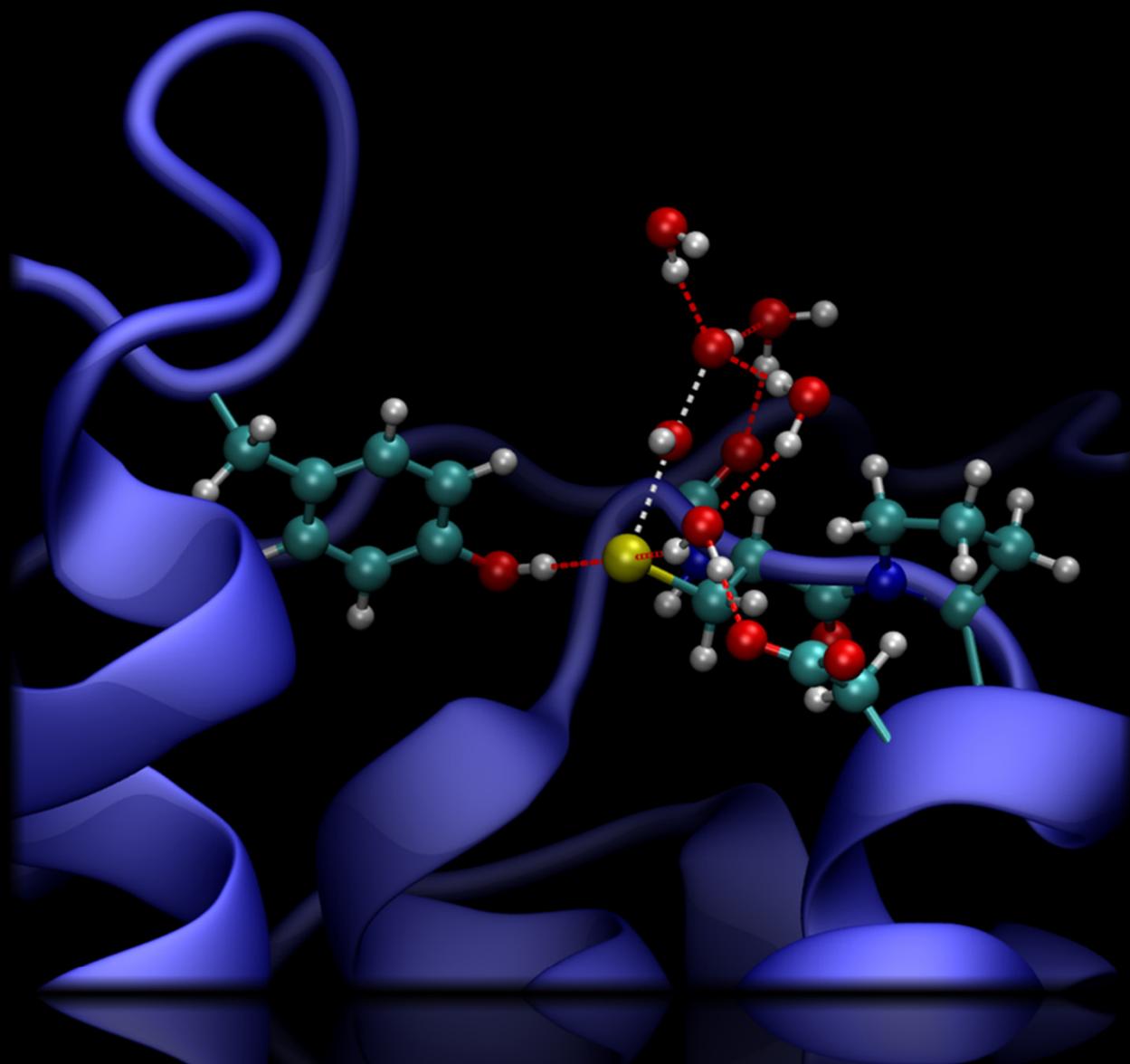


ALBÚMINA SÉRICA HUMANA: OXIDACIÓN DEL TIOL Y GLICACIÓN

Tesis de Doctorado en Química
Facultad de Química – PEDECIBA Química
Universidad de la República



Lic. Jenner Bonanata

Orientadora: Dra. Laura Coitiño
Co-orientadora: Dra. Beatriz Álvarez

Montevideo
2017



Tesis de Doctorado en Química
Facultad de Química – PEDECIBA Química
Universidad de la República – Uruguay

ALBÚMINA SÉRICA HUMANA: OXIDACIÓN DEL TIOL Y GLICACIÓN

Jenner Bonanata

Orientadora:

Dra. Laura Coitiño

Laboratorio de Química Teórica y Computacional – Instituto de Química Biológica
Facultad de Ciencias – Universidad de la República – Uruguay

Co-orientadora:

Dra. Beatriz Álvarez

Laboratorio de Enzimología – Instituto de Química Biológica
Facultad de Ciencias – Universidad de la República – Uruguay

Montevideo, Uruguay

2017

Índice

Índice	2
Resumen.....	6
Abreviaturas.....	8
1. Introducción	10
1.1. Tioles biológicos y ácidos sulfénicos	10
1.1.1. Tioles biológicos.....	10
1.1.2. Vías de oxidación de tioles y ácidos sulfénicos	11
1.1.3. Oxidación de tioles por peróxidos	13
1.1.4. Oxidación de ácidos sulfénicos por peróxidos	14
1.2. Glicación de proteínas y metilglioxal.....	16
1.2.1. Generalidades	16
1.2.2. Metilglioxal	20
1.3. Albúmina sérica humana	22
1.3.1. Generalidades	22
1.3.2. Reactividad del tiol de la HSA y su derivado – el ácido sulfénico	24
1.3.3. Glicación de la HSA.....	25
1.3.4. Interacción entre glicación de HSA y oxidación de Cys34.....	27
2. Fundamentos metodológicos	29
2.1. Generalidades	29
2.2. Métodos teórico-computacionales para el modelado de la estructura molecular.....	29
2.2.1. Métodos clásicos para modelar estructura molecular al detalle atómico	30
2.2.2. Métodos cuánticos	33
2.2.3. Métodos mixtos QM/MM	53
2.3. Caracterización de especies estables y estados de transición.....	58
2.3.1. La superficie de energía potencial de los sistemas moleculares	58
2.3.2. Búsqueda de estructuras de especies relevantes: optimización de geometría.....	59
2.3.3. Caminos de reacción.....	63
2.4. Simulaciones de dinámica molecular	65
2.4.1. Generalidades	65
2.4.2. Termostatos y barostatos.....	66

2.4.3. Condiciones de contorno periódicas	67
2.4.4. Análisis post-trayectoria.....	68
2.5. Descripción del solvente	69
2.5.1. Solvente explícito	69
2.5.2. Solvente implícito	69
2.6. Cálculo de termoquímica y cinética	70
2.6.1. Termodinámica estadística, colectivos, función de partición molecular	70
2.6.2. La función de partición y la aproximación del gas ideal, rotor rígido y oscilador armónico.....	71
2.6.3. Teoría del estado de transición.....	73
2.7. Fundamentos de los métodos experimentales usados	74
2.7.1. Espectroscopía infrarroja.....	74
2.7.2. Cuantificación de tioles	75
2.7.3. Dependencia de la cinética de reacción con la temperatura.....	76
2.7.4. Separación de isoformas de HSA a nivel del residuo Cys34.....	76
3. Objetivos	79
3.1. Objetivo general.....	79
3.2. Objetivos específicos.....	79
4. El entorno local del tiol de la HSA	80
4.1. Antecedentes.....	80
4.2. Metodología	81
4.2.1. Dinámica molecular de HSA con el residuo Cys34 en las formas tiol y tiolato	81
4.2.2. Espectroscopia infrarroja (FT-IR) de HSA con Cys34 en estado reducido	82
4.3. Resultados y discusión.....	82
4.3.1. Estructura y dinámica del entorno del residuo Cys34 de la HSA en las formas tiol y tiolato	82
4.3.2. Espectroscopía infrarroja del tiol de la HSA	89
4.4. Conclusiones.....	90
5. Oxidación del tiol de la HSA por peróxidos.....	92
5.1. Antecedentes.....	92
5.2. Metodología	92
5.2.1. Preparación de los sistemas reactivos QM/MM	92
5.2.2. Cálculos QM/MM.....	93

5.2.3. Cinética de la reacción de HSA-S ⁻ con H ₂ O ₂	94
5.3. Resultados y discusión.....	94
5.3.1. Reacción del tiolato de la HSA con H ₂ O ₂	94
5.3.2. Reacción del tiolato de la HSA con ácido peroxinitroso.....	99
5.4. Conclusiones.....	101
6. El entorno local del ácido sulfénico de la HSA: Estructura y dinámica.....	103
6.1. Antecedentes.....	103
6.2. Metodología.....	104
6.2.1. Simulaciones de dinámica molecular.....	104
6.2.2. Parametrización de residuos no estándar: ácido sulfénico y sulfenato.....	104
6.2.3. Determinación de la constante de acidez del ácido sulfénico de la HSA	105
6.3. Resultados y discusión.....	108
6.3.1. Dinámica de HSA-SOH.....	108
6.3.2. Dinámica de HSA-SO ⁻	112
6.3.3. Determinación del pK _a del ácido sulfénico.....	114
6.4. Conclusiones.....	116
7. Oxidación de ácidos sulfénicos.....	118
7.1. Antecedentes.....	118
7.2. Metodología.....	119
7.2.1. Estudio DFT del mecanismo oxidación de un ácido sulfénico de bajo peso molecular por H ₂ O ₂	119
7.2.2. Preparación de sistemas de HSA para QM/MM.....	120
7.2.3. Modelado del mecanismo oxidación del ácido sulfénico de la HSA por H ₂ O ₂ usando un esquema de QM/MM aditivo.....	120
7.2.4. Modelado ONIOM del mecanismo oxidación del ácido sulfénico de la HSA por H ₂ O ₂	121
7.2.5. Cinética de la reacción del ácido sulfénico de la HSA con H ₂ O ₂	122
7.3. Resultados y discusión.....	123
7.3.1. Estudio DFT del mecanismo oxidación de un ácido sulfénico de bajo peso molecular por H ₂ O ₂	123
7.3.2. Modelado QM/MM de la reacción del sulfenato de la HSA con H ₂ O ₂	128
7.3.3. Cinética de la oxidación del ácido sulfénico de la HSA por H ₂ O ₂	134
7.4. Conclusiones.....	136
8. Interacción entre la oxidación de Cys34 y la glicación de la HSA.....	138
8.1. Antecedentes.....	138

