



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS, S. C.**

**POSGRADO**

**Modelado Molecular de la funcionalización de nanodiamantes con  
Tamoxifeno dirigido a receptores del cáncer mamario.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Presenta:**

M.C. Linda Lucila Lucero Landeros Martinez.

**Asesor:**

Dra. Norma Rosario Flores Holguín.

**CHIHUAHUA, CHIH.**

**Agosto, 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi esposo David Alejandro Pérez Vega por todo su amor y apoyo, a mi hijo Darren Armando Pérez Landeros por ser el angelito que me impulsaba día a día con sus sonrisas y abrazos dándome la fortaleza para poder culminar esta trayectoria.

A mi familia por confiar en mí y por todos sus apapachos los amo.

A mis compañeros de laboratorio los ya doctores Kathy, Nora, Jesús y Rody por todo lo que aprendí de todos ustedes y por esos excelentes momentos que pasamos juntos.

A la Dra. Norma Flores por todo su conocimiento y apoyo brindado a lo largo de mi doctorado.

A Conacyt por todo el apoyo económico que me brindo para realizar mis estudios de doctorado.

## INDICE

AGRADECIMIENTOS .....	ii
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT .....	3
III. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 Justificación .....	7
3.2 Hipótesis .....	7
3.3 Objetivo General .....	7
3.5 Objetivos Particulares .....	8
IV. ANTECEDENTES .....	9
V. MARCO TEÓRICO.....	12
5.1 Cáncer mamario.....	12
5.2 Tamoxifeno.....	13
5.2.1 Metabolismo del Tamoxifeno. ....	13
5.3 RGD y NGR.....	15
5.3.1 Arginina-Glicina-Ácido Aspartico (RGD). ....	15
5.3.2 Asparagina-Glicina-Arginina (NGR). ....	16
5.4 Nanodiamantes y su funcionalización. ....	17
5.5 Receptores Hormonales.....	18
5.5.1 Receptor de Estrógeno.....	18
5.5.2 Receptor de Progesterona.....	19
5.6 Química computacional.....	20
5.6.1 Métodos de mecánica molecular.....	21
5.6.2 Acoplamiento molecular.....	21
5.7 Métodos de Mecánica cuántica.....	22
5.7.1 Ecuación de Schrödinger .....	22
5.8 Teoría del Funcional de la Densidad.....	22
5.8.1 Funcionales de la densidad. ....	23
5.8.2 Conjuntos de Base.....	24
5.9 Propiedades .....	24
5.9.1 Optimización de geometrías. ....	24

5.9.2 Frecuencias moleculares.....	25
5.9.3 Índices de Reactividad.....	25
5.10 Índices de Fukui.....	27
5.11 Descriptores de transferencia de carga.....	28
VI. MATERIALES Y METODOS.....	29
6.1 Equipo y programa.....	29
6.2 Moléculas analizadas.....	29
6.3 Detalles Computacionales.....	31
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
7.1 Tamoxifeno.....	34
7.1.1 Análisis estructural.....	34
7.1.2 Zonas de ataque electrofílico del Tamoxifeno.....	34
7.1.3 Densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO del Tamoxifeno.....	35
7.1.4 Cálculo de parámetros de reactividad del Tamoxifeno.....	36
7.2 RGD y NGR.....	37
7.2.1 Análisis estructural del RGD y NGR.....	37
7.2.2 Zonas de ataque nucleofílico y electrofílico del RGD y NGR.....	38
7.2.3 Densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO del RGD y NGR.....	39
7.2.4 Cálculo de parámetros de reactividad del RGD y NGR.....	40
7.3. Complejo RGD-TAM-y NGR-TAM.....	41
7.3.1 Análisis estructural del RGD-TAM y NGR-TAM.....	41
7.3.2 Reactividad del complejo RGD-TAM y NGR-TAM.....	41
7.3.3 Densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO del complejo RGD-TAM y NGR-TAM.....	43
7.4. Nanodiamante.....	45
7.4.1 Análisis estructural del nanodiamante.....	45
7.4.2 Determinación de la distancia óptima del complejo ND-TAM.....	46
7.5. Complejo ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR.....	47
7.5.1 Análisis estructural del complejo ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR.....	47
7.5.2 Densidad electrónica de orbitales HOMO y LUMO en los complejos ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR.....	47

7.5.3	Parámetros de reactividad en el complejo ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR.....	49
7.6.	Análisis del Receptor de estrógeno con el Tamoxifeno y sus metabolitos. .	49
7.6.1	Acoplamiento molecular.....	49
7.6.2	Descripción del sitio activo.....	51
7.6.3	Reactividad química del sitio activo .....	52
7.6.4	Descriptor de transferencia de carga.....	54
7.6.5	Puentes de hidrógeno.....	56
7.7.	Análisis del Receptor de progesterona con el Tamoxifeno y sus metabolitos. .....	57
7.7.1	Acoplamiento molecular.....	57
7.7.2	Descripción del sitio activo.....	59
7.7.3	Reactividad química.....	60
7.7.4	Descriptor de transferencia de carga.....	62
7.7.5.	Puentes de hidrógeno.....	64
7.8.	Propuestas de esterificación.....	64
7.8.1.	Análisis estructural.....	65
7.8.2.	Reactividad de los nanodiamantes esterificados.....	65
7.8.3.	Determinación de la distancia optima del complejo NDESTERIFICADO-TAM. .....	66
7.8.4.	Determinación de los puentes de hidrógeno en el complejo ND <sub>ESTERIFICADO</sub> -TAM.....	67
7.8.5.	Reactividad química del complejo ND <sub>ESTERIFICADO</sub> -TAM.....	68
VIII.	CONCLUSIONES .....	69
IX.	PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....	70
X.	PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	73
XI.	LITERATURA CITADA.....	74
XII.	ANEXOS .....	82
12.1.	Artículos Publicados.....	82

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fármaco Tamoxifeno. ....	13
Figura 2. Estructura química del Tamoxifeno y sus diferentes metabolitos. ....	14
Figura 3. Estructura química del tripéptido RGD. ....	16
Figura 4. Estructura química del tripéptido NGR. ....	16
Figura 5. Receptor de Estrógeno. ....	19
Figura 6. Receptor de progesterona. ....	20
Figura 7. Acoplamiento molecular. ....	22
Figura 8. Diagrama de flujo del modelado aplicado al Tamoxifeno, ácido láctico, nanodiamante, metabolitos y residuos del sitio activo. ....	31
Figura 9. Diagrama de flujo del análisis de distancia de equilibrio en el complejo. ....	31
Figura 10. Diagrama de flujo del análisis de acoplamientos moleculares fármaco, metabolitos con los receptores hormonales. ....	32
Figura 11. Grupos funcionales hidrofóbicos e hidrofílicos del Tamoxifeno. ....	33
Figura 12. Sitio de ataque electrofílico del Tamoxifeno. ....	35
Figura 13. Topologías de los orbitales moleculares de frontera (HOMO y LUMO) del fármaco TAM Isovalor 0.02. ....	36
Figura 14. Estructura optimizada a) del RGD y b) del NGR. ....	37
Figura 15. Sitios de ataque nucleofílico y electrofílico a) del RGD y b) del NGR. ....	38
Figura 16. Topologías de los orbitales moleculares de frontera (HOMO y LUMO) a) del RGD y b) del NGR con un Isovalor 0.02. ....	39
Figura 17. Reactividad intrínseca y cruzada en los complejos a) RGD-TAM y b) NGR-TAM. ....	42
Figura 18. Topologías de los orbitales moleculares de frontera (HOMO y LUMO) de los complejos a) del RGD-TAM y b) del NGR-TAM con un Isovalor 0.02. ....	44
Figura 19. Estructura optimizada, (a) nanodiamante, (b) nanodiamante con grupos funcionales carboxilos. ....	45
Figura 20. Reacción de esterificación ND-COOH con el ácido láctico. ....	46
Figura 21. A) Distancia de equilibrio, b) Enlaces de puentes de hidrógeno en el complejo ND-TAM. ....	47
Figura 22. Topologías de los orbitales moleculares de frontera (HOMO y LUMO) de los complejos ND-TAM- RGD y ND-TAM- NGR con un Isovalor 0.02. ....	48
Figura 23. Las mejores posiciones de acoplamiento, energía de enlace y estructura esquemática del sitio activo del A) Tamoxifeno, B) NDTAM, C) 4OHTAM y D) END con el receptor de estrógeno. ....	50
Figura 24. Puentes de hidrógeno en A) Tamoxifeno, B) NDTAM, C) 4OHTAM y D) END con el receptor de estrógeno. ....	57

Figura 25. Las mejores posiciones de acoplamiento, energía de enlace y estructura esquemática del sitio activo del A) Tamoxifeno, B) NDTAM, C) 4OHTAM y D) END con el receptor de progesterona. ....	58
Figura 26. Puente de hidrógeno A) Tamoxifeno con los residuos Leu 718- Asn 719 y B) en NDTAM con el residuo Asp 719 con el receptor de progesterona. ....	64
Figura 27. Estructuras optimizadas de los vehículos acarreadores a) ND <sub>2HP</sub> , b) ND <sub>PGA</sub> , c) ND <sub>PEG</sub> .....	65
Figura 28. Coordenadas de la distancia de equilibrio a) ND <sub>2HP</sub> -TAM en los átomos H <sub>362</sub> -O <sub>364</sub> , b) ND <sub>PGA</sub> -TAM en los átomos O <sub>359</sub> -C <sub>361</sub> y c) ND <sub>PEG</sub> -TAM en los átomos H <sub>367</sub> -C <sub>369</sub> . ....	67

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación del espectro IR teórico con el espectro FT-IR del Tamoxifeno experimental. ....	34
Tabla 2. Parámetros de reactividad del Tamoxifeno calculados con M06/6-31G(d). ....	37
Tabla 3. Parámetros de reactividad de los péptidos RGD y NGR calculados con M06/6-31G(d) con el método de solvatación CPCM, utilizando DFT. ....	40
Tabla 4. Parámetros de reactividad de los complejos TAM-RGD y TAM-NGR calculados con M06/6-31G(d). ....	43
Tabla 5. Parámetros de reactividad de los complejos ND-TAM-RGD, ND-TAM-NGR y ND-TAM calculados con M06/6-31G (d) con el método de solvatación CPCM.....	49
Tabla 7. Parámetros de reactividad del sitio activo del receptor d estrógeno con el fármaco Tamoxifeno y sus metabolitos. ....	53
Tabla 8. Transferencia de carga entre el Tamoxifeno y los metabolitos y los residuos del receptor de estrógeno con su identificación de secuencia. ....	55
Tabla 10. Parámetros de reactividad del sitio activo del receptor de progesterona con el fármaco Tamoxifeno y sus metabolitos.....	61
Tabla 11. Transferencia de carga entre los metabolitos y los residuos del receptor de progesterona. ....	62
Tabla 12. Parámetros de reactividad de los nanodiamantes esterificados.....	66
Tabla 13. Puentes de hidrógeno en complejos NDEsterificado-TAM.....	68
Tabla 14. Parámetros de reactividad de los complejos. ....	68

## I. RESUMEN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de mama ocupa las mayores incidencias de las neoplasias malignas en las mujeres que representan el 11.34% de todos los casos de cáncer y tiene un incremento global del 1.5% anual. Además la incidencia de esta enfermedad está relacionada, con la presencia de ciertos factores de riesgo que pueden favorecer su desarrollo a través de modificaciones hormonales, alterando la cinética celular de la glándula mamaria (Weidner, *et al.*, 1997; González, 1992 y Capote, 1993). Un tipo de receptor que se encuentra en las células mamarias son los receptores hormonales (receptores de estrógeno (RE) y receptores de progesterona (RP) los cuales funcionan como un interruptor que activa o desactiva una función particular en la célula mamaria.

Uno de los tratamientos utilizados para los receptores hormonales, es el Tamoxifeno (TAM) conocido como un modulador selectivo del receptor estrógeno (SERMs) usado para el tratamiento de receptores que expresan el cáncer de mama (Gao L, *et al.*, 2011). Sin embargo, aun cuando el TAM da buenos resultados, también tiene efectos secundarios debido a que en toda célula, dañada o no, cuenta en su superficie con ciertas proteínas que contienen tripéptidos como son el Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) y Asparagina-Glicina-Arginina (NGR) cuyas funciones son el reconocimiento y sitio de unión de varios receptores de adhesión celular por lo que es relevante darle propiedades de selectividad al fármaco. Esto se pretende llevar a cabo utilizando técnicas de modelado molecular y química computacional que permiten obtener un complejo nanoacarreador-fármaco, particularmente moléculas de carbono de dimensiones nanométricas, en este caso, nanodiamantes (ND).

En este trabajo se presenta el modelado molecular y la caracterización computacional de la funcionalización del nanodiamante con TAM y el acoplamiento molecular (Docking) del TAM y sus metabolitos con la macromolécula (RE y RP). La obtención del dominio de unión de los receptores

hormonales y el análisis de flujo de electrones ( $\Delta N$ ) de los aminoácidos que conforman el sitio activo de los receptores hormonales con el fármaco y sus metabolitos. Los resultados han sido obtenidos aplicando la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) con la química modelo M06/6-31G (d) y el modelo continuo de solvatación CPCM usando como solvente agua. Los resultados obtenidos son la localización del farmacóforo del TAM y la caracterización de los tripéptidos permitieron comprender la causa de los efectos secundarios producidos por este medicamento. Se diseñó una propuesta de funcionalización para la elaboración del complejo ND-TAM utilizando ácido láctico como molécula puente. El uso de la técnica de acoplamiento molecular permitió encontrar que el TAM es más efectivo en los receptores de estrógeno que en los receptores de progesterona. Los resultados obtenidos en esta investigación han servido como base para el protocolo experimental de proyectos *in-vitro* que a la fecha se llevan a cabo por otro grupo de investigación de nuestra institución.

Palabras clave: Funcionalización; acoplamiento molecular; reactividad química; Tamoxifeno.

## II. ABSTRACT

According to World Health Organization, breast cancer occupies the highest incidence of malignant neoplasms in women, accounting for 11.34% of all cancer cases and has an overall increase of 1.5% annually. In addition, the incidence of this disease is related to the presence of certain risk factors that may favor its development, exerting their effect through hormonal modifications, altering the cellular kinetics of the mammary gland (Weidner, et al., 1997; Gonzalez, 1992 and Capote, 1993). One type of receptor found in mammary cells is hormone receptors (estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) which act as a switch that activates or deactivates a particular function in the mammary cell.

One of the treatments used for hormone receptors is Tamoxifen (TAM) known as a selective estrogen receptor modulator (SERMs) used for the treatment of receptors that express breast cancer (Gao L, et al., 2011). However, even when TAM gives good results, it also has side effects because in any cell, damaged or not, it counts on its surface with certain tripeptide-containing proteins such as Arginine-Glycine-Aspartic Acid (RGD) and Asparagine-Glycine-Arginine (NGR) whose functions are the recognition and binding site of several cell adhesion receptors for which it is relevant to give properties of selectivity to the drug. This is intended to be carried out using molecular modeling techniques and computational chemistry to obtain a nanocarrier-drug complex, particularly nanometric carbon molecules, in this case nanodiamonds (ND).

In this work present the molecular modeling and computational characterization of the functionalization of nanodiamond with TAM, characterization of the same and the molecular docking of TAM and its metabolites with the macromolecule (ER and PR). Obtaining the hormone receptor binding domain and the electron flow analysis ( $\Delta N$ ) of the amino acids that make up the active site of the hormone receptors with the drug and its metabolites. The results were obtained by applying the DFT (Density Functional Theory) with model chemistry M06/6-31G(d) and the continuous model CPCM solvation using water as the solvent. The results obtained are the location of the pharmacophore of TAM was found and the characterization

or the tripeptides allowed understanding the cause of the side effects produced by this medicine. A functionalization proposal was designed for the elaboration of the ND-TAM complex using lactic acid as a bridge molecule. The use of the molecular docking technique allowed us to find that TAM is more effective in estrogen receptors than in progesterone receptors. The results obtained in this research have served as a basis for the experimental protocol of *in vitro* projects that to date is carried out by another research group of our institution.

Keywords: Functionalization; molecular docking; chemical reactivity; Tamoxifen.

### **III. INTRODUCCIÓN**

El cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. En los últimos años, la incidencia se ha incrementado a razón de 1-2% anual y es más frecuente en América Latina y el Caribe. Para evaluar el pronóstico del cáncer de mama, existen parámetros que predicen la evolución o agresividad del mismo, como son los ganglios linfáticos axilares, el tamaño del tumor y el grado histológico (Weidner, *et al.*, 1997).

Además la incidencia de esta enfermedad está relacionada, con la presencia de ciertos factores de riesgo que pueden favorecer su desarrollo a través de modificaciones hormonales, alterando la cinética celular de la glándula mamaria (Weidner, *et al.*, 1997 y González, 1992). Un tipo de receptor que se encuentra en las células mamarias son los receptores hormonales (receptores de estrógeno (RE) y receptores de progesterona (RP) los cuales responden a las señales emitidas por estas hormonas que se encuentren en el interior y sobre la superficie de ciertas células del cuerpo, incluidas las mamarias. Estas proteínas receptoras funcionan como un interruptor que activa o desactiva una función particular en la célula.

Uno de los tratamientos utilizados para los receptores hormonales, es el Tamoxifeno (TAM) conocido como un modulador selectivo del receptor estrógeno (SERMs). El fármaco es metabolizado en el hígado en distintos metabolitos; 4-hidroxi-TAM (4OH), N-dimetil-TAM (ND-TAM) y 4-hidroxi-N-dimetil-TAM también conocido como Endoxifeno (END). Tanto la molécula del TAM como sus tres metabolitos son considerados SERMs debido a su capacidad de unirse a los receptores hormonales. En estudios *In vivo* se ha comprobado de los SERMs compiten con los estrógenos para unirse a sus receptores, lo que resulta en una atenuación de la respuesta celular medida por estrógenos (Beverage, *et al.*, 2007). El TAM y sus metabolitos actúan al inhibir competitivamente la unión del estradiol con el receptor hormonal. Cuando se une el TAM o alguno de los metabolitos al RE o RP cambia la forma del dominio de unión a la del estradiol, donde forma un dímero y solo es activado el sitio AF1, por lo cual recluta menos coactivadores y el

efecto de transcripción en el DNA se atenúa aunque no se pierde. Algunos estudios han puesto de manifiesto que las concentraciones plasmáticas medias del TAM no muestran diferencias significativas al ser medidas tras 1 y 4 meses del inicio del tratamiento. Sin embargo, si existen diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas medias de los otros tres metabolitos, medidas también en los tiempos antes indicados (Jin *et al.*, 2005; Lien *et al.*, 1995).

Una de las técnicas de modelado molecular conocida como acoplamiento molecular o docking permite definir la afinidad de unión de una molécula con otra, en la cual se puede predecir la conformación preferentemente de una molécula, al estar unida a otra con el fin de formar un complejo más estable (Lengauer, 1996). Esta técnica es usada para predecir la orientación del enlace de una molécula pequeña conocida como ligando que pueden ser fármacos, los cuales ejercerán su acción en una macromolécula, en este caso una proteína, lo cual permite la predicción de la afinidad del ligando en la macromolécula y proporciona una idea de cómo esas moléculas podrán unirse potencialmente *In vitro* o *In vivo*. Este método es de gran importancia en el diseño de fármacos (Kitchen, et al., 2004). Por esta razón, se llevó a cabo un análisis de acoplamientos moleculares del fármaco TAM y sus metabolitos para evaluar la afinidad de unión de cada uno de ellos en los receptores hormonales, además de realizar un análisis de flujo de electrones ( $\Delta N$ ) de los aminoácidos que conforman el sitio de unión de los receptores hormonales con el fármaco y sus metabolitos. Con lo cual se puede predecir en cual aminoácido se lleva a cabo el daño oxidativo en presencia del TAM y sus metabolitos.

### **3.1 Justificación**

En la actualidad los tratamientos como la quimioterapia y la radioterapia se utilizan para combatir el cáncer con cierta efectividad, sin embargo, son consideradas terapias agresivas y con efectos secundarios. No solo atacan a las células enfermas, sino también a las células sanas. Esto genera la necesidad urgente de encontrar nuevas alternativas que permitan evitar estos efectos secundarios. Actualmente está en estudio la aplicación de terapia dirigida, la cual permite administrar directamente a los tumores cancerígenos, los fármacos quimioterapéuticos a través del uso de acarreadores de tamaño nanométrico, tal como los nanodiamantes. Cada tipo de terapia dirigida funciona de manera diferente, pero todas interfieren en la capacidad de las células cancerosas para crecer, dividirse, repararse y comunicarse con otras células. El uso de las técnicas de modelado molecular, para predecir los acoplamientos e interacción del fármaco unido a un nanoacarradeador, resulta de gran importancia, ya que permitirá la predicción de los sitios de unión y energías de interacción. Además se pueden utilizar criterios de la conformación espacial para evaluar el grado de complejidad estérico, entre el fármaco y el sitio de unión.

### **3.2 Hipótesis**

La funcionalización del nanodiamante con Tamoxifeno será capaz de acoplarse con los receptores de cáncer mamario sin que exista un impedimento estérico generado por el nanoacarrador.

### **3.3 Objetivo General**

Obtener el arreglo molecular óptimo del transportador de fármaco que confiera las propiedades que faciliten el acoplamiento a receptores de cáncer mamario.

### 3.5 Objetivos Particulares

- Obtener la metodología computacional que refleje con mayor precisión los resultados experimentales del fármaco y que permita caracterizar al resto de los compuestos, a través de la teoría de funcionales de la densidad.
- Determinar computacionalmente la geometría optimizada del fármaco y sus parámetros de reactividad química.
- Establecer el método de funcionalización adecuado del ND-TAM que no comprometa la farmacodinámica del medicamento.
- Analizar computacionalmente la geometría optimizada del complejo ND-TAM y sus parámetros de reactividad química como el potencial de ionización, afinidad electrónica, dureza química, potencial químico, electronegatividad.
- Determinar la estructura de mínima energía del RGD y NGR, consecuentemente calcular los complejos RGD-TAM y NGR-TAM seguido de sus parámetros de reactividad química.
- Modelar el acoplamiento de los receptores hormonales RE y RP con el TAM, para obtener el dominio de los receptores con la técnica de acoplamiento molecular y determinar el  $\Delta N$ .

#### **IV. ANTECEDENTES**

El cáncer es potencialmente mortal no sólo debido a la alta tasa de mortalidad de la enfermedad en sí. Durante décadas los investigadores han buscado tratamientos contra el cáncer más asequibles y eficientes desafortunadamente las terapias convencionales, como la quimioterapia y la radioterapia enfrentan retos tales como pobre biodisponibilidad y toxicidad intrínseca. Además que la eficiencia terapéutica de muchos fármacos se ve muy comprometida por los problemas de citotoxicidad que estos generan.

