados	41
Fig. 3.4	Producto resultante sin separar	41
Fig. 4.1	Espectro de masas de bradiquinina	45
Fig. 4.2	Espectro HPLC de bradiquinina	46
Fig. 4.3	Espectro IR de bradiquinina	47



Índice de tablas

Tabla	Título	Pág.
Tabla 1.1	Nombres y abreviaturas de los aminoácidos comunes	12
Tabla 2.1	Estructura y funciones de algunos péptidos	28
Tabla 3.1	Aminoácidos a utilizar y cantidades en gramos	39
Tabla 4.1	Explicación de los picos característicos de los grupos funcionales presentes en la bradiquinina	48



Lista de abreviaturas

Abreviatura Significado

Boc	t-butiloxicarbonilo
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
DODT	3,6-dioxa-1,8-octanoditiol
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
HOBt	N-hidroxibenzotriazol
KDa	Kilodalton
MTBE	Eter metil terbutílico
pH	Potencial de Hidrogeno
pKa	Constante de disociación acida
TFA	Acido trifluoroacetico
TIS	Triisopropilsilano



Agradecimientos

Quiero dar gracias a mi mamá porque gracias a tu estimulación soy la estudiante que soy.

Gracias a mi papá, porque gracias a ti soy el ser humano que soy.

A mis hermanas Yaritza y Yaneli por su apoyo.

A mi tata Henry Mendias por empujarme siempre hacia adelante.

A mi Alma Mater por recibirme y forjarme como profesional.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por darme a los maestros que me guiaron durante la carrera.

Al Maestro Manuel Martínez y al Doctor Heriberto Espinoza por permitirme trabajar con ustedes.

Quiero agradecer especialmente a los Maestros que dejaron una marca en mi como Química: al Doctor Eduardo Rogel por incrementar mi gusto por los polímeros desde primer semestre cuando lo conocí, al Ingeniero Guerra por notar mi potencial desde el principio y por alentarme a seguir adelante, al Maestro Mario Ramírez por enseñarme en realidad lo que es estudiar para un examen, a la Maestra Carmen Jauregui por enseñarme que uno nunca debe dejar de prepararse. Gracias por todo su apoyo.

Esta tesis está dedicada a mi tutor de la carrera, padrino de generación y amigo: el Doctor Salvador Valera Lamas por mostrarme confianza durante el principio de la carrera y por su apoyo incondicional.

A mi Ingeniero Lomelí por ayudarme en mi experimento y apoyarme en todo lo que has podido.

Y finalmente pero no menos importantes a mis amigos Masu Bello, Luis Sosa, Isaac Velázquez, Yehimi Gonzales, Guillermo Dávalos y Yared Vargas, porque con ustedes compartí más horas del día durante la carrera que con mi propia familia y gracias a todas esas experiencias y risas de laboratorio este camino se hizo más ameno. Éxito para todos.

Muchas Gracias.

En memoria a mi amigo Juan Pablo Ungson Ley porque siempre me alentó a ser una mejor Química.



Resumen

Síntesis y Caracterización de Bradiquinina

Por Lorena Mendias Sánchez

Para obtener el Título de Químico Industrial

Universidad Autónoma de Baja California

La bradiquinina, péptido cuya reacción con el plasma sanguíneo libera una sustancia que provoca intensa caída en la presión arterial, fue descubierta por el Dr. Mauricio Rocha e Silva, junto con sus colegas Wilson Teixeira Beraldo y Gastao Rosenfeld, tres fisiólogos y farmacólogos brasileños que trabajaban en el Instituto de Biología de Sao Paulo en 1948. La bradiquinina se detectó en el plasma sanguíneo de animales tras la adición de veneno de la *Bothrops jararaca* (la víbora lanceolada brasileña).

La bradiquinina es un mensajero no peptídico que es producido enzimáticamente a partir de la calidina en sangre, donde es un agente potente pero de corta vida en la dilatación arteriolar y en el incremento de la permeabilidad capilar. La bradiquinina también es liberada por los mastocitos durante ataques de asma, por la pared intestinal como vasodilatadora gastrointestinal, por los tejidos lesionados como señal de dolor y puede funcionar como neurotransmisor.



Capítulo 1. Generalidades

1.1 Introducción

Entre todos los aminoácidos posibles, apenas 20 son los que encontramos comúnmente en las proteínas. La estructura general de los aminoácidos incluye un grupo amino y un grupo carboxilo, los cuales están enlazados al carbono α . El carbono α también está unido a un hidrogeno y a un grupo en la cadena lateral que representaremos con la letra R. El grupo R determina la identidad del aminoácido en cuestión (figura 1.1). La fórmula bidimensional ilustrada aquí solo puede mostrar parcialmente la estructura típica de los aminoácidos debido a una de las más

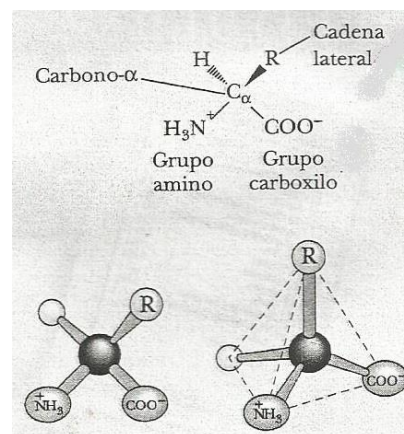


Fig. 1. 1 Representación general de los aminoácidos, mostrando las formas iónicas que predominan a pH 7

importantes propiedades de estos compuestos es su forma tridimensional o estereoquímica. Todos los objetos del mundo tienen una imagen especular. Muchos



L- Alanina

D- Alanina

Fig. 1.2 Estereoquímica de la alanina

pareos de objetos son imágenes especulares que pueden ser superpuestas. En otros casos los objetos que son imágenes especulares no pueden ser superpuestos entre sí, pero están relacionados como la mano derecha lo está con la



izquierda. Las imágenes especulares que no son factibles de ser superpuestas entre sí se dice que son quirales; muchas biomoléculas importantes son quirales. Un centro quiral encontrado frecuentemente en las biomoléculas es un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes. Un centro así aparece en todos los aminoácidos excepto en la glicina. La glicina tiene dos átomos de hidrógeno enlazados al carbono α ; en otras palabras, la cadena lateral o grupo R de la glicina es un hidrógeno. En todos los demás aminoácidos existentes, en general, el carbono α tiene cuatro grupos diferentes enlazados a su alrededor, dando lugar a dos formas de imágenes especulares no superponibles. La figura 1.2 nos muestra el dibujo de los estereoisómeros de la alanina, en la que el grupo R es un $-\text{CH}_3$. En las figuras bidimensionales los enlaces en forma de cuña punteados representan enlaces que se alejan del observador y los enlaces mostrados como cuñas sólidas expresan que van dirigidos hacia afuera del plano del papel en dirección del observador.

Estas dos formas, la L y D, son la base de la clasificación de los aminoácidos. La terminología viene del latín donde L significa *Laevus* = izquierdo y D *Dexter* = derecho, nomenclatura que proviene de la capacidad de los compuestos ópticamente activos de hacer rotar la luz polarizada hacia la derecha (dextrógiros) o a la izquierda (levógiros). Los aminoácidos que aparecen en las proteínas de seres vivos son todos de la forma L. Aunque hay algunos aminoácidos D en la naturaleza, sobre todo en las paredes de las células bacterianas y en algunos antibióticos; sin embargo, no se encuentran en proteínas normales. Los grupos R y por lo tanto los aminoácidos individuales, se clasifican en atención a diversos criterios, dos de los cuales son



particularmente importantes. El primero se refiere a la naturaleza polar o no polar de la cadena lateral. El segundo depende de la presencia de un grupo ácido o alcalino en esa cadena lateral. Otros criterios útiles son la presencia de grupos funcionales diferentes de los grupos ácidos o alcalinos y la naturaleza de esos grupos.

Como ya se mencionó, la cadena lateral del aminoácido más simple la glicina, es un átomo de hidrógeno, y en este único caso dos átomos de hidrogeno están ligados al carbono α . En todos los demás aminoácidos, la cadena lateral es más larga y más compleja. Los átomos de la cadena lateral son designados con letras del alfabeto griego, contando a partir del carbono α . Estos átomos de carbono son, a su vez, los carbonos beta, gamma, delta y épsilon (β , γ , δ , ϵ); un átomo de carbono terminal lo denominamos el carbono ω (omega, nombre de la última letra del alfabeto griego). Acostumbramos hacer referencia a los aminoácidos por medio de abreviaturas de tres letras o de una letra, donde la designación de una letra se hace cada día más común. La tabla 1.1 lista todas ellas.



Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Abreviatura de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

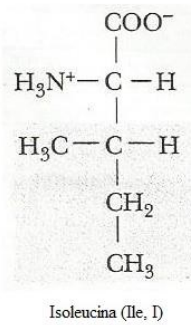
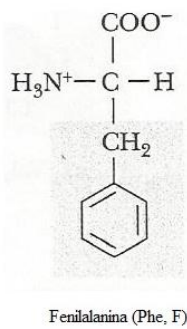
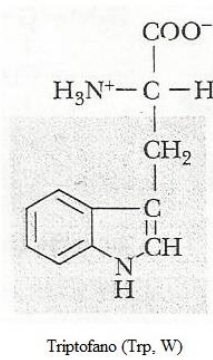
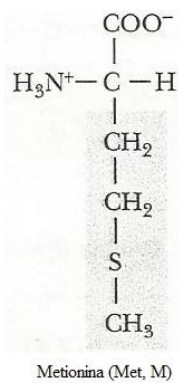
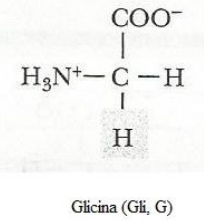
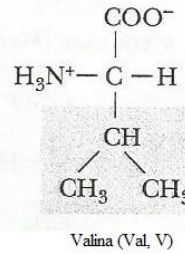
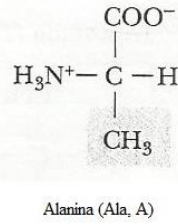
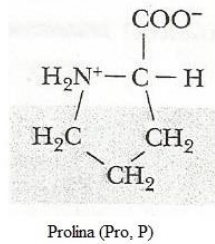
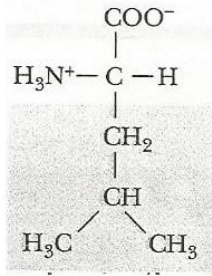
Tabla 1.1 Nombres y abreviaturas de los aminoácidos comunes