8.2. Metodología.....	138
8.2.1. Parametrización de residuos modificados.....	138
8.2.2. Dinámica molecular de HSA glicada	139
8.2.3. Modelado QM/MM de la reacción entre HSA-S ⁻ glicada y H ₂ O ₂	139
8.2.4. Efectos de la oxidación (formación de disulfuros mixtos con cisteína) de Cys34 sobre la reactividad de residuos de Lys y Arg	139
8.2.5. Cálculo QM/MM de descriptores de la reactividad	140
8.2.6. Estudio cinético de la reacción del tiol de la HSA con MGO.....	140
8.3. Resultados y discusión.....	141
8.3.1. Evaluación de cambios en el entorno local de Cys34 inducidos por glicación en residuos de Arg y Lys.....	141
8.3.2. Modelado QM/MM de la oxidación del tiol de Cys34 en HSA glicada	144
8.3.3. Efectos de la S-cisteinilación de la HSA sobre la tendencia de residuos de Arg y Lys a glicarse	145
8.3.4. Cinética de la reacción del tiol de la HSA con metilglioxal.....	146
8.4. Conclusiones.....	148
9. Conclusiones generales y perspectivas.....	149
Referencias.....	153
Agradecimientos.....	180
Anexo: Publicaciones.....	181

Resumen

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína mayoritaria en el plasma, y cumple varias funciones, entre ellas atrapar especies oxidantes y electrófilas. Esta función se asocia a su residuo de cisteína libre, Cys34, el cual representa más del 80 % de los tioles libres en plasma. Este tiol puede reaccionar con peróxidos (*i.e.* oxidarse) para dar un ácido sulfénico de vida media larga, el cual puede seguir tres destinos: reducirse por reacción con un tiol para formar un disulfuro mixto, oxidarse irreversiblemente a ácido sulfínico, o decaer espontáneamente a un producto aún no caracterizado. Por otro lado, dada su prolongada vida media, la HSA es susceptible a ser modificada (glicada) por compuestos carbonílicos reductores presentes en el plasma, generando productos de glicación. Dichas modificaciones alteran la estructura y función de la HSA. En particular, se ha sugerido que habría una interacción sinérgica entre la glicación de la HSA y la oxidación del tiol. En este trabajo de tesis se usó un conjunto de técnicas experimentales y de modelado computacional para estudiar las propiedades del tiol de la HSA y de su derivado ácido sulfénico, y también, la interacción entre la glicación de la HSA y la oxidación del Cys34.

Seis aspectos principales fueron tratados: (1) la estructura y dinámica del entorno del residuo Cys34 en las formas tiol y tiolato; (2) los mecanismos de las reacciones del tiolato de la HSA con peróxidos; (3) la estructura y dinámica del entorno de Cys34 en las formas ácido sulfénico y sulfenato; (4) el mecanismo de la reacción del ácido sulfénico de la HSA con H_2O_2 ; (5) la interacción entre la glicación de la HSA y la oxidación del tiol; y (6) la reacción del tiol de la HSA con metilglioxal. Lateralmente, también se validó, metodología tanto experimental como computacional, para describir este tipo de problemas.

En primer lugar, se determinó que los residuos Tyr84 y Asp38 cumplen un papel importante modulando propiedades del tiol tales como la acidez y la nucleofilia, y se asignó un rol estructural a His39. Otro hallazgo importante es que el tiol(ato) interacciona con moléculas de agua que hacen de puente con el carboxilato de Asp38. En segundo lugar, se confirmó el carácter S_N2 del mecanismo de las reacciones del tiolato de la HSA con peróxidos, obteniendo energías libres de activación de respectivamente 14.2 y 10.4 kcal mol⁻¹ para las reacciones con H_2O_2 y HOONO. Como hallazgo mecanístico importante, se aprecia que, mientras en la reacción con H_2O_2 se da una transferencia protónica “post-estado de transición”,

esto no ocurre en su análoga con HOONO, mostrando que la naturaleza del grupo saliente determina la naturaleza del producto de reacción. En paralelo, se determinó experimentalmente un valor de entalpía de activación de 13.7 kcal mol⁻¹, próximo al valor resultante del modelado de 12.9 kcal mol⁻¹. En tercer lugar, se llegó a dos hallazgos importantes respecto al entorno del ácido sulfénico de la HSA: (a) la presencia de un enlace de hidrógeno persistente entre el ácido sulfénico y el carboxilato de Asp38; y (b) la cercanía del NH peptídico de Cys34 al S γ del ácido sulfénico, que además se encuentra formando enlace de hidrógeno (puenteado por agua) con el imidazol de His39. Además, se estimó que el pK_a del ácido sulfénico de la HSA se encuentra entre 7.0 y 7.6. En cuarto lugar, el mecanismo más probable de la oxidación de un ácido sulfénico de bajo peso molecular por H₂O₂, un mecanismo S_N2 en el que el S ataca al H₂O₂, que lleva a la formación de sulfenato y agua. Teniendo en cuenta este resultado, se modeló a nivel QM/MM la reacción del sulfenato de la HSA con H₂O₂, obteniendo un valor de la energía libre de activación a 300 K de 16.3 kcal mol⁻¹. También se determinó experimentalmente la constante de velocidad de la reacción del ácido sulfínico de la HSA con H₂O₂ (0.112 ± 0.007 M⁻¹ s⁻¹ a 25 °C y pH 7.4).

Finalmente, se realizó una primera aproximación a cómo la glicación afecta la oxidación de Cys34 y viceversa. Si bien la glicación por glucosa en Lys195 parece afectar el entorno del tiolato, estos cambios no alteran la reactividad frente a H₂O₂. Por otro lado, la oxidación del tiol parece favorecer la glicación de Lys525. En paralelo, se determinó la constante de velocidad de la reacción del tiol de la HSA con metilglioxal la cual vale (8.7 ± 0.8) × 10⁻⁴ M⁻¹ s⁻¹ (37 °C, pH 7.4).

Se espera que estos resultados ayuden a comprender las propiedades del tiol y del ácido sulfénico de la HSA, y de la interacción entre la glicación de la HSA y la oxidación de Cys34, dos procesos cuyo aumento se asocia a diversas patologías.

Abreviaturas

AhpC	Alquilhidroperóxido reductasa C
AhpE	Alquilhidroperóxido reductasa E
Arg	Arginina
AGE	Producto de la glicación avanzada
AGE-HSA	Albúmina sérica humana formando AGEs
AO	Orbital atómico
AP-HSA	Albúmina sérica humana formando producto de Amadori
BSA	Albúmina sérica bovina
CEC	<i>S</i> -(carboxietil)cisteína
CEL	<i>N</i> -(carboxietil)lisina
CG	Gradiente conjugado
cGTO	Orbital contraído tipo Gauss
Cys	Cisteína
DFT	Teoría del funcional de la densidad
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoato
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GTO	Orbital tipo Gauss
Hcy	Homocisteína
HF	Hartree-Fock
HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
HSA	Albúmina sérica humana
HSA-SH	HSA con Cys34 en la forma tiol
HSA-S ⁻	HSA con Cys34 en la forma tiolato
HSA-SOH	HSA con Cys34 en la forma ácido sulfénico
HSA-SO ⁻	HSA con Cys34 en la forma sulfenato
HSA-SS-Cys	HSA con Cys34 formando disulfuro mixto con cisteína
HOONO	Ácido peroxinitroso
IRC	Coordenada de reacción intrínseca
KS	Kohn-Sham
KS-HOMO	Orbital KS ocupado de mayor energía
KS-LUMO	Orbital KS virtual de menor energía

Lys	Lisina
MD	Dinámica molecular
MG-H1	<i>N</i> -(hidro-5-metil-4-imidazol-2-il)-ornitina
MODIC	Entrecruzamiento imidazol derivado de metilglioxal
MGO	Metilglioxal
MM	Mecánica molecular
MO	Orbital Molecular
MP n	Teoría perturbacional de Møller-Plesset de orden n
NBO	Orbital natural de enlace
NPA	<i>Natural population analysis</i>
Prdx	Peroxirredoxina
PC	Complejo de productos
PCM	Modelo continuo polarizable
Pro	Prolina
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
QM	Mecánica cuántica
QM/MM	Método mixto cuántico-clásico
RAGE	Receptor de productos de glicación avanzada
RC	Complejo de reactivos
RESP	<i>Restrained electrostatic potential</i>
RFO	<i>Rational Function Optimization</i>
RMSD	Desviación media cuadrática
RMSF	Fluctuación media cuadrática
SCF	Campo autoconsistente
SD	<i>Steepest descent</i>
SASA	Superficie expuesta al solvente
TS	Estado de transición
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
WBI	Índice de enlace de Wiberg

1. Introducción

1.1. Tioles biológicos y ácidos sulfénicos

1.1.1. Tioles biológicos

Los tioles (RSH) son compuestos que contienen un grupo sulfhidrilo ($-SH$) unido a un átomo de carbono. Presentan carácter reductor y en solución acuosa pueden ionizarse para dar lugar a tiolatos (RS^-), los cuales son buenos nucleófilos. En sistemas biológicos están representados fundamentalmente por la cisteína, Cys, y sus derivados de alto y bajo peso molecular. Los tioles pueden oxidarse por mecanismos de uno y dos electrones dando una amplia variedad de productos (*e.g.* ácidos sulfénicos y disulfuros) de los cuales se hablará en mayor detalle más adelante. Estos productos, salvo excepciones, pueden reducirse de vuelta a tioles.