Afortunadamente, la nanomedicina ha demostrado una promesa excepcional para mejorar el suministro de agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama. El tamaño extremadamente pequeño de las nanopartículas hace que sea ventajosa y potencialmente superior a utilizar como quimioterapia dirigida. En las últimas tres décadas, los esfuerzos de investigación en este campo han dado lugar a nanoestructuras innovadoras, incluyendo polimérico y nanopartículas no poliméricas, QDs, SPIONS, AuNPs, nanocables (Qiao, *et al.*, 2010) y los nanodiamantes (ND), los cuales son biocompatibles en el organismo, no se bioacumulan y tienen aplicaciones en la nanomedicina, suministro de fármacos y en terapias contra el cáncer (Han B, *et al.*, 2013).

En la literatura existe una cantidad considerable de trabajos relacionados con las diferentes propiedades y aplicaciones de los ND. A continuación se muestran aquellos que en su contenido tienen fundamento relevante para el presente trabajo de investigación:

Boon-Toh, *et al* (2014), describen el complejo ND-mitoxantrona que puede sintetizarse rápidamente y mejorar la eficacia del fármaco. La caracterización del complejo mostró que cuenta con propiedades para la liberación del fármaco favorable y que es capaz de mejorar la retención y la eficacia en una línea celular de cáncer de mama. Los resultados de este estudio apoyan la evaluación adicional de ND-mitoxantrona en los estudios de escalada de dosis y de seguridad preclínicos hacia la validación clínica.

Man, *et al* (2014), estudiaron la síntesis del conjugados ND-daunorrubicina para superar la quimiorresistencia en la leucemia. El trabajo contiene un análisis teórico- experimental, se demostró que el conjugado mejora la eficacia y se reduce la toxicidad generada por el fármaco. Además se demostró por medio de dinámica molecular a que pH el conjugado es más estable.

Xiao, *et al* (2013), estudiaron la metástasis de pulmón generado por el cáncer de mama, en donde suministran el fármaco doxorubicina mediante el uso del ND, para inhibir la metástasis pulmonar.

Mochallin, *et al* (2012), revisaron la síntesis, estructura, propiedades, la superficie química y las transformaciones de fase de los nanodiamantes. El contenido de su trabajo se discute en particular las propiedades químicas, mecánicas, electrónicas y ópticas del nanodiamante a través del dopaje en la superficie y la introducción de grupos funcionales. Estas características permiten tener aplicaciones en administración de fármacos, bioimagen, ingeniería de tejidos y también como un material de relleno para nanocompositos.

Man y Ho (2012), en su trabajo discuten las propiedades del ND con un enfoque en la entrega terapéutica, además de la comprensión de su uso en imágenes, dispositivos, implantes / recubrimientos y biocompatibilidad.

Chow, *et al* (2011), analizaron la eficacia de un quimioterapéutico ND-conjugado en modelos de ratón de cáncer de mama y de hígado. El complejo es ND-doxorrubicina supero el flujo del fármaco y aumento significativamente la inhibición de la apoptosis y el crecimiento del tumor más allá del tratamiento convencional doxorubicina en ambos modelos de tumores de hígado y carcinoma mamario. Por lo tanto, la quimioterapia ND-conjugado representa una estrategia prometedora, biocompatible para superar la quimiorresistencia y mejorar la eficacia y la seguridad de la quimioterapia.

Xue-Qing, *et al* (2011), analizaron el complejo ND-placlitaxel el cual mostró un biorreconocimiento ligando- diana en las células tumorales y la toxicidad en las células sanas se minimizo con el uso del ND.

Lam y Ho (2009), reportan al ND como una plataforma de aplicaciones biomédicas con énfasis en la terapia del cáncer, que van desde las modalidades sistémicas a los componentes primarios dentro de microfilms híbridos. Además comparan los resultados experimentales y las explicaciones teóricas de la dinámica del fármaco con el uso del ND como vehículo acarreador y también discuten diversas formas de incorporar al ND en microfilms como un revestimiento e implante en la liberación de fármaco.

Otros trabajos reportados utilizan el ND para aplicaciones terapéuticas y de imágenes, así como esfuerzos considerables para examinar su biocompatibilidad tanto *in vitro* como *in vivo*, además han evaluado la administración de fármacos de moléculas pequeñas como la doxorubicina (Dox), el paclitaxel, el cisplatino, el 4-hidroxitamoxifen (4-OHT) y el purvalanol los cuales han sido adsorbidos o conjugados covalentemente a ND (Liu, *et al.*, 2010; Zhang, *et al.*, 2011; Guan, *et al.*, 2010 y Chen, *et al.*, 2009).

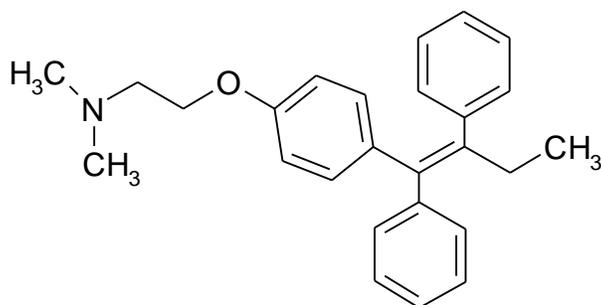
## V. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Cáncer mamario.

El cáncer mamario es la principal causa de mortalidad por enfermedades neoplásicas en la mujer, en México y el mundo. El estudio de la expresión génica es una parte fundamental para el entendimiento del origen del cáncer, así como el análisis del origen de promotores de mutaciones, los cuales están involucrados en el desarrollo del cáncer. Recientemente se han publicado estudios que demuestran que mutaciones en las células somáticas, alteraciones en el ambiente hormonal materno, variantes heredadas y portadores de mutaciones somáticas en sus genomas y conductores de mutación, relacionados con la expresión de receptores hormonales de estrógenos, progesterona, el HER-2 y leptina (Santillán-Benítez, *et al.*, 2013), son temas relacionados con la elucidación de subtipos moleculares de cáncer mamario. El análisis permite conocer más acerca del origen del cáncer mamario, además de identificar caminos para desarrollar terapias preventivas eficientes (Santillán-Benítez, *et al.*, 2013). Para el cáncer de seno HER2 positivo se utilizan los medicamentos como el Trastuzumab, Pertuzumab y Lapatinib, en cuanto al cáncer de mama por receptores hormonales positivos se utilizan medicamentos como el Fluvestran y Tamoxifeno (Muñoz, 1997). Los niveles de expresión en cáncer mamario encontrados en los diversos subtipos moleculares, están fuertemente relacionados con la expresión de los receptores hormonales y en una menor cantidad en HER2 (Curtis, *et al.*, 2012). Lo que nos ha llevado a investigar a los receptores hormonales con Tamoxifeno para analizar la afinidad de unión, las interacciones electrostáticas y determinar como actúa el fármaco dentro del sitio activo de los receptores hormonales.

## 5.2 Tamoxifeno.

Los receptores de estrógeno (RE), ofrecen un mejor pronóstico a los pacientes con cáncer de mama positivo a RE, revelado por inmunohistoquímica. El tratamiento más común en estos pacientes es el uso de Tamoxifeno (Figura 1), un inhibidor de los receptores de estrógenos, conocido también como SERM (por sus siglas en inglés, *Selective Estrogen Receptor Modulator*), ya que permite inhibir los efectos de los estrógenos en células neoplásicas de cáncer de mama, sin alterar los efectos benéficos que tiene sobre hueso, sistema cardiovascular y nervioso (Camarata, *et al.*, 2008)



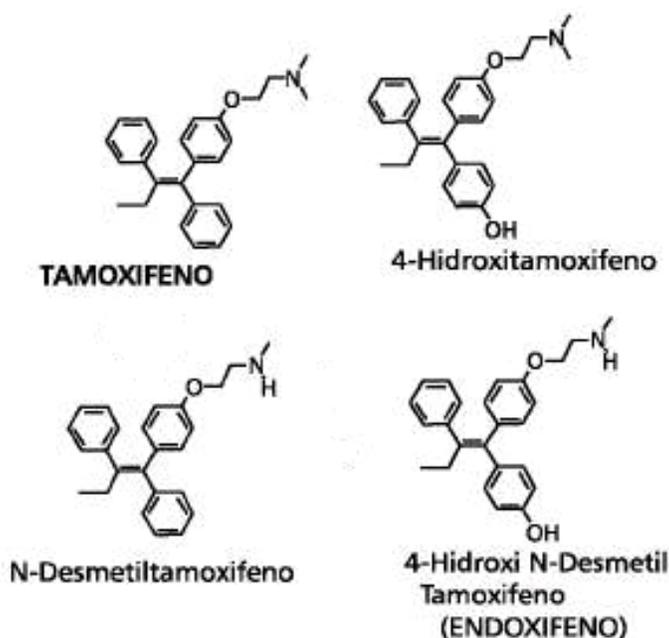
**Figura 1.** Fármaco Tamoxifeno.

Existen varios fármacos que interfieren con la unión del estrógeno a los receptores de estrógeno. Los fármacos llamados moduladores selectivos de receptores de estrógeno, como el Tamoxifeno y el toremifeno, se unen a los receptores de estrógeno e impiden así que el estrógeno se una a esos receptores. El uso principal del Tamoxifeno es tratar el cáncer de seno con receptor hormonal positivo (cáncer de seno con células que tienen receptores de estrógeno y/o progesterona).

### 5.2.1 Metabolismo del Tamoxifeno.

El TAM actúa en el tejido mamario el cual interfiere con la actividad de los estrógenos, hormonas femeninas que promueven el crecimiento de las células cancerosas en la mama. Debido a su efecto agonista parcial, TAM ejerce efectos

benéficos sobre el metabolismo lipídico y óseo. Su uso durante 5 años en dosis de 20mg/día es la pauta considerada estándar. Es ampliamente conocida la conversión en el organismo de TAM en una serie de metabolitos con una capacidad mucho mayor que la del propio TAM. El Tamoxifeno es metabolizado en las células del hígado para producir tres distintos metabolitos: 4-hidroxi-TAM (4OHTAM), N-dimetil-TAM (NDTAM) y 4-hidroxi-N-dimetil-TAM (END) como se muestra en la Figura 2. Tanto la molécula de Tamoxifeno como sus tres metabolitos son consideradas SERMs (Moduladores selectivos de estrógeno) debido a su capacidad de unirse a los receptores de estrógenos en el DNA. En estudios in vivo se ha comprobado que los SERMs compiten con los estrógenos para unirse a sus receptores, lo que resulta en una atenuación de la respuesta celular mediada por estrógenos (Beverage, *et al.*, 2007). Se ha observado que tanto la eficacia como la toxicidad de TAM varían enormemente entre individuos, debido a que el metabolismo de TAM presenta una gran variabilidad interindividual. TAM ha demostrado una reducción casi a la mitad de la tasa de recurrencia de cáncer de mama así como una reducción de un tercio de la tasa de mortalidad.



**Figura 2.** Estructura química del Tamoxifeno y sus diferentes metabolitos.

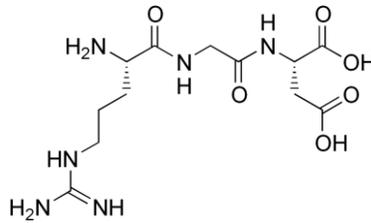
### **5.3 RGD y NGR.**

El TAM es un fármaco anti estrogénico, utilizado para combatir el cáncer de mama en receptores hormonales positivos; en esta investigación se analizó la interacción del TAM con Arginina-Glicina-Ácido aspártico (RGD) y Asparagina-Glicina-Arginina (NGR) que son específicos de la fibronectina y la aminopeptidasa N, que se encuentran en la superficie de las células sanas o dañadas; de comprobarse la interacción entre el fármaco y los tripeptidos, se confirmaría la causa de un efecto secundario del tratamiento, que de llegar a tenerla, es lo que generalmente se conoce como un efecto adverso producido por el fármaco.

#### **5.3.1 Arginina-Glicina-Ácido Aspartico (RGD).**

El tripéptido RGD se encuentra en la fibronectina una proteína de adhesión con capacidad para fijar las células a una serie de matrices la cual se encuentra en la superficie de las células y matrices pericelulares. Ver Figura 3. Este tripéptido en la actualidad también, se ha desarrollado para imitar proteínas de adhesión celular y puede ser reconocido específicamente por integrinas, (Humphries, et al., 2006) que son un grupo versátil de los receptores de superficie celular heterodiméros. (Thumshim, et al., 2003). Las diversas aplicaciones de péptidos RGD incluyen la apoptosis, la angiogénesis y la formación de tumores, recubrimiento de superficies (biomateriales), la mejora de adhesión celular, la mejora de sistemas de administración de fármacos, y de formación de imágenes de diagnóstico. (Haubner, et al., 1997) además de que son buenos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades tales como la trombosis y el cáncer.

Existen trabajos previos en los cuales se ha realizado la funcionalización de RGD con nanopartículas mPEG-PLGA-PLL con el fármaco antitumoral mitoxantrona (DHAQ) y un agente fluorescente Rodamina B (Rb) encapsulado en su interior, lo que le permitió ser usado como terapia de imagen contra el cáncer de mama (Liu, et al., 2012).

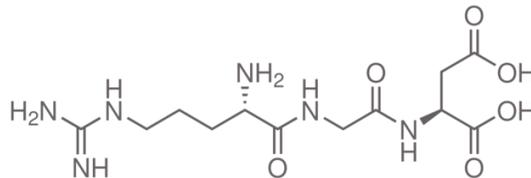


**Figura 3.** Estructura química del tripéptido RGD.

### 5.3.2 Asparagina-Glicina-Arginina (NGR).

El tripéptido NGR se encuentra en la aminopeptidasa la cual regula los niveles de hormonas peptídicas y la digestión de proteínas en el intestino, así como la maduración de proteínas, la degradación de péptidos hormonales y no hormonales. La Figura 4 muestra la estructura del péptido.

Hasta el momento, este tripéptido ha sido utilizado para la entrega de diversos compuestos anti-tumorales, como son los fármacos quimioterapéuticos, péptidos apoptóticos, partículas virales, citoquinas y liposomas a los vasos del tumor (Arap, et al., 1998; Curnis, et al., 2000, 2002b, 2005; Ellerby et al., 1999; Grifman, et al., 2001; Lui et al., 2000 y Pastorino, et al., 2003). Esta propiedad se debe a la unión del NGR a la aminopeptidasa (APN, también conocida como, N(CD13)) la cual esta expresada en células endoteliales de los vasos asociados a los tumores (Curnis, et al., 2002<sup>a</sup> y Pasqualini, et al., 2000). Mientras que algunos estudios se han centrado sustancialmente en la función del NGR como vehículo, han informado que sirvió también como una sonda molecular para la formación *in vivo* de imágenes de tumores y evaluación de la neovasculatura mediante la unión a APN.(Wallbrunn, et al., 2008;Buehler, et al., 2006 and Oostendorp, et al., 2010).



**Figura 4.** Estructura química del tripéptido NGR.

#### **5.4 Nanodiamantes y su funcionalización.**

Los nanodiamantes (ND) a menudo se describen como un núcleo de diamante cristalino con una combinación de enlaces sp<sup>2</sup> y sp<sup>3</sup> (Ho,2010), tiene una forma octaédrica y superficie (111) (Mochalin, et al.,2012). Los ND han demostrado una compatibilidad excepcional en una gran variedad de entornos biológicos, los cuales han sido modificados químicamente para llevar varias clases de terapias contra el cáncer y coadyuvar en la capacidad de la liberación de fármacos.

Dentro de las plataformas de la funcionalización de los ND también se han reportado el uso de polímeros como el ácido láctico que presenta la ventaja de ser biodegradable (Xin, *et al.*, 2010) además de ser ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas como hilos de sutura quirúrgicos, reconstrucción de tejidos y medicamentos de liberación controlada (Kim, *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que las moléculas de fármacos quimioterapéuticos se unen a la superficie del ND principalmente a través de la interacción electrostática y de enlace de hidrógeno entre las moléculas del fármaco a estudiar y la funcionalización del grupo hidroxilo y carboxilo situados en la superficie del ND durante la síntesis (Shimkunas, *et al.*,2009; Zhu, *et al.*, 2006; Zhu, *et al.*,2009).

Las condiciones ácidas en el tejido tumoral, endosomas y lisosomas, pueden ser responsables de la escisión de profármacos sensibles a los ácidos. Basado en el trabajo pionero de Otto Warburg, quien describió las células cancerosas que convierten la glucosa en lactato, incluso en condiciones no hipóxicas, lo que reduce el valor de pH del ambiente del tumor (Warburg, 1956), técnicas no invasivas con electrodos de pH han demostrado que el entorno en el tejido tumoral es a menudo 0,5-1,0 unidades de pH menor que en el tejido normal (Tannock y Rotin, 1989). Este cambio de pH, aunque pequeña, podría contribuir a la liberación extracelular de profármacos sensibles a los ácidos, especialmente si el profármaco permanece en el intersticio del tumor durante periodos de tiempo más largos.

## **5.5 Receptores Hormonales.**

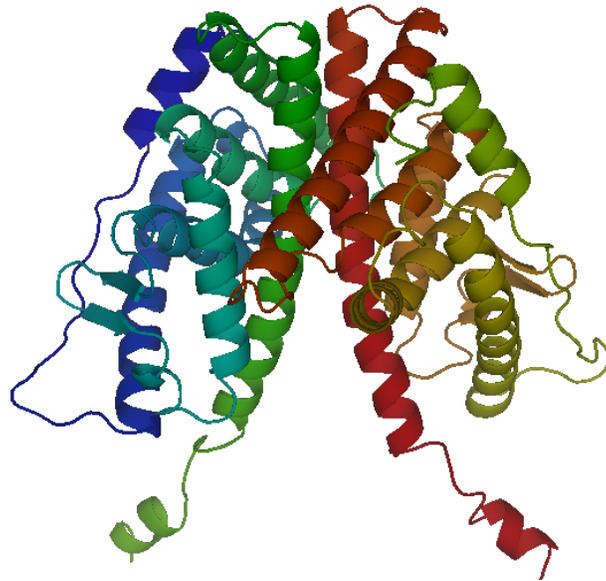
Los receptores hormonales son proteínas que se encuentran en el interior y sobre la superficie de ciertas células del cuerpo, incluidas las células mamarias. Estas proteínas receptoras actúan como un interruptor que activa o desactiva una función particular en la célula. Si la sustancia adecuada se acopla al receptor, como una llave que encaja en una cerradura, el interruptor se activa e inicia una función específica de la célula. Al unirse a receptores de hormonales, el estrógeno y la progesterona contribuyen al desarrollo y funcionamiento de las células mamarias. El estrógeno y la progesterona a menudo se denominan "hormonas femeninas" porque cumplen una función importante en el ciclo menstrual, el desarrollo sexual, el embarazo y el parto.

### **5.5.1 Receptor de Estrógeno.**

El receptor de estrógeno positivo (RE) regula la diferenciación y el mantenimiento de tejidos neural, esquelético, cardiovascular y los tejidos reproductivos (Smith et al., 1994). Los compuestos que modulan la actividad transcripcional RE actualmente se usan para tratar la osteoporosis, la enfermedad cardiovascular y el cáncer de mama (Jordan, 1998).

Todos los ligandos RE unen exclusivamente al dominio de unión a ligando-C-terminal (LBD). El LBD reconoce una variedad de compuestos diversos en sus propiedades de tamaño, forma y composición química. Algunos de estos ligandos, incluido el estrógeno endógeno  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y el estrógeno sintético no esteroideo (DES) conocido como dietilstibestrol, funciona como agonista puro, mientras que otros, tales como ICI-164384, funcionan como antagonistas puros. Los ligandos sintéticos tales como Tamoxifeno (TAM) y raloxifeno (RAL) pertenecen a una creciente clase de moléculas conocida como moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERMs), que funcionan como antagonistas en contextos de tejido y promotores específicos (Grese et al., 1997). El diseño de nuevos SERMs y la optimización de los existentes requieren una comprensión de los efectos de diferentes composiciones químicas y estructuras de los ligandos

sobre la actividad transcripcional RE. La estructura cuaternaria del RE se muestra en la Figura 5.



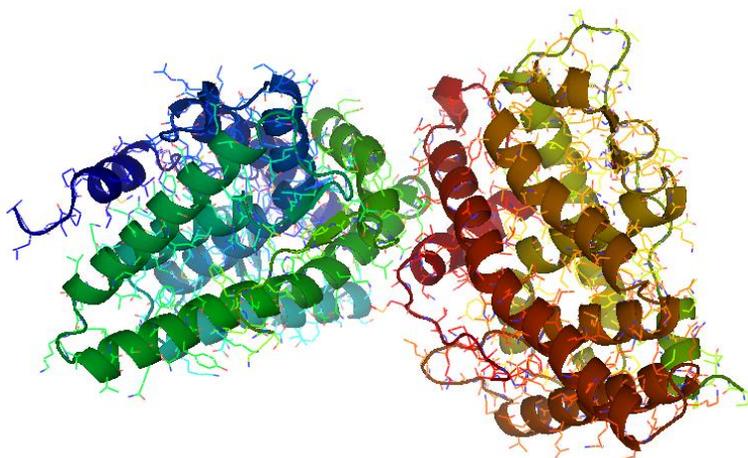
**Figura 5.** Receptor de Estrógeno.

### **5.5.2 Receptor de Progesterona.**

El receptor de progesterona (RP) es un receptor de esteroides el cual pertenece a la super familia de los receptores nucleares de factores de transcripción (Mangelsdorf, et al., 1995; Sladek, 2011). La estructura cuaternaria del RP muestra en la Figura 6.

Los RP se expresan en niveles bajos en la mayoría de los sistemas fisiológicos, pero en niveles más altos en el sistema reproductivo femenino y en el sistema nervioso central (Bookout, et al., 2006), representa un papel importante en los eventos reproductivos y el comportamiento sexual.

La disfunción en los RP indican trastornos en la reproducción (Conneely, et al., 2003), síndromes neurológicos (Brinton, et al., 2008), cáncer de endometrio (Yang, et al., 2011), ovario ( Akahira, et al., 2000) y mama (Obr, et al., 2012).



**Figura 6.** Receptor de progesterona.

## **5.6 Química computacional.**

La química computacional es una disciplina que trata con el modelado y simulación computacional de sistemas tales como: biomoléculas, polímeros, moléculas orgánicas e inorgánicas, entre otros. Desde su llegada, la química computacional ha crecido y ha llegado a ser muy popular debido a sus grandes beneficios, y esto es posible debido al desarrollo en los equipos de cómputo durante las últimas décadas. (Romachandran, *et al.*,2008)

La ventaja de la simulación es el poder modelar un sistema molecular sin tener que utilizar reactivos ni generar basura o desechos químicos, lo cual se traduce en un ahorro de insumos y energía, mientras se cuida el medio ambiente. (Flores, 2002)

También ayuda a los químicos a hacer predicciones antes de ejecutar los experimentos reales para que puedan estar mejor preparados para hacer observaciones.