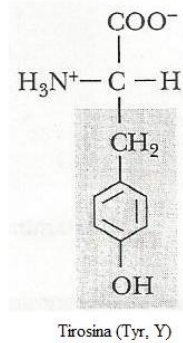
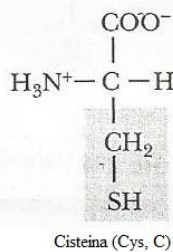
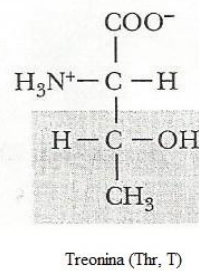
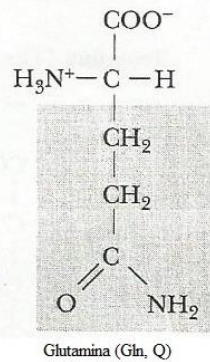
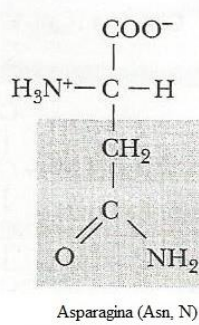
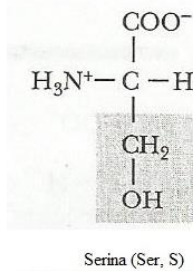
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Síntesis y Caracterización de Bradiquinina

A No polares (Hidrofobicos)

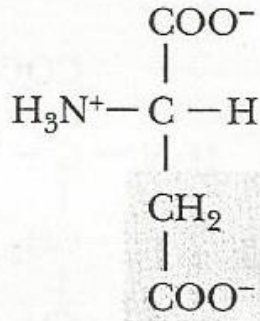


B Polares (no cargados)

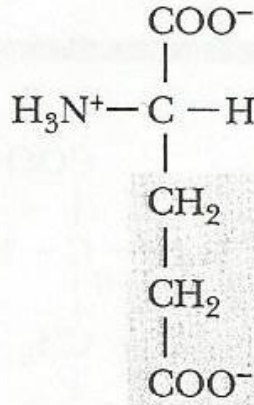




C Acidos

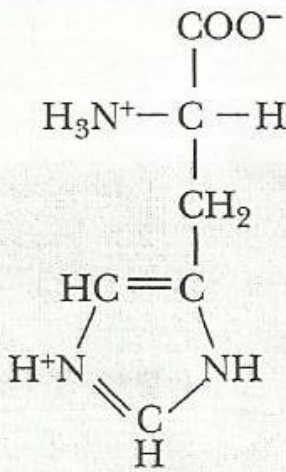


Acido Aspartico (Asp, D)

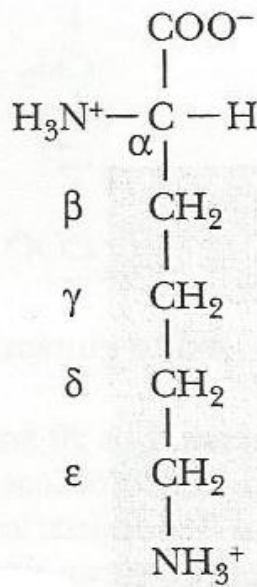


Acido Glutamico (Glu, E)

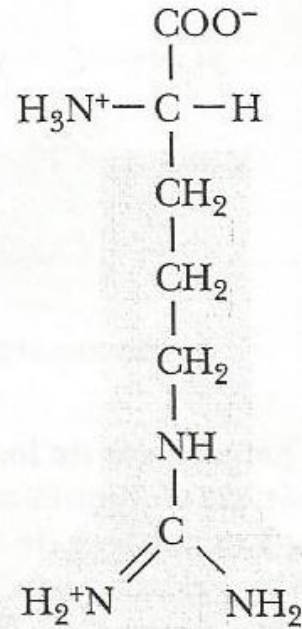
D Basicos



Histidina (His, H)



Lisina (Lys, K)



Arginina (Arg, R)

Figura 1.3 Estructuras de los aminoácidos más frecuentemente encontrados en las proteínas



Uno de los grupos de aminoácidos tiene cadenas laterales no polares. Este grupo incluye la glicina, la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, el triptófano y la metionina. En varios miembros de este grupo (la alanina, la valina, la leucina y la isoleucina) la cadena lateral es un hidrocarburo alifático. La prolina tiene una estructura alifática cíclica y el nitrógeno está unido a dos átomos de carbono. En la terminología de química orgánica, el grupo amino de la prolina es una amina secundaria y por ello, la prolina con frecuencia es llamada un iminoácido. Contrariamente, los grupos amino de todos los demás aminoácidos comunes son aminas primarias. En la fenilalanina, el grupo del hidrocarburo es aromático en vez de ser alifático. En el triptófano, la cadena lateral contiene un anillo de indol, el cual es también aromático. En la metionina, la cadena lateral contiene un átomo de azufre además de los grupos de hidrocarburos alifáticos.

Otro grupo de aminoácidos tiene cadenas laterales polares que son eléctricamente neutras a pH neutro. Este grupo incluye la serina, la treonina, la tirosina, la cisteína, la glutamina y la asparagina. Por conveniencia, a veces aquí también se incluye la glicina pues carece de una cadena lateral no polar. En la serina y la treonina el grupo polar es un hidroxilo (-OH) ligado a grupos de hidrocarburos alifáticos. El grupo hidroxilo en la tirosina está ligado a un grupo aromático, que al final pierde un protón a pH más altos. (El grupo hidroxilo en la tirosina es un fenol, el cual es un ácido más fuerte que un alcohol alifático. Como resultado de ello, la cadena lateral de la tirosina puede perder un protón en una titulación, mientras que los de serina y treonina requieren un pH tan alto que los valores de pK_a no son listados para estas cadenas



laterales). En la cisteína, la cadena polar lateral consiste de un grupo tiol (-SH), el cual puede reaccionar con un grupo tiol de otra cisteína para formar un puente disulfuro (-S-S-) en las proteínas, a través de una reacción de oxidación. El grupo tiol también puede perder un protón. Los aminoácidos glutamina y asparagina tienen grupos amida en sus cadenas laterales, que derivan de grupos carboxílicos. Los enlaces amídicos no se ionizan en el rango de pH comúnmente encontrados en la bioquímica. La glutamina y la asparagina pueden ser considerados como los derivados de los ácidos glutámico y aspártico, respectivamente; estos dos aminoácidos tienen grupos carboxílicos en sus cadenas laterales, además del que está presente en todos los aminoácidos. Un grupo carboxilo puede perder un protón, formando el correspondiente anión carboxilato: glutamato y aspartato, respectivamente en el caso de estos dos aminoácidos está cargado negativamente, cuando se encuentra a pH neutro.

Tres aminoácidos (histidina, lisina y arginina) poseen cadenas laterales básicas o alcalinas, y la cadena lateral en los tres está cargada positivamente en o cerca del pH neutral. En la lisina, el grupo amino de la cadena lateral, está ligado a una cola de hidrocarburo alifático. En la arginina, el grupo básico de la cadena lateral, el grupo guanidino, es más complejo en su estructura que el grupo amino, pero también está ligado a una cola de un grupo hidrocarburo. En la histidina libre en solución, el pK_a del grupo imidazol de la cadena lateral es 6.0, el cual no está muy lejos del pH fisiológico. Los valores de pK_a para varios aminoácidos dependen del medio en que se encuentran y pueden cambiar significativamente dentro de los confines de una proteína. La histidina puede ser encontrada en la forma protonada y no protonada en las proteínas,



y las propiedades de muchas proteínas dependen de si los residuos de histidina individuales están o no eléctricamente cargados.

En un aminoácido libre el grupo carboxilo y el grupo amino de la estructura general se cargan a pH neutro –la porción carboxilato se carga negativamente y el grupo amino, positivamente-. Los aminoácidos sin grupos cargados en sus cadenas laterales existen en una solución neutra como zwitteriones sin carga neta. Un zwitterión tiene ambos tipos de cargas positivas y negativas, pero en solución es eléctricamente neutro. Los aminoácidos neutros existen en la forma $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$ (esto es, sin grupos cargados).

Los aminoácidos individuales pueden ligarse formando enlaces covalentes. Este enlace se forma entre el grupo

α -carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino del siguiente. Se elimina agua en el proceso y los residuos de aminoácidos quedan enlazados después de que el agua ha sido eliminada (fig. 1.4). Un enlace construido de esta forma se identifica como enlace peptídico. Los péptidos

son compuestos formados enlazando unos cuantos aminoácidos, cuyo número va

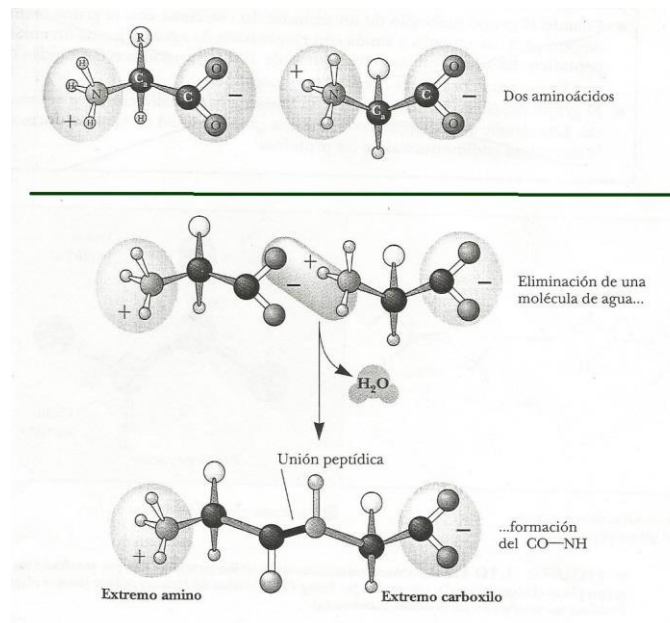


Figura 1.4 Formación del enlace peptídico



dedos a varias docenas. En una proteína, muchos aminoácidos están ligados por enlaces peptídicos para formar una cadena polipeptídica.

El enlace carbono-nitrógeno formado cuando dos aminoácidos son unidos a través de un enlace peptídico normalmente se representa como una sola ligadura, con un par de electrones compartidos entre los dos átomos. Con un simple cambio en la posición de un par de electrones, sería posible escribir este enlace como una doble ligadura. Este intercambio de electrones es bien conocido en química orgánica y da por resultado estructuras de resonancia, mismas que difieren unas de otras únicamente por el posicionamiento de los electrones. Las posiciones de ligadura doble y sencilla en una estructura resonante son diferentes de sus posiciones en otra estructura resonante del mismo compuesto. No hay una sola estructura resonante que en la realidad represente un enlace en el compuesto; más bien todas las estructuras resonantes contribuyen a la situación de enlace.