En las proteínas, los residuos de Cys se encuentran entre los menos abundantes, con una frecuencia de aparición de $\sim 3\%$, considerando como 100% a los 20 aminoácidos codificados [1]. A pesar de esto, los residuos de Cys tienen varias funciones asociadas [2]. En el caso de las proteínas extracelulares, los residuos de Cys se encuentran por lo general oxidados, formando puentes disulfuro ($-S-S-$) [3], los cuales permiten su correcto plegamiento y contribuyen a estabilizar su estructura tridimensional. En cambio, en las proteínas intracelulares, los residuos de Cys normalmente se encuentran en su forma reducida. Por otro lado, los residuos de Cys también pueden coordinar iones metálicos, como ocurre en el caso de los dedos de Zn [4], en los centros ferrosulfurados [5] y en algunas hemoproteínas [6].

La versatilidad redox del azufre hace que los residuos Cys muchas veces estén involucrados en la catálisis redox [7], como por ejemplo en la reducción de disulfuros [8], en el plegamiento de proteínas [9], en la reparación del daño oxidativo de proteínas [10] y en el catabolismo del H_2S [11]. Por otro lado, dado el carácter nucleofílico del grupo tiol, los residuos Cys forman parte del sitio activo de proteasas [12] y fosfatasas [13], y también pueden actuar en la detoxificación de electrófilos oxidantes [14] y no oxidantes [15, 16]. Por último, existen residuos Cys que no cumplen ninguna función específica, denominados residuos de Cys huérfanos [17], los cuales no suelen estar conservados.

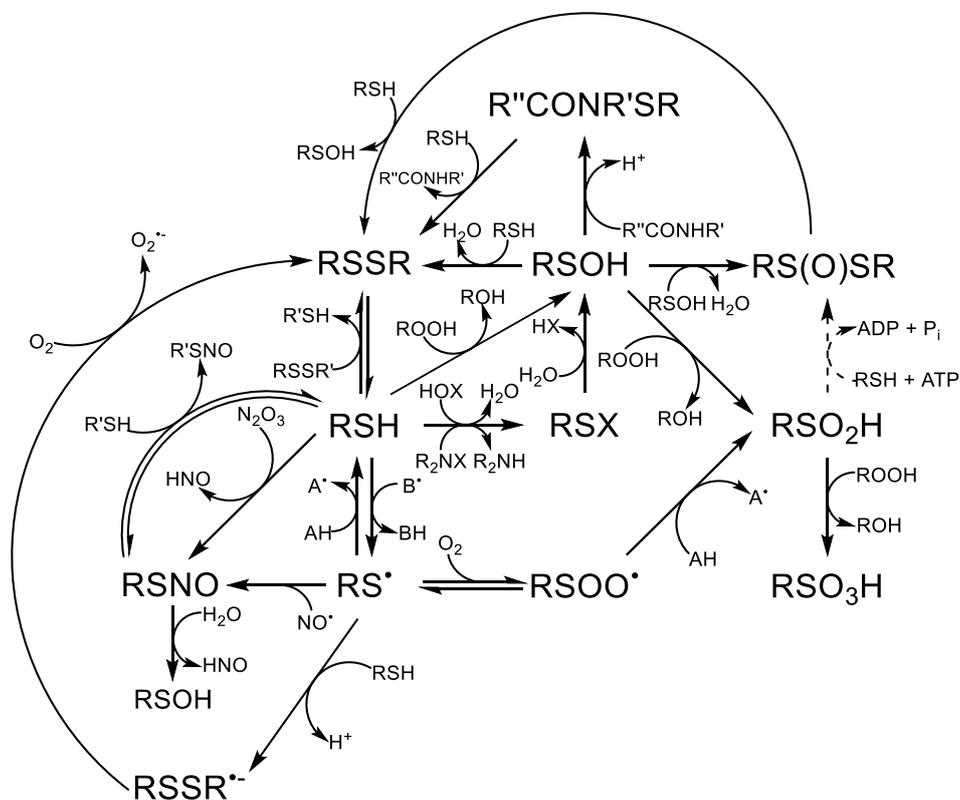
En los últimos años, los residuos Cys han cobrado especial importancia en la señalización celular [18]. Por ejemplo, la acción de varias clases de proteínas,

incluyendo enzimas metabólicas [19], proteínas señalizadoras [20] y factores de transcripción [21] puede ser regulada por la oxidación de un residuo Cys. Por otro lado, las proteínas que presentan un residuo de Cys con funciones catalíticas pueden inactivarse, y por lo tanto ser reguladas, por la oxidación de dicho residuo, como las proteína tirosina fosfatasas [22].

Una propiedad muy importante de los tioles biológicos es su acidez, dado que, al momento de reaccionar, un tiol debe estar ionizado, ya que el tiolato es la especie con carácter nucleofílico. El valor de pK_a de un tiol peptídico ordinario es de alrededor de 9 [23], y puede verse disminuido por la estabilización del tiolato debida a interacciones electrostáticas y a la formación de enlaces de hidrógeno. Por lo general, los residuos Cys involucrados en la catálisis y en la detoxificación de especies oxidantes suelen tener valores de pK_a menores a 6 [24].

1.1.2. Vías de oxidación de tioles y ácidos sulfénicos

Como se mencionó anteriormente, los tioles pueden reaccionar con oxidantes de dos electrones (*e.g.* peróxidos, $ROOH$; haloaminas, R_2NX ; ácidos hipohalosos, HOX), o con oxidantes de un electrón (especies de capa abierta como HO^\bullet , $O_2^{\bullet-}$, NO_2^\bullet y $CO_3^{\bullet-}$). Las vías de oxidación de los tioles se ilustran en el **Esquema 1.1**.



Esquema 1.1. Vías de oxidación de tioles.

La oxidación de un tiol por oxidantes de dos electrones suele conducir a la formación de un ácido sulfénico (RSOH), de forma directa, como en las reacciones con peróxidos, o indirecta, como las reacciones con haloaminas y ácidos hipohalosos para formar haluros de sulfenilo (RSX), o la reacción con derivados del óxido nítrico (*e.g.* N_2O_3) para formar un S-nitrosotiol (RSNO). Estos productos pueden hidrolizarse para dar ácidos sulfénicos [25].

El ácido sulfénico, especie que puede actuar como electrófilo o como nucleófilo, puede seguir cuatro destinos: a) reaccionar con un tiol para formar un disulfuro (RSSR) y agua; reaccionar con otra molécula de ácido sulfénico para formar un tiosulfinato (RS(O)SR) y agua; b) reaccionar con una amida para formar una sulfenilamida (R''CONR'SR) y agua; y c) reaccionar con un peróxido para formar un ácido sulfínico (RSO₂H) y agua, un proceso denominado sobreoxidación de tioles [26]. Las tres primeras especies pueden reducirse a tioles: el disulfuro RSSR puede reaccionar con un tiol R'SH para formar un tiol RSH y un disulfuro RSSR', en un proceso conocido como intercambio tiol-disulfuro; el tiosulfinato puede reaccionar con un tiol para formar un disulfuro y un ácido sulfénico; y la sulfenilamida puede reaccionar con un tiol para dar un disulfuro y una amida [22]. A diferencia de los otros tres derivados del ácido sulfénico, el ácido sulfínico solo puede reaccionar con un peróxido para formar un ácido sulfónico (RSO₃H), el cual no puede ser reducido por reacción con tioles, y agua [26]. Una excepción la constituyen algunos ácidos sulfínicos proteicos, los cuales pueden ser reducidos por la reacción con un tiol a expensas de una molécula de ATP, catalizada por las sulfirredoxinas [27]. Volviendo a los ácidos sulfénicos, por lo general se trata de intermediarios de vida corta, debido a la posibilidad de reaccionar con tioles. No obstante, la vida media de un ácido sulfénico puede ser larga debido a impedimentos estéricos y a la ausencia de tioles cercanos [28, 29].

La oxidación de un tiol por procesos de un electrón (*i.e.* especies de capa abierta como HO•, O₂^{•-}, NO₂[•] y CO₃^{•-}) conduce a la formación de un radical tiilo (RS•). El radical tiilo puede tener los siguientes destinos: a) reducirse de nuevo a tiol por reacción con un reductor de un electrón como el ácido ascórbico; b) reaccionar con una molécula de O₂ para formar un radical tioperoxilo (RSOO•), que a su vez puede ser reducido por un reductor de un electrón a ácido sulfínico; c) reaccionar con un tiol para formar el anión radical disulfuro capaz de reducir el O₂ a superóxido [30]; d) o reaccionar con el óxido nítrico para formar un S-nitrosotiol.