En muchos aspectos los cálculos teóricos ya han rebasado a la síntesis experimental. Cualquier especie química puede ser estudiada teóricamente: los cálculos sobre cationes, aniones y otros intermedios reactivos, que presentan serias dificultades a la hora de ser estudiados experimentalmente, no plantean, en

principio, mayor problema que los cálculos realizados sobre moléculas más estables. Información detallada sobre estados excitados, así como sobre disposiciones moleculares hipotéticas o moléculas deformadas, únicamente puede ser obtenida a través de los cálculos computacionales (Baldenebro, 2010).

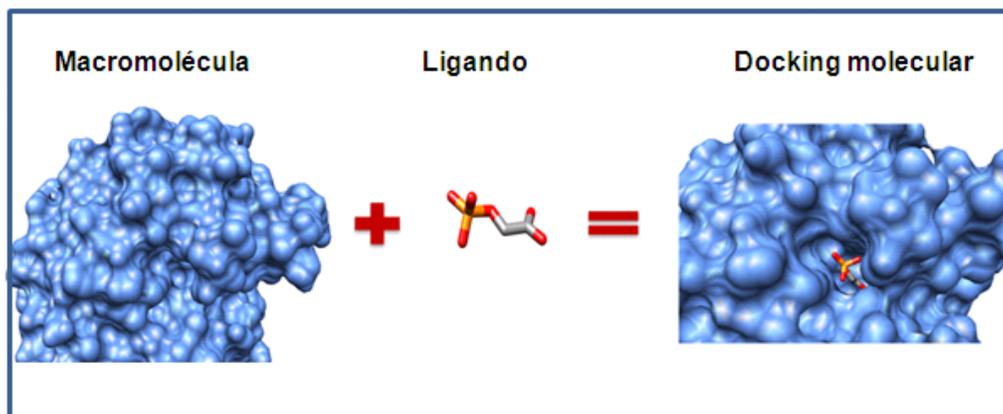
### **5.6.1 Métodos de mecánica molecular.**

Los métodos de mecánica molecular (MM) están basados en las leyes de la mecánica clásica, y usan como modelo una molécula compuesta por átomos unidos por enlaces que parecen resortes. Los métodos de MM predicen geometrías en el equilibrio y energías relativas. Ciertamente es que son mucho más rápidos que los cálculos mecánico cuánticos, se pueden tratar sistemas hasta de 10000 átomos. (Cuevas y Cortez, 2003).

Las técnicas de MM han demostrado ser un complemento útil en espectroscópica y otros métodos de investigación de la estructura y reactividad de los compuestos inorgánicos. (Brubaker G.R, *et al.*, 1984).

### **5.6.2 Acoplamiento molecular.**

En el campo del modelado molecular, este es un método que predice la conformación preferida de una molécula, al estar unida a otra con el fin de formar un complejo más estable. (Lengauer,1996). Figura 7 El acoplamiento molecular (Docking) es usado para predecir la orientación del enlace de una molécula pequeña conocida como ligando que pueden ser fármacos, los cuales ejercerán su acción en una macromolécula (proteína) y permite predecir la afinidad, la actividad del ligando en la macromolécula que puede involucrar interacciones bioquímicas favorables, proporcionando una idea de cómo esas moléculas podrán unirse potencialmente *in vitro* o *in vivo*. Principalmente este método es importante en el diseño de fármacos (Kitchen, et al., 2004).



**Figura 7.** Acoplamiento molecular.

## 5.7 Métodos de Mecánica cuántica.

Se utilizan métodos de mecánica cuántica a diferentes niveles de exactitud en la investigación teórica de superficies de potencial y propiedades moleculares en sistemas que van desde moléculas pequeñas hasta moléculas orgánicas e inorgánicas de gran tamaño. Se fundamenta en las bases teóricas a nivel electrónico en reacciones químicas, fuerzas íter o intramoleculares, puentes de hidrógeno y espectros rotacionales y vibracionales. Utilizando la ecuación cuántica del estado estacionario, la ecuación de Schrödinger.

### 5.7.1 Ecuación de Schrödinger.

Como regla general, las formulaciones de la ecuación de Schrödinger son matemáticamente complejas y su implementación computacional es intensiva. Sin embargo, la disponibilidad de gran capacidad, en computadoras de alta velocidad ha hecho posible para hacer frente, con creciente éxito, los problemas de interés teórico y de la importancia practica en muy diversos campos. (Kryachko y Ludeña, 1992).

## 5.8 Teoría del Funcional de la Densidad.

La Teoría del Funcional de la Densidad (DFT), representa una forma alternativa a la de los métodos ab initio convencionales de introducir los efectos de la correlación electrónica, en la correlación de la ecuación de Schrödinger

electrónica. De acuerdo con la DFT, la energía de estado fundamental de un sistema polieletrónico puede expresarse a partir de la densidad electrónica, y de hecho el uso de la densidad electrónica en lugar de la función de onda para el cálculo de la energía constituye la base fundamental de la DFT. Estas expresiones acostumbran proporcionar resultados sorprendentemente buenos si uno considera las aproximaciones en las que éstas se basan. Los métodos basados en DFT se han popularizado en la última década para el cálculo de sistemas de cierto tamaño, y en especial para los complejos de metales de transición, a partir de la introducción de funcionales de correlación-intercambio que proporcionan resultados de calidad comparable o superior a teorías que utilizan la función de onda para cuantificar la energía (Andrés y Beltrán, 2000).

### **5.8.1 Funcionales de la densidad.**

Se han definido una variedad de funcionales, los cuales se distinguen por la forma en que se tratan los componentes de intercambio y correlación. En primer lugar, tenemos funcionales de intercambio local y funcionales de correlación que sólo involucran los valores de las densidades de spin electrón; los funcionales de intercambio local más empleados son: Slater,  $X\alpha$ , y el tratamiento de densidad de spin de Vosco, Wilk y Nusair (VWN). En segundo lugar tenemos el funcional gradiente-correctado, los cuales involucran los valores de la densidad de spin electrón y sus gradientes, estos funcionales suelen llamarse no locales; los funcionales de gradiente-correctado más conocidos son: Becke(propuesto en 1988), el más popular fue propuesto por Lee, Yang y Parr (LYP), una combinación de ambas formas conocidos como funcional BLYP, y los propuestos por Perdew: Perdew 86 y Perdew-Wang 91.

Por último se presentan los funcionales híbridos, los cuales se definen como una combinación lineal de términos de intercambio HF, local y gradiente-correctado. La mejor combinación conocida es la formulación de tres parámetros de Becke (conocidos como B3LYP y B3PW91).

### **5.8.2 Conjuntos de Base.**

Un conjunto de base es un conjunto de funciones que se utilizan para describir la forma de los orbitales en un átomo (Young, 2001). Es decir, un conjunto de base es una descripción matemática de los orbitales en un sistema molecular, los conjuntos de base más grandes constituyen una aproximación más exacta de los orbitales por imponer pocas restricciones sobre la localización de los electrones en el espacio.

Existen dos tipos de funciones bases comúnmente usadas en los cálculos de estructura electrónica: Orbitales Tipo Slater (STO) y Orbitales Tipo Gaussianos (GTO).

No es muy recomendada la utilización del orbital tipo Slater ya que sus cálculos son para niveles de átomos y diatómicos, mientras que para los orbitales de tipo Gaussianas no es una limitación.

## **5.9 Propiedades**

### **5.9.1 Optimización de geometrías.**

La optimización de geometría nos permite localizar un mínimo de energía en la superficie de energía potencial, y así conseguir la estructura de equilibrio de un sistema molecular. Entonces, lo que se busca es donde el gradiente de energía que es igual a cero, pero esto no sólo ocurre para los mínimos, también para los puntos de ensilladura.

La optimización está completa cuando las fuerzas son cero, y una vez que se ha completado, aparecen parámetros optimizados, expresados en distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros (Cramer, 2004).

### **5.9.2 Frecuencias moleculares.**

Los cálculos de frecuencias solo son válidos en puntos estacionarios de la superficie de energía potencial, por lo que es necesario que el cálculo se lleve a cabo en una geometría optimizada, por esta razón siempre se debe correr una optimización de geometrías antes de realizar el cálculo de frecuencias. (James, 1996). El resultado del cálculo de frecuencias permite construir el espectro infrarrojo de un sistema molecular

### **5.9.3 Índices de Reactividad**

Dentro del marco de la teoría de funcionales de la densidad se ha desarrollado un formalismo que permite determinar, a partir de los parámetros obtenidos del cálculo, propiedades como potencial de ionización, afinidad electrónica, electronegatividad, índice de electrofilicidad y dureza química, entre otros, las cuales permiten establecer la reactividad de los sistemas moleculares.

Además de los anteriores, se puede mencionar que una reacción generalmente lleva consigo un cambio en la densidad electrónica y esto puede ser cuantificado a través de las funciones de Fukui que nos dice, desde el punto de vista energético, la forma más estable en que se distribuye la carga que se transfiere en un evento químico. Es decir, si la molécula va a recibir carga, la función de Fukui asociada con el proceso de aceptación de carga nos dice en qué partes va a recibir la carga, mientras que si la molécula va a ceder carga, la función de Fukui asociada con el proceso de donación de carga nos va a decir de qué regiones la va a donar. De esta manera, la función de Fukui relacionada con el proceso de aceptar carga describe los sitios susceptibles de recibir un ataque nucleofílico, mientras que la función de Fukui relacionada con el proceso de donar carga describe los sitios susceptibles de recibir un ataque electrofílico.

### 5.9.3.1 Potencial de Ionización.

El potencial de ionización (I) se define como la energía necesaria para separar un electrón de un sistema molecular. Este se calcula con la diferencia de energía entre el catión y la especie neutra (Pearson, 1986).

$$I = E_{(+1)} - E_{(0)} \quad \text{Ec.4.1}$$

### 5.9.3.2 Afinidad electrónica.

Una propiedad importante de los sistemas moleculares que influye en su comportamiento químico es su capacidad de aceptar electrones y con ello formar aniones (Pearson, 1986). Dicha propiedad se denomina afinidad electrónica (AE).

En términos de energía, la afinidad electrónica se define como la diferencia de energía, entre las especies neutra y reducida de un sistema en sus respectivas geometrías optimizadas y se calcula con la siguiente expresión:

$$AE = E_{(0)} - E_{(-1)} \quad \text{Ec.4.2}$$

### 5.9.3.3 Electronegatividad.

Es una medida de la fuerza con la que los núcleos de los átomos atraen con mayor intensidad a los electrones de valencia.

Es el promedio aritmético de la energía de ionización I y de la afinidad electrónica AE (Parr, 1978).

$$\chi = \frac{I + AE}{2} \quad \text{Ec. 4.3}$$

### 5.9.3.4 Dureza.

La Dureza Química ( $\eta$ ) es una propiedad global del sistema y mide la resistencia impuesta por este al cambio en su distribución electrónica.

La dureza es un descriptor de la reactividad,  $\eta$ , ha sido definida como la segunda derivada parcial con respecto al número de electrones (Pearson, 1986). Y la ecuación correspondiente para la obtención de la dureza es:

$$\eta = \frac{I - EA}{2} \quad \text{Ec. 4.4}$$

### 5.9.3.5 Índice de electrofilicidad.

La electrofilicidad ( $\omega$ ) es una medida de estabilización energética del sistema cuando se satura de electrones que provienen del medio externo. Esta propiedad queda expresada por el cuadrado del potencial químico dividido entre el doble producto de la dureza química (Parr, 1979).

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad \text{Ec. 4.5}$$

## 5.10 Índices de Fukui

Fukui primero consideró la importancia de los orbitales de frontera como factores principales que determinan una reacción química (Morrel, et al., 2005).

Las funciones de Fukui condensadas son números obtenidos por integración aproximada de las funciones de Fukui sobre las regiones atómicas:

$$f^{+1} = q(N+1) - q(N) \quad \text{para un ataque nucleofílico} \quad \text{Ec. 4.6}$$

$$f^{-1} = q(N) - q_i(N-1) \quad \text{para un ataque electrofílico} \quad \text{Ec. 4.7}$$

$$f^0 = \frac{1}{2} f [ q_i(N+1) - q_i(N-1) ] \quad \text{para un ataque por radicales} \quad \text{Ec. 4.8}$$

### 5.11 Descriptores de transferencia de carga.

La interacción global entre los residuos del sitio activo del RE y el fármaco puede ser representado por el parámetro  $\Delta N$  que determina el número fraccional de electrones transferido desde el sistema A al sistema B, y viene dado por (Parr y Pearson, 1983).

$$\Delta N = \frac{\mu_B - \mu_A}{2(\eta_A + \eta_B)} \quad \text{Ec. 4.9}$$

Donde  $\mu_A$ ,  $\mu_B$  y  $\eta_A, \eta_B$ , son el potencial químico y la dureza química para los sistemas **A** y **B**, donde **A** es el fármaco Tamoxifeno y los metabolitos y **B** son los residuos de los receptores hormonales respectivamente. Si  $\Delta N < 0$ , la carga fluirá de **A** a **B** en donde **A** actúa como un donante de electrones y si  $\Delta N > 0$ , la carga fluirá de **B** a **A** en donde **A** actúa como un aceptor de electrones.

## **VI. MATERIALES Y METODOS**

### **6.1 Equipo y programa.**

El equipo utilizado es una estación de trabajo Dell Precision M6400 Inter ® Core (TM) 2 Extreme, CPU Q9300 2.53 GHZ, 3.48 GB de RAM y un Clúster de alto rendimiento con 8 nodos de 16 núcleos con 64GB en RAM

Los programas utilizados para el modelado son Autodock 4.2 con una interfaz gráfica ADT 1.4.5 y Gaussian 09W, con una interfaz gráfica Gauss View 5.0.

Las aplicaciones utilizadas para el análisis de los resultados son SpecDis Swizard, Origin Pro 8 y Chem Draw.

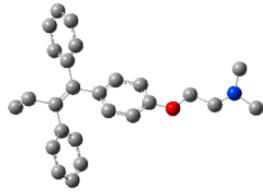
### **6.2 Moléculas analizadas.**

Las moléculas analizadas son las siguientes:

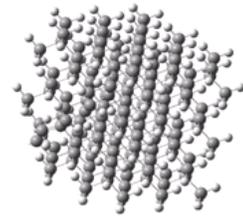
El fármaco Tamoxifeno, sus metabolitos: 4-Hidroxi-Tamoxifeno, N-dimetil-Tamoxifeno y 4-hidroxi-N-dimetil-Tamoxifeno los tripéptidos RGD y NGR, el ácido láctico, el nanodiamante, así como los aminoácidos que conforman el sitio activo de los receptores de estrógeno y progesterona. En la Tabla 4.1 se muestran las estructuras de las moléculas arriba descritas.

**Tabla 4.1** Moléculas estudiadas

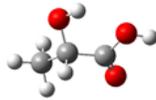
Tamoxifeno



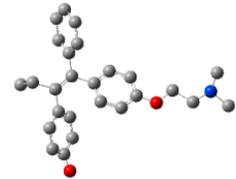
Nanodiamante



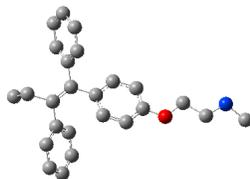
Ácido Láctico



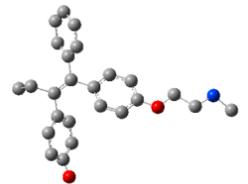
4-Hidroxi-Tamoxifeno



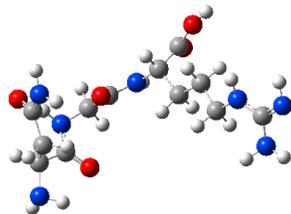
N-dismetil-Tamoxifeno



4-hidroxi-N-dismetil-Tamoxifeno

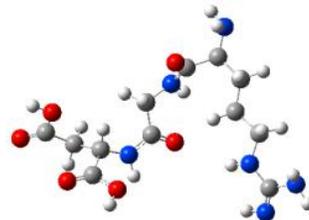


RGD



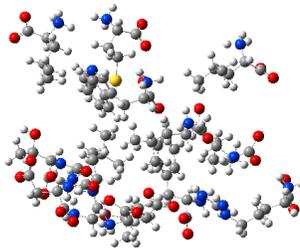
(Arginina-Glicina-Ácido Aspártico)

NGR

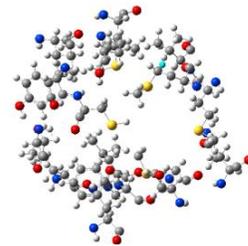


Asparagina-Glicina-Ácido Aspártico)

Sitio activo receptor estrógeno

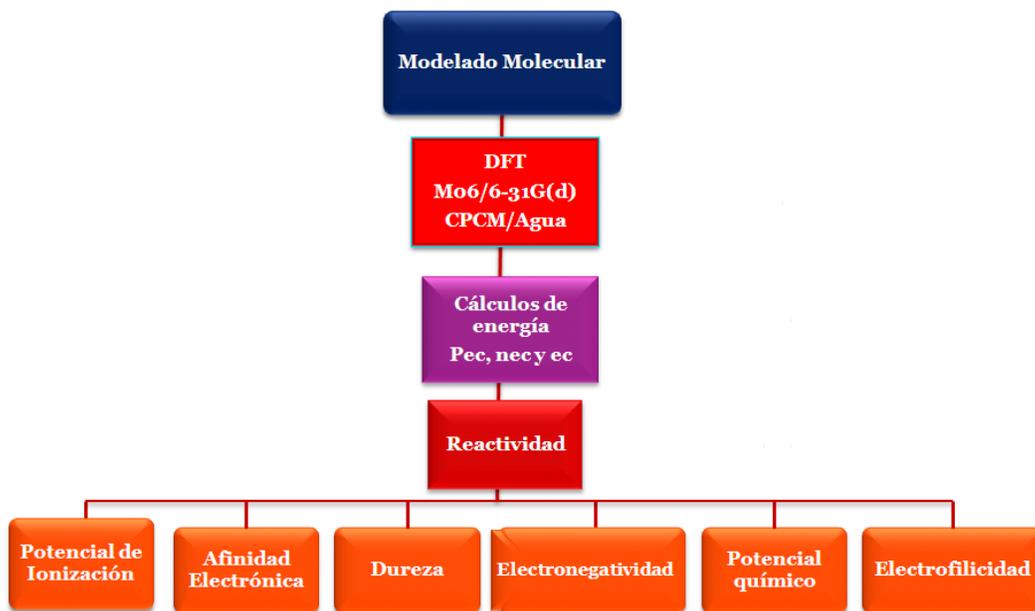


Sitio activo del receptor progesterona

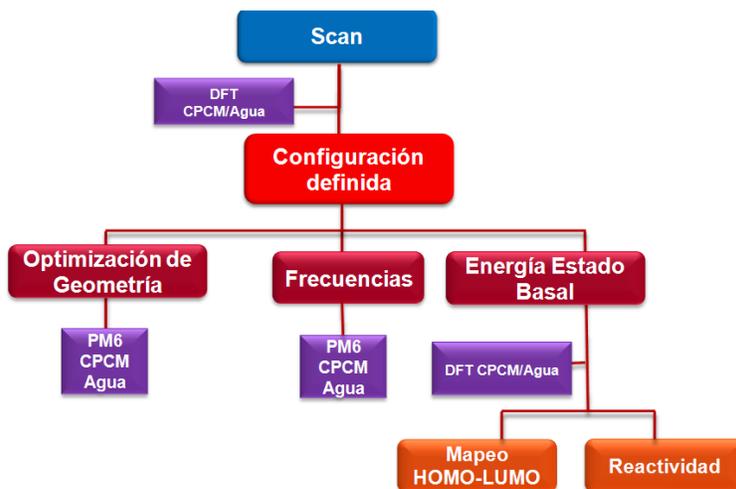


### 6.3 Detalles Computacionales

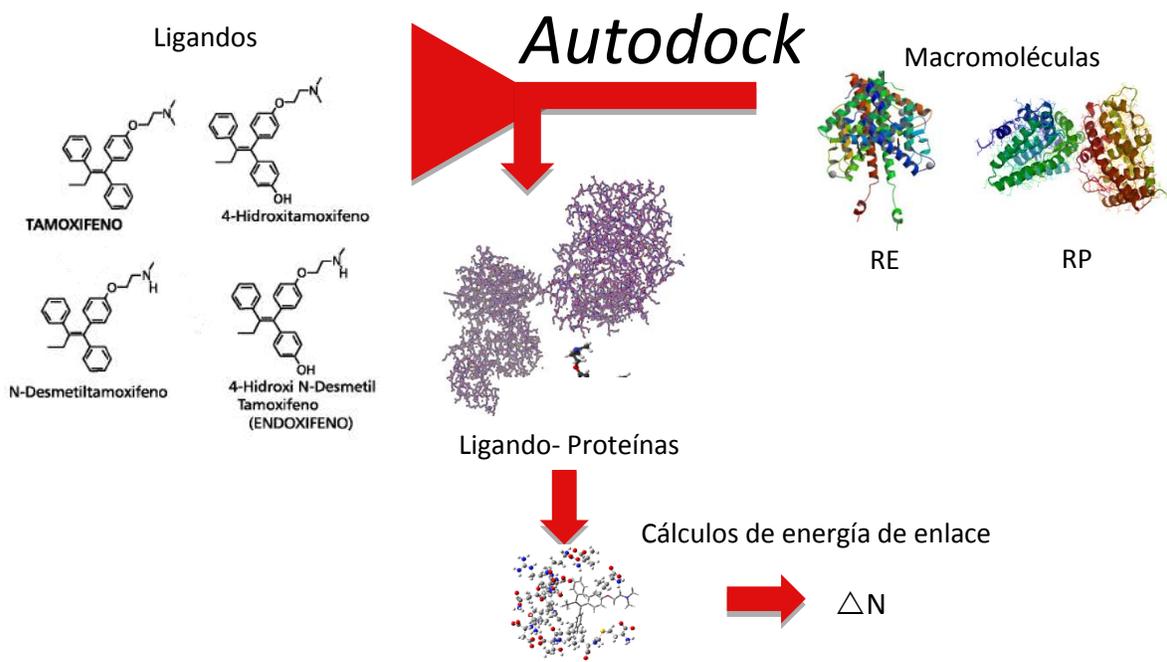
La metodología de la secuencia de caracterización en el fármaco, los metabolitos, ácido láctico, nanodiamante y aminoácidos del sitio activo, así como los cálculos de energía, aproximación de distancias y acoplamientos moleculares se muestran en la Figura 8-10. Las estructuras del nanodiamante, ácido láctico y metabolitos fueron construidas y la estructura del fármaco fue obtenida en DrugBank.



**Figura 8.** Diagrama de flujo del modelado aplicado al Tamoxifeno, ácido láctico, nanodiamante, metabolitos y residuos del sitio activo.