El enlace peptídico puede ser escrito como un híbrido de resonancia de dos estructuras (fig. 1.5), una con un solo enlace entre el carbono y el nitrógeno y la otra con una doble ligadura entre el carbono y el nitrógeno. La unión peptídica tiene un carácter parcial de doble ligadura. Como resultado de ello, el grupo peptídico que forma el enlace entre los dos aminoácidos es plano. La unión peptídica es también más fuerte que una unión sencilla ordinaria debido a la estabilización que le da la resonancia.

La característica estructural tiene importantes implicaciones para las conformaciones de los péptidos y las proteínas. Hay rotación libre alrededor de los enlaces entre el carbono- α de un residuo aminoácido dado y entre el nitrógeno amínico



y el carbono carbonílico de ese residuo, pero no hay rotación significativa alrededor de la unión peptídica. Esta restricción estereoquímica juega un papel importante para determinar cómo puede plegarse el esqueleto de la proteína.

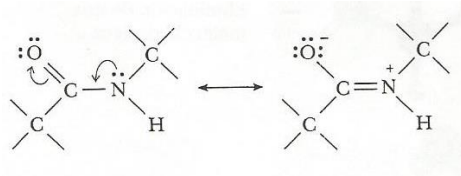


Figura 1.5 Las estructuras resonantes de la unión peptídica dan por resultado un grupo plano bidimensional

Las proteínas biológicamente activas son polímeros que constan de aminoácidos enlazados por uniones peptídicas covalentes.

Una molécula tan grande como la de una proteína, puede tomar muchas configuraciones diferentes (estructuras tridimensionales). De

todas las configuraciones posibles, solo una o unas cuantas tienen actividad biológica; estas son las configuraciones nativas. Muchas proteínas no tienen estructuras repetitivas regulares obvias. Como consecuencia, estas proteínas suelen describirse como poseedoras de largos segmentos de “estructura aleatoria”. El término *aleatorio* en realidad es un nombre inapropiado, debido a que la misma estructura “aleatoria” se encuentra de manera repetitiva en las conformaciones nativas de todas las moléculas de una proteína dada, y esta conformación “aleatoria” pero perfectamente repetitiva es necesaria para su funcionamiento adecuado. Debido a que las proteínas son complejas, se les define en términos de cuatro niveles de estructura.

La estructura primaria es el orden en el que los aminoácidos individuales se enlazan covalentemente. El péptido Leu-Gly-Thr-Val-Arg-Asp-His (recuerde que el aminoácido N terminal se menciona al principio) tiene una estructura primaria diferente a la del péptido Val-His-Asp-Leu-Gly-Arg-Thr, aunque ambos tienen el mismo número y



tipo de aminoácidos. Observe que el orden de los aminoácidos puede ser escrito en una línea. La estructura primaria es el primer paso unidimensional para especificar la estructura tridimensional de una proteína. Para algunos bioquímicos, la estructura incluye todas las interacciones covalentes, entre ellas, las de los puentes disulfuro que pueden formarse por las cisteínas; sin embargo, consideremos los puentes disulfuro como parte de la estructura terciaria.

La estructura secundaria es el arreglo en el espacio de los átomos en el esqueleto peptídico. Los arreglos α -hélice y β -plegada son dos tipos de estructuras secundarias. Éstas tienen interacciones repetitivas resultantes del puente de hidrógeno, entre los grupos amida N-H y los grupos carbonilos del esqueleto peptídico. Las conformaciones de las cadenas laterales de los aminoácidos no son parte de la estructura secundaria. En muchas proteínas, el plegamiento de partes de la cadena puede ocurrir independientemente del plegado de otras partes. A tales porciones de las proteínas, plegadas de manera independiente de las otras se les denomina dominios o estructura supersecundaria.

La estructura terciaria son los arreglos tridimensionales de todos los átomos en la proteína, incluidos aquellos en las cadenas laterales y en cualquier grupo prostético (grupos diferentes a los aminoácidos).

Una proteína puede constar de muchas cadenas polipeptídicas múltiples llamadas subunidades. Los arreglos de las subunidades respecto unas de otras es la estructura cuaternaria. La interacción entre subunidades es mediada por interacciones



no covalentes, como puentes de hidrogeno, atracciones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas.

1.2 Objetivos

- Preparar una columna para la síntesis del péptido.
- Sintetizar el péptido aminoácido por aminoácido en la columna.
- Aislar y purificar el producto.
- Caracterizar el producto mediante Espectrometría de masas, Cromatografía de líquidos a alta presión y Espectrometría Infrarrojo.



Capítulo 2. Marco Teórico

2.1 Bradiquinina y calidina y sus antagonistas

Factores diversos como lesión tisular, reacciones alérgicas, infecciones por virus y otros trastornos inflamatorios activan una serie de reacciones proteolíticas que generan bradiquinina y calidina en los tejidos. Dichos péptidos son autacoides que actúan localmente y producen dolor, vasodilatación, mayor permeabilidad vascular y síntesis de prostaglandina. De este modo, integran un subgrupo de un gran número de mediadores que contribuyen a la respuesta inflamatoria.

En los últimos años, se han hecho descubrimientos interesantes sobre las cininas y sus receptores. Los metabolitos de cininas, aceptados en épocas pasadas como inactivadores de productos de degradación, son considerados ahora como mediadores potentes de la inflamación y el dolor; los péptidos en cuestión interactúan con receptores específicos cuya presencia es inducida por daño tisular. Con base en la información comentada, quizá se pueda contar con métodos nuevos de intervención terapéutica en cuadros inflamatorios crónicos.

2.2 Antecedentes Históricos

La observación antigua de que la orina inyectada por vía intravenosa disminuía la presión arterial permitió identificar las cininas. Entre 1920 y 1939, Frey y sus colaboradores, y Kraut y Werle, identificaron la sustancia que causaba la hipotensión y demostraron que podría obtenerse un material similar en saliva, plasma y otros tejidos.



El páncreas era una fuente rica de tal sustancia, razón por la cual la llamaron calicreína, con base en el sinónimo griego *kallicréas*. En 1937 Werle, Gotze y Keppler definieron que las calicreínas generan una sustancia farmacológicamente activa, a partir de algún precursor inactivo presente en el plasma. En 1948, Werle y Berek llamaron a la sustancia activa calidina y demostraron que era un polipéptido separado de una globulina plasmática que llamaron calidinógeno.

El interés en este campo se intensificó cuando Rocha e Silva y colaboradores (1949) señalaron que la tripsina y algunos venenos de serpiente actuaban en la globulina plasmática para producir una sustancia que disminuía la presión arterial y que ocasionaba contracción de aparición lenta en el intestino. Ante esta respuesta lenta, llamaron a tal sustancia bradiquinina, término proveniente de las raíces griegas *bradys* (lento) y *kinein* (movimiento). En 1960, Elliot y colaboradores aislaron el péptido bradiquinina que fue sintetizado por Boissonnas y colaboradores. Muy poco después, se advirtió que la calidina era un decapeptido, es decir era la bradiquinina con un residuo adicional de lisina en el extremo terminal amino. Las dos sustancias son miembros de un grupo de polipéptidos con estructuras químicas y propiedades farmacológicas similares de distribución muy amplia en la naturaleza. Se ha adoptado para todo el grupo el término genérico cininas, y la calidina y la bradiquinina han sido designadas cininas plasmáticas.

En 1980, Regoli y Barabé dividieron los receptores de cinina en clases B1 y B2. A mediados del decenio de 1980, fue posible la síntesis de la primera generación de los antagonistas de receptores de cinina. En los comienzos del decenio de 1990, se



produjo la síntesis de la segunda generación de antagonistas de cinina con especificidad de receptores; dichos antagonistas han permitido ampliar el conocimiento sobre las acciones de la cinina. El mayor uso de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en seres humanos ha estimulado el interés por las cininas debido a que los inhibidores de ACE tornan lento el metabolismo de la cinina.

Sistema endógeno de calicreína-cininógeno-cinina

2.3 Síntesis y metabolismo de cininas

La bradiquinina es un nonapéptido. La calidina posee un residuo de lisina adicional en la terminación amino y a veces se le conoce como lisil-bradiquinina. Los péptidos son separados de las α_2 globulinas que son sintetizadas por el hígado y circulan en el plasma. Los precursores en cuestión han sido llamados cininógenos. Se conocen dos de ellos que son el alto peso molecular (HMW) y el de bajo peso molecular (LMW). Varias de las proteasas de serina generarán cininas, pero las proteasas altamente específicas que liberan bradiquinina y calidina, a partir de los cininógenos, reciben el nombre de calicreína.

Las sustancias de esta categoría (calicreínas) circulan en el plasma en forma inactiva y deben ser activadas por otras proteasas. Dos calicreínas actúan en los cininógenos: la plasmática y la tisular. Son enzimas diferentes y se activan mediante procesos distintos. La precalicreína plasmática es una proteína inactiva que tiene 88 kDa aproximadamente y que está unida en un complejo a partes iguales con su sustrato, el cininógeno de alto peso molecular. La cascada en cuestión es “frenada”



por los inhibidores de proteasa presentes en el plasma; entre los más importantes está el inhibidor del primer componente activado del complemento (C1INH) y la α_2 -macroglobulinas. Después de su síntesis por el hígado, la precalicreína plasmática es desdoblada y activada por el factor XII conocido también como de Hageman, proteasa que actúa por igual en las cascadas de coagulación intrínseca y en la cinina para activar una fracción de 36 kDa, la calicreína. El propio factor XII es activado por el contacto con superficies con carga negativa como las de colágeno. Como dato importante, como lo señala la línea de guiones en la figura 2.1, la calicreína hace que actúe todavía más el factor XIIa y con ello ejerce un efecto de retroalimentación positiva en el sistema.

En comparación con la calicreína plasmática, la tisular es una proteína mas pequeña (masa molecular, 29000 Da). Es sintetizada en diversos tejidos como glándulas salivales, sistema nervioso central y aparato cardiovascular. Actúa localmente muy cerca de su sitio de origen. La síntesis de procalicreína tisular es regulada por diversos factores que incluyen aldosterona en riñón y glándulas salivales, y andrógenos, en otras glándulas. La secreción de la procalicreína tisular también puede ser regulada, por ejemplo; su secreción desde el páncreas aumenta por la estimulación del neumogástrico. La activación de la procalicreína en calicreína necesita de la degradación proteolítica. En seres humanos, no se ha definido con exactitud la sucesión de estos fenómenos de activación.