1.1.3. Oxidación de tioles por peróxidos

Como se mencionó anteriormente, los tioles pueden reaccionar con peróxidos, oxidándose, para formar ácidos sulfénicos. Estudios cinéticos a distintos valores de pH muestran un aumento de la reactividad de los tioles frente a diversos peróxidos (*e.g.* H₂O₂; ácido peroxinitroso, HOONO) al aumentar el pH, sugiriendo que la especie reactiva es el tiolato [31, 32], lo cual también es apoyado por trabajos de modelado computacional [33].

Las reacciones de tioles de bajo peso molecular con H₂O₂ tienen constantes de velocidad k independientes del pH (*i.e.* las que se observarían si el tiol se encontrase completamente ionizado) de entre 4 y 40 M⁻¹ s⁻¹ [31, 34, 35]. En la **Tabla 1.1** se muestra una selección de constantes de velocidad para reacciones de tiolatos de bajo peso molecular con H₂O₂. Respecto al mecanismo de reacción, trabajos de modelado computacional sugieren que las reacciones de tiolatos con peróxidos siguen un mecanismo S_N2, en el que el tiolato actúa como nucleófilo [33, 36-41]. En el caso de las reacciones con H₂O₂, es de resaltar que, posteriormente al estado de transición, se da una transferencia protónica, formándose sulfenato y agua en lugar de ácido sulfénico y OH⁻ [36, 37, 39], mientras que en la reacción con HOONO no se observa dicha transferencia protónica, formándose ácido sulfénico y NO₂⁻ [40]. Posiblemente debido a que este último es una base mucho más débil que el OH⁻ [40], y presumiblemente más débil que los sulfenatos (el valor del pK_a del ácido cisteínsulfénico es de alrededor de 7.5 [42], mientras que el del ácido nitroso es de alrededor de 3.3 [43]).

Tabla 1.1. Constantes de velocidad independientes del pH para reacciones de tioles de bajo peso molecular con H₂O₂ a 25 °C. Adaptada de [35].

Tiol	k (M ⁻¹ s ⁻¹)
N-Acetilcisteína	39.3
2-Mercaptoetanol	24.3
Captopril	24.1
Cisteína	14.3
Cisteína etiléster	3.9
Glutación	31.9
Cisteinilglicina	12.0
Homocisteína	19.7

En tioles proteicos, la reactividad frente a H_2O_2 puede variar mucho en las distintas proteínas. El valor de k puede ir desde el orden de los $10 M^{-1} s^{-1}$ en PTP1B [44] y papaína [45, 46], pasando por $10^3 M^{-1} s^{-1}$ en GAPDH [47], hasta 10^4 - $10^8 M^{-1} s^{-1}$ en peroxirredoxinas (Prdx2, Prdx5, AhpC, AhpE) [48-52]. En la **tabla 1.2** se reportan valores de k independientes del pH para algunas reacciones de tioles proteicos con H_2O_2 . Los valores de k anormalmente altos en enzimas como GAPDH y peroxirredoxinas sólo pueden explicarse por interacciones específicas con residuos del sitio activo que estabilizan al estado de transición respecto al complejo proteína- H_2O_2 , más que a la reactividad intrínseca del tiolato [38, 41, 53].

Tabla 1.2. Constantes de velocidad independientes del pH para reacciones de tioles proteicos con H_2O_2 a 25 °C. Adaptada de [53].

Tiol	$k (M^{-1} s^{-1})$	Referencia
Papaína	62	[45, 46]
PTP1B	9	[44]
GAPDH	2.8×10^3	[47]
AhpE	8.2×10^4	[52]
Prdx5	3.0×10^5	[51]
AhpC	5.8×10^7	[48, 49]
Prdx2	1.0×10^8	[50]

1.1.4. Oxidación de ácidos sulfénicos por peróxidos

Los ácidos sulfénicos también pueden oxidarse por reacción con peróxidos para dar ácidos sulfínicos. Como se mencionó anteriormente, se trata de intermediarios de vida corta cuando no están estéricamente impedidos. Debido a esto, se cuenta con escasa información de la cinética de la reacción de ácidos sulfénicos de bajo peso molecular con peróxidos, habiendo sólo un trabajo del estudio cinético detallado de la oxidación del ácido 9-fluoro-10-tripticensulfénico por H_2O_2 y peróxidos orgánicos, usando metanol como solvente [54]. En el caso de la reacción con H_2O_2 , el valor de la constante de velocidad independiente del pH es de $0.29 M^{-1} s^{-1}$ a 20 °C. En solución acuosa no se cuenta con información cinética de estas reacciones.

Por otro lado, se cuenta con información cinética de la oxidación de varios ácidos sulfénicos proteicos, con valores de constante de velocidad k de entre 10^{-1} y $10^4 M s^{-1}$ [20, 28, 29, 52, 55-57], lo cual sugiere que el entorno proteico (interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno con el sulfenato y/o el H_2O_2 , presencia de

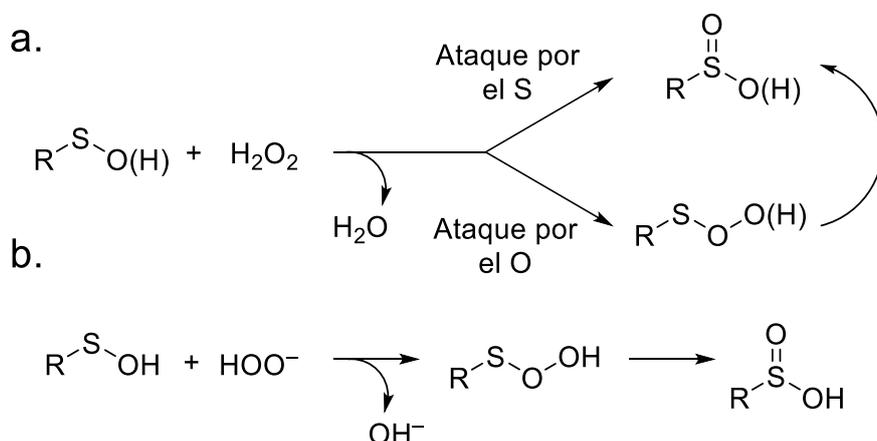
moléculas de agua en el sitio de reacción) modula la cinética de la reacción, estabilizando (o bien desestabilizando) diferencialmente al estado de transición respecto al complejo proteína-H₂O₂. En la **Tabla 1.3** se muestran valores de constantes de velocidad para las reacciones de ácidos sulfénicos proteicos con H₂O₂, determinadas bajo distintas condiciones de temperatura y pH.

Tabla 1.3. Constantes de velocidad para reacciones de ácidos sulfénicos de proteínas con H₂O₂.

Proteína	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	Condiciones	Ref.
HSA	0.4	37 °C; pH 7.4	[56]
AhpE (<i>M. tuberculosis</i>)	40	25 °C; pH 7.4	[52]
Fosfatasa Cdc25B (C426S)	47	20 °C; pH 7.0	[55]
Prdx1	57	25 °C; pH 7.4	[52]
Fosfatasa Cdc25B	60	20 °C; pH 7.0	[55]
MAP kinasa 3 (C218S)	101	20 °C; pH 8.0	[20]
Fosfatasa Cdc25C (C330S)	101	20 °C; pH 7.0	[55]
Fosfatasa Cdc25C	110	20 °C; pH 7.0	[55]
NADH peroxidasa (<i>Streptococcus</i>)	390	25 °C; pH 7.0	[29]
Prdx2	1.2×10^4	20 °C; pH 7.4	[31]
Prdx3	1.2×10^4	20 °C; pH 7.4	[31]
NADH peroxidasa (H10Q)	1.8×10^4	25 °C; pH 7.0	[57]

Respecto al mecanismo de reacciones entre ácidos sulfénicos y peróxidos, se cuenta con poca información. El estudio de la cinética de la reacción del ácido sulfénico de AhpE con H₂O₂ a distintos valores de pH muestra un aumento de la constante de velocidad observada al aumentar el pH, lo que indicaría o bien que la especie reactiva es el sulfenato, o que la reacción sufre catálisis básica [52]. Lo mismo sugiere el modelado computacional DFT (del inglés *density functional theory*, teoría del funcional de la densidad; se explicará más en detalle los aspectos metodológicos en la sección 2) en fase gaseosa –con correcciones de energética al nivel Hartree-Fock usando solvente implícito– de las reacciones de ácido metanosulfénico y metanosulfenato con H₂O₂ [33]. Este trabajo, junto a otro trabajo de modelado computacional a nivel DFT en fase gaseosa (con energías mejoradas usando solvente implícito) considerando la participación activa de las moléculas de agua [58], sugiere que las reacciones de ácidos sulfénicos con peróxidos siguen un mecanismo S_N2 en el que el S ataca al peróxido, y también consideran la posibilidad de que se dé un intercambio protónico asistido por solvente (SAPE, del inglés *solvent-assisted*

proton exchange). Tanto la hipótesis del SAPE como la de la catálisis básica son descartadas por la ausencia de efectos cinéticos isotópicos en la reacción de 9-fluoro-10-tripticensulfénico con H_2O_2 en metanol deuterado [54]. No obstante, dichos trabajos no tienen en cuenta que el sulfenato es un nucleófilo ambidentado [59, 60], por lo que sin otra evidencia no debería descartarse la posibilidad de que el átomo de O del sulfenato ataque al peróxido, formando un intermediario persulfenato (RSO_2^-) que rearreglaría a sulfinato. Además, el ácido sulfénico puede actuar como electrófilo, y la base conjugada del H_2O_2 , el HO_2^- , presenta carácter nucleófilo [61-63], por lo que tampoco debería descartarse la posibilidad de un ataque nucleofílico del HO_2^- sobre el S del ácido sulfénico, para formar ácido persulfénico (RSOOH) que rearreglaría a ácido sulfínico. Los posibles mecanismos de la reacción de un ácido sulfénico con H_2O_2 se ilustran en el **Esquema 1.2**.