**Figura 9.** Diagrama de flujo del análisis de distancia de equilibrio en el complejo.

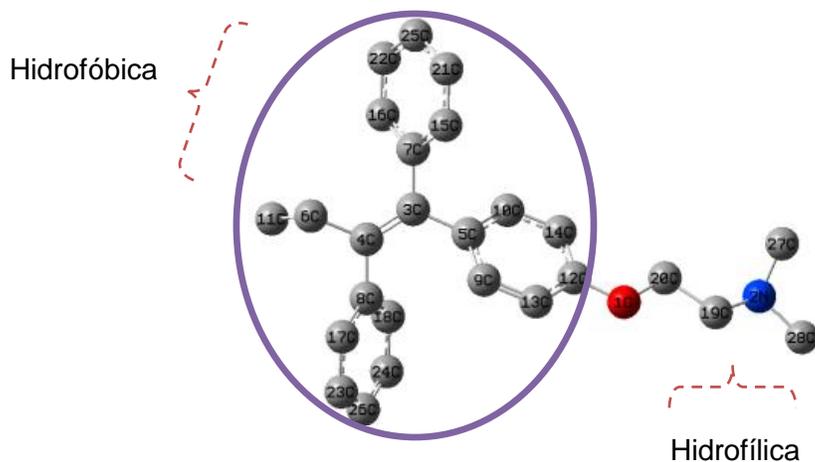


**Figura 10.** Diagrama de flujo del análisis de acoplamiento molecular fármaco, metabolitos con los receptores hormonales.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un requisito para los compuestos que son potencialmente candidatos a fármacos, es que sean solubles en los lípidos y agua, el cálculo de las propiedades del fármaco y del complejo ND-TAM se realizaron con agua como solvente y el modelo continuo de solvatación CPCM (Tomasi, *et al.*, 2005), debido a que es el principal componente en el organismo, al considerar que las reacciones de transferencia de protones en diversos disolventes son importantes no solo en la química, sino también en otras ramas de la ciencia como la biología y la medicina. (Ghalami y Ghiami, 2013).

La solubilidad se debe a la disposición de los anillos de benceno y un grupo funcional éter, que conforman la parte lipofílica o hidrofóbica del fármaco y a la posición del grupo funcional amina terciaria, que es la parte lipofóbica o hidrofílica. Estos grupos se muestran en la Figura 11.



**Figura 11.** Grupos funcionales hidrofóbicos e hidrofílicos del Tamoxifeno.

## 7.1 Tamoxifeno

### 7.1.1 Análisis estructural

La geometría del Tamoxifeno no es plana, presenta tres ángulos diedros con respecto al carbono central C3: C5-C3-C7-C16 con un valor de 127.44°, el C5-C3-C4-C8 con -9.66°, y C5-C3-C4-C6 con 171.49°, además de un ángulo diedro en el extremo opuesto de la molécula el cual corresponde al C20-C19-N2-C27 con un valor de 65.86°. La molécula con la geometría mencionada se presenta en la Figura 12.

Del espectro IR teórico obtenido, se interpretan los picos principales de grupos funcionales como son el estiramiento del C-H del alcano, el estiramiento  $-C=C-$  del alqueno y estiramiento del anillo C=C, los cuales son muy cercanos a los reportados experimentalmente por Shivam, *et al.*, 2012. La comparación espectral del IR experimental y el espectro IR teórico del fármaco TAM por la química modelo M06/6-31G (d), se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Comparación del espectro IR teórico con el espectro FT-IR del Tamoxifeno experimental.

	Vibraciones		
	Estiramiento Alcano C-H $\text{cm}^{-1}$	Estiramiento Alqueno $-C=C-$ $\text{cm}^{-1}$	Estiramiento Anillo C=C $\text{cm}^{-1}$
Química modelo	Datos Teóricos		
<b>M06/6-31G(d)</b>	2929.74	1690.54	1458.97
<b>Datos experimentales</b>	<b>2800-3000</b>	<b>1700-1740</b>	<b>1400-1500</b>

### 7.1.2 Zonas de ataque electrofílico del Tamoxifeno.

Con la obtención del estado de mínima energía del TAM, se determinó el sitio de ataque electrofílico. De acuerdo al índice de Fukui el sitio más susceptible a un ataque electrofílico es el C3, que corresponde al grupo funcional alqueno de la estructura del fármaco. Los átomos que presentan mayor disposición a ataques electrofílico nucleofílico y por radical se muestran en la Figura 12. Debido a que los alquenos reaccionan fácilmente y es fácil que se rompa el doble enlace

carbono-carbono y tomando en cuenta la importancia de no modificar la farmacodinamia del fármaco, se analiza el método que permita cargar el fármaco sobre la superficie del ND a través de los grupos funcionales COOH que contiene el vehículo acarreador

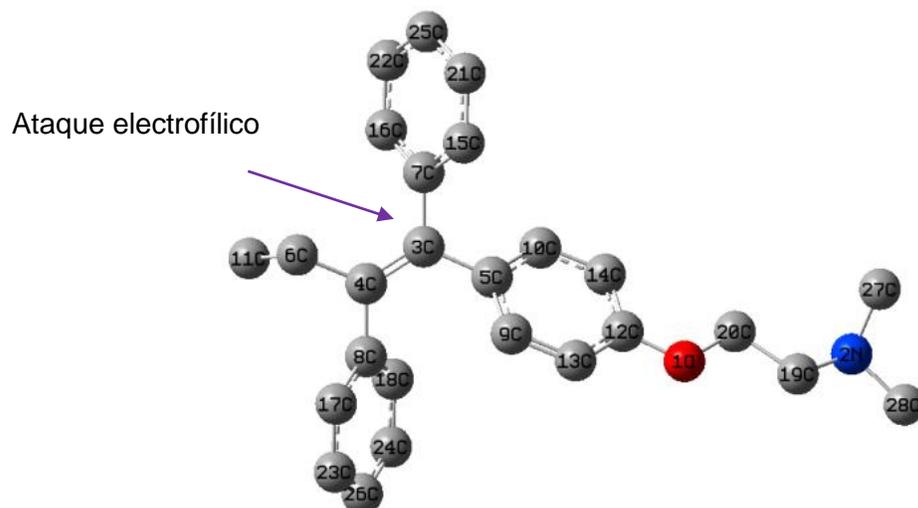
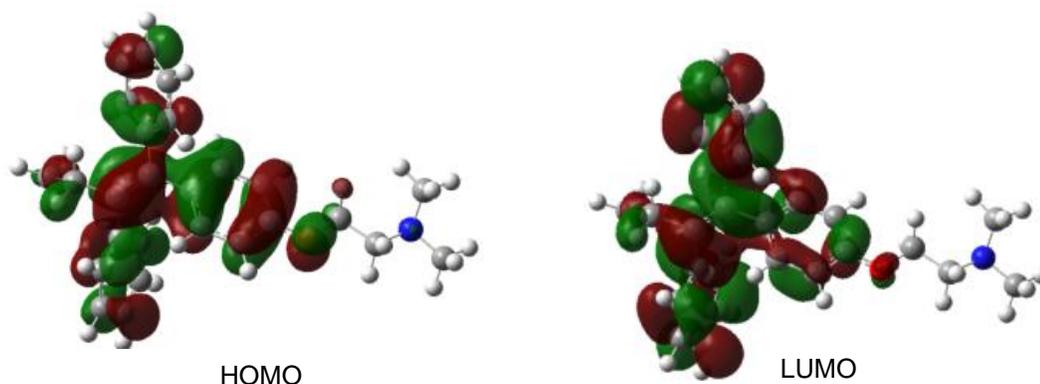


Figura 12. Sitio de ataque electrofílico del Tamoxifeno.

### 7.1.3 Densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO del Tamoxifeno.

El análisis de los orbitales de frontera muestra que la zona rica en electrones HOMO son susceptibles a un ataque electrofílico, como se muestra en la Figura 13, en el TAM la zona más rica en electrones se encuentra más cargada en los grupos funcionales fenilo y el éter de la estructura, consiguientemente esto indica que estos sitios son los que interaccionan en los receptores hormonales, conforme a lo reportado por Shiau, *et al.*, 1998. Tanto en el HOMO como en el LUMO en la zona de la amina terciaria y el grupo funcional éter presente en el fármaco no hay distribución de densidad electrónica esto es debido a que no hay separación de orbitales, lo que nos indica que esta parte de la estructura química del TAM no interaccionaría con el sitio activo de los receptores RE y RP.



**Figura 13.** Topologías de los orbitales moleculares de frontera (HOMO y LUMO) del fármaco TAM Isovalor 0.02.

La densidad electrónica permitió determinar el farmacóforo del Tamoxifeno. De acuerdo a Gareth 2003 el conocimiento de la densidad electrónica de un fármaco permite explicar cómo las drogas (ligandos) se unen estructuralmente al sitio activo del receptor.

#### **7.1.4 Cálculo de parámetros de reactividad del Tamoxifeno.**

Los parámetros químicos de reactividad, tales como potencial de ionización ( $I$ ), la afinidad electrónica (EA), electronegatividad ( $\chi$ ), dureza química ( $\eta$ ), electrofilicidad ( $\omega$ ) y potencial químico ( $\mu$ ) se consideraron para el estudio del TAM. Los parámetros fueron obtenidos a través de la aproximación por energías en su estado neutro, aniónico y catiónico, en base a la optimización de la geometría del estado fundamental.

En relación a los resultados obtenidos en la Tabla 2. Los valores de dureza química de fármacos contra el cáncer como el ciplastino y agentes alquilantes se encuentran dentro del rango 2.31 a 4.55 eV. Por lo tanto, el TAM es más reactivo que el ciplastino y los agentes alquilantes reportados por Kumar, *et al.*,2011 y López, *et al.*,2012.

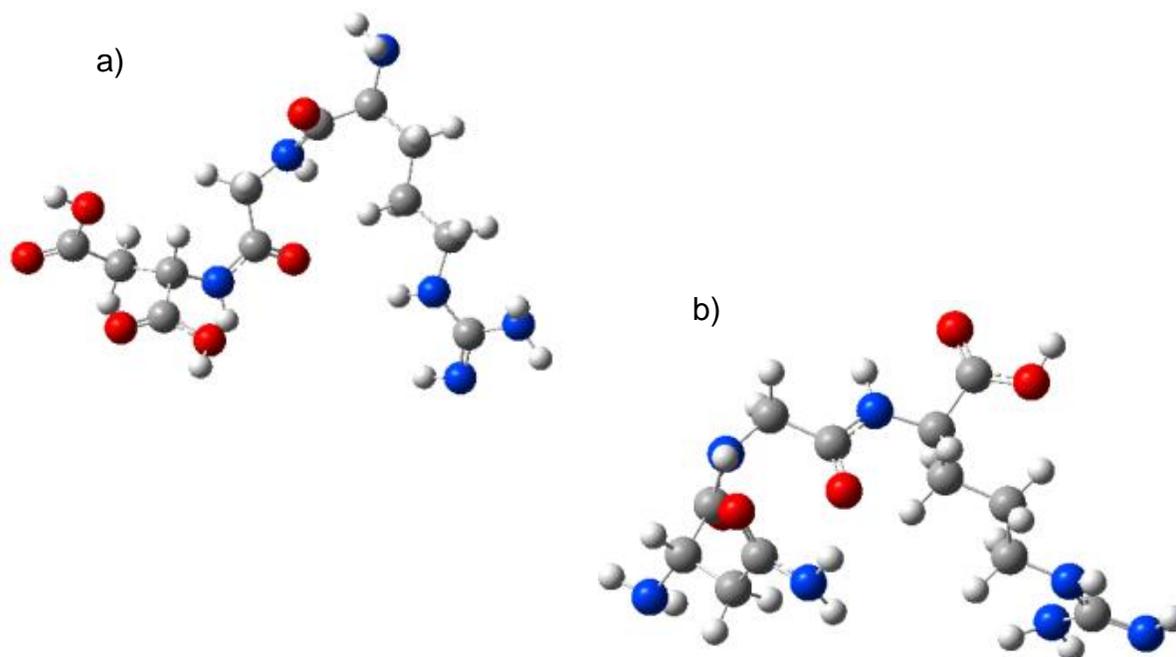
**Tabla 2.** Parámetros de reactividad del Tamoxifeno calculados con M06/6-31G(d).

Fármaco	AE (eV)	I (eV)	$\eta$ (eV)	$\chi$ (eV)	$\mu$ (eV)	$\omega$ (eV)
TAM	1.10	5.46	2.18	3.28	-3.28	2.46

## 7.2 RGD y NGR.

### 7.2.1 Análisis estructural del RGD y NGR.

La estructura de mínima energía de los tripéptidos RGD y NGR en fase acuosa se muestra en la Figura 14, el cálculo de frecuencias se llevó a cabo para corroborar que las moléculas se encuentran en su estado de mínima energía.



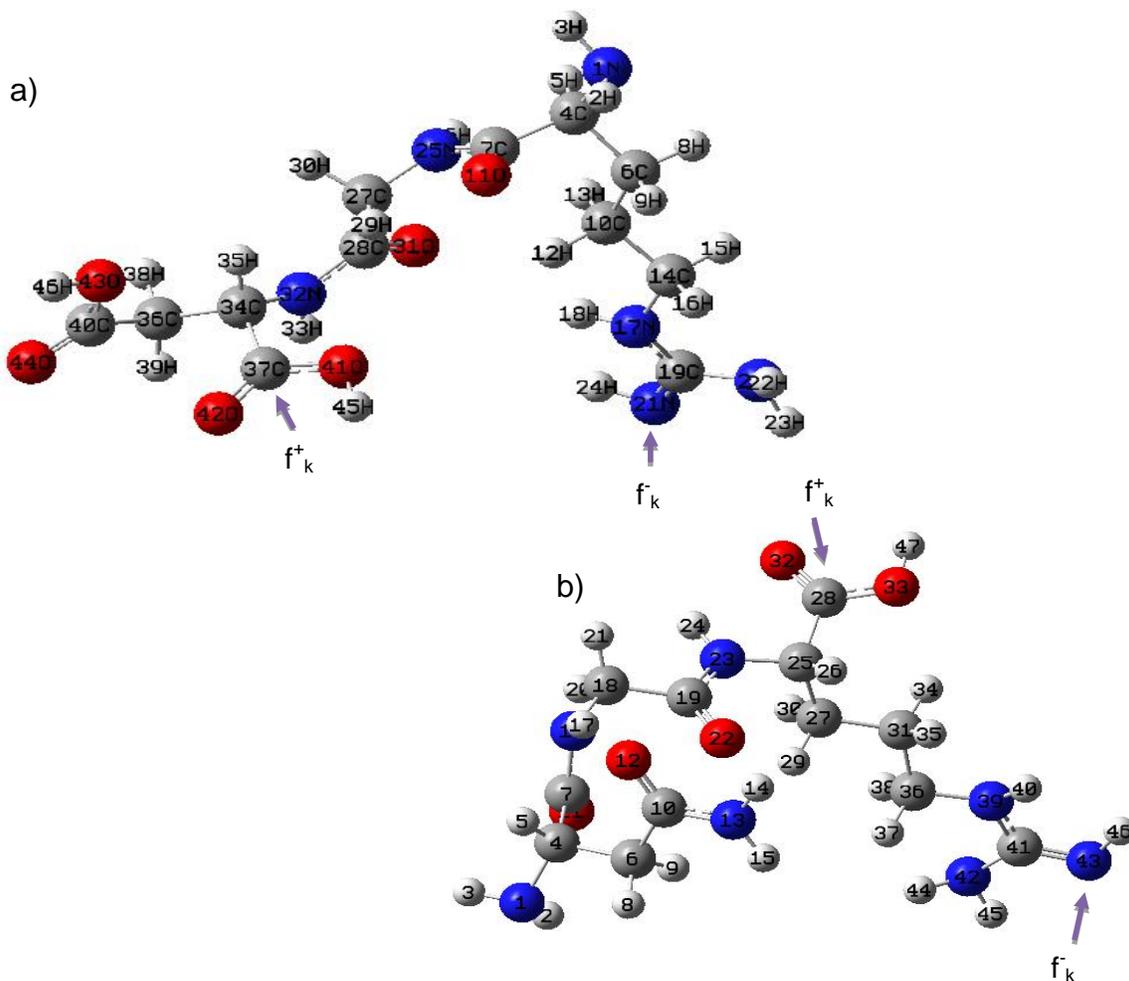
**Figura 14.** Estructura optimizada a) del RGD y b) del NGR.

Se observó que las estructuras de los tripéptidos tuvieron modificaciones antes y después de la optimización en sus ángulos diedros. Después de la optimización los ángulos en RGD cambiaron de  $0^\circ$  a  $43.85^\circ$  en O41-C37-C34-N32, de  $121.94^\circ$  a  $77.23^\circ$  en O11-C7-C4-C6 y de  $-180^\circ$  a  $-160.14^\circ$  en N21-C19-N17-C14. En NGR cambiaron de  $-161.91^\circ$  a  $-159.35^\circ$  en N1-C4-C6-C10, de  $-176.05^\circ$  a  $-172.97^\circ$  en

N43C4-N39-C36 y de  $0.36^\circ$  a  $-0.75^\circ$  en O22-C19-N23-C25. En la Figura 15, se pueden visualizar los átomos que forman los ángulos diedros en los tripéptidos.

### 7.2.2 Zonas de ataque nucleofílico y electrofílico del RGD y NGR

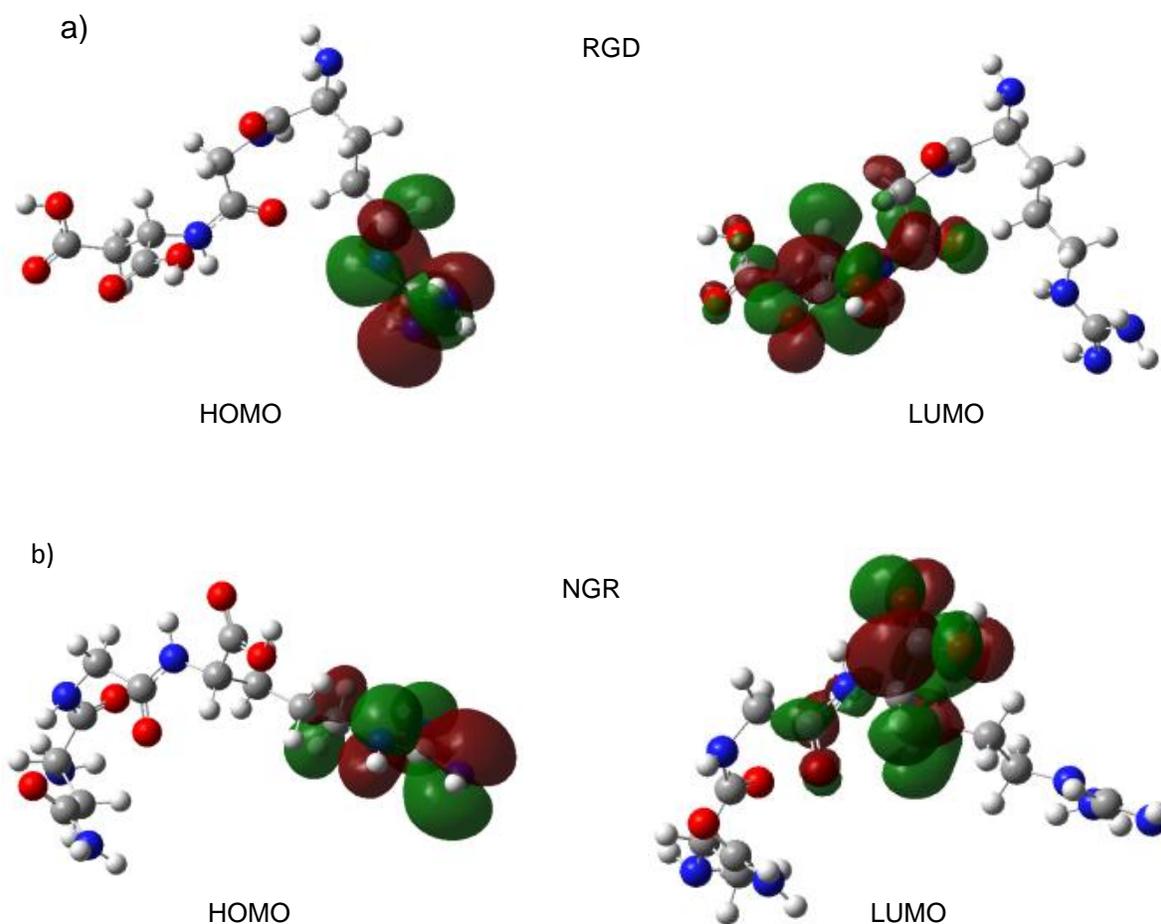
Una vez obtenida la estructura del estado basal, se calculó la energía y se determinó el sitio de ataque electrofílico ( $f_k^-$ ) y nucleofílico ( $f_k^+$ ). Los resultados de los condensados de los índices de Fukui se obtuvieron con la distribución de carga de Hirshfeld, el átomo C37 del tripéptido RGD es susceptible a un ataque nucleofílico y el N21 el sitio susceptible a un ataque electrofílico y en el tripéptido NGR el átomo susceptible a un ataque nucleofílico es el C28 y el átomo susceptible a un ataque electrofílico es el N43, como se muestra en la Figura 15.



**Figura 15.** Sitios de ataque nucleofílico y electrofílico a) del RGD y b) del NGR.

### 7.2.3 Densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO del RGD y NGR.

La distribución electrónica de los orbitales de frontera HOMO y LUMO en los tripéptidos RGD y NGR es mostrada en la Figura 16.



**Figura 16.** Topologías de los orbitales moleculares de frontera (HOMO y LUMO) a) del RGD y b) del NGR con un Isovalor 0.02.

En el mapeo de orbitales se observan las zonas que tienen saturación de electrones y que son susceptibles a un ataque electrofílico o nucleofílico, en el HOMO la mayor densidad electrónica localizada en el grupo guanidina de la arginina (R) en el RGD y NGR tal y como se muestra en la Figura 7 inciso a) y b) y en el LUMO se encuentra más cargada en los grupos funcionales carboxilo

perteneciente al ácido aspártico (D) del RGD y en el carboxilo de la glicina del NGR. Al aproximar el TAM a estos tripéptidos se puede observar si los electrones migran del orbital HOMO al orbital LUMO, esta es una forma de predecir si hay interacción del fármaco con estos tripéptidos que, de llegar a tenerla, es lo que generalmente se conoce como un efecto secundario producido por el fármaco.

#### 7.2.4 Cálculo de parámetros de reactividad del RGD y NGR.

Los parámetros químicos de reactividad, tales como potencial de ionización (I), la afinidad electrónica (EA), electronegatividad ( $\chi$ ), dureza química ( $\eta$ ), electrofilicidad ( $\omega$ ) y potencial químico ( $\mu$ ), para los tripéptidos RGD y NGR, se muestran en la Tabla 3, al igual que el Tamoxifeno, fueron obtenidos a través de la aproximación por energías en las cuales se calcula la energía del péptido en su estado neutro, aniónico y catiónico con base en la optimización de la geometría del estado fundamental.

**Tabla 3.** Parámetros de reactividad de los péptidos RGD y NGR calculados con M06/6-31G(d) con el método de solvatación CPCM, utilizando DFT.

Péptido	I (eV)	AE (eV)	$\eta$ (eV)	$\chi$ (eV)	$\mu$ (eV)	$\omega$ (eV)
RGD	6.16	0.29	2.94	3.23	-3.23	1.77
NGR	6.16	0.01	3.08	3.09	-3.09	1.55

Los parámetros de reactividad química de los tripéptidos RGD y NGR son muy semejantes, sin embargo, el RGD es más afín en aceptar electrones y es más reactivo que el NGR.