Nombre	Estructura*	Funciones
Bradiquinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	Agonista, B ₂ >B ₁
Calidina	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser Pro-Phe-Arg	Agonista, B ₂ ≈B ₁
des-Arg-bradiquinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	Agonista, B ₁
des-Arg-calidina	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	Agonista, B ₁
des-Arg-[Leu]-bradiquinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Leu	Antagonista, B ₁
[D-Phe]-bradiquinina	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser[D-Phe]-Phe-Arg	Antagonista, B ₂ (también en cierta medida B ₁)
HOE 140	[D-Arg]-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-Tic-Oic-Arg*	Antagonista, B ₂
WIN 64338	No péptido	Antagonista, B ₂

Tabla 2.1 Estructura y funciones de algunos péptidos.

*Hyp= trans-4-hidroxi-Prolina; Thi=β-(2-tienil)-Alanina; Tic= [D]-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-il-carbonilo; Oic= (3as, 7as)-octahidroindol-2-il-carbonilo; Arg= arginina; Pro=prolina; Gly= glicina; Phe=fenilalanina; Ser= serina; Leu=leucina

Los dos sustratos de las caliceínas, que son los cininógenos de alto y bajo peso molecular, son producto de un solo gen, que surgen por el procesamiento alternativo de mRNA. El cininógenos de alto peso molecular contiene 626 residuos de aminoácidos; la secuencia bradiquinínica interna de nueve residuos aminoácidos se une con la secuencia de “cadena pesada” de la terminación amino (362 aminoácidos), y la secuencia de “cadena ligera” de la terminación carboxil (255 aminoácidos). El cininógenos de bajo peso molecular es idéntico a la forma de mayor tamaño de la proteína, desde la terminación amino hasta la secuencia bradiquinínica; su cadena ligera breve difiere de la comentada. El cininógenos de alto peso molecular es



desdoblado por la calicreína plasmática y tisular para generar bradiquinina y calidina, respectivamente. El de bajo peso molecular es un sustrato sólo para la calicreína tisular, y el producto es la calidina.

El decapeptido calidina tiene casi la misma actividad que el nonapéptido bradiquinina y es innecesario que se transforme en este último para que genere sus efectos característicos. Se produce conversión moderada de calidina en bradiquinina conforme la aminopeptidasa plasmática separa el residuo de lisina en la terminación amino. Sin embargo, la reacción mencionada es lenta en comparación con la velocidad de inactivación por hidrólisis en la terminación carboxilo. La mínima estructura eficaz necesaria para desencadenar las respuestas clásicas corresponde a la del nonapéptido.

Las cininas tienen una existencia brevísima y su vida media en el plasma es sólo de unos 15 segundos. Aún más, en un solo paso por el lecho vascular pulmonar pueden destruirse 80 a 90% de las cininas. En la circulación se identifican únicamente concentraciones picomolares. La principal enzima catabolizante en pulmón y otros lechos vasculares es una dipeptidilcarboxipeptidasa, conocida en esta situación como cininasa II y en otros como enzima convertidora de angiotensina. La separación del dipéptido en la terminación carboxilo anula la actividad cininiforme. La arginina carboxipeptidasa, otra enzima de acción lenta (carboxipeptidasa-N; cininasa I), separa el residuo de arginina en la terminación carboxilo y así genera des-Arg-bradiquinina y des-Arg-calidina, que por sí mismas son potentes agonistas de receptores de cinina



B₁. Se ha descrito una deficiencia de carboxipeptidasa-N de tipo familiar; las personas con valores bajos de la enzima presentan angioedema o urticaria.

2.4 Receptores de bradiquinina

Se conocen como mínimo dos receptores diferentes de cininas que han sido llamados B₁ y B₂. El receptor clásico, llamado ahora B₂, liga selectivamente bradiquinina y calidina (Tabla 2.1) y es un constitutivo de casi todos los tejidos normales. Los receptores B₂ median la mayor parte de los efectos de la bradiquinina y calidina, en ausencia de inflamación. El receptor B₁ se liga de modo selectivo a los metabolitos des-Arg en la terminación carboxi, de la bradiquinina y calidina y es menor su número que el del receptor B₂ en casi todos los tejidos. Los receptores B₁ están en el músculo liso normal de vasos; son regulados en forma aditiva por la inflamación. Durante situaciones de estrés, como traumatismo, presión tisular o inflamación, pueden predominar los efectos en receptores B₁. Los mecanismos de envío de señales de dichas estructuras no se han definido con la precisión que se ha obtenido con los receptores B₂.

El receptor B₂ se acopla a proteínas G y activa a las fosfolipasas A₂ y C. La activación de la fosfolipasa C inducida por cinina hace que aumente IP₃ (y con ello el calcio citosólico) y el diacilglicol (y con ello la actividad de proteincinasa C). Se ha demostrado que la bradiquinina activa a la proteincinasa C que depende de calcio y a la que no depende de este ion, así como a las isoformas atípicas. La estimulación de la fosfolipasa A₂ libera ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana. El ácido



araquidónico liberado puede ser metabolizado a la forma de mediadores inflamatorios potentes.

Se ha sugerido la existencia del receptor B_3 con base en la broncoconstricción de la tráquea de cobayos inducida por cinina. Además también se ha propuesto la presencia de receptores B_4 y B_5 en las células de músculo liso de esófago de zarigüeya. Sin embargo, datos recientes obtenidos con antagonistas de cinina más potentes no han corroborado la existencia de ninguno de los tres receptores mencionados. Los estudios recientes indican que la broncoconstricción en el cobayo, que al parecer sería un efecto del receptor B_3 , en realidad puede representar funciones no identificadas del receptor B_2 .

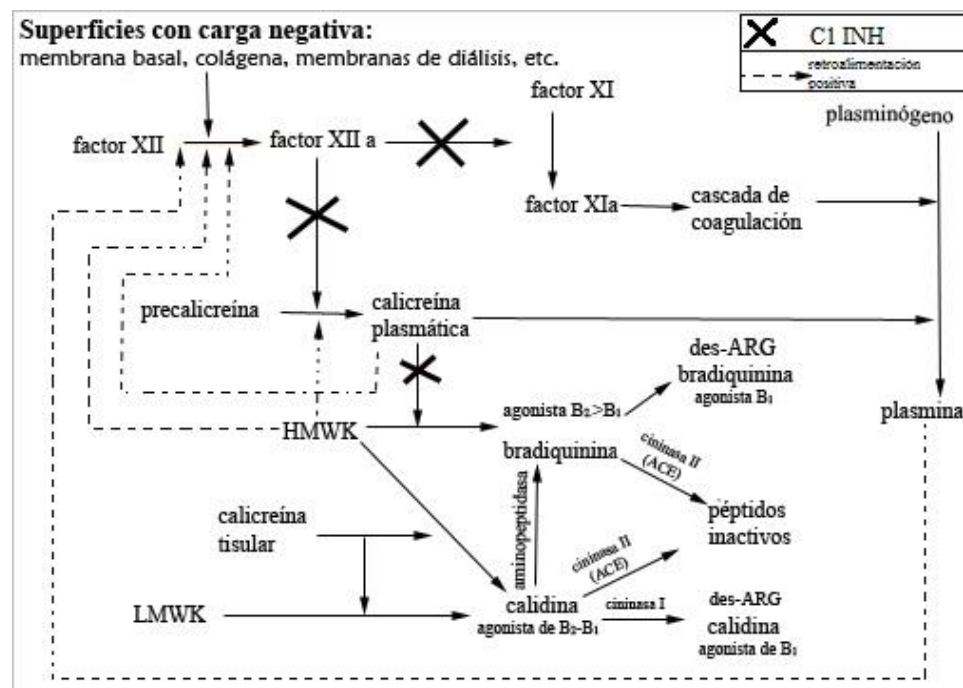


Figura 2.1 Esquema de la producción y catabolismo de la cinina



La bradiquinina y la calidina son formadas por las calicreínas. En seres humanos, se han identificado dos calicreínas que son la plasmática y la tisular. Adviértase la relación entre el sistema cininógenos de alto peso molecular (HMWK), son esenciales en la activación del factor XII (de Hageman) y su función, y por ello constituyen factores de coagulación. Obsérvese que la calicreína plasmática y el factor XII se activan de manera recíproca. Las líneas de guiones señalan “asas” de retroalimentación positiva. La conversión de HMWK a bradiquinina por acción de calicreína plasmática en realidad incluye tres fases seriadas.

El esquema indica los efectos “restrictivos” del inhibidor de complemento, que el inhibidor de la esterasa de C1 (C1 INH, “X”). En algunos de los mismos sitios, actúan otros inhibidores de proteinasas plasmáticas como plasmina, α_2 -macroglobulina y α_1 -antitripsina. Además de ser el inhibidor primario de la calicreína plasmática, el C1 INH inhibe al factor XIIa.

La bradiquinina y la calicreína son transformadas a sus metabolitos respectivos des-Arg por la cininasa I. A diferencia de los compuestos originales, estas cininas son ligandos potentes de receptores cinínicos B_1 , pero no de los B_2 . Los metabolitos des-Arg tienen mayor importancia durante la inflamación en que hay regulación aditiva de receptores B_1 . La bradiquinina y la calicreína son inactivadas por la cininasa II conocida también como enzima convertidora de angiotensina (ACE).



2.5 Funciones y propiedades farmacológicas de las calicreínas y las cininas.

Los antagonistas de bradiquinina, más nuevos y específicos, han permitido obtener mayores conocimientos de las acciones de las cininas. Ha surgido interés por la intervención de dichos compuestos en fenómenos como dolor, inflamación y enfermedades inflamatorias crónicas, en el aparato cardiovascular y en el de reproducción. Se ha originado un gran interés clínico por los efectos de las cininas, porque la enzima convertidora de angiotensina contribuye a la degradación de bradiquinina. Los inhibidores de ACE incrementan los valores de bradiquinina, lo cual puede explicar algunos de los efectos adversos de los inhibidores de la enzima convertidora.

Las cininas son potentes algésicos que ocasionan dolor ardoroso e intenso si se aplican a la base cruenta y al descubierto de una vesícula, y un dolor ardoroso y pulsátil en la mano si se inyectan en la arteria humeral. La bradiquinina estimula neuronas sensitivas primarias y hace que se liberen neuropéptidos como la sustancia P, la neurocinina A y el péptido producido por el gen de calcitonina. En el dolor agudo, los receptores B_2 median la algesia por bradiquinina; dicho dolor disminuye notablemente por acción de los antagonistas de B_2 , pero no por la de los B_1 . El dolor de la inflamación crónica entraña la participación de un número mayor de receptores B_1 .