Esquema 1.2. Posibles mecanismos de reacción del ácido sulfénico con H_2O_2 . a) Ácido sulfénico/sulfenato como nucleófilo; b) ácido sulfénico como electrófilo.

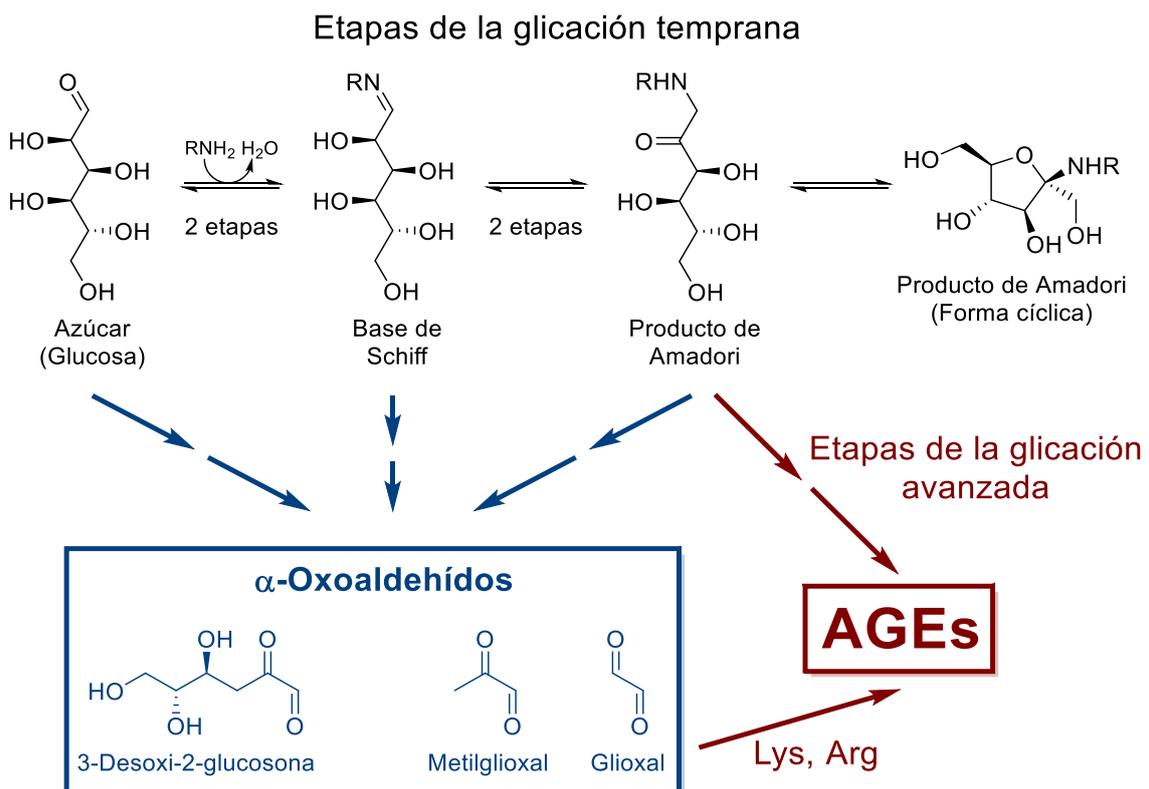
Finalmente, como ya se mencionó, el ácido sulfínico puede reaccionar con peróxidos para formar un ácido sulfónico. En el caso de la reacción con H_2O_2 (metanol, 20 °C), el ácido 9-fluoro-10-tripticensulfínico (que mayoritariamente se encuentra en la forma sulfinato, RSO_2^-) reacciona de forma más lenta ($k = 5.8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que el ácido sulfénico ($k = 0.29 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [54]. Los datos obtenidos en el contexto del trabajo de modelado computacional ya mencionado, apoyan la idea de que la reacción sigue un mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ en el cual el S del sulfinato ataca al OH del peróxido [33].

1.2. Glicación de proteínas y metilglicoxal

1.2.1. Generalidades

Se denomina glicación a la modificación no enzimática de aminas biológicas por especies que contienen grupos carbonilo tales como azúcares reductores y

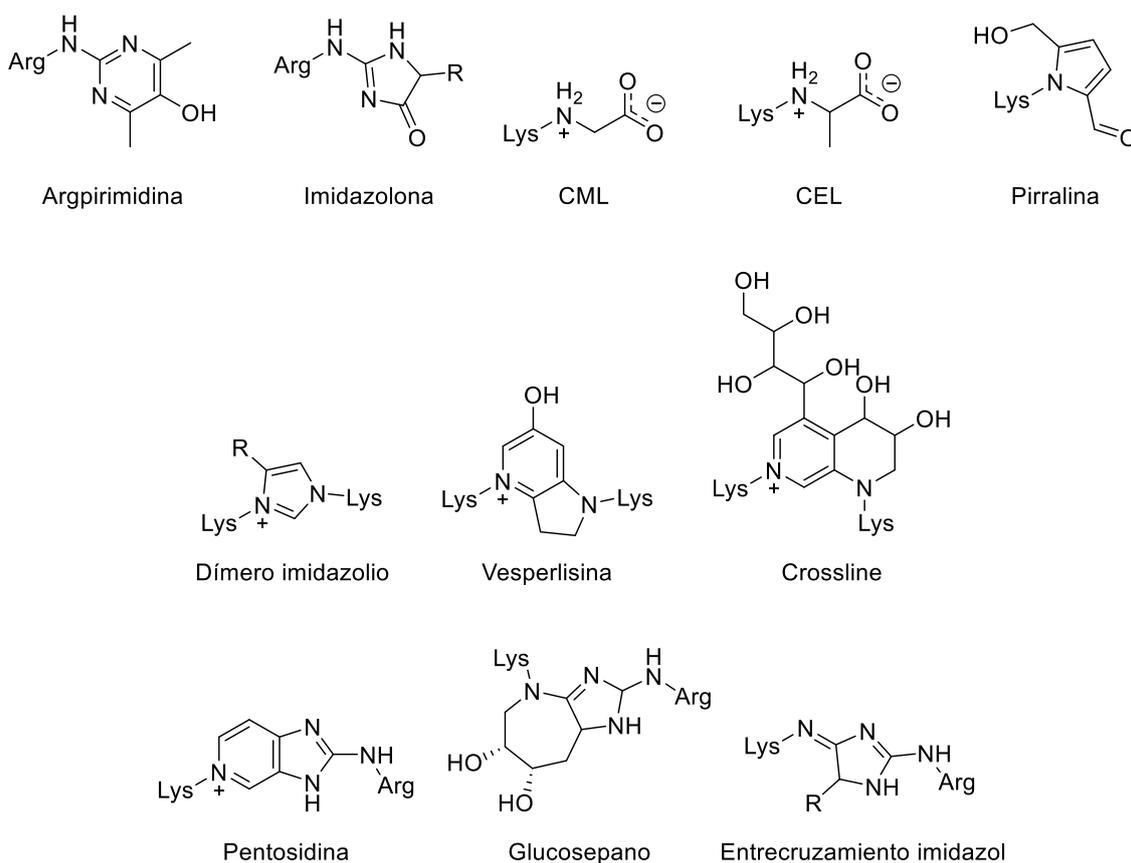
α -oxoaldehídos. Estos últimos también pueden reaccionar con los grupos tiol de los residuos Cys. En proteínas, la glicación se da a nivel del grupo amino terminal y de las cadenas laterales de Lys y Arg, dando lugares a modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones pueden desencadenar cambios estructurales que pueden llevar a alteraciones en la función. Entre las proteínas cuya función se ve alterada por la glicación se encuentran la miosina (proteína involucrada en la contracción muscular) [64], la α -cristalina (proteína encargada de mantener la transparencia del cristalino y la córnea del ojo) [65-67], las proteínas de choque térmico [68], el colágeno [69], la hemoglobina [70] y la albúmina sérica humana (HSA, proteína que se tratará en detalle más adelante) [71, 72]. Se ha relacionado un aumento en los niveles de proteínas glicadas con diversas patologías tales como diabetes [73-78], nefropatías [79], retinopatías [80], enfermedades cardiovasculares [81, 82] y enfermedades neurodegenerativas [83], así como con el envejecimiento [65, 76, 79, 83].



Esquema 1.3. Procesos de glicación temprana y avanzada por glucosa y relación con la formación de α -oxoaldehídos.