### **7.3. Complejo RGD-TAM-y NGR-TAM.**

El complejo RGD-TAM y NGR-TAM consiste en la unión de las moléculas RGD y NGR al TAM a través de la distancia de equilibrio, la cual permite hacer una serie de cálculos de energía a través de 15 pasos con aproximaciones de 1 Å. Sin embargo, debido a que la distancia de equilibrio no incluye una geometría optimizada, estos complejos se optimizan con la química modelo M06/6-31G(d) y el método de solvatación CPCM usando como solvente agua, seguido de un cálculo de frecuencias que permitió verificar que ambos complejos se encuentran en el estado de mínima energía y por lo tanto, en un estado basal y así proceder a determinar si hay interacción entre el fármaco con alguno de estos tripéptidos que son específicos de una célula sana o con cáncer.

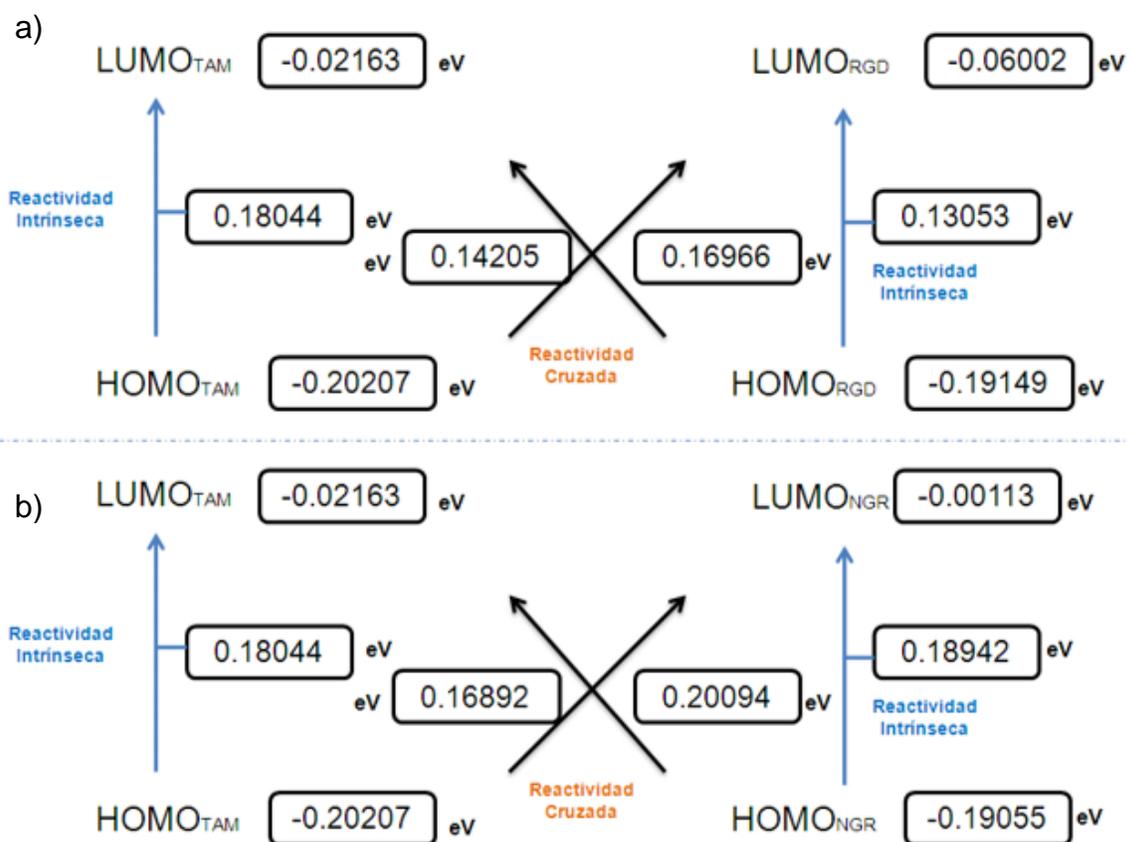
#### **7.3.1 Análisis estructural del RGD-TAM y NGR-TAM.**

#### **7.3.2 Reactividad del complejo RGD-TAM y NGR-TAM.**

El cálculo de la reactividad intrínseca y la reactividad cruzada de TAM, RGD y NGR permite determinar la interacción de los tripéptidos y el fármaco. La reactividad intrínseca (RI) se define por la energía del orbital molecular más alto ocupado (HOMO) y el orbital molecular más bajo (LUMO) en una sola molécula. La reactividad cruzada (RC) se calcula para determinar la interacción entre dos moléculas. En este caso el de los complejos TAM-RGD y TAM-NGR. La energía de separación analizada es: a)  $HOMO_{TAM}-LUMO_{RGD}$  y  $HOMO_{RGD}-LUMO_{TAM}$  y b)  $HOMO_{TAM}-LUMO_{NGR}$ ,  $HOMO_{NGR}-LUMO_{TAM}$  Ver la Figura 17.

La reactividad intrínseca indica qué tan propensa es una molécula a reaccionar (Chamorro, et al., 2015) y la reactividad cruzada permite saber cómo reaccionan las moléculas entre sí, por lo tanto, quién da o recibe electrones. Ambos índices muestran y ofrecen una aproximación a la reactividad de las moléculas involucradas donde se refleja la relación entre las estructuras, la reacción química, y su mecanismo molecular (Vargas-Sánchez, et al., 2015).

De acuerdo con los valores obtenidos de reactividad intrínseca y el hecho de que el gap entre HOMO y LUMO caracteriza la estabilidad química molecular (RAO, 1965), RGD tiene menor estabilidad que TAM y NGR. El valor para NGR es 0.18942 eV, para TAM 0.18044 eV y para RGD 0.13053 eV. Con respecto a la reactividad cruzada TAM da más fácilmente sus electrones a los tripéptidos.



**Figura 17.** Reactividad intrínseca y cruzada en los complejos a) RGD-TAM y b) NGR-TAM.

Los parámetros de reactividad química de los complejos se calcularon y los resultados se encuentran en la Tabla 4. Estos parámetros son potencial de ionización ( $I$ ); afinidad electrónica ( $EA$ ); electronegatividad ( $\chi$ ); dureza química ( $\eta$ ); índice de electrofilicidad ( $\omega$ ) y potencial químico ( $\mu$ ). Las propiedades se

obtuvieron por aproximación vertical con cálculos de energía catiónica, aniónica y neutra.

**Tabla 4.** Parámetros de reactividad de los complejos TAM-RGD y TAM-NGR calculados con M06/6-31G(d).

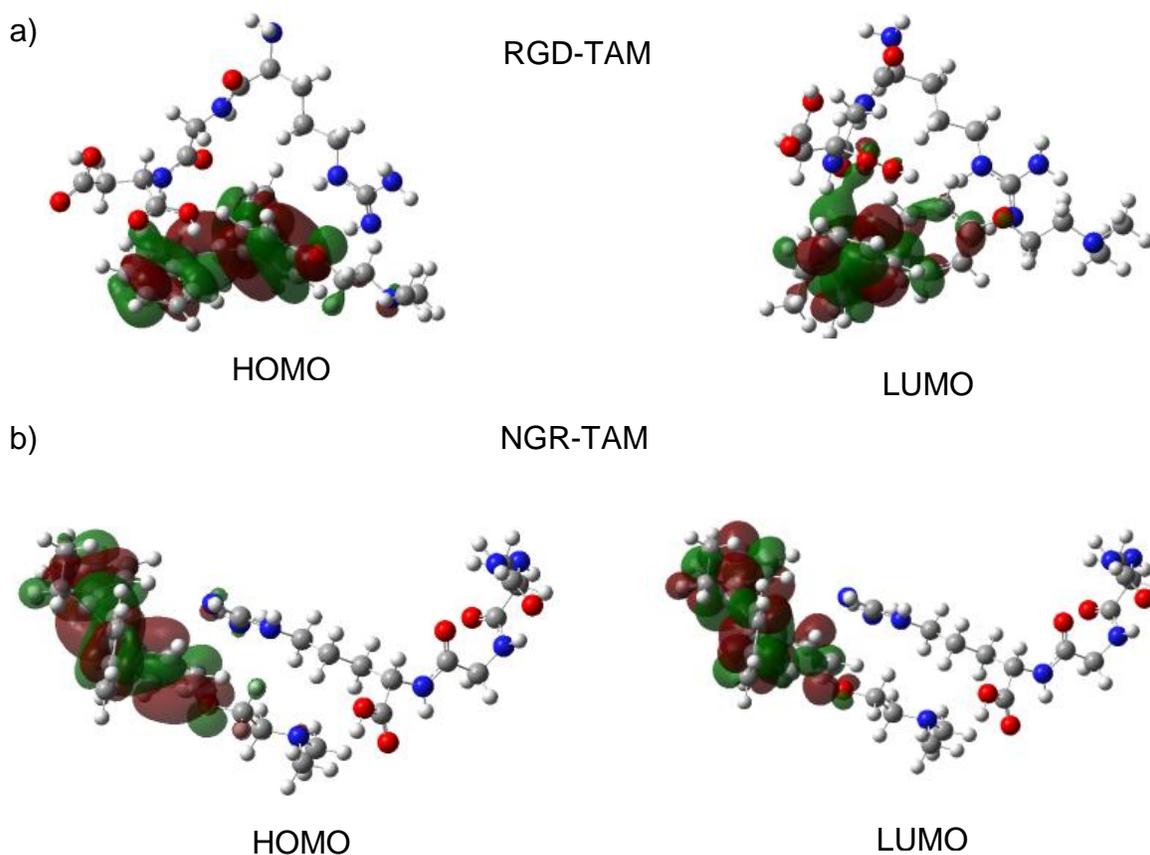
Complejo	AE (eV)	I (eV)	$\eta$ (eV)	$\chi$ (eV)	$\omega$ (eV)	$\mu$ (eV)
TAM- RGD	1.11	5.36	2.12	3.23	2.46	-3.23
TAM-NGR	1.24	5.53	2.14	3.38	2.67	-3.38

Los valores de reactividad química son muy semejantes en ambos complejos, sin embargo, el complejo TAM-RGD es más afín en aceptar electrones, posee mayor estabilidad y además tiene el valor más bajo en el potencial de ionización y es más reactivo que el complejo TAM-NGR.

Otro concepto importante que puede caracterizar es la citotoxicidad. De acuerdo a Aggarwal, cuando el valor del GAP entre HOMO-LUMO es menor, la citotoxicidad es mayor. Por lo tanto, el análisis del GAP en los complejos TAM-RGD y TAM-NGR son 4.849 eV y 4.852 eV respectivamente y son menores que el obtenido para el fármaco Tamoxifeno que es de 6.52 eV, por lo tanto, la presencia del TAM en los tripéptidos tiene un efecto citotóxico.

### 7.3.3 Densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO del complejo RGD-TAM y NGR-TAM.

En el mapeo de orbitales en la Figura 18a) muestra la densidad electrónica de HOMO en el complejo RGD-TAM se encuentra sobre el farmacóforo de TAM y una parte en la cadena lineal del fármaco. En LUMO se muestra la migración de electrones de orbitales HOMO a orbitales LUMO en el caso RGD; que incluyen átomos de los grupos laterales R disponibles, tales como el grupo funcional carboxilo que pertenece al ácido aspártico del tripeptido RGD. Sin embargo, se puede observar que la densidad electrónica en el HOMO y LUMO en el complejo NGR-TAM se localizó sobre el farmacóforo del TAM, lo que sugiere que no hay interacción entre el fármaco y este tripéptido. Figura 18b).



**Figura 18.** Topologías de los orbitales moleculares de frontera (HOMO y LUMO) de los complejos a) del RGD-TAM y b) del NGR-TAM con un Isovalor 0.02.

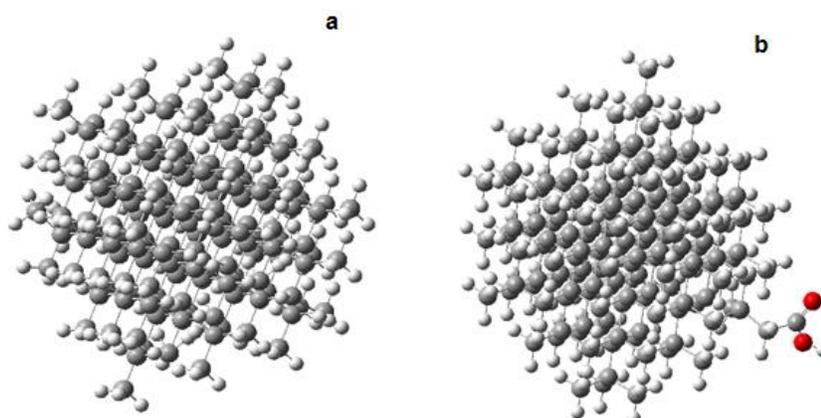
El mapeo de orbitales permitió determinar que al administrar el fármaco directamente, este interactúa con células sanas y células cancerosas. Sin embargo, si el medicamento es suministrado a través de un vehículo acarreador de manera que la droga pueda viajar a través del organismo, sin afectar a las células sanas y que, al llegar al sitio de interés, es decir, el Receptor Hormonal, el TAM se activa e interactúa con los receptores, evitando de esta manera los efectos secundarios. En esta investigación se estudia particularmente el nanodiamante como acarreador.

## 7.4. Nanodiamante.

### 7.4.1 Análisis estructural del nanodiamante.

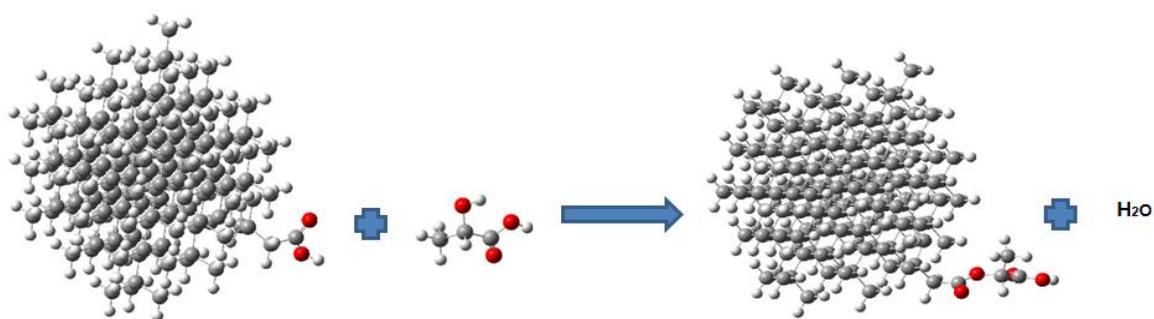
El análisis de la estructura del nanodiamante, se llevó a cabo con la misma metodología que el resto de las moléculas estudiadas previamente.

La optimización de la estructura de mínima energía del ND se muestra en la Figura 19 (a), la cual es una estructura a base de carbono con un tamaño aproximado de 1.5 nm, el ND al someterse a un tratamiento ácido que genera grupos funcionales carboxilo en su superficie (Pichot, et al., 2010 y Comet, et al., 2009). La estructura optimizada del ND con ácido carboxilo se muestra en la Figura 19(b). De acuerdo a Comet, et al.,2010 se puede determinar por medio del método de titulación de Bohem que los únicos grupos funcionales presentes en la superficie de un ND son grupos carboxílicos, y que la densidad media de la superficie de grupos carboxilo corresponde a 0.85 COOH por nanómetro cuadrado. En la Figura 19 inciso a) y b) se observa que en las estructuras optimizadas no tienen cambios estructurales en el ND por la generación de ácidos carboxilos sobre la superficie.



**Figura 19.** Estructura optimizada, (a) nanodiamante, (b) nanodiamante con grupos funcionales carboxilos.

La reacción de esterificación se realizó utilizando un monómero de ácido láctico de PLLA, que ha demostrado ser biocompatible (Garlotta, et al.,2001) y el grupo funcional carboxilo que se encuentra en la superficie del ND, lo que permitió generar una cadena lineal de cinco átomos para asegurar una mejor interacción entre ND y TAM. La reacción de esterificación se muestra en la Figura 20.

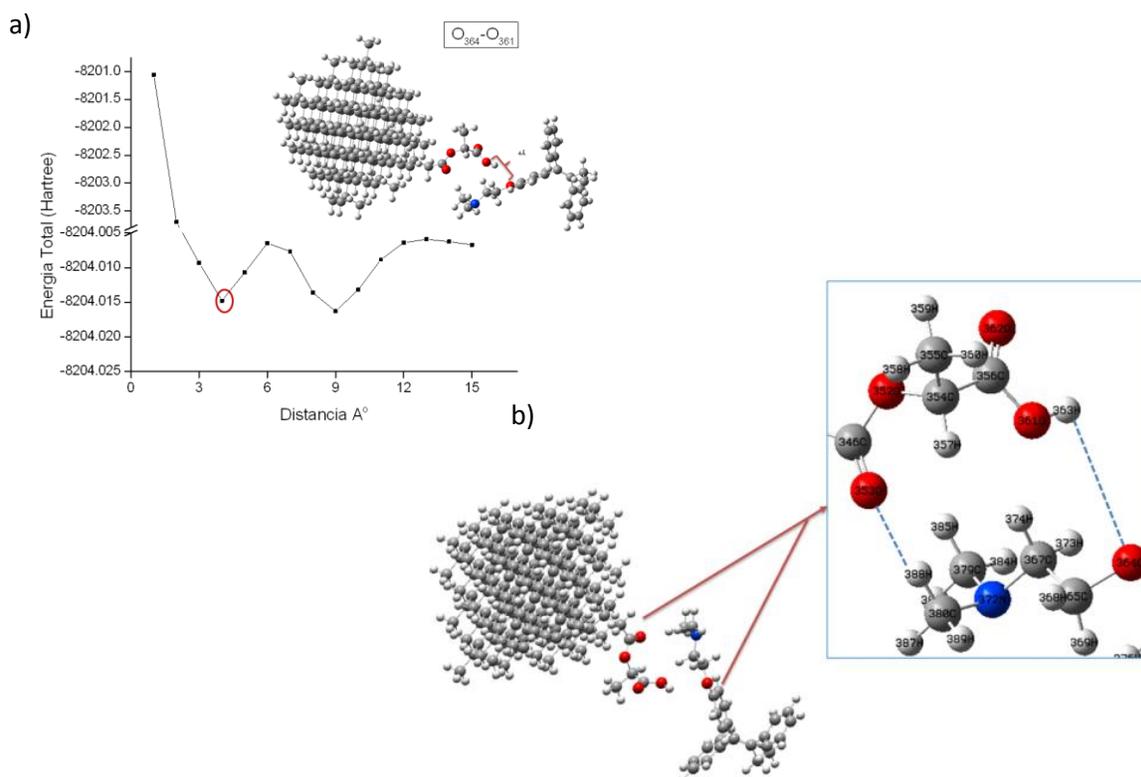


**Figura 20.** Reacción de esterificación ND-COOH con el ácido láctico.

#### **7.4.2 Determinación de la distancia óptima del complejo ND-TAM.**

Para la formación del complejo ND-TAM se realizó un análisis de distancia de equilibrio de uno de los múltiples enlaces generados por el complejo, que permitió hacer una serie de cálculos acercando a diferentes distancias dos moléculas a través de la aproximación de los átomos de oxígeno en el ND y el TAM, su estado de mínima energía fue -8204.01 Hartrees, a una distancia de 4 Å. Ver Figura 21. Una vez definida la distancia de equilibrio se realizó una optimización y cálculo de frecuencias del complejo ND-TAM con el método semiempírico PM6 y CPCM usando como solvente agua.

En el complejo ND-TAM, se obtuvieron dos puentes de hidrógeno débiles y de acuerdo a la regla de cinco de Lipinski, *et al*, 2001, que establece que si se tienen cinco o menos puentes de hidrógeno el fármaco tiene buena absorción o permeabilidad. Por lo tanto, el complejo ND-TAM tendrá buena absorción y permeabilidad.



**Figura 21.** A) Distancia de equilibrio, b) Enlaces de puentes de hidrógeno en el complejo ND-TAM.

## 7.5. Complejo ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR.

### 7.5.1 Análisis estructural del complejo ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR.

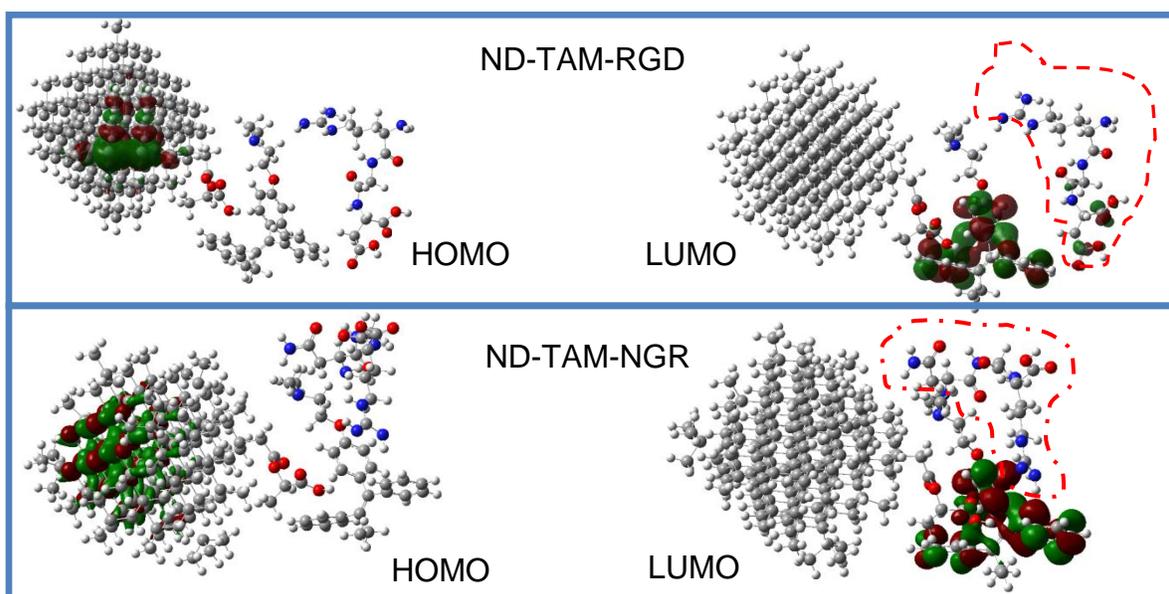
Se optimizaron los complejos ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR con la química M06/6-31G(d) y el modelo continuo de solvatación CPCM (Tomasi, et al., 2005), así como también el cálculo de frecuencias que permitió obtenerlas vibraciones características.

### 7.5.2 Densidad electrónica de orbitales HOMO y LUMO en los complejos ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR.