Las cininas inyectadas semejan un cuadro inflamatorio. La medición de los componentes de la cascada de cinina y los efectos de antagonistas de bradiquinina señalan que la primera participa en diversas enfermedades inflamatorias. Las cininas plasmáticas intensifican la permeabilidad en la microcirculación. El efecto, similar al



observado con la histamina y la serotonina en algunas especies, ocurre en las venas finas y entraña la separación de las uniones entre células endoteliales. Lo anterior, aunado a un mayor gradiente de presión hidrostática genera edema, y este último acoplado a la estimulación de las terminaciones nerviosas origina una respuesta ‘de roncha y eritema’ a las inyecciones intradérmicas en seres humanos. Los receptores B_1 en células de inflamación como los macrófagos, puede desencadenar la producción de los mediadores inflamatorios IL-1 y el factor α de necrosis tumoral (TNF- α).

En diversos cuadros inflamatorios crónicos, se han detectado mayores concentraciones de cininas; entre ellos están rinitis causada por la inhalación de antígenos y la que surge con infección por rinovirus. Se forma bradiquinina y se agotan los componentes de la cascada de cinina durante crisis de hinchazón, edema laríngeo y dolor abdominal en el angioedema hereditario. Las cininas también pueden intervenir en forma importante en cuadros como gota, coagulación intravascular diseminada, enteropatías inflamatorias, artritis reumatoide y asma. Los compuestos mencionados también contribuyen a los cambios en huesos que se advierten en estados inflamatorios crónicos. Las cininas estimulan la resorción ósea a través de los receptores B_1 y quizá B_2 , tal vez por una activación de osteoclastos mediada por osteoblastos.

Algunos pacientes que han recibido inhibidores de ACE han mostrado angioedema y urticaria; ambos signos pueden surgir en cualquier momento después de iniciar el tratamiento, pero hay mayor probabilidad de que aparezcan en término de una semana de haber recibido por primera vez el fármaco. Se trata del clásico efecto de los



inhibidores de ACE y, según se piensa, éste proviene de la inhibición del metabolismo de cinina por parte de ACE. Un efecto adverso más común de los inhibidores de ACE (en mujeres particularmente) es la tos crónica no productiva que desaparece cuando se interrumpe la administración del inhibidor mencionado es un punto de controversia, pero la acumulación de cininas tal vez participe en este efecto indeseable.

La intervención de las cininas en la inflamación y permeabilidad vascular constituye un aspecto importante en la fisiopatología de neumopatías como el asma. La inhalación o la inyección intravenosa de cininas causan broncospasmo en asmáticos, pero no en sujetos normales; dicha broncoconstricción es bloqueada por compuestos anticolinérgicos más no por antihistamínicos ni por inhibidores de la ciclooxigenasa. La inhalación repetida de bradiquinina atenúa la respuesta, y aplaca la broncoconstricción en reacción a la bradiquinina y también en respuesta a la adenosina 5' monofosfato.

Las cininas plasmáticas son vasodilatadores cuya potencia es unas 10 veces mayor que la de la histamina. Inyectadas por la vena ocasionan hiperemia en la zona con mayor riego y una cefalalgia pulsátil. También dilatan otros lechos viscerales, corazón y riñones. Algunos de los efectos directos de la cinina pueden ser complementados por la capacidad de estas sustancias para estimular la liberación de histamina y otros metabolitos vasoactivos de las células cebadas. La vasodilatación sistémica inducida por cinina hace que disminuyan netamente las presiones sistólica y diastólica, fenómeno mediado por el óxido nítrico originado por células endoteliales. A diferencia de ello, la bradiquinina puede causar vasoconstricción directa en vasos con lesión endotelial.



El goteo intravenoso de cininas produce siempre efectos vasodepresores en seres humanos normales y en modelos animales. Se han obtenido resultados antagónicos en algunos estudios, pero los antagonistas de cinina ejercen efectos mínimos en animales normales. A diferencia de lo comentado, en presencia de compuestos opresores, los antagonistas de cinina hacen que aumente en grado notable la presión arterial. Por tal motivo, con base en los datos señalados y otras observaciones, las cininas tal vez intervengan muy poco en la regulación de la presión arterial en personas normales, mas tienen una evidente función reguladora de la vasodepresión en estados hipertensivos como los causados por el exceso de mineralocorticoides e hipertensión renovascular.

Las cininas también pueden incrementar las eferencias simpáticas por medio de mecanismos de los sistemas nervioso central y periférico. Los datos anteriores sugieren que las cininas pueden mediar la hipertensión, en algunas circunstancias, a través del sistema nervioso simpático aunque es solo un planteamiento teórico.

Los inhibidores de ACE aumentan los valores de cininas en tejidos y plasma; algunos de los efectos beneficiosos de dichos compuestos en el corazón tal vez se encuentren mediados por mayores concentraciones de cininas cardiacas producidas en forma local. Algunas investigaciones han demostrado que los antagonistas de cinina antagonizan los beneficios del inhibidor de Schwieler-ACE, como la disminución de la hipertrofia ventricular izquierda y la isquemia cardiaca, pero no se ha definido la intervención exacta de las cininas en esta área.



Las cininas regulan el volumen y la composición de la orina. Intensifican la corriente sanguínea por riñones y también el transporte electrógeno de cloruro en el conducto colector, al estimular receptores en la superficie basolateral del túbulo renal. Los antagonistas de cinina B_2 disminuyen los efectos diuréticos de la furosemida y también los inhibidores de ACE en la excreción de agua y sodio. En estados hipertensivos, las cininas quizá generen una acción más notable. Además, la aldosterona aumenta las concentraciones tisulares de calicreína renal.

Las reacciones anafilactoides en sujetos sometidos a hemodiálisis en que se usan las membranas AN69 de poliacrilonitrilo pueden ser consecuencia de la vasodilatación y el angioedema inducidos por cinina. En tales pacientes, las cininas son generadas por el factor XII activado por las superficies de la membrana AN69 con carga negativa. Muchos de los sujetos que presentaron la respuesta anafilactoide también recibían inhibidores de ACE, lo cual disminuyó su capacidad de degradar cininas.

El útero de rata es especialmente sensible a contraerse por acción de las cininas, por intervención del receptor B_2 . Las cininas también actúan en el sistema reproductor del varón en funciones como espermatogénesis y para estimular la movilidad de espermatozoides, quizá por medio del receptor B_2 en la membrana de dicha célula. Las cininas estimulan la dilatación de la arteria pulmonar fetal, el cierre del conducto arterioso y la constricción de los vasos umbilicales, fenómenos que ocurren en la fase de ajuste de la circulación fetal a la neonatal.



El sistema de calicreína-cinina actúa también en muy diversas funciones corporales y sirve como mediador en la formación de edema y en la contracción del músculo liso. La contracción de aparición lenta, inducida por cinina, del íleon aislado del cobayo fue lo que originó el nombre de bradiquinina. Las cininas también tienen efectos neuroquímicos en SNC, además de su capacidad de transgredir la barrera hematoencefálica, y así penetrar a mayor profundidad en el sistema nervioso central.

2.6 Aplicaciones terapéuticas potenciales

Se han obtenido datos preliminares de los posibles usos de cininas en cuadros como la infertilidad del varón por astenozoospermia y oligospermia. También las sustancias en cuestión quizá sean eficaces para incrementar la penetración de compuestos quimioterápicos antineoplásicos, a través de la barrera hematoencefálica.

Los inhibidores endógenos de las calicreínas (proteínas plasmáticas) incluyen aprotinina, el inhibidor de la esterasa C_1 y de la α_2 -macroglobulina. Se han obtenido inhibidores péptidos de la calicreína como posibles compuestos terapéuticos, pero se han hecho progresos más firmes en la síntesis de antagonistas selectivos de las cininas.

Los inhibidores de calicreína han sido estudiados para usarlos como fármacos terapéuticos en cuadros como pancreatitis aguda, sepsis, síndrome carcinoide y edema cerebral. Hasta la fecha, casi todas las investigaciones se han efectuado en modelos animales y hay escasa o nula experiencia en seres humanos.



2.7 Antagonistas de receptores

Los primeros antagonistas de cinina fueron agonistas parciales y su vida media fue breve por degradación enzimática in vivo. En los comienzos del decenio de 1990, se sintetizaron antagonistas de cinina más selectivos y de acción más larga al sustituir aminoácidos sintéticos en posiciones clave (por ejemplo, HOE 140). También se han obtenido antagonistas de B₂ no péptidos como WIN 64338. Para fines experimentales, es posible contar con antagonistas con selectividad por el receptor de cinina B₁.

No se dispone de los antagonistas de cinina para administrar en seres humanos, y la posible utilidad de ellos aún se investiga en cuadros tan diversos como dolor, asma y otras enfermedades inflamatorias crónicas. Los efectos adversos en aparato cardiovascular y en otros sitios pueden limitar su utilidad. Los antagonistas antiguos, de existencia breve y no selectivos, han generado resultados ambiguos cuando han sido estudiados in vivo.

Los estudios iniciales con antagonistas de cinina no detectaron efecto significativo alguno en el tratamiento del choque, pero investigaciones más nuevas han descrito algún beneficio con ellos en el choque séptico y en la hipotensión inducida por pancreatitis. En estudios preliminares, también se ha señalado algún beneficio en broncoconstricción, inflamación, síntomas inducidos por rinovirus y dolor.

Se estudian también las acciones de los antagonistas naturales de los receptores de cininógeno. Los investigadores han observado que el veneno de la víbora brasileña de fosetas *Bothropsatrox* potencia a las cininas, y que algunos extractos vegetales usados en el tratamiento tradicional de las mordeduras de dichos



ofidios inhiben los efectos de las cininas. De los extractos vegetales mencionados, se han obtenidos esteroides glicólicos que poseen actividad como antagonistas de cinina.

2.8 Perspectivas

Los mejores conocimientos de las relaciones de estructura-función en los subtipos de receptores histamínicos han permitido la síntesis ininterrumpida de antagonistas con selectividad por H_2 para tratamiento de úlceras pépticas. La acumulación de mayores conocimientos sobre las acciones fisiológicas y fisiopatológicas de los subtipos de receptores H_3 en el sistema nervioso central y otros órganos permiten la obtención de sustancias terapéuticas nuevas y más selectivas.