En el caso de azúcares reductores (aldosas), como la glucosa (el azúcar más abundante en el plasma, que llega a tener una concentración de hasta 20 mM), el proceso químico comienza con el ataque nucleofílico de un grupo amino sobre el

grupo aldehído del azúcar (en su forma abierta) para formar una carbinolamina, intermediario de vida corta que se deshidrata para formar una imina (conocida como base de Schiff). Ésta se transforma en un enodiol intermediario que a su vez se transforma en una fructosilamina (también conocida como producto de Amadori) que puede ciclarse [84-86]. Estas modificaciones, de naturaleza reversible, conocidas como productos de la glicación temprana, pueden sufrir una serie de modificaciones oxidativas y no oxidativas (glicación avanzada) para formar productos de glicación avanzada (AGEs, por la sigla en inglés de *advanced glycation endproducts*) [87] y α -oxoaldehídos, tales como 3-desoxi-2-glucosona, metilgloxal y glixal [88] (**Esquema 1.3**). Estos últimos, como se mencionará más adelante, tienen la capacidad de modificar irreversiblemente las cadenas laterales de los residuos de Lys y Arg (también formando AGEs), y también pueden reaccionar reversiblemente con las cadenas laterales de los residuos Cys, formando un hemitioacetal [89-91].



Esquema 1.4. Estructuras de algunos productos de glicación avanzada.
Abreviaturas: CML, *N*-(carboximetil)lisina; CEL, *N*-(carboxietil)lisina.

Volviendo a los AGEs, dado que su formación es irreversible, es de esperar que la mayor parte de los efectos de la glicación sobre las proteínas se deban a la a dicho proceso. En línea con esto, se ha relacionado la presencia elevada de AGEs con

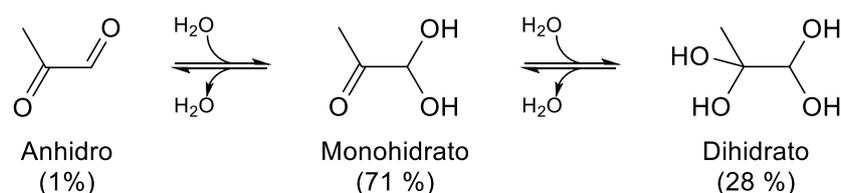
patologías como retinopatías [92], nefropatías [93], enfermedades cardiovasculares [82, 87] y enfermedades neurodegenerativas [83]. Por otro lado, los AGEs y α -oxoaldehídos se observan en algunos alimentos (el oscurecimiento durante la cocción se debe a la formación de AGEs) [94], y el consumo de estos alimentos parece aumentar los niveles de AGEs en el organismo [95]. Existe una gran variedad de AGEs, entre ellos productos simples como *N*-(carboximetil)lisina (CML), *N*-(carboxietil)lisina (CEL), pirralina, hidroimidazolonas y argpirimidina, y entrecruzamientos como dímeros de lisina, vesperlisina, “crossline”, entrecruzamientos imidazol, glucosepano y pentosidina. Las estructuras de algunos de los AGEs más importantes se muestran en el **Esquema 1.4**.

Algunos de estos productos, como la argpirimidina y la pentosidina, son fluorescentes [96]. Otros, como las hidroimidazolonas, CML y CEL, pueden unirse a una proteína llamado RAGE (del inglés *receptor for advanced glycation endproducts*, receptor de productos de glicación avanzada) [95]. Dicha proteína puede encontrarse como un receptor de membrana (mRAGE) en células endoteliales y fagocitos, o en forma soluble (sRAGE). La unión de AGEs al mRAGE activa cascadas de señalización que terminan en un aumento de la expresión de proteínas involucradas en la inflamación, la expresión de citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión, la producción de especies reactivas de oxígeno y la expresión del mismo RAGE [87, 97], por lo que . La función del sRAGE parece ser regular la unión de los AGEs al mRAGE por interferencia y favoreciendo la endocitosis de proteínas que contienen AGEs [98]. Otros receptores de membrana –involucrados en la endocitosis y posterior degradación de proteínas que contienen AGEs– también pueden unir AGEs, como los receptores AGE-R (AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3) y los receptores barrenderos A1 y A2 de los macrófagos [87, 99, 100]. Por otro lado, la unión de AGEs al receptor AGE-R1 parece regular la acción del receptor RAGE [101]. Finalmente, existen otros receptores que pueden unir AGEs que no están involucrados en la endocitosis de los mismos, como CD36 y LOX-1 [87]. La unión de AGEs a CD36 activa vías de señalización que favorece la producción de especies reactivas de oxígeno, y en los adipocitos activa vías de señalización que desembocan en la disminución de la producción de leptina (proteína que disminuye el apetito) [102]. Por otro lado, la unión de AGEs al receptor LOX-1 en células endoteliales además de activar vías de señalización que desembocan en un aumento de la expresión de proteínas inflamatorias y moléculas de adhesión, activa vías que desembocan en la disminución de la producción celular de NO[•] (causando

disfunción endotelial y en la apoptosis de la célula endotelial (favoreciendo la generación de placas de ateroma) [103].

1.2.2. Metilglioxal

El metilglioxal (MGO) es un α -oxoaldehído muy reactivo que se produce por vías endógenas, tales como descomposición de triosas fosfato [104], auto-oxidación de carbohidratos [105, 106], degradación de la glucosa [107], peroxidación de lípidos [108] y degradación de ácidos nucleicos [109]. En individuos sanos, los valores reportados de la concentración de MGO se encuentran entre 120 y 650 nM [110-124]. En condiciones patológicas (*e.g.*: diabetes, nefropatía) [115, 125, 126], la concentración de MGO se ve aumentada, con valores reportados desde 150 nM hasta 2.4 μ M [110-124], aunque probablemente este último valor esté sobreestimado [121], esperándose que la concentración plasmática de MGO se encuentre por debajo de 1 μ M.

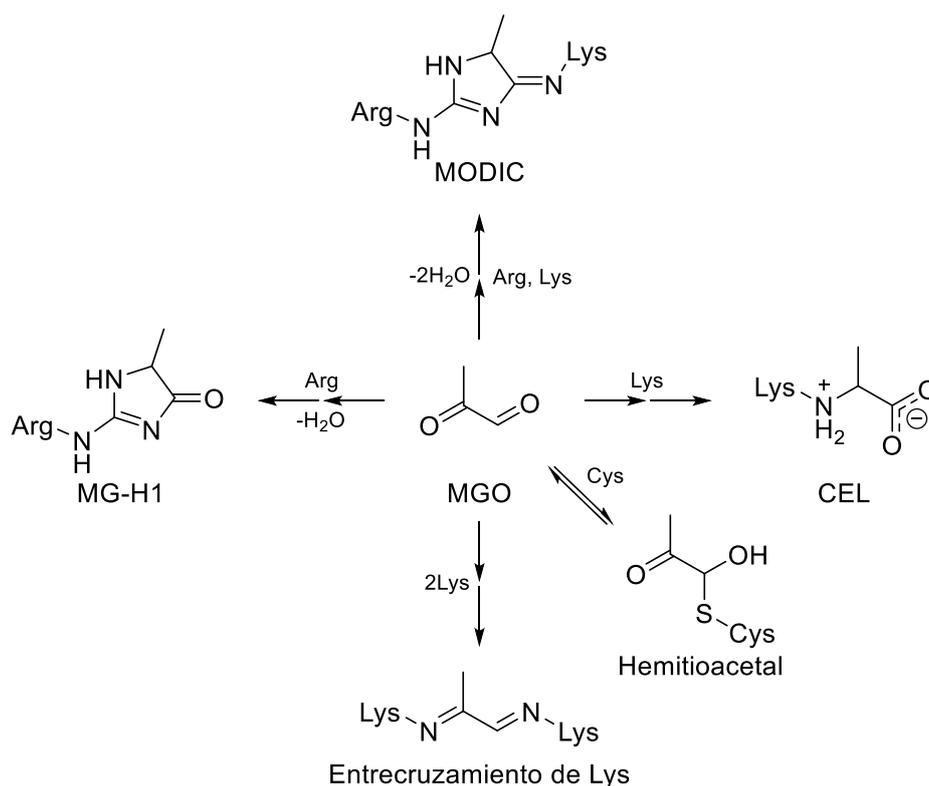


Esquema 1.5. Formas del MGO presentes en solución acuosa.

El MGO puede formar hidratos, y en solución acuosa se encuentran tres formas del MGO en equilibrio en distintas proporciones (**Esquema 1.5**): anhidro (1 %), monohidrato (71 %) y dihidrato (28 %) [127-129]. El MGO también reacciona de forma reversible con las cadenas laterales de Arg y Lys presentes en las proteínas [130], y modificaciones irreversibles posteriores pueden ocurrir como la formación de entrecruzamientos de cadenas laterales de Lys o entrecruzamientos MODIC (del inglés *methylglyoxal-derived imidazole crosslink*, entrecruzamientos imidazol derivados de metilglioxal, que se dan entre cadenas laterales de Lys y Arg) [130] y CEL [65] a nivel de residuos Lys, y la formación de imidazolonas como N-(hidro-5-metil-4-imidazolón-2-il)-ornitina (MG-H1) [130].

Los mecanismos para la formación de estos productos no están del todo elucidados debido a que presentan varias etapas, aunque se cuenta con trabajos de modelado DFT en solución acuosa que en los que se exploran varias alternativas mecanísticas para la formación de entrecruzamientos entre Lys y Arg derivados de glioxal y MGO (*e.g.* MODIC) [131-133]. En otro trabajo (también de modelado DFT en solución

acuosa) se estudió un posible mecanismo para la reacción entre lisina y glicoxal monohidrato para dar CML [134]. El mecanismo consiste en la formación reversible de una base de Schiff, la cual sufre rearrreglos irreversibles para dar lugar a CML. La reacción análoga con MGO podría seguir un mecanismo similar, dando CEL. Análogamente, el MGO puede reaccionar de forma reversible con las cadenas laterales de Cys para formar un hemitioacetal [89, 91]. Se ha sugerido que este hemitioacetal se transformaría en *S*-(carboxietil)cisteína (CEC) [135], por extrapolación a lo observado por la reacción de tioles con glicoxal que da como producto final *S*-(carboximetil)cisteína [136]. No obstante, el producto CEC nunca se ha identificado como producto de las reacciones de tioles con MGO [89], probablemente debido a las diferencias entre el glicoxal y el MGO (el primero es un dialdehído, mientras que el segundo es un cetoaldehído; cetonas y aldehídos presentan una química diferente). En el **Esquema 1.6** se muestran las vías de formación de productos derivados del MGO.