Se realizó el análisis de los orbitales de frontera HOMO y LUMO de los complejos ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR. En ambos complejos, el HOMO se encuentra en

el ND, sin embargo, en el LUMO se ha observado una interacción del TAM con el RGD, la cual permanece en la misma parte del tripéptido antes de añadir la nanoestructura. El mapeo de los orbitales frontera se muestra en la Figura 21. Los tripeptidos se marcan con la línea roja punteada.

A pesar de la interacción del RGD con el complejo ND-TAM, el análisis del GAP HOMO-LUMO en los complejos ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR tienen 7.47 eV y 6.91 eV respectivamente, aumentando 1.22 eV en el RGD y 0.32 eV en el NGR. Por lo tanto, la citotoxicidad del Tamoxifeno disminuye con el uso del nanodiamante.



**Figura 22.** Topologías de los orbitales moleculares de frontera (HOMO y LUMO) de los complejos ND-TAM- RGD y ND-TAM- NGR con un Isovalor 0.02.

### 7.5.3 Parámetros de reactividad en el complejo ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR.

En estudios recientes se ha hecho el uso de los tripéptidos RGD y NGR de forma sintética en conjunto con un vehículo acarreador, donde argumentan que es más eficaz la entrega de fármacos a su sitio de unión cuando se usan estos tripéptidos, por lo que se revisó la interacción del complejo ND-TAM con el RGD y NGR para corroborar si en efecto la adición de estos tripéptidos mejora la dureza química que tiene el ND-TAM.

Los parámetros químicos de reactividad, tales como potencial de ionización (I), la afinidad electrónica (EA), permiten determinar la dureza química, las cuales fueron calculadas para los complejos ND-TAM-NGR y ND-TAM-RGD. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Parámetros de reactividad de los complejos ND-TAM-RGD, ND-TAM-NGR y ND-TAM calculados con M06/6-31G (d) con el método de solvatación CPCM.

Complejo	I (eV)	AE (eV)	$\eta$ (eV)
ND-TAM-RGD	5.53	1.24	2.14
ND-TAM-NGR	5.11	0.64	2.24
ND-TAM	2.72	1.08	0.82

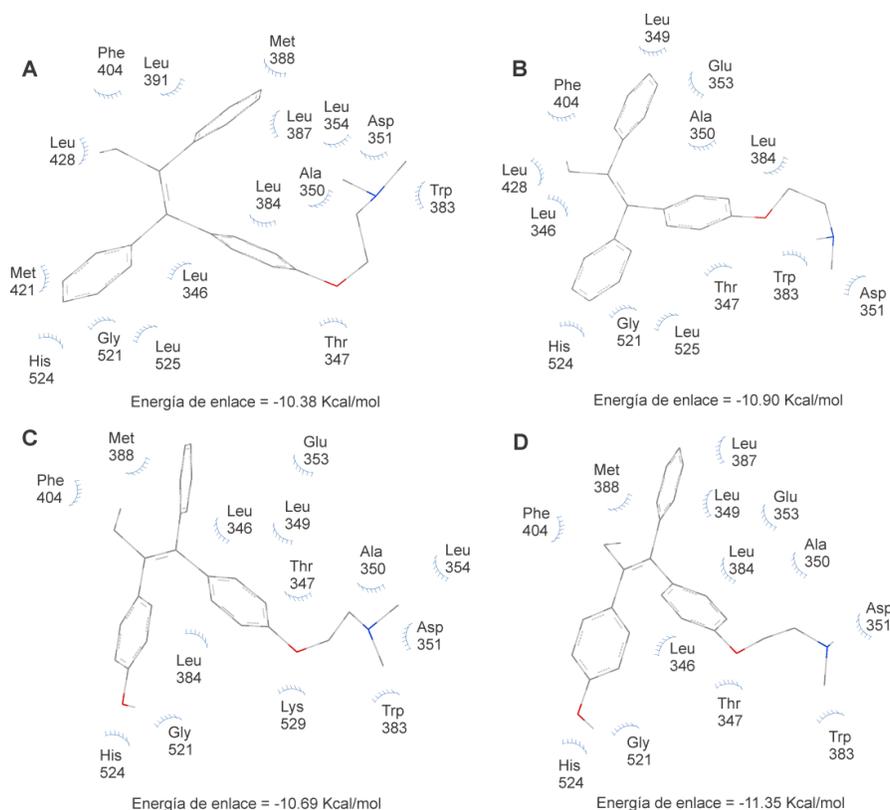
El análisis de la reactividad química de los complejos ND-TAM-RGD, ND-TAM-NGR y ND-TAM, muestran que la mejor opción para la entrega del fármaco Tamoxifeno en el receptor de estrógeno y progesterona es el complejo ND-TAM de acuerdo con el valor de la dureza química. Los complejos ND-TAM-RGD y ND-TAM-NGR no se consideran óptimos para el acarreo del fármaco debido a que será más difícil reaccionar en presencia de los receptores hormonales.

## 7.6. Análisis del Receptor de estrógeno con el Tamoxifeno y sus metabolitos.

### 7.6.1 Acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular entre el receptor de estrógeno con el Tamoxifeno y sus diferentes metabolitos, N-desmetiltamoxifen (NDTAM), el 4-hidroxitamoxifeno

(4OHTAM) y el endoxifen (END), se efectuó por medio de AutodocAk 4.2 con una interfaz gráfica ADT 1.4.5, la estructura esquemática del sitio de activo y las energías de enlace se muestran en la Figura 23.



**Figura 23.** Las mejores posiciones de acoplamiento, energía de enlace y estructura esquemática del sitio activo del A) Tamoxifeno, B) NDTAM, C) 4OHTAM y D) END con el receptor de estrógeno.

Los valores negativos en las energías de enlace obtenidas en cada uno de los acoplamientos realizados indican que el sistema es estable y que hay una interacción entre el RE con el fármaco y sus metabolitos en el sitio activo.

La energía de enlace muestra que el END con -11.35 kcal/mol es el metabolito con mayor afinidad en el sitio activo, que el propio TAM con -10.38 kcal/mol, lo cual coincide con lo reportado por Clarke et al., 2003, donde hace mención que el END tiene una afinidad por el receptor de estrógeno 100 veces mayor que el ND-TAM

o el propio TAM. De acuerdo a Garet, 2007, si un ligando tiene un buen acoplamiento y sus grupos funcionales están colocados de manera que interactúen con el sitio activo de la macromolécula analizada, es probable que este ligando sea biológicamente activo. Lo que ha llevado al centro oncológico Clínica Mayo a realizar pruebas en el uso del END como una nueva alternativa de tratamiento contra el cáncer de mama, debido a que han encontrado que este metabolito es biológicamente activo.

### **7.6.2 Descripción del sitio activo.**

Los aminoácidos que conforman el sitio activo del receptor de estrógeno con el TAM y sus metabolitos son los siguientes:

*TAM:* Trp383-Leu384, Gly521, Leu346-Thr347, Phe404, His524-Leu525, Leu387-Met388, Leu391, Leu428, Leu354, Met421 y Ala350-Asp351.

*4OHTAM:* Trp383-Leu384, Glu353-Leu354, Leu349-Ala350-Asp351, Gly521, Met388, His524, Lys529, Leu346-Thr347 y Phe404.

*NDTAM:* Trp383-Leu384, Leu349-Ala350-Asp351, Gly521, Leu346-Thr347, Phe404, His524-Leu525, Glu353 y Leu428.

*END:* Trp383-Leu384, Leu349-Ala350-Asp351, Gly521, His524, Leu346-Thr347, Phe404, Glu353 y Leu387-Met388.

Los residuos que están en contacto con el TAM en sitio activo están formados por 16 residuos. De éstos solamente diez están unidos entre sí en la secuencia de la proteína (Leu 346-Thr 347), (Trp 383-Leu384), (His 524-Leu525), (Ala 350-Asp 351) y (Leu 387-Met 388).

Con carácter altamente hidrofílico, se encuentra el residuo glicina (Gly 521), que es uno de los aminoácidos más pequeño y el único no quiral de los 20 aminoácidos presentes en la célula. De los residuos hidrofóbicos se encuentran la fenilalanina (Phe 404) característica dada debido a su anillo fenílico; tres residuos

de leucina de leucina (Leu 354, 391 y 428) que contiene un radical alquilo y la metionina (Met 421) que contiene un átomo de azufre. El sitio de interacción identificado por el acoplamiento molecular del TAM en el RE, coincide con el sitio activo obtenido por cristalografía de rayos X por Shiau, et al., 1998.

En el caso del 4OHTAM está formado por 14 residuos. Nueve de ellos están unidos formando dipéptidos y tripéptidos, Triptofano383-Leucina384 (Trp 383-Leu384), Ácido glutámico353-Leucina354 (Glu 353-Leu354), Leucina346-Treonina347 (Leu 346-Thr347) y Leucina349-Alanina350-Ácido aspartico351 (Leu349-Ala350-Asp351). Los otro cinco son: glicina521 (Gly 521), la cual es altamente hidrofílica; la lisina529 (Lys 529), este residuo contiene un grupo amino protonable que provee carga positiva a las proteínas acetiltransferasas; la histidina524 (His524) que contienen un grupo amino en la cadena lateral que participa en enlaces de puentes de hidrógeno. De los residuos hidrofóbicos se encuentran la fenilalanina (Phe 404) y la metionina (Met 388).

El sitio activo en el NDTAM consiste en los siguientes residuos: Leucina346-Treonina347 (Leu346-Thr347), Histidina524-Leucina525 (His524-Leu525), Triptofano383-Leucina384 (Trp383-Leu384) y Leucina349-Alanina350-Ácido aspartico351 (Leu349-Ala350-Asp351). El residuo hidrofílico glicina521 (Gly521) y los residuos hidrofóbicos fenilalanina404 (Phe404), ácido glutámico (Glu353) y leucina428 (Leu428).

Por otra parte el sitio activo en el END está formado por los siguientes residuos. Leucina346-Treonina347 (Leu346-Thr347), Leucina387-Metionina388 (Leu387-Met388) y Triptofano383-Leucina384 (Trp 383-Leu384) y los residuos glicina521 (Gly 521) y histidina524 (His524) que son altamente hidrofílicos.

### **7.6.3 Reactividad química del sitio activo**

Una vez definido el sitio activo del TAM y cada uno de sus metabolitos, se realizó un análisis cuantitativo de la reactividad de los residuos por medio de los descriptores de reactividad como son el potencial de ionización (I) y la afinidad electrónica (AE), el potencial químico ( $\mu$ ), la dureza química ( $\eta$ ) y la electrofilicidad

( $\omega$ ). Los parámetros de reactividad de los residuos y los metabolitos se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 6.** Parámetros de reactividad del sitio activo del receptor d estrógeno con el fármaco Tamoxifeno y sus metabolitos.

Ligandos	Sitio activo	AE (eV)	I (eV)	$\eta$ (eV)	$\chi=-\mu$ (eV)	$\omega$ (eV)
TAM	Phe 404	0.51	6.4	2.95	-3.46	2.03
	Leu 354	0.34	7.00	3.33	-3.67	2.02
	Leu 391	0.27	6.21	2.97	-3.24	1.77
	Leu 428	0.47	7.00	3.26	-3.73	2.14
	Met 421	0.88	6.18	2.65	-3.53	2.35
	Gly 521	0.21	7.03	3.41	-3.62	1.92
	Leu346-Thr347	0.88	7.74	3.43	-4.31	2.71
	Trp383-Leu384	0.91	6.04	2.56	-3.47	2.35
	His524-Leu525	0.81	6.10	2.65	-3.46	2.25
	Ala350-Asp351	0.45	5.77	2.66	-3.11	1.81
4OHTAM	Leu387-Met388	0.51	6.25	2.87	-3.38	1.99
	Gly 521	0.21	7.03	3.41	3.62	1.92
	Met 388	0.46	6.11	2.82	2.39	1.91
	His 524	0.43	6.20	2.89	3.31	1.90
	Lys 529	0.83	7.22	3.19	4.02	2.54
	Phe 404	0.51	6.40	2.95	3.46	2.03
	Trp383-Leu384	0.91	6.04	2.56	3.47	2.35
	Glu 353-Leu354	0.66	5.59	2.47	3.13	1.98
	Leu346-Thr347	0.88	7.74	3.43	4.31	2.71
Leu349-Ala350-Asp351	0.73	5.79	2.53	3.26	2.10	
NDTAM	Gly 521	0.21	7.03	3.41	3.62	1.92
	Phe 404	0.51	6.4	2.95	3.46	2.03
	Glu 353	0.20	5.62	2.71	2.91	1.57
	Leu 428	0.47	7.00	3.23	3.73	2.14
	His 524-Lue525	0.81	6.1	2.65	3.46	2.25
	Trp383-Leu384	0.91	6.04	2.56	3.47	2.35
	Leu 346-Thr347	0.88	7.74	3.43	4.31	2.71
	Leu 349-Ala350-Asp351	0.73	5.79	2.53	3.26	2.10
END	Gly 521	0.21	7.03	3.41	3.62	1.92
	His 524	0.43	6.20	2.89	3.31	1.90
	Leu 387-Met388	0.51	6.25	2.87	3.38	1.99
	Leu 346-Thr347	0.88	7.74	3.43	4.31	2.71
	Trp383-Leu384	0.91	5.79	2.53	3.26	2.10

Se calcularon los parámetros de reactividad química del sitio activo de cada uno de los acoplamiento. En el TAM los valores de afinidad electrónica son todos positivos, con respecto al potencial de ionización las cantidades se mantuvieron

arriba de 6 eV. En el 4OHTAM el residuo más reactivo es Glu353-Leu354. En NDTAM el residuo más estable es Leu346-Thr347 y en el análisis del END el valor más bajo de potencial de ionización está en el residuo Trp383-Leu384 el cual impacta directamente el valor de dureza química.

#### **7.6.4 Descriptor de transferencia de carga.**

El descriptor de transferencia de carga ( $\Delta N$ ) es una de las interacciones no covalentes que están presentes en sistemas biológicos en un complejo macromolécula-ligando el cual se describe en la ecuación 4.9.

Un valor positivo de  $\Delta N$  indica que el fármaco actúa como un aceptor de electrones, mientras que un valor negativo de  $\Delta N$  indica que el fármaco actúa como un donador de electrones. Por lo tanto, en el RE el TAM en presencia del residuo Ala 350-Asp351 actúa como aceptor de electrones, mientras que la transferencia de carga con el resto de los residuos que conforman el sitio activo son valores negativos, comportándose el TAM como donador de electrones. En la presencia de los residuos Glu353-Leu354, Leu349-Ala350-Asp351 y His524, la  $\Delta N$  del 4OHTAM es aceptor de electrones, mientras que frente al resto de los residuos actúa como donador de electrones. El NDTAM actúa como aceptor de electrones en presencia de los residuos Glu353 y Leucina349-Ala350-Asp351 y como donador de electrones con el resto de los residuos. Finalmente, el END es un aceptor de electrones en la presencia del residuo Trp383-Leu384 y con el resto de los residuos actúa como donante de electrones. Los valores se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 7.** Transferencia de carga entre el Tamoxifeno y los metabolitos y los residuos del receptor de estrógeno con su identificación de secuencia.

Metabolito	Residuo	$\Delta N$
TAM	Phe 404	-0.030
	Leu 354	-0.046
	Leu 391	-0.009
	Leu 428	-0.052
	Met 421	-0.039
	Gly 521	-0.041
	Leu346-Thr347	-0.100
	Trp383-Leu384	-0.033
	His524-Leu525	-0.032
	Ala350-Asp351	0.003
	Leu387-Met388	-0.023
4OHTAM	Gly 521	-0.022
	Met 388	0.089
	His 524	0.004
	Lys 529	-0.058
	Phe 404	-0.010
	Trp383-Leu384	-0.012
	Glu 353-Leu354	0.022
	Leu346-Thr347	-0.080
Leu349-Ala350-Asp351	0.009	
NDTAM	Gly 521	-0.016
	Phe 404	-0.004
	Glu 353	0.047
	Leu 428	-0.026
	His 524-Lue525	-0.004
	Trp383-Leu384	-0.005
	Leu 346-Thr 347	-0.073
Leu 349-Ala350-Asp351	0.015	
END	Gly 521	-0.029
	His 524	-0.004
	Leu 387-Met388	-0.01
	Leu 346-Thr347	-0.086
	Trp383-Leu384	0.001

El valor de transferencia de carga más alto está en el mismo residuo, Leu346-Thr347, para el fármaco y todos los metabolitos que actúan como donantes con cantidades de -0.100, -0.080, -0.086 y -0.073 para TAM, 4OHTAM, END y NDTAM, respectivamente. Mientras que la mayor intensidad en aceptar carga en el TAM es en el residuo Ala350-Asp351 con 0.003, en el 4OHTAM en Met388 con 0.089, en NDTAM en el residuo Glu353 con 0.047 y en el END en el residuo

Trip383-Leu384 con 0.001. Los residuos antes mencionados se oxidan con mayor facilidad en presencia del TAM y sus metabolitos.

### **7.6.5 Puentes de hidrógeno.**

Se realizó un análisis de los puentes de hidrógeno obtenidos entre el receptor, el TAM y cada uno de los metabolitos del TAM.

*TAM.* Tiene un puente de hidrógeno (N----O=C) entre el grupo donador (N) del TAM y el grupo aceptor (C=O) del residuo Asp 351.

*4OHTAM.* Tiene un puente de hidrógeno (C=O----O-H) entre el grupo donador (O-H) del 4OHTAM y el grupo aceptor (C=O) del residuo Gly521.

*END.* Tiene dos puentes de hidrógeno, el primero (C=O----OH) entre el grupo aceptor (C=O) de la Gly521 y el grupo donador (O-H) perteneciente a uno de los anillos del END. El segundo (C=O----HN) entre el grupo aceptor (C=O) de Asp351 y la amina secundaria (NH) del END.

*NDTAM.* En este metabolito se formó un puente de hidrógeno (C=O----HN) entre el grupo aceptor (C=O) del residuo Asp351 y el grupo amino del NDTAM.

En todos los casos, el fármaco y los metabolitos analizados cumplen con la regla de cinco de Lipinski. Esta regla establece que un fármaco debe de tener cinco o menos enlaces de hidrógeno para ser fácilmente absorbido por el cuerpo. Los puentes de hidrógeno se muestran en la Figura 24. De los tres metabolitos analizados el END, es el que tiene la mejor energía de enlace y dos puentes de hidrógeno formados en el sitio de unión del receptor de estrógeno. Por lo que centros oncológicos actualmente están realizando pruebas in vivo para demostrar que el END es la mejor opción para combatir el cáncer de mama positivo al estrógeno.

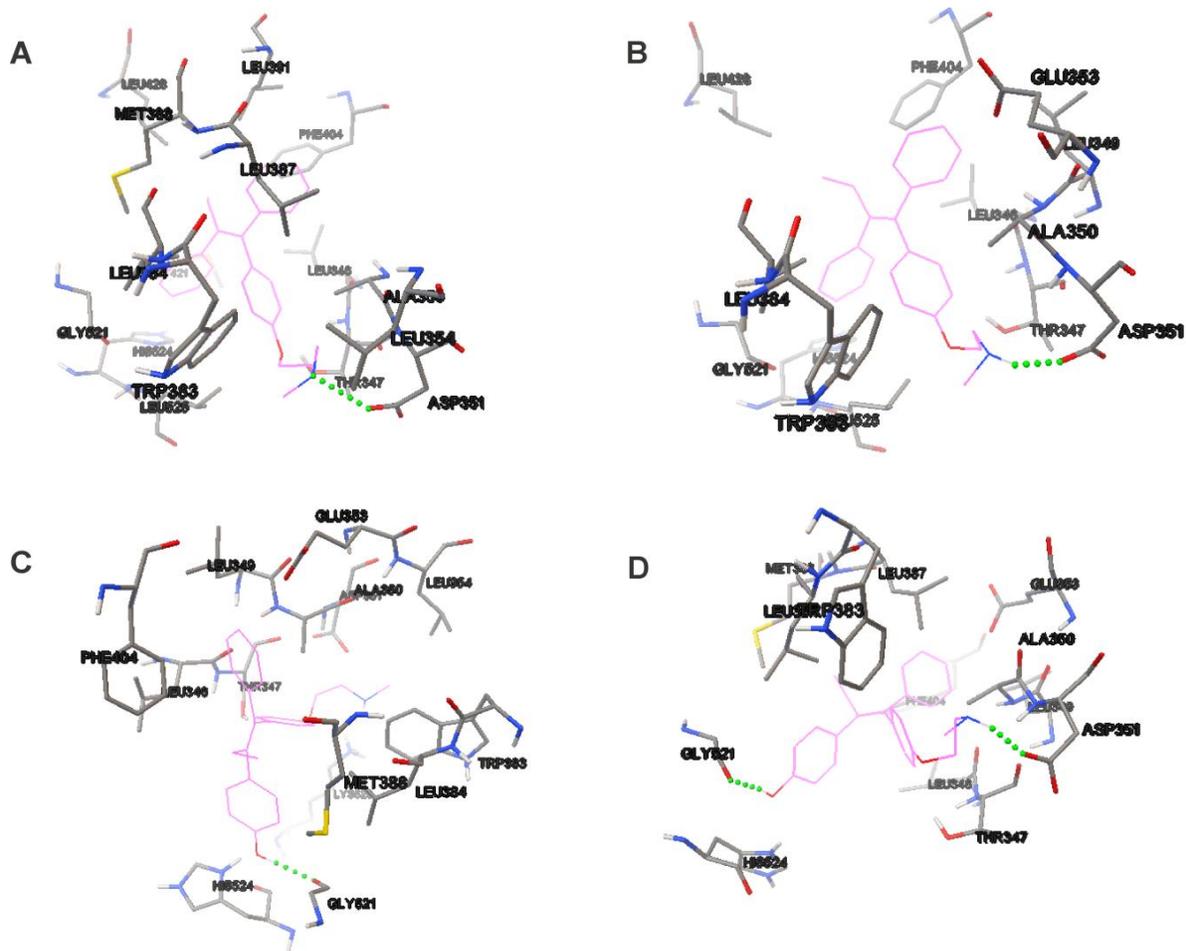


Figura 24. Puentes de hidrógeno en A) Tamoxifeno, B) NDTAM, C) 4OHTAM y D) END con el receptor de estrógeno.