Los descubrimientos recientes de la identidad de los receptores de cinina B_1 y B_2 y la intervención de los metabolitos de cinina como mediadores potentes de la inflamación y del dolor han constituido información importante, y con ella está dada la oportunidad de obtener nuevos fármacos para tratar cuadros inflamatorios crónicos. Están en fase de investigación nuevos compuestos peptídicos y no peptídicos.



Capítulo 3. Proceso Experimental

3.1 Sustancias y disoluciones a utilizar

- Resina RinkAmide: 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxy
- Diclorometano (DCM)
- Dimetilformamida (DMF)
- Piperidina al 25% (10ml de piperidina en 30ml de DMF)
- Diisopropilcarbodiimida (DIC)
- N-hydroxybenzotriazolhidratado (HOBt)
- Nitrógeno

Número	Aminoácido	Cantidad (g)
1	Arg	1.32
2	Phe	0.79
3	Pro	0.69
4	Ser	0.78
5	Phe	0.79
6	Gly	0.61
7	Pro	0.69
8	Pro	0.69
9	Arg	1.32

Tabla 3.1 Aminoácidos a utilizar y cantidades en gramos



3.2 Procedimiento

Se agregó 1g de la Resina RinkAmide a la columna y se agregó DCM hasta cubrir la resina. Se dejó reposar por 30 minutos, para que la resina se hinche, aumentando así la superficie de contacto y a la vez elimina impurezas. Después se eliminó el DCM por vacío.

Se agregó DMF hasta cubrir la resina y se agitó por 1min con N_2 para eliminar impurezas. Se eliminó la DMF por vacío. Se



Figura 3.1 Columna empacada con resina

agregó piperidina al 25% hasta cubrir la resina, agitando 5 minutos con N_2 para eliminar el grupo protector Fmoc de la resina, posteriormente se eliminó la piperidina por vacío

Se volvió a agregar piperidina al 25% agitando por 20min, esto logra una eliminación completa del grupo Fmoc. Durante este paso se fueron disolviendo los gramos del aminoácido correspondiente con 0.28g del activador HOBt en DMF hasta disolver, aproximadamente se utilizan 6ml de DMF por gramo de aminoácido.



Figura 3.2 Disolución del aminoácido



Se eliminó la piperidina al 25% por vacío y se lavó con DMF agitando con N_2 por un minuto. Repitiendo este paso 3 veces.

Se agregó el aminoácido disuelto en DMF a la resina y se agitó por 1 minuto.

Posteriormente se agregó 0.31ml de DIC. Se tapo y se dejó reaccionar por 2hrs con agitación continua con N_2 . La adición de este reactivo y del activador logra evitar reacciones secundarias y además se lleva a cabo más rápido la reacción.

Se eliminó el disolvente. Se lavó con DMF 3 veces por 1 minuto y se repitió desde el paso #6 hasta el último aminoácido, donde se lavó con DCM 3 veces por 1 minuto.



Figura 3.3 Aminoácidos utilizados



Figura 3.4 Producto resultante sin separar

Para la separación del péptido de la resina, se transfirió a un tubo de ensaye de 50 mL y se añadieron 7 ml de una disolución constituida por 90% de TFA, 4% de DODT, 2% de TIS y 4% de agua, y se agitó por 3 horas.

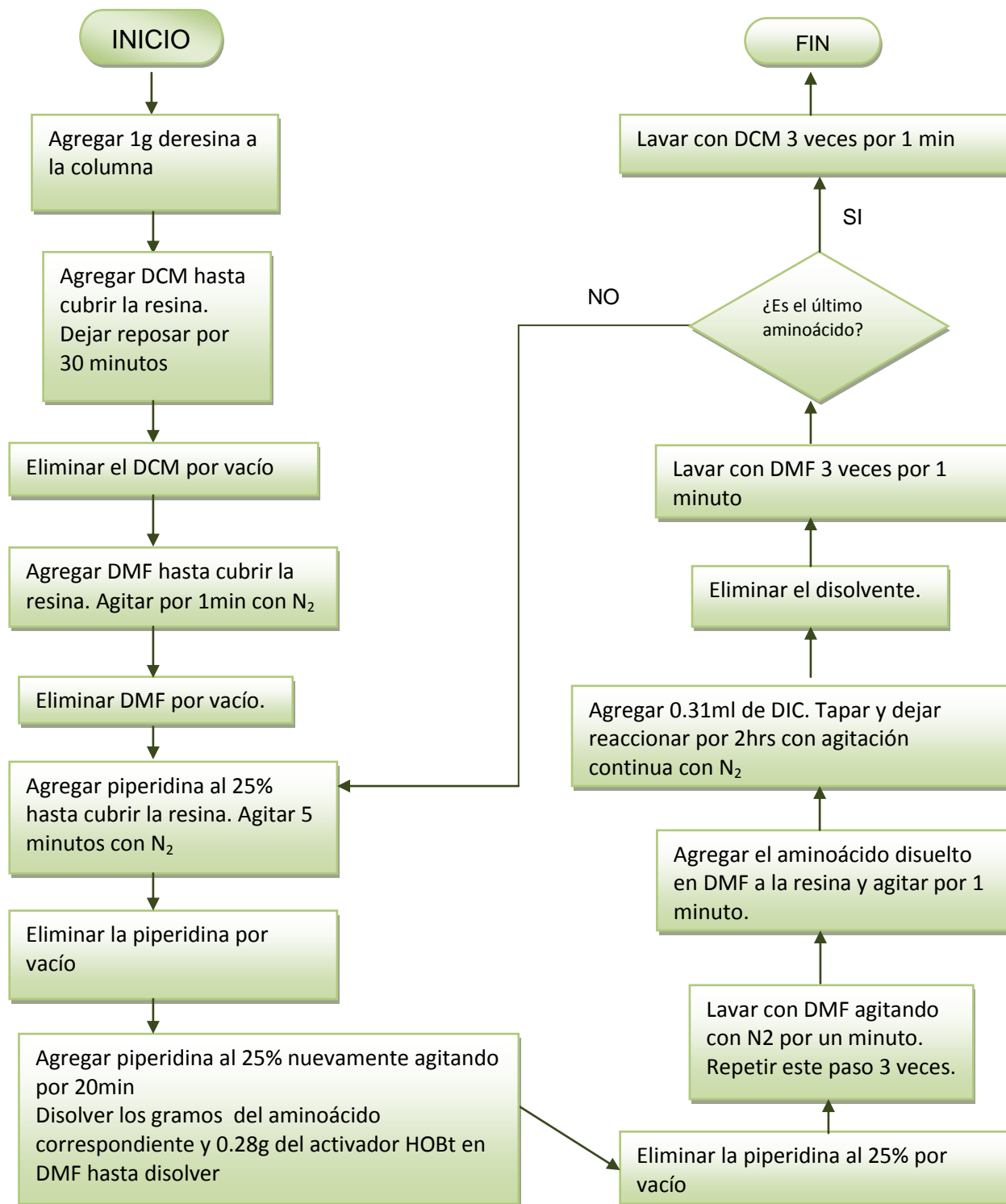


Se filtro la disolución y el péptido se precipitó adicionando 13 ml de una disolución de MTBE al 50% en éter de petróleo a -20°C . Se centrifugó y se decantó el líquido. El péptido se lavo tres veces por centrifugación y decantación utilizando cada vez 10 ml de la disolución mencionada de MTBE.

Se dejo secar al aire por 10 min y posteriormente se disolvió con 0.5 ml de acetonitrilo y 4ml de una disolución de acido acético al 10% en agua. La mezcla se enfrió utilizando una mezcla de acetona en hielo seco y se liofilizo, obteniéndose un sólido color blanco.

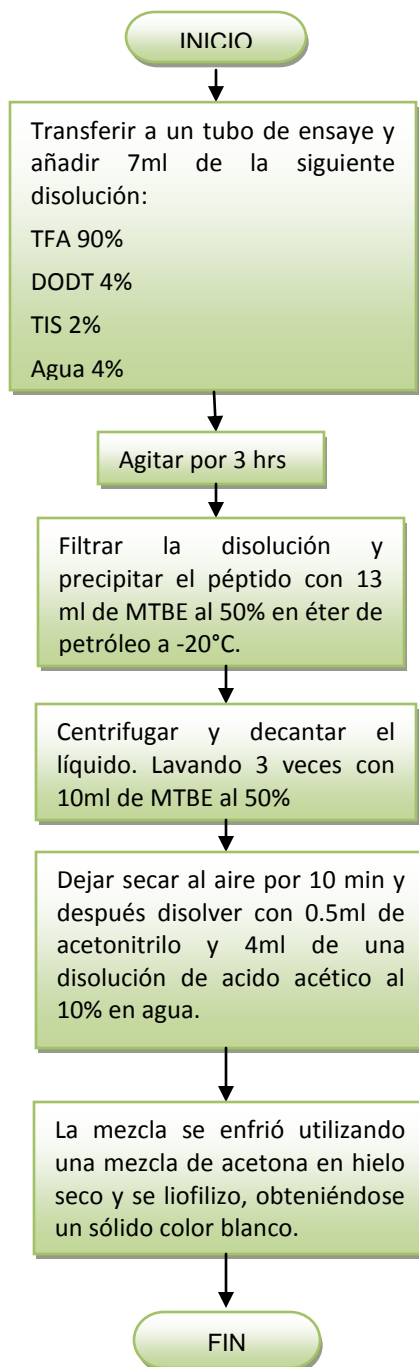


3.3 Diagrama de Flujo (Síntesis)





3.3 Diagrama de Flujo (Separación)





Capítulo 4. Discusión de Resultados

4.1 Resultados de Análisis por Espectrometría de Masas

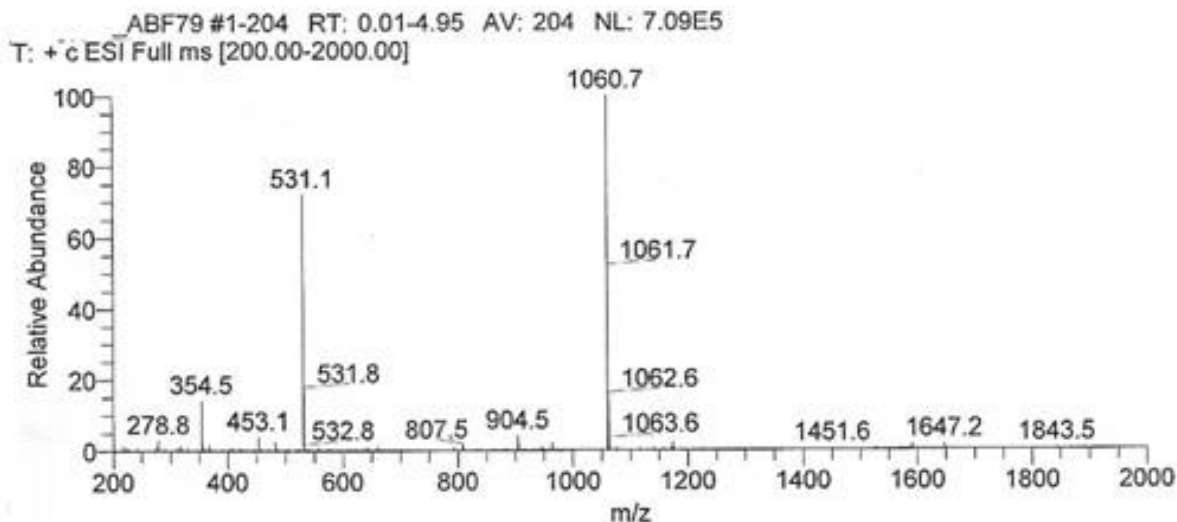


Fig. 4.1 Espectro de masas de bradiquinina

El peso molecular teórico de la bradiquinina es 1060.21 g/mol, el resultado de este análisis confirma que si se obtuvo el péptido ya que presenta un pico considerable en 1060.7.