Esquema 1.6. Vías de formación de productos entre metilglicoxal y cadenas laterales de Arg, Lys y Cys. MGO: Metilglicoxal. CEL: *N*-(carboxietil)lisina. MODIC: Entrecruzamiento imidazol derivado de metilglicoxal (del inglés *methylglyoxal-derived imidazole crosslink*) MG-H1: *N*-(hidro-5-metil-4-imidazol-2-il)ornitina.

Cabe destacar que el receptor RAGE mencionado anteriormente presenta una elevada afinidad por el producto MG-H1 (del orden de 1 nM) [137], mientras que

para el producto CEL (unido a las proteínas) tiene una afinidad mucho menor (del orden de 1 μM)[138].

En el medio intracelular, el MGO es detoxificado por el sistema glioxalasa, el cual cataliza la transformación de MGO a D-lactato [139]. Dicha transformación se da en tres etapas. Primero el MGO reacciona de forma rápida con glutatión para formar un hemitioacetal. Luego, éste se isomeriza a un tioéster, D-S-lactoilglutatión (catalizada por la glioxalasa I) [140]. Finalmente, el tioéster se hidroliza a D-lactato y agua, una reacción catalizada por la glioxalasa II [141].

1.3. Albúmina sérica humana

1.3.1. Generalidades

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína más abundante en el plasma, representando alrededor del 60 % del total. Su concentración en plasma es de alrededor de 600 μM . Se trata de una cadena polipeptídica simple de 585 residuos, no glicosilada, con un peso molecular de 66438 Da y una carga global de alrededor de -14 a pH 7.4.

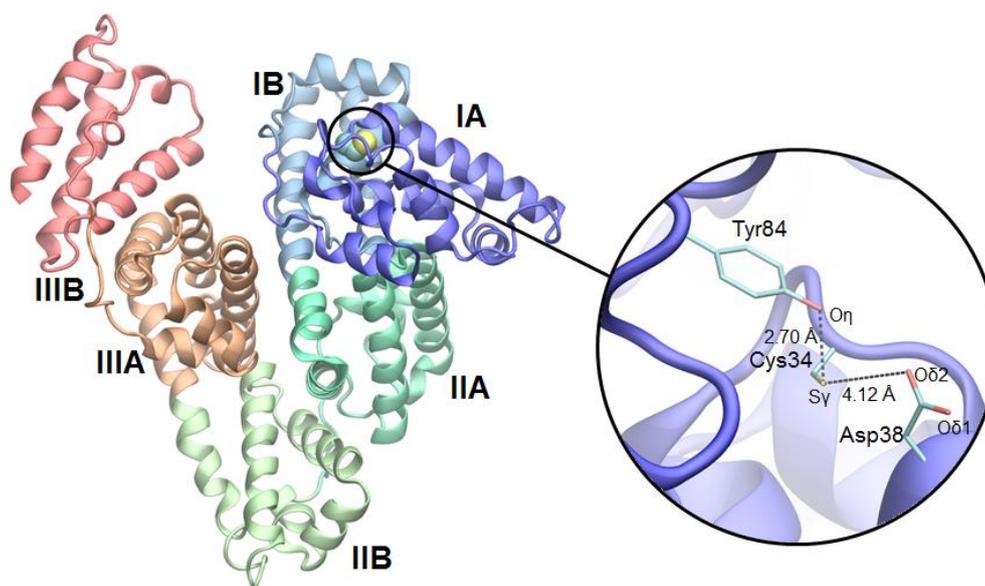
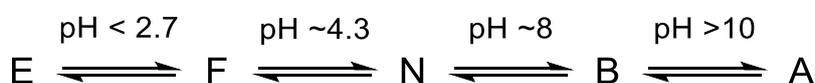


Figura 1.1. Representación de la estructura cristalográfica de la HSA (coloreada por subdominio) libre de ligandos y modificaciones (PDB: 1A06_A) y ubicación del residuo Cys34.

Se trata de una proteína globular que presenta un 60 % de hélice α y nada de hoja plegada β , organizada en tres dominios (I, residuos 1-195; II, residuos 196-303; III, residuos 304-585). Cada uno de estos dominios se divide en dos subdominios, A y B

(**Figura 1.1**), cuya estructura se encuentra estabilizada por enlaces disulfuro (en total la HSA tiene 17 de estos enlaces) [142]. Se sugiere que el origen de esta estructura en subdominios se debe a eventos de duplicación genética [143]. La HSA tiene un único residuo de cisteína libre, Cys34, el cual se encuentra en una hendidura, cercano a los residuos Asp38 y Tyr84 (**Figura 1.1**), que representa más del 80 % de los tioles libres en plasma [144].

Debido a que tiene numerosos residuos ionizables (36 Asp, 62 Glu, 59 Lys, 24 Arg, 16 His, 1 Cys y 18 Tyr), la HSA puede sufrir cambios conformacionales reversibles al variar el pH. A valores de pH menores a 4.3, la HSA experimenta una transición de la conformación normal (conformación N; presente a pH 7.4) a la conformación F (del inglés *fast*, rápida, debido a que migra rápido en los geles de electroforesis), que a su vez sufre una transición a valores de pH menores a 2.7 a la conformación E (extendida). Por otro lado, la forma N sufre a valores de pH mayores a 8 una transición a la conformación B (básica), que a su vez puede sufrir una transición a la forma A (del inglés *aged*, envejecida) a valores de pH por encima de 10 [142]. Se ha reportado que la forma B presenta una mayor capacidad de unión a ligandos [145] y que la presencia de calcio a concentraciones plasmáticas facilita la transición de N a B a pH 7.4 [146], lo que sugiere que dicha transición es relevante biológicamente.



Esquema 1.7. Conformaciones de la HSA en relación con el pH. E: Forma extendida. F: Forma *fast*. N: Forma normal. B: Forma básica. A: Forma *aged*.

A la fecha, en el *Protein Data Bank* (PDB) se encuentran depositadas numerosas estructuras 3D de HSA, tanto para la proteína libre (*i.e.* sin ligandos ni modificaciones) [147] como unida a ligandos, como por ejemplo ácidos grasos [148], hemina [149], bilirrubina [150], prostaglandinas [151] y fármacos [152]. A la fecha, no se cuenta con estructuras de HSA con modificaciones covalentes a nivel de Cys34 detectadas experimentalmente, ni formando productos derivados de reacciones con MGO a nivel de residuos de Arg y Lys, pero sí se cuenta con una estructura de HSA formando una base de Schiff (o un producto de Amadori de cadena abierta) a nivel del residuo Lys195 [153] (esto se detallará más adelante), siendo ésta la única estructura de HSA con modificaciones postraduccionales.

Entre las funciones de la HSA se encuentran el transportar moléculas pequeñas (ácidos grasos, bilirrubina, hormonas, fármacos, etc.) y cationes metálicos,

mantener la presión coloidosmótica (asociada a su gran carga negativa) [142] y capturar especies electrófilas, tanto oxidantes [56, 154-161] como no oxidantes [89-91, 136, 162-164]. Esta última función está asociada a su tiol libre en Cys34.

1.3.2. Reactividad del tiol de la HSA y su derivado – el ácido sulfénico

Al igual que como se mencionó de forma general en la **Sección 1.1** para tioles proteicos y de bajo peso molecular, el tiol de la HSA (HSA-SH) puede oxidarse por peróxidos como H₂O₂ y ácido peroxinitroso para formar un ácido sulfénico de vida media relativamente larga [56, 154], el cual puede reaccionar con tioles de bajo peso molecular (*e.g.* cisteína, cisteinilglicina, homocisteína) para formar disulfuros mixtos (HSA-SS-R; cisteína: HSA-SS-Cys; homocisteína: HSA-SS-Hcy) [165], decaer espontáneamente a un producto no caracterizado que se presume que se trata de una sulfenilamida [165, 166], o reaccionar con peróxidos para formar un ácido sulfínico (HSA-SO₂H) que no puede ser reducido *in vivo* y que a su vez puede oxidarse, también de forma irreversible, a ácido sulfónico (HSA-SO₃H) [56].

Por otro lado, el tiol de la HSA puede reaccionar con electrófilos centrados en carbono, como por ejemplo carbonilos α,β -insaturados como 4-hidroxinonanal [164] y derivados nitrados de ácidos grasos insaturados [162] –siguiendo un mecanismo tipo Michael– y α -oxoaldehídos como glioxal y MGO para formar [89, 136] para formar hemitioacetales (esto ya fue mencionado en la **Sección 1.2.2**), y con disulfuros de bajo peso molecular (*e.g.* cistina, homocistina) para formar disulfuros mixtos [167]. La formación de éstos últimos modula la unión de ligandos [168-170]. En la **Tabla 1.4** se muestran valores de constantes de velocidad de reacciones del tiol de la HSA con especies electrófilas.

Tabla 1.4. Constantes de velocidad de reacciones del tiol de la HSA con especies electrófilas a 37 °C y pH 7.4.