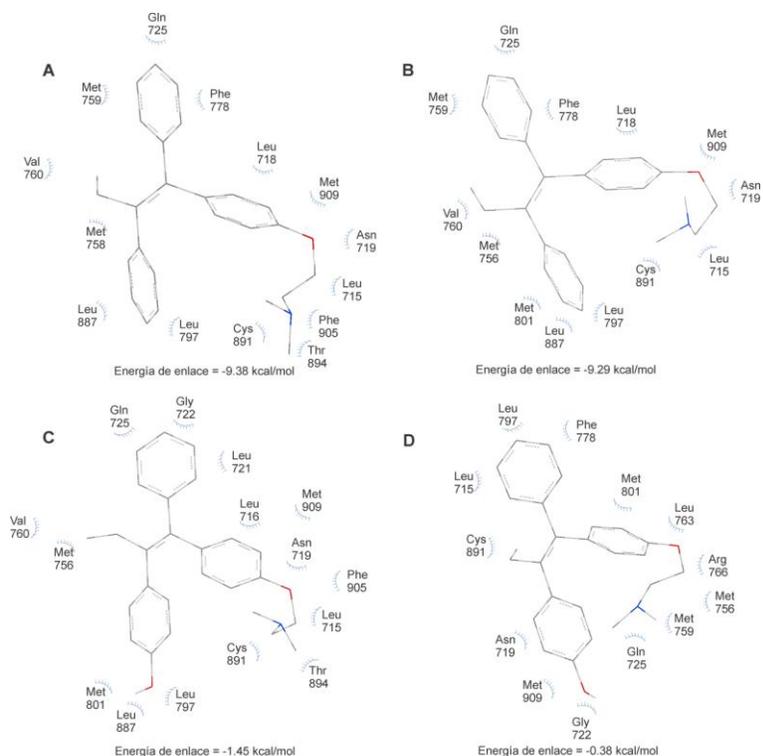
## 7.7. Análisis del Receptor de progesterona con el Tamoxifeno y sus metabolitos.

### 7.7.1 Acoplamiento molecular.

El análisis del acoplamiento molecular entre el receptor de progesterona con el fármaco y los diferentes metabolitos del TAM, se efectuó con la misma metodología descrita arriba, el sitio de activo y las energías de enlace se muestran en la Figura 25.

El valor negativo de la energía de enlace en el acoplamiento indica que el sistema es estable y que hay una interacción entre RP el fármaco y los metabolitos en el sitio

activo: -9.38 kcal/mol para el TAM, -1,45 kcal/mol para 4OHTAM, -9,29 kcal/Mol para NDTAM y -0,38 kcal/mol para END. Aunque los metabolitos, END y 4OHTAM, tienen una energía de enlace negativo, sus valores son muy bajos en comparación con el TAM que tiene -9,38 kcal/mol. Por lo tanto, estos dos metabolitos tendrán una actividad biológica muy baja en los receptores de progesterona



**Figura 25.** Las mejores posiciones de acoplamiento, energía de enlace y estructura esquemática del sitio activo del A) Tamoxifeno, B) NDTAM, C) 4OHTAM y D) END con el receptor de progesterona.

La interacción entre los residuos y el END tiene un arreglo diferente al que se obtuvo en los otros metabolitos, lo que influyó en la obtención del valor de la energía de enlace tan baja en el END. Los grupos funcionales que tiene el END están colocados de manera que no interactúan con los residuos de importancia del sitio activo de la macromolécula analizada, indicando que este metabolito no es biológicamente activo en este receptor.

### **7.7.2 Descripción del sitio activo.**

Los aminoácidos que conforman el sitio activo del receptor de progesterona con el TAM y sus metabolitos son los siguientes:

*TAM:* Leu718-Asn719, Met759-Val760, Met909, Met801, Cys891, Gln725, Leu715, Phe778, Thr894, Leu887, Leu797, Met756 y Phe 909.

*4OHTAM:* Leu718-Asn719, Met909, Met801, Cys891, Gln725, Leu715, Met756, Val760, Thr894, Leu887, Leu797, Met756 y Phe905.

*NDTAM:* Leu718-Asn719, Met759-Val760, Met909, Met801, Cys891, Gln725, Leu715, Phe778, Leu887, Leu797.

*END:* Met909, Met801, Cys891, Leu715, Phe778, Met756, Leu797, Asn719, Trp755, Met759, Gly722, Leu763 y Arg766.

Los residuos que están en contacto con el TAM en el sitio activo son 15 residuos. De éstos solamente cuatro están unidos entre sí en la secuencia de la proteína metionina759-valina760 (Met359-Val760) y leucina718-asparagina719 (Leu 718-Asn719). Con carácter hidrofílico hay tres residuos como son la glutamina725 (Gln725), que contiene dos átomos de nitrógeno cuya característica convierte a este aminoácido ideal para proporcionar nitrógeno a las actividades metabólicas, la treonina894 (Thr894), que tiene un grupo oxidrilo, la cisteína891 (Cys891) que contiene el grupo funcional tiol que se considera importante para el ensamblaje y la estabilidad de algunas proteínas. De los residuos hidrofóbicos que se encuentran esta la fenilalanina905 y fenilalanina778 (Phe905 y 778) característica dada debido a su anillo fenílico; tres residuos de leucina715, leucina797 y leucina787 (Leu715, 797 y 787) que contienen un radical alquilo, y metionina756, metionina801 y metionina909 (Met756, 801 y 909) que contienen un azufre en su estructura.

En el metabolito 4OHTAM hay 15 residuos en contacto con el sitio activo del receptor de progesterona. Cuatro de ellos están unidos entre sí formando

dipéptidos, leucina718-ácido aspártico718 (Leu 718-Asn719) y leucina721-glicina722 (Leu721-Gly722). De los otros 11 residuos son altamente hidrofílicos: glutamina725 (Gln 725), la cisteína81 (Cys 891) y la Treonina894 (Thr 894) y altamente hidrofóbicos: fenilalanina905 (Phe905), metionina756, metionina801 y metionina909 (Met756, Met801 y Met909), valina760 (Val760) y leucina715, leucina797 y leucina887 (Leu715, Leu797 y Leu887).

El sitio activo para el NDTAM consiste en los siguientes residuos: leucina718-ácido aspártico719 (Leu718-Asp719) y la metionina759-valina760 (Met759-Val760). Residuos hidrofílicos glutamina725 (Gln725), arginina766 (Arg766) y cisteína891 (Cys891). Los residuos hidrofóbicos son fenilalanina778 (Phe778), metionina756, metionina801 y metionina909 (Met756, Met801 y Met909) y leucina715, leucina763, leucina797 y leucina887 (Leu715, Leu763, Leu797 y Leu887).

El sitio activo en el END está formado por los siguientes residuos. Glutamina725 (Gln 725), cisteína891 (Cys891), glicina722 (Gly722), asparagina719 (Asn719) y arginina766 (Arg766) los cuales son hidrofílicos. Los residuos hidrofóbicos son fenilalanina778 (Phe778), triptófano755 (Trp755), metionina756, metionina759 y metionina909 (Met756, Met759 y Met909) y leucina715, leucina763 y leucina797 (Leu715, Leu763 y Leu797).

### **7.7.3 Reactividad química.**

Una vez obtenida la estructura más estable del sitio activo del TAM y los metabolitos, se realizó un análisis de la reactividad química de los residuos del receptor de progesterona por medio de los descriptores de reactividad química. Los resultados de estos cálculos se muestran en la Tabla 10.

El análisis del TAM con el sitio activo muestra que las afinidades electrónicas de los residuos oscilan de 0.43 eV a 0.93 eV, el residuo Met759-Val760 tiene el valor más bajo de potencial químico, lo cual impacta directamente en su dureza química. En el 4OHTAM el residuo Leu721-Gly722 tiene un valor negativo en afinidad electrónica, esto se debe a que la energía del residuo no es absorbida,

sino liberada en el proceso de aceptación de electrones, por lo tanto el residuo Leu721-Gly722 no acepta un electrón, es decir, es necesario suministrar energía con el fin de formar el anión (Martínez, et al., 2008). En el NDTAM los valores de electronegatividad se mantuvieron arriba de 3 eV y finalmente en el END el residuo más estable es Met759.

**Tabla 8.** Parámetros de reactividad del sitio activo del receptor de progesterona con el fármaco Tamoxifeno y sus metabolitos

Metabolito	Sitio activo	EA (eV)	I (eV)	$\eta$ (eV)	$\chi=-\mu$ (eV)	$\omega$ (eV)
TAM	Leu 715	0.6	7.02	3.21	3.31	2.26
	Leu 797	0.67	6.86	3.09	3.76	2.29
	Leu 887	0.43	7.01	3.29	3.72	2.1
	Cys 891	0.55	6.89	3.13	3.72	2.19
	Gln 725	0.7	7.1	3.2	3.9	2.38
	Thr 894	0.49	6.57	3.04	3.53	2.05
	Phe 778	0.86	6.6	2.87	3.73	2.42
	Phe 905	0.93	6.58	2.82	3.76	2.5
	Met 756	0.75	6.3	2.77	3.52	2.24
	Met 801	0.64	6.27	2.82	3.42	2.12
	Met 909	0.5	6.21	2.85	3.36	1.97
	Met759-Val760	1.05	6.26	2.61	3.65	2.56
Leu718-Asn719	1.06	7.06	3	4.06	2.74	
4OHTAM	Phe 905	0.93	6.58	2.82	3.76	2.5
	Leu 797	0.67	6.86	3.09	3.74	2.36
	Leu 887	0.43	7.01	3.29	3.72	2.1
	Thr 894	0.49	6.57	3.04	3.53	2.05
	Val 760	0.76	6.92	3.08	3.84	2.4
	Met 756	0.75	6.3	2.77	3.52	2.54
	Leu 715	0.6	7.02	3.21	3.81	2.26
	Gln 725	0.7	7.1	3.2	3.9	2.38
	Cys 891	0.55	6.89	3.17	3.72	2.18
	Met 801	0.64	6.27	2.82	3.45	2.12
	Met 909	0.5	6.21	2.85	3.36	1.97
	Leu721-Gly722	-0.33	7.13	3.73	3.4	1.55
Leu718-Asn719	1.06	7.06	3	4.06	2.74	
NDTAM	Leu 763	0.35	7.17	3.41	3.76	2.07
	Leu 797	0.67	6.86	3.09	3.74	2.36
	Leu 887	0.43	7.01	3.29	3.72	2.1
	Phe 778	0.86	6.6	2.87	3.73	2.42
	Leu 715	0.6	7.02	3.21	3.81	2.26
	Arg766	0.78	6.7	2.96	3.74	2.36
	Gln 725	0.7	7.1	3.2	3.9	2.38
	Cys 891	0.55	6.89	3.17	3.72	2.18
	Met 756	0.75	6.3	2.77	3.53	2.24
	Met 801	0.64	6.27	2.82	3.45	2.12

	Met 909	0.5	6.21	2.85	3.36	1.97
	Met759-Val760	1.05	6.26	2.61	3.65	2.56
	Leu718-Asn719	1.06	7.06	3	4.06	2.74
	Arg 766	0.21	7.03	3.41	3.62	1.92
	Leu 763	0.43	6.2	2.89	3.31	1.9
	Gly 722	0.51	6.25	2.87	3.38	1.99
	Met 759	0.88	7.74	3.43	4.31	2.71
	Trp 755	0.86	5.85	2.5	3.35	2.25
	Asn 719	0.76	7.16	3.2	3.96	2.45
END	Leu 797	0.67	6.86	3.09	3.74	2.36
	Met 756	0.75	6.3	2.77	3.52	2.54
	Phe 778	0.86	6.6	2.87	3.73	2.42
	Leu 715	0.6	7.02	3.21	3.81	2.26
	Cys 891	0.55	6.89	3.17	3.72	2.18
	Met 801	0.64	6.27	2.82	3.45	2.12
	Met 909	0.73	5.79	2.85	3.26	2.1

#### 7.7.4 Descriptor de transferencia de carga.

La transferencia de carga entre el fármaco, los metabolitos y residuos del receptor de progesterona se calculó usando la ecuación 4.9. Los resultados muestran que Met909 en 4OHTAM; Met909 y Leu763 en END y Met909, Met756, Arg766 y Leu763 en NDTAM actúan como aceptores de electrones. El resto de los residuos actúan como donantes de electrones. Los valores se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 9.** Transferencia de carga entre los metabolitos y los residuos del receptor de progesterona.

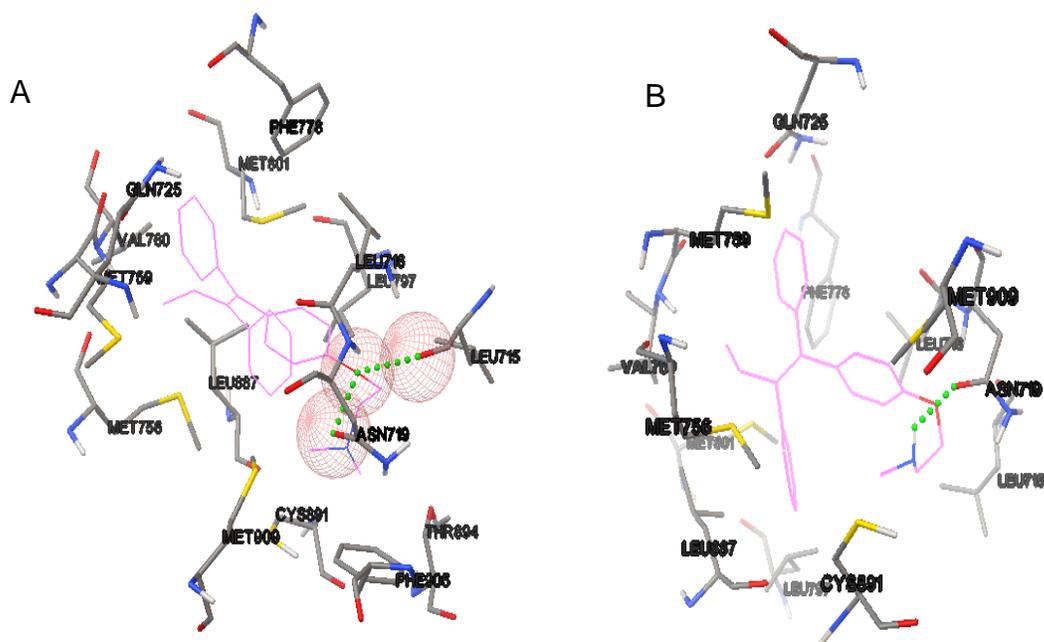
Metabolito	Residuo	$\Delta N$
	Leu 715	-0.005
	Leu 797	-0.047
	Leu 887	-0.042
	Cys 892	-0.043
	Gln 726	-0.059
TAM	Thr 895	-0.026
	Phe 778	-0.046
	Phe 905	-0.050
	Met 756	-0.026
	Met 801	-0.017
	Met 909	-0.011
	Met759-Val761	-0.040
	Leu718-Asn719	-0.076
	Leu718-Asn719	-0.064
	Leu721-Gly722	-0.002
	Phe 905	-0.037

	Leu 797	-0.033
	Leu 887	-0.030
	Thr 894	-0.014
4OHTAM	Val 760	-0.043
	Met 756	-0.014
	Leu 715	-0.039
	Gln 725	-0.047
	Cys 891	-0.031
	Met 801	-0.007
	Met 909	0.002
<hr/>		
	Leu 763	0.615
	Leu 797	-0.027
	Leu 887	-0.024
	Phe 778	-0.027
	Leu 715	-0.033
	Arg 766	0.665
	Gln 725	-0.041
NDTAM	Cys 891	-0.025
	Met 756	0.669
	Met 801	-0.001
	Met 909	0.008
	Met 759-Val 760	-0.021
	Leu 718-Asn 719	-0.057
<hr/>		
	Arg 766	-0.027
	Leu 763	0.001
	Gly 722	-0.006
	Met 759	-0.088
	Trp 755	-0.003
	Asn 719	-0.060
END	Leu 797	-0.040
	Met 756	-0.020
	Phe 778	-0.041
	Leu 715	-0.046
	Cys 891	-0.037
	Met 801	-0.013
	Met 909	0.006
<hr/>		

Para el TAM, 4OHTAM y NDTAM los máximos valores de transferencia de electrones está en el residuo Leu718-Asn719 con -0.076, -0.064 y -0.057 respectivamente. Para el END está en el residuo Met759 con -0.088.

### 7.7.5. Puentes de hidrógeno.

El análisis de los puentes de hidrógeno muestra el sitio activo del receptor de progesterona con el TAM y los metabolitos del TAM. En el caso de los metabolitos 4OHTAM y END no se generaron puentes de hidrógeno, mientras que en el TAM se formó un puente de hidrógeno bifurcado (O----C=O) entre el grupo donador (O) del TAM y el grupo aceptor (C=O) de los residuos Leu718 y Asn719. Mientras que con NDTAM se formó un puente de hidrógeno (C=O----HN) entre el residuo Asn719 y el grupo amino de NDTAM. Ver la Figura 26. En este caso solo el TAM y el NDTAM cumplen con la regla de cinco de Lipinski.



**Figura 26.** Puente de hidrógeno A) Tamoxifeno con los residuos Leu 718- Asn 719 y y B) en NDTAM con el residuo Asp 719 con el receptor de progesterona.

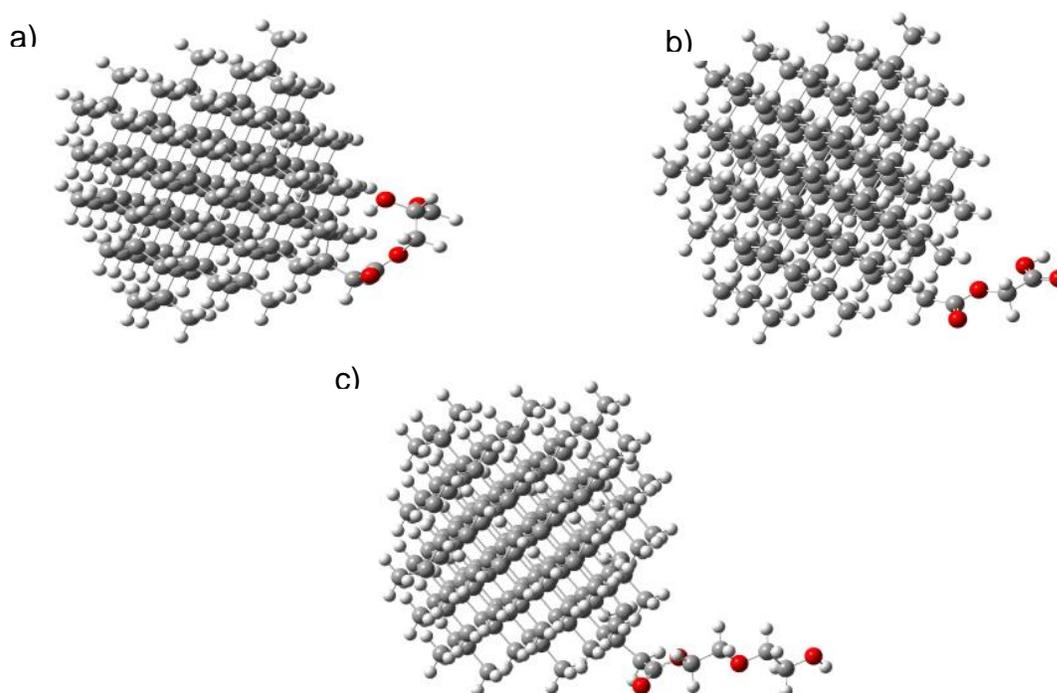
### 7.8. Propuestas de esterificación.

Con el fin de buscar nuevos métodos de esterificación del nanodiamantes con 2-Hidroxiopropanal (2HP), ácido glicólico (PGA) y polietilenglicol (PEG) a través de las técnicas de modelado molecular empleadas en esta investigación, que

permitirán la carga del Tamoxifeno al nanodiamante mediante interacciones electrostáticas (puentes de hidrógeno) entre el fármaco y el vehículo portador, de esta forma el fármaco será entregado específicamente a los receptores hormonales.

### 7.8.1. Análisis estructural.

Se presentan algunas figuras que muestran la esterificación del nanodiamante con 2HP, PGA y PEG que tienen efectos significantes en la predicción de las propiedades moleculares en el acarreo del fármaco TAM



**Figura 27.** Estructuras optimizadas de los vehículos acarreadores a) ND<sub>2HP</sub>, b) ND<sub>PGA</sub>, c) ND<sub>PEG</sub>.

### 7.8.2. Reactividad de los nanodiamantes esterificados.

Los parámetros químicos de reactividad, se obtuvieron utilizando la aproximación por energías en las cuales se calcula la energía de la molécula en su estado neutro, así como aniónica y catiónica, conforme a la optimización de la geometría en su estado fundamental. Ver Tabla 12.

**Tabla 10.** Parámetros de reactividad de los nanodiamantes esterificados.

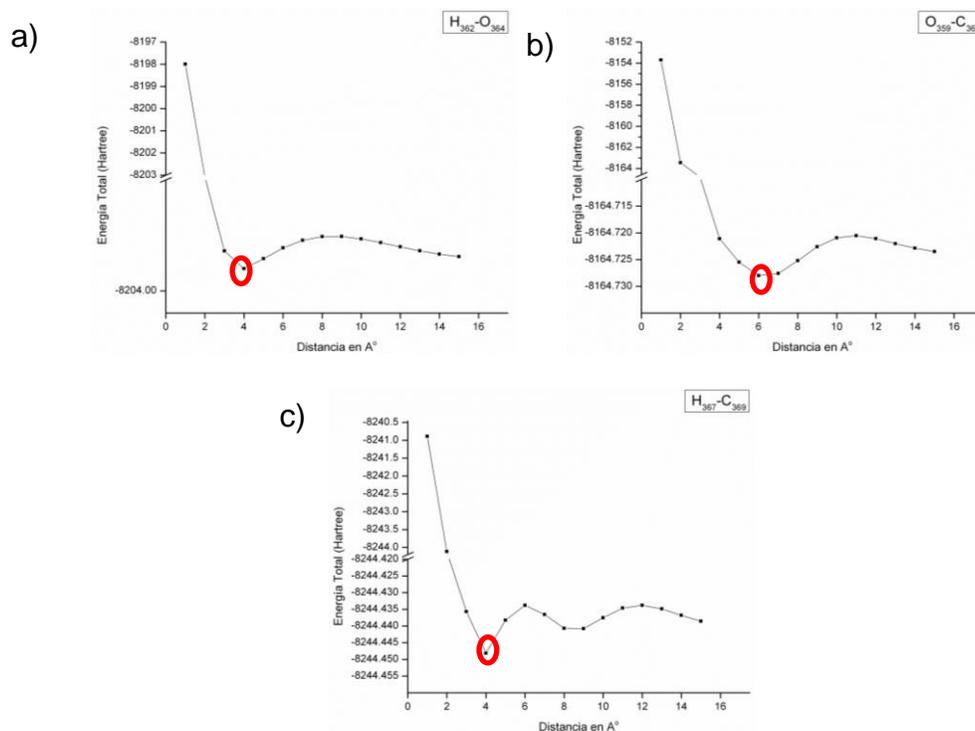
ND Esterificado	AE (eV)	I (eV)	$\eta$ (eV)	$\chi=-\mu$ (eV)	$\omega$ (eV)
ND <sub>ALA</sub>	<b>0.02</b>	<b>2.72</b>	<b>1.35</b>	<b>1.37</b>	<b>0.69</b>
ND <sub>2HP</sub>	0.53	2.73	1.11	1.64	1.21
ND <sub>PGA</sub>	0.07	2.72	1.32	1.39	0.73
ND <sub>PEG</sub>	-0.25	2.71	1.48	1.23	0.51

De acuerdo al parámetro de dureza química se determinó cuál de los nanodiamantes esterificados tiene la mayor facilidad de interactuar en presencia del fármaco Tamoxifeno. El ND<sub>2HP</sub> con 1.11 eV interactuara con mayor facilidad en presencia del fármaco, seguido del ND<sub>PGA</sub> con 1.32 eV.