4.2 Resultados de Análisis de Cromatografía de Líquidos a Alta Presión (HPLC)

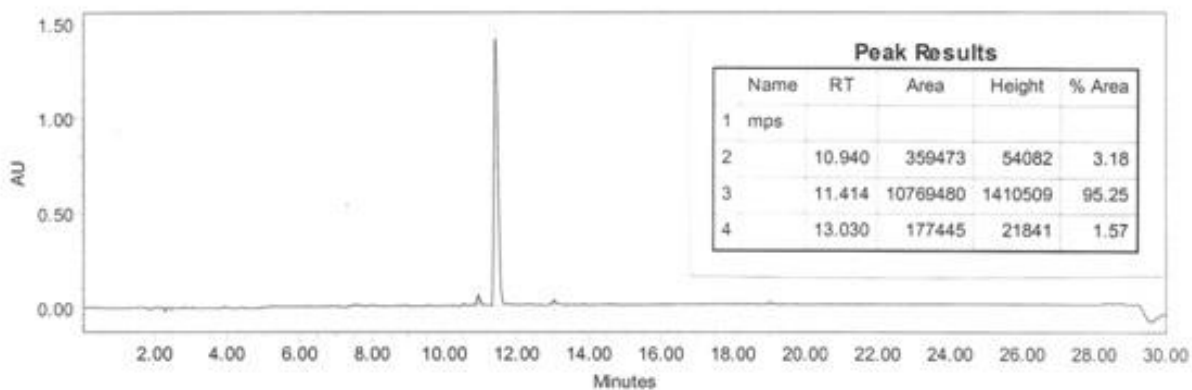


Fig. 4.2 Espectro de HPLC de bradiquinina

Este análisis permite ver el grado de pureza en que se obtuvo el péptido que fue de un 95.25%.



4.3 Resultados de Análisis de Espectroscopia Infrarrojo

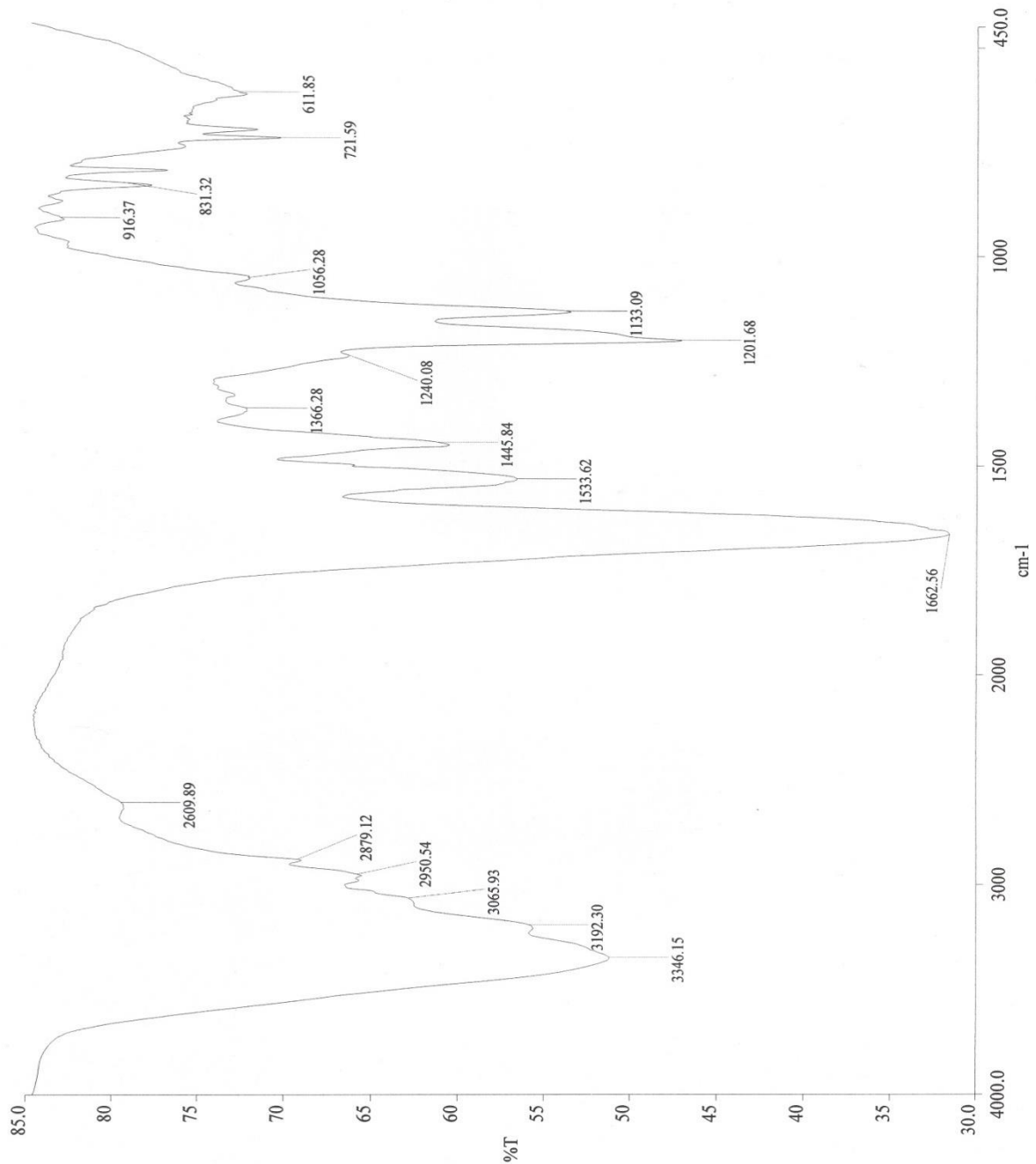


Fig. 4.3 Espectro Infrarrojo de la bradiquinina



Aminoácido	Vibración	Grupo Funcional o tipo de enlace	Frecuencia (cm ⁻¹)
Arginina	Tensión	N-H	3346.15 y 1533.66
	Flexión	N-H	721.59
	Tensión	C-N	1201.68
	Tensión	Imina	1662.56
Serina	Tensión	Alcohol (-OH)	3346.15
	Tensión	C-O	1133.09
	Tensión	C-O-H	1366.28
Prolina	Flexión	Amina secundaria (-NH-)	1533.62
Fenilalanina	Tensión	C=C aromático	1662 y 1445.84
	Flexión		800 y 831.32
Glicina	Tensión	N-H	1533.62
	Tensión	Acido carboxílico	2600 a 3000

Tabla 4.1 Explicación de los picos característicos de los grupos funcionales presentes en la bradiquinina

A continuación se detalla la explicación de los picos más representativos del espectro: Se observa el enlace N-H de Arginina en el pico más amplio entre 3500 y 3300 cm⁻¹. El pico en 1533.66cm⁻¹ indica la presencia de amina primaria junto con una señal de flexión fuera de plano en 721.59 cm⁻¹ y finalmente la interacción de tensión de C-N cm⁻¹ en 1201.68cm⁻¹. En cuanto a Serina, su grupo funcional que se busco es el de alcohol (-OH), por las interacciones entre todos los aminoácidos no se aprecia muy definida la señal característica de alcoholes sin embargo está presente en 3346.15cm⁻¹ y también se observa otro pico en 1133.09cm⁻¹ producto de la tensión del enlace C-O y por último se ve a interacción C-O-H en 1366.28cm⁻¹. A continuación se observo de prolina, la interacción característica de flexión de aminas secundarias en el pico que se encuentra a los 1533.62cm⁻¹. En cuanto a fenilalanina se encontraron señales típicas de compuestos aromáticos, por ejemplo el enlace C=C aromático en 1662 y 1445.84cm⁻¹ y después se aprecian 2 picos entre 800 y 831.32 cm⁻¹ indicando la presencia de un anillo aromático monosustituido, el patrón común de este tipo de molécula que se encuentra entre 1600 y 2000cm⁻¹, no se aprecia, pero tampoco se ve en el espectro que se saco de la base de datos. Para glicina se buscaron interacciones típicas de aminas y ácidos carboxílicos y si están presentes, pero más que nada se comparo con el espectro de la base de datos para encontrar similitudes y confirmar que existe glicina en el péptido.



Capítulo 5. Conclusiones

El objetivo del experimento resulto satisfactorio pues la resina utilizada dio resultados muy positivos comprobando así que el método utilizado para la síntesis es muy optimo para este tipo de péptidos ya que el resultado del espectro de masas nos indica que se obtuvo un compuesto con el mismo peso molecular del que se esperaba al igual que es muy efectivo para su separación ya que dio un grado de pureza del 95%. Al hacer el análisis y traducción del espectro infrarrojo se encontraron los grupos funcionales de los aminoácidos utilizados.

Los resultados obtenidos en este proyecto son de gran utilidad para diseñar y sintetizar péptidos que sean usados como nuevos fármacos antihistamínicos y se conviertan en una alternativa para combatir los efectos adversos que conllevan los tratamientos actuales.