### **7.8.3. Determinación de la distancia optima del complejo NDESTERIFICADO-TAM.**

Se realizó un análisis de distancia de equilibrio de uno de los múltiples enlaces generados por la esterificación que permitió hacer una serie de cálculos acercando a diferentes distancias las dos moléculas a través de la aproximación de los átomos H<sub>362</sub>-O<sub>364</sub> del ND<sub>2HP</sub>-TAM, O<sub>359</sub>-C<sub>361</sub> del ND<sub>PGA</sub>-TAM y H<sub>367</sub>-C<sub>369</sub> del ND<sub>PEG</sub>-TAM. Ver Figura 28.

Una vez definida la distancia se realizó una optimización y cálculo de frecuencias del complejo ND<sub>Esterificado</sub>-TAM con un método semiempírico con PM6, el cálculo de frecuencias permitió verificar que el complejo ND<sub>Esterificado</sub>-TAM se encuentra en el estado de mínima energía y por lo tanto, en un estado basal y así preceder a realizar un análisis de puentes de hidrógeno.



**Figura 28.** Coordenadas de la distancia de equilibrio a) ND<sub>2HP</sub>-TAM en los átomos H<sub>362</sub>-O<sub>364</sub>, b) ND<sub>PGA</sub>-TAM en los átomos O<sub>359</sub>-C<sub>361</sub> y c) ND<sub>PEG</sub>-TAM en los átomos H<sub>367</sub>-C<sub>369</sub>.

#### 7.8.4. Determinación de los puentes de hidrógeno en el complejo ND<sub>ESTERIFICADO</sub>-TAM.

Un análisis de los puentes de hidrógeno fue realizado entre las propuestas de esterificación del ND y el TAM para determinar si la esterificación género una mayor interacción electrostática entre la cadena lineal del vehículo acarreador y la cadena lineal del fármaco. Estas nuevas propuestas de suministro del fármaco permitieron evaluar si mejora la biodistribución y liberación del TAM en los receptores hormonales.

Las longitudes de enlace y ángulos teóricos de los PH, C=O--- H-C, H-O----O, C-H----N y C-H ---- O son débiles según la clasificación de la Jeffrey, *et al.*, 1991. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 11.** Puentes de hidrógeno en complejos ND<sub>Esterificado</sub>-TAM.

Complejo	Tipo de interacción	Longitud de enlace A----B(Å)	Ángulo (A-H----B) (°)	Tipo de enlace
ND <sub>2HP</sub> -TAM	C-H----O	3.38	164.48	Débil
	C-H----O	3.38	110.75	Débil
	C-H----N	4.69	149.21	Débil
ND <sub>PGA</sub> -TAM	C-H----O	3.31	158.41	Débil
	C-H----N	3.96	129.22	Débil
	C-H----O	3.12	138.53	Débil
	C-H----O=C	3.57	91.74	Débil
	C-H----O=C	4.07	92.05	Débil
ND <sub>PEG</sub> -TAM	C-H----O	4.20	124.87	Débil
	C-H----O	4.20	89.35	Débil
	O-H----C	4.01	132.79	Débil

### 7.8.5. Reactividad química del complejo ND<sub>ESTERIFICADO</sub>-TAM.

Se realizó un análisis cuantitativo de la reactividad de los complejos por medio de los descriptores de reactividad. Los parámetros de los complejos se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 12.** Parámetros de reactividad de los complejos.

Complejos	AE (eV)	I (eV)	$\eta$ (eV)	$\chi=-\mu$ (eV)	$\omega$ (eV)
ND <sub>ALA</sub> -TAM	<b>1.08</b>	<b>2.72</b>	<b>0.82</b>	<b>1.90</b>	<b>2.21</b>
ND <sub>2HP</sub> -TAM	0.75	2.84	1.05	1.79	1.53
ND <sub>PGA</sub> -TAM	0.70	2.73	1.02	1.72	1.45
ND <sub>PEG</sub> -TAM	0.66	2.75	1.05	1.72	1.39

De acuerdo a la dureza química el complejo ND<sub>ALA</sub>-TAM es la mejor propuesta con 0.82 eV para la entrega del fármaco Tamoxifeno en los receptores hormonales.

## VIII. CONCLUSIONES

Se realizó la validación de la química modelo y con ella se realizaron los cálculos de optimización de la estructura del Tamoxifeno y se calcularon sus parámetros de reactividad. Con la información obtenida se pudo determinar el farmacóforo del Tamoxifeno.

Se generó el protocolo teórico de funcionalización del ND con el fármaco TAM el cual será probado de forma experimental por otro grupo de investigación de nuestra esta institución.

El análisis de los tripéptidos mostró que el RGD posee la mayor facilidad para modificar su distribución electrónica en presencia de otro compuesto.

El uso del nanodiamante como acarreador disminuye el efecto citotóxico del fármaco en el RGD.

El uso de RGD y NGR como vectores no favorece las propiedades de reactividad de los complejos. La mejor opción para la entrega del fármaco Tamoxifeno es ND-TAM.

Se definió que en el sitio activo de estrógeno el daño oxidativo se dará en los aminoácidos Ala350-Asp351, Met388, His524, Glu353-Leu354, Leu349-Ala350-Asp351 y Trp383-Leu384. Mientras que para progesterona son Met909, Leu363, Met756.

Los resultados de reactividad química, muestran que la propuesta original con ácido láctico es mejor opción que las propuestas de esterificación para la entrega del fármaco.

## **IX. PUBLICACIONES Y CONGRESOS**

### **Publicaciones**

L. Landeros-Martinez, E. Orrantia-Borunda, N. Flores-Holguin, DFT Chemical Reactivity Analysis of Biological Molecules in the Presence of Silver Ion, Organic Chem Curr Res, 4 (2015) 1-6. doi:10.4172/2161-0401.1000153

Linda-Lucila Landeros-Martinez, D. Chavez-Flores, E. Orrantia-Borunda, N. Flores-Holguin, Construction of a Nanodiamond-Tamoxifen Complex as a Breast Cancer Drug Delivery Vehicle, Journal of Nanomaterials, 2016 (2016) 9.

Linda-Lucila Landeros-Martinez, Erasmo Orrantia-Borunda, Norma Flores-Holguín. Predicción de la reactividad química de Tamoxifeno en receptores hormonales, Octavo Congreso Internacional de Investigación Científica Multidisciplinaria, 4 (2016) 24-38.

Nota: En la sección de anexos se incluyen las copias de los artículos.

### **Congresos nacionales e internacionales**

L.L.L. Landeros Martínez, E. Orrantia Borunda, N. Flores-Holguín. Validación de la química modelo del fármaco Tamoxifeno con diferentes funcionales. XIII Reunión Mexicana de FísicoQuímica Teórica. Morelia, Michoacan, México (5-8 de Noviembre del 2014)

Linda Lucila Lucero Landeros Martínez. Sesión de posters de divulgación científica. 9 Congreso CIMAV. Chihuahua, Chih., México (29 de Octubre del 2014).

Linda L.L. Landeros Martínez, E. Orrantia Borunda, N. Flores-Holguín. Reactividad química del RGD y NGR con Tamoxifeno. XIV Reunión Mexicana de FísicoQuímica Teórica. Tonalá, Jalisco, México (19-21 de Noviembre del 2015).

Linda L.L. Landeros Martínez, Erasmo Orrantia Borunda, Norma R. Flores Holguín, Funcionalización de Nanodiamantes con Tamoxifeno, en el área de salud, Medio Ambiente y Recursos naturales. Chihuahua, Chih., 1 de Octubre del 2015.

Linda L.L. Landeros Martínez, E. Orrantia Borunda, N. Flores-Holguín. Reactividad química del dominio de unión de los receptores hormonales con el tamoxifeno y sus diferentes metabolitos. XV Reunión Mexicana de FísicoQuímica Teórica. Mérida, Yuc., México (17-19 de Noviembre del 2016).

Norma Flores-Holguín, Theoretical reactivity of Cell-Surface receptors in presence of Nanodiamonds as Carriers, Organized by PremC from September 28<sup>TH</sup> to September 30<sup>TH</sup> 2016 at the University Pierre and Marie Curie in Paris.

N Flores-Holguín, L.L. Landeros-Martínez, Erasmo Orrantia-Borunda, L.M. Rodríguez-Valdez and Daniel Glossman-Mitnik, DFT calculation of Reactivity parameters of Cell-Surface receptors, 2016 in Cancun.

### **Participación en convocatorias de concursos académicos**

Linda Lucila Lucero Landeros Martínez, Erasmo Orrantia Borunda, Norma Rosario Flores Holguín. Nanodiamantes como transportador de Tamoxifeno dirigido a receptores de cáncer mamario. Premio 2014 CANIFARMA.

Linda Lucila Lucero Landeros Martínez, Erasmo Orrantia Borunda, Norma Rosario Flores Holguín. Complejo Nanodiamante-Tamoxifeno como vehículo de entrega de fármacos dirigido a receptores de cancer mamario. Premio 2015 CANIFARMA.

Linda Lucila Lucero Landeros Martinez, Curso de química Biológica: una ciencia aplicada, Impartida en el marco de la XL Semana de Química Internacional. Chihuahua, Chih., Octubre del 2015.

Linda Landeros Martínez, Reconocimiento por la impartición del seminario, Modelado Molecular de la funcionalización del Tamoxifeno dirigido a receptores del cáncer mamario. Chihuahua, Chih., México a 26 de Febrero del 2016.

Linda Lucila Lucero Landeros Martinez, Reconocimiento por haber participado en el Octavo Congreso Internacional de investigación Científica Multidisciplinaria como expositor de la Ponencia. Predicción de la reactividad química de Tamoxifeno con receptores hormonales. Chihuahua, Chih., a 11 de Noviembre del 2016.

### **Divulgación científica**

Linda Lucila Lucero Landeros Martínez, Participación en la Feria Infantil de Arte y Ciencia 2015. Realizada del 27 Abril al 3 de Mayo en la plaza Mayor. Chihuahua, Chih.

Linda Lucila Lucero Landeros Martínez, Participación en las Jornadas Académicas a puertas abiertas 2015 como expositor de sesión de poster de divulgación científica. Chihuahua, Chih., 17-18 de Septiembre del 2015.

Linda Lucila Lucero Landeros Martínez, Feria Infantil de Arte y Ciencia 2016. Celebrada del 25 al 30 de Abril por el Instituto Chihuahuense de la Cultura. Chihuahua, Chih a 2 de Mayo del 2016.

## **X. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES**

Se recomienda corroborar los datos obtenidos en este trabajo mediante técnicas experimentales.

Realizar un estudio complementario de aproximaciones del fármaco Tamoxifeno (frente, derecha e izquierda) en la esterificación del nanodiamante con 2-hidroxiopropanal, ácido glicólico y poli etilenglicol, para obtener el estado de mínima energía de estas aproximaciones, seguido de un análisis de puentes de hidrógeno.

Tomando en cuenta que otros de los polímeros utilizados en la entrega de fármacos son el ácido málico y N-(2-hidroxiopropil metacrilamida), resultaría de gran interés realizar el análisis de esterificación del nanodiamante con estos polímeros.

Se sugiere modificar la parte lipofóbica del Tamoxifeno con otro grupo funcional hidrofílico que le permita tener una mayor energía de enlace en el sitio activo de los receptores hormonales.

## XI. LITERATURA CITADA

Akahira, J., Inoue, T., Suzuki, T., Ito, K., Konno, R., Sato, S., ... & Sasano, H. (2000). Progesterone receptor isoforms A and B in human epithelial ovarian carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR studies. *British journal of cancer*, 83(11), 1488.

Baldenegro López Jesús Adrian. (2010). Tesis de Maestría “Modelación molecular de sistemas fotosensibles para celdas solares, sensibilizadas por colorante”.

Beverage, J. N., Sissung, T. M., Sion, A. M., Danesi, R., & Figg, W. D. (2007). CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(9), 2224-2231.

Bookout, A. L., Jeong, Y., Downes, M., Ruth, T. Y., Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*, 126(4), 789-799.

Brinton, R. D., Thompson, R. F., Foy, M. R., Baudry, M., Wang, J., Finch, C. E., ... & Nilsen, J. (2008). Progesterone receptors: form and function in brain. *Frontiers in neuroendocrinology*, 29(2), 313-339.

Brubaker, G. R., Henk, M. G., & Johnson, D. W. (1985). Synthesis, spectroscopy and electrochemistry of some polynuclear complexes of aminoethanethiol. *Inorganica chimica acta*, 100(2), 201-206.

Callister, W. D. (2002). *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales* (Vol. 1). Reverté

Clarke, R., Liu, M. C., Bouker, K. B., Gu, Z., Lee, R. Y., Zhu, Y., ... & Hilakivi-Clarke, L. A. (2003). Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene*, 22(47), 7316-7339.

Comet, M., Pichot, V., Siegert, B., Britz, F., & Spitzer, D. (2010). Detonation nanodiamonds for doping Kevlar. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 10(7), 4286-4292.

Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., & Lydon, J. P. (2003). Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids*, 68(10), 771-778.

Cuevas Gabriel, Cortes Fernando. (2003). Química computacional. Introducción a la química computacional. Editorial cfe México, DF. Pp 21-23

Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., ... & Gräf, S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346-352.

Chen, M., Pierstorff, E. D., Lam, R., Li, S. Y., Huang, H., Osawa, E., & Ho, D. (2009). Nanodiamond-mediated delivery of water-insoluble therapeutics. *Acs Nano*, 3(7), 2016-2022.

Chow, E. K., Zhang, X.-Q., Chen, M., Lam, R., Robinson, E., Huang, H., Ho, D. (2011). Nanodiamond Therapeutic Delivery Agents Mediate Enhanced Chemoresistant Tumor Treatment. *Science Translational Medicine*, 3 (73), 73ra21.

Felice, B., Prabhakaran, M. P., Rodríguez, A. P., & Ramakrishna, S. (2014). Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science and Engineering: C*, 41, 178-195.

Flores-Holguín N., Aguilar-Elguézabal A., Rodríguez-Valdez L. (2002). Tesis de Maestría. “Estudio de las propiedades estructurales, eléctricas, ópticas y termoquímicas de los oligotiadiazoles, aplicando técnicas de química computacional y modelado molecular”.

Gao, L., Tu, Y., Wegman, P., Wingren, S., & Eriksson, L. A. (2010). Conformational Enantiomerization and Estrogen Receptor  $\alpha$  Binding of Anti-Cancer Drug Tamoxifen and Its Derivatives. *Journal of chemical information and modeling*, 51(2), 306-314.

Ghalami-Choobar, B., & Ghiami-Shomami, A. (2013). Theoretical calculation of pK<sub>a</sub> values of the Nortryptiline and Amitryptiline drugs in aqueous and non-aqueous solvents. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1018, 66-70.

Grese, T.A., Sluka, J.P., Bryant, H.U., Cullinan, G.J., Glasebrook, A.L., Jones, C.D., Matsumoto, K., Palkowitz, A.D., Sato, M., Termine, J.D., et al. (1997). Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14105–14110

Gareth Thomas, *Fundamentals of Medicinal Chemistry*, Editorial Wiley. Weinheim, Germany. (2003). pp 105-109.

Gopalakrishnan, S. B., Kalaiarasi, T., & Subramanian, R. (2014). Comparative DFT Study of Phytochemical Constituents of the Fruits of *Cucumis trigonus* Roxb. and *Cucumis sativus* Linn. *Journal of Computational Methods in Physics*, 2014.

González B. (1992) *Cáncer de mama en oncología clínica: Patología Especial*. Edit. Interamericana. la edición. Madrid. Tomo II. Cap. 14. p. 179-201.

Man, H. B., Kim, H., Kim, H. J., Robinson, E., Liu, W. K., Chow, E. K. H., & Ho, D. (2014). Synthesis of nanodiamond–daunorubicin conjugates to overcome multidrug

chemoresistance in leukemia. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(2), 359-369.

Guan, B., Zou, F., & Zhi, J. (2010). Nanodiamond as the pH-Responsive Vehicle for an Anticancer Drug. *Small*, 6(14), 1514-1519.

Ho, D. N. (2010). Applications in biology and nanoscale medicine. Springer US), 10, 978-1.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.

Jeffrey G.A. (1991). *An Introduction to Hydrogen Bonding*,

Jin, Y., Desta, Z., Stearns, V., Ward, B., Ho, H., Lee, K. H., ... & Blanchard, R. (2005). CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(1), 30-39.

Jordan, V. C., & Gosden, B. (1982). Importance of the alkylaminoethoxy side-chain for the estrogenic and antiestrogenic actions of tamoxifen and trioxifene in the immature rat uterus. *Molecular and cellular endocrinology*, 27(3), 291-306.

Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*, 3(11), 935-949.

Kumar, V., Jain, G., Kishor, S., & Ramaniah, L. M. (2011). Chemical reactivity analysis of some alkylating drug molecules—A density functional theory approach. *Computational and Theoretical Chemistry*, 968(1), 18-25.

Lam, R., & Ho, D. (2009). Nanodiamonds as vehicles for systemic and localized drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 6(9), 883-895.

Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current opinion in structural biology*, 6(3), 402-406.

Lien, E. A., Anker, G., & Ueland, P. M. (1995). Pharmacokinetics of tamoxifen in premenopausal and postmenopausal women with breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 55(2), 229-231.

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.

Liu, K. K., Zheng, W. W., Wang, C. C., Chiu, Y. C., Cheng, C. L., Lo, Y. S., ... & Chao, J. I. (2010). Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy. *Nanotechnology*, 21(31), 315106.

López, J. M., Ensuncho, A. E., & Robles, J. (2013). Estudio Teórico de la Reactividad Química y Biológica de Cisplatino y algunos Derivados con Actividad Anticancerosa. *Información tecnológica*, 24(3), 3-14.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., & Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83(6), 835-839.

Man, H. B., Kim, H., Kim, H.-J., Robinson, E., Liu, W. K., Chow, E. K.-H., & Ho, D. (2014). Synthesis of nanodiamond–daunorubicin conjugates to overcome multidrug chemoresistance in leukemia. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(2), 359-369.

- , M. A., Barbosa, A., & Costas, M. (2008). Donator acceptor map for carotenoids, melatonin and vitamins. *The Journal of Physical Chemistry A*, 112(38), 9037-9042.

Mochalin, V. N., Shenderova, O., Ho, D., & Gogotsi, Y. (2012). The properties and applications of nanodiamonds. *Nat Nano*, 7(1), 11-23.

Morell, C., Grand, A., & Toro-Labbé, A. (2005). New dual descriptor for chemical reactivity. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(1), 205-212.

Muñoz, A. (1997). *Cáncer: genes y nuevas terapias* (Vol. 2). Editorial Hélice.

Obr, A. E., & Edwards, D. P. (2012). The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 357(1), 4-17.

Parr, R. G., Donnelly, R. A., Levy, M., & Palke, W. E. (1978). Electronegativity: the density functional viewpoint. *The Journal of Chemical Physics*, 68(8), 3801-3807.

Parr, R. G., Szentpaly, L. V., & Liu, S. (1999). Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, 121(9), 1922-1924.

Pearson, R. G. (1986). Absolute electronegativity and hardness correlated with molecular orbital theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), 8440-8441.

Ramochandran K, G.Deepa, K. Namboori. (2008). Computational chemistry and molecular modeling. Editorial Spinger

Pan, S., Banerjee, S., & Chattaraj, P. K. (2012). Role of lithium decoration on hydrogen storage potential. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(3), 229-240.

Toh, T. B., Lee, D. K., Hou, W., Abdullah, L. N., Nguyen, J., Ho, D., & Chow, E. K. H. (2014). Nanodiamond–mitoxantrone complexes enhance drug retention in chemoresistant breast cancer cells. *Molecular pharmaceutics*, 11(8), 2683-2691.

Qiao, W., Wang, B., Wang, Y., Yang, L., Zhang, Y., & Shao, P. (2010). Cancer therapy based on nanomaterials and nanocarrier systems. *Journal of Nanomaterials*, 2010, 7.

Santillán-Benítez J. G. Quiroz-Ordóñez, H. Mendieta-Zerón, L. M. Gómez-Oliván, (2013). *Revista de Medicina e Investigación*. Vol 1 Num 1.

Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927-937.

Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927-937.

Shimkunas, R. A., Robinson, E., Lam, R., Lu, S., Xu, X., Zhang, X. Q., & Ho, D. (2009). Nanodiamond–insulin complexes as pH-dependent protein delivery vehicles. *Biomaterials*, 30(29), 5720-5728.

Shivam Umeshkumar Upadhyay et al. (2012). *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*. 3(3): 422-430.

Sladek FM (2011) What are nuclear receptor ligands? *Mol. Cell. Endocrinol* 334: 3–13

Smith, E. P., Boyd, J., Frank, G. R., Takahashi, H., Cohen, R. M., Specker, B., ... & Korach, K. S. (1994). Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *New England Journal of Medicine*, 331(16), 1056-1061.

Tomasi, M. Persico, (1994). Molecular interactions in solution: an overview of methods based on continuous distributions of the solvent, *Chem. Rev.*, 94, 2027–2094.

Xiao, J., Duan, X., Yin, Q., Zhang, Z., Yu, H., & Li, Y. (2013). Nanodiamonds-mediated doxorubicin nuclear delivery to inhibit lung metastasis of breast cancer. *Biomaterials*, 34(37), 9648-9656.

Xin, H., Chen, L., Gu, J., Ren, X., Luo, J., Chen, Y., ... & Fang, X. (2010). Enhanced anti-glioblastoma efficacy by PTX-loaded PEGylated poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics*, 402(1), 238-247.

Yang, S., Thiel, K. W., & Leslie, K. K. (2011). Progesterone: the ultimate endometrial tumor suppressor. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(4), 145-152.

Von Wallbrunn, A., Waldeck, J., Hoeltke, C., Zühlsdorf, M., Mesters, R., Heindel, W., & Bremer, C. (2008). In vivo optical imaging of CD13/APN-expression in tumor xenografts. *Journal of biomedical optics*, 13(1), 011007-011007.

Weidner N, Cady b, Goodson W (1997) Pathologic prognostic factors for patients with breast carcinoma. *Surgical Oncology Clinics of North America* 6:415- 462

Zhang, X. Q., Lam, R., Xu, X., Chow, E. K., Kim, H. J., & Ho, D. (2011). Multimodal nanodiamond drug delivery carriers for selective targeting, imaging, and enhanced chemotherapeutic efficacy. *Advanced materials*, 23(41), 4770-4775..

Zhu, Y., Ran, T., Li, Y., Guo, J., & Li, W. (2006). Dependence of the cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes on the culture medium. *Nanotechnology*, 17(18), 4668.

Zhu, Y., Li, W., Li, Q., Li, Y., Li, Y., Zhang, X., & Huang, Q. (2009). Effects of serum proteins on intracellular uptake and cytotoxicity of carbon nanoparticles. *Carbon*, 47(5), 1351-1358.

## **XII. ANEXOS**

### **12.1. Artículos Publicados.**