Capítulo 6. Bibliografía

1. Alonso, V. B. (2003). "Utilidad de los antagonistas de los receptores de angiotensina II en la insuficiencia cardíaca."
2. Bas M, Adams V, Suvorava T, Niehues T, Hoffmann TK, Kojda G (Agosto 2007). "Nonallergic angioedema: role of bradykinin"
3. Chan, W. C., & White (2000). "Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach."
4. Chuang, H. H., Prescott, E. D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S. E., Basbaum, A. I. & Julius, D. (2001). "Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns (4, 5) P2-mediated inhibition."
5. Dendorfer A, Wolfrum S, Wagemann M, Qadri F, Dominiak P. (2001). "Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats".
6. E Silva, M. R., Beraldo, W. T., & Rosenfeld, G. (1949). "Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin".
7. Fields, G. B., & Noble, R. L. (1990). "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. International journal of peptide and protein research"
8. Flórez J. Histamina, G. J. (1992). "Bradiquinina, 5-hidroxitriptamina y sus antagonistas."
9. Fuller, R. W., Dixon, C. M., Cuss, F. M., & Barnes, P. J. (1987). "Bradykinin-induced bronchoconstriction in humans. Mode of action."
10. King, D. S., Fields, C. G., & Fields, G. B. (1990). "A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. International journal of peptide and protein research"
11. Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, Kokkonen JO (Abril 2000). "Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma".
12. Merrifield, R. B. (1963). "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide"



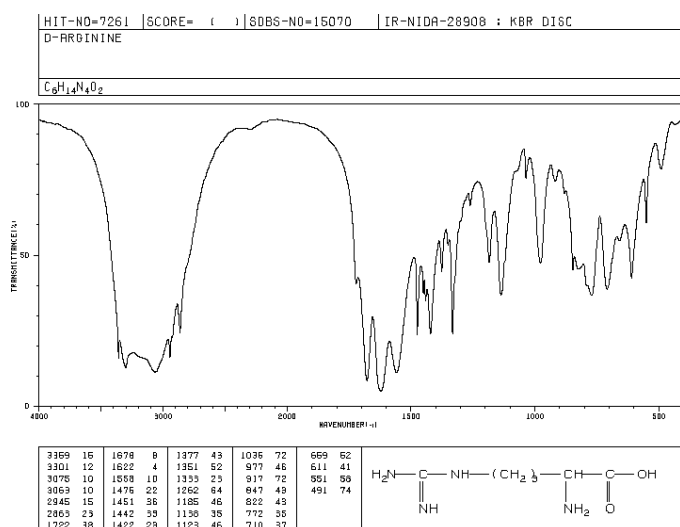
13. Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG (Junio 1994). "Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling"
14. Rabelo, E. R., Rohde, L. E., Schaan, B. D., Rubira, M. C., Ruschel, K. B., Plentz, R. D. & Moreno Junior, H. (2008). "Bradiquinina o acetilcolina como vasodilatadores para evaluar la función endotelial venosa en sujetos sanos"
15. Regoli, D., & Barabe, J. (1980). "Pharmacology of bradykinin and related kinins"
16. Reyes, O., Figueroa, I., Garay, H. E., Gonzalez, L. J., & Cruz, L. J. (1996). "Síntesis en fase sólida de un péptido fluoresceinado para la determinación cualitativa de proteasas"
17. Rivero, I. A., González, T., & Basterrechea, M. (2004). "Síntesis en paralelo de decapeptidos en fase sólida y sus afinidades a cationes de interés biológico".
18. Schnölzer, Alewood P., Jones, A., Alewood, D., & Kent S. B. (1992). "In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis."
19. Stewart, J. M., & Young, J. D. (1984). "Solid phase peptide synthesis" (Vol. 107).
20. Vázquez Vigoa, A., Cruz Álvarez, N., González Del Valle, Z., & Vázquez Cruz, A. (1998). "Antagonistas de los receptores de angiotensina II"



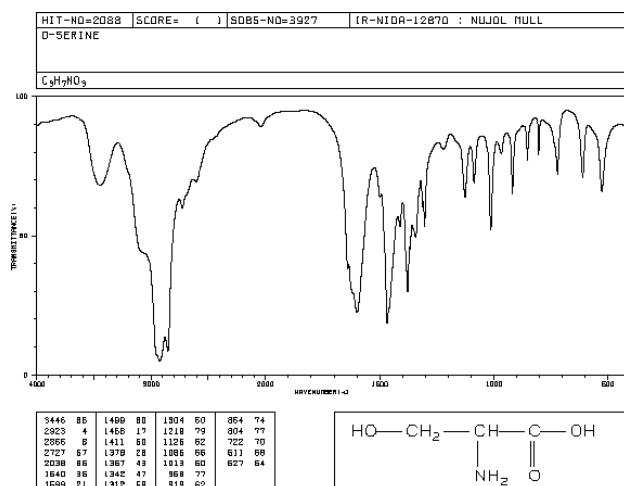
Capítulo 7. Anexos

7.1 Espectros Infrarrojo de los aminoácidos presentes en el péptido de la base de datos con estructuras

Arginina

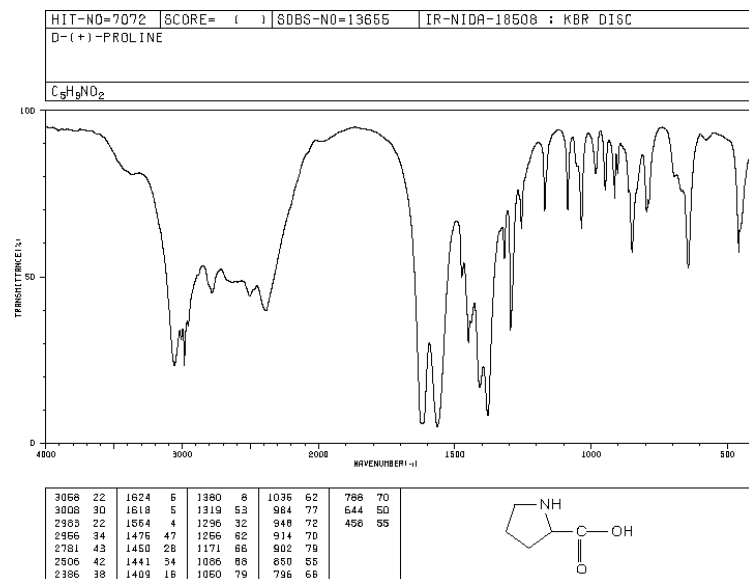


Serina

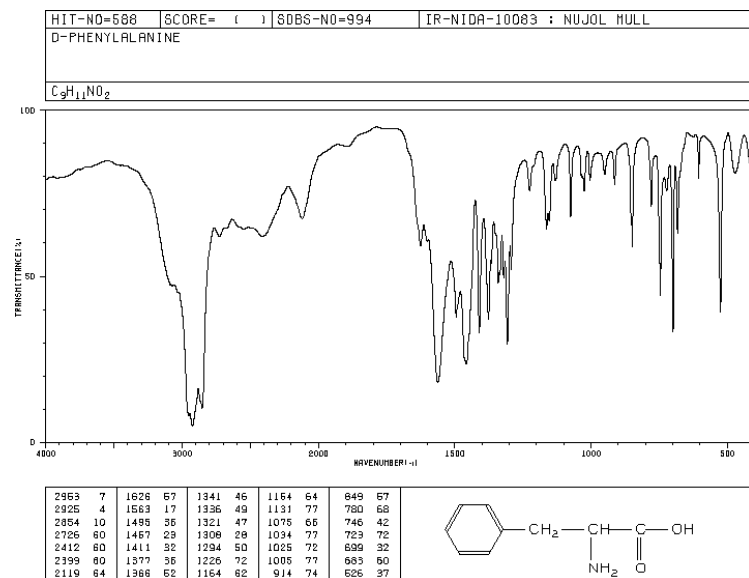




Prolina

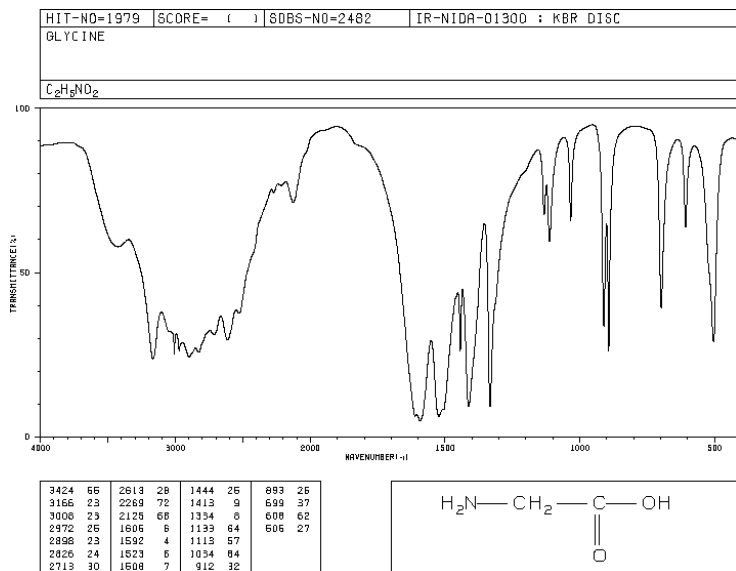


Fenilalanina



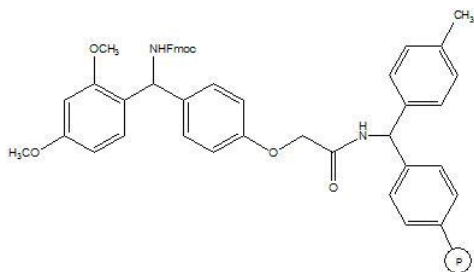


Glicina

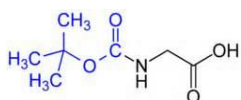


7.2 Estructuras de los compuestos utilizados en el procedimiento

Resina RinkAmide



Grupo Fmoc

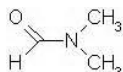




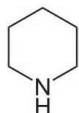
Diclorometano



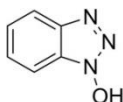
Dimetilformamida



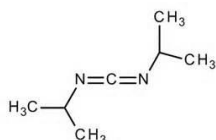
Piperidina



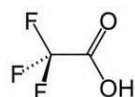
H-hidroxi-benzotriazol



Diisopropilcarbodiimida



Acido Trifluoroacetico

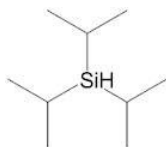




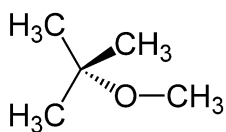
3,6-dioxa-1,8-octanoditiol



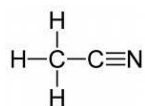
Triisopropilsilano



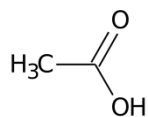
Eter metil terbutílico



Acetonitrilo



Acido acético



Acetona