Especie	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	Referencia
H ₂ O ₂	2.26	[154]
Ácido peroxinitroso	3.8×10^3	[160]
HNE	29.4	[164]
DTNB	16.1	[156]
Homocistina	0.175	[167]

Como se mencionó antes, la HSA tiene además la capacidad de unir de ácidos grasos de forma no covalente. La unión de éstos –y de otros ligandos– induce cambios que

incrementan la reactividad del tiol frente a distintas especies (*e.g.* peróxidos, disulfuros, MGO) [90, 156].

En adultos sanos, alrededor del 75 % de la HSA circulante se encuentra en la forma HSA-SH, mientras que el resto se encuentra mayoritariamente en la forma HSA-SS-Cys [171, 172]. Entre el 1 y el 2 % de la HSA circulante se encuentra en las formas HSA-SO₂H y HSA-SO₃H [173-177]. Un incremento en los niveles plasmáticos de HSA-SS-R, HSA-SO₂H y HSA-SO₃H está asociado con distintas patologías y podría constituir un biomarcador de la implicación del estrés oxidativo en procesos patológicos y de la función de la HSA como antioxidante [144, 178].

Respecto a la acidez del tiol de la HSA, ésta es controversial, con valores de pK_a reportados de entre 5 y 8.8 [156, 179-183], principalmente debido a la extrapolación de lo observado en albúmina sérica bovina (BSA, acrónimo del inglés *bovine serum albumin*) [179, 180] a la HSA (proteínas que se comportan de forma diferente [184]), o bien por una interpretación errónea del gráfico de la constante de velocidad observada respecto al pH (los autores sugieren un valor de pK_a de ~ 7 , sin embargo del gráfico se obtiene un valor de ~ 8) [181]. Experimentos de cinética en función del pH [156, 185] sugieren que el pK_a tiene un valor de ~ 8 aunque no queda claro si los cambios observados se deben a la ionización del tiol o a cambios en el entorno debidos a la transición N-B. Sin embargo, experimentos de titulación UV-visible –un método directo, ya que el tiolato absorbe a 238 nm pero el tiol no– arrojan un valor de pK_a de 8.05 [185]. Estos resultados dan mayor solidez a la idea de que el pK_a de Cys34 se encuentra alrededor de 8.

1.3.3. Glicación de la HSA

Dada su alta concentración, gran cantidad de residuos básicos (59 Lys y 24 Arg) y larga vida media (alrededor de 21 días), la HSA es altamente susceptible a glicarse [186]. La glicación produce cambios en la estructura, y por lo tanto, en la función de la HSA, disminuyendo la capacidad de transportar ligandos [71, 187, 188].

Cuando el agente glicante es la glucosa, se han reportado modificaciones en los 59 residuos Lys de la HSA [189], no obstante, el sitio más importante de glicación *in vivo* es el residuo Lys525 [190, 191]. Actualmente se cuenta con una estructura cristalográfica de HSA modificada por glucosa *in vitro* (PDB: 4IW2) formando una base de Schiff (o un producto de Amadori de cadena abierta) con Lys195 [153]. Cuando el agente glicante es el MGO, el sitio primario de modificación es Arg410 (y

la modificación que presenta es el producto MG-H1 mencionado en la **Sección 1.2.2**), aunque otros sitios minoritarios han sido identificados [188, 192].

En individuos sanos, la proporción de HSA glicada se encuentra entre el 1 y el 10 % del total [187], mientras que en pacientes diabéticos la proporción suele ser dos o tres veces mayor [193-200]. En pacientes diabéticos no controlados la proporción de HSA glicada puede llegar incluso al 90 % [201]. Asimismo, las alteraciones en la estructura y función de la HSA inducidas por la glicación tienen implicaciones clínicas. Altos niveles de HSA glicada se relacionan con daños irreversibles asociados con las alteraciones metabólicas observadas en la diabetes [76, 202]. Varios trabajos muestran la importancia de la HSA glicada en condiciones de insuficiencia renal y microangiopatía en diabéticos [79, 203-209], y también en complicaciones vasculares de la retinopatía asociada a la diabetes [80]. Por otro lado, se sugiere que la HSA glicada está involucrada en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Estudios *in vitro* apuntan a que la HSA glicada favorece la activación y agregación plaquetaria [210-212] y desfavorece la agregación de eritrocitos [213]. Adicionalmente, la HSA glicada puede afectar el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético [214] y en adipocitos [215]. Se ha observado que la albúmina glicada dispara la generación de especies reactivas de oxígeno, las cuales llevan a la reducción de la sensibilidad a la insulina del adipocito [215, 216]. Más aún, está bien establecido que la albúmina glicada contribuye a la modificación oxidativa de proteínas intracelulares en adipocitos [217, 218].

La HSA glicada formando AGEs (AGE-HSA) afecta la biología celular mediante la interacción del producto MG-H1 que se forma en Arg410 con el receptor RAGE mencionado en la **Sección 1.2.1**, que resulta en la activación de cascadas de señales que terminan en la expresión de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión (*i.e.* inmunogénesis), y en un aumento en la expresión del propio RAGE [137]. Además, como también se mencionó, AGE-HSA se une a los receptores CD36, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno y disminuyendo la producción de leptina (lo que favorecería la obesidad) [102], y a los receptores LOX-1 de las células endoteliales, activando cascadas de señalización que desembocan en inmunogénesis, disfunción endotelial y apoptosis de la célula endotelial (que se relaciona con la formación de placas de ateroma) [103]. Por otro lado, AGE-HSA puede mostrar propiedades antigénicas, las cuales pueden llevar a una respuesta autoinmune [219, 220].

Los efectos de la HSA glicada no solo se deben a AGE-HSA. Varios tipos celulares (*e.g.* monocitos, macrófagos) presentan receptores de fructosil-lisina, a los que se une la HSA que forma productos de Amadori (AP-HSA) [221]. En macrófagos y monocitos, la unión de AP-HSA a estos receptores activa vías de señalización que terminan en la expresión de mediadores inflamatorios [222, 223]. El receptor IGF-1 de las células mesangiales del riñón también une AP-HSA, activando vías de señalización que disminuyen la expresión de catalasa (una enzima con función antioxidante que cataliza la dismutación de peróxidos), lo cual favorecería el envejecimiento de dichas células [224]. Asimismo, se ha reportado que AP-HSA, mediante receptores no identificados [225], favorece la expresión de colágeno, fibronectina y de proteínas involucradas en el crecimiento y la diferenciación celular [206, 207, 226]. Las células endoteliales también presentan un receptor que une AP-HSA [227]. Dicha unión activa vías de señalización que provocan un incremento en la síntesis de NO• que induce la muerte celular [228, 229], lo cual podría tener un rol en el desarrollo de enfermedades vasculares, y también activa vías de señalización que inducen un aumento en la expresión de E-selectina, una molécula de adhesión [230]. Otras células que son afectadas por AP-HSA son las del músculo liso vascular, y los queratocitos del ojo. La interacción entre las primeras y AP-HSA favorece la proliferación de las mismas y la expresión de mediadores inflamatorios [231], y la generación de NO• [232]. En los queratocitos, AP-HSA también parece inducir la expresión de mediadores inflamatorios [233].

1.3.4. Interacción entre glicación de HSA y oxidación de Cys34

En los últimos años, se ha sugerido que la glicación de la albúmina y la oxidación del tiol de Cys34 son procesos sinérgicos, es decir, que la glicación favorece la oxidación de Cys34 y viceversa [234].

Por un lado, se ha reportado que el tiol de la BSA incubada con glucosa parece ser más susceptible a oxidarse por especies radicalarias [193], y que la BSA incubada con glucosa (5-100 mM, 37 °C, pH 8) por 7 semanas muestra una disminución del contenido de tioles de hasta un 61 % [235]. Una disminución del contenido de tioles similar (40 %) se ha observado cuando se incubaba BSA con MGO (1 mM, 37 °C, pH 7.4) durante 150 horas (aprox. 6 días), aunque esta disminución puede deberse a la reacción del tiol con MGO [236]. En línea con estos resultados, se han observado niveles disminuidos de HSA-SH en pacientes diabéticos (~34 %) [237] e hiperglicémicos (~50 %) [238]. Estos trabajos sugieren que la glicación aumentaría

la tendencia a oxidarse del tiol de Cys34, aunque no se cuenta con estudios cinéticos de las reacciones de HSA-SH (glicada) frente a especies oxidantes.

Por otro lado, se ha observado que la BSA tratada con H₂O₂ 10 mM (pH 7.4, 37 °C) presenta mayores niveles de glicación por glucosa (se incubó la proteína por 4 semanas con concentraciones de glucosa de hasta 30 mM), de hasta 35 % [234]. También se ha reportado que la HSA con disulfuros mixtos a nivel de Cys34 (HSA-SS-Cys, HSA-SS-Hcy; variantes de HSA oxidada a nivel de Cys34) presenta una mayor reactividad del grupo amino de Lys525 frente a homocisteína-tiolactona [239], que si bien no es un agente glicante, tiene carácter electrófilo. Esto sugiere que el grupo amino de Lys525 presenta mayor nucleofilia en HSA que forma disulfuros mixtos, lo que podría traducirse en un aumento en la tendencia a glicarse de dicho residuo.

Otro aspecto a destacar es que se ha observado que los oxoaldehídos, entre ellos el MGO, tienen la capacidad de reaccionar con el tiol de la HSA, si bien las constantes de velocidad para este tipo de reacciones no se han determinado [89, 91], lo que disminuiría la actividad antioxidante de la HSA.

2. Fundamentos metodológicos

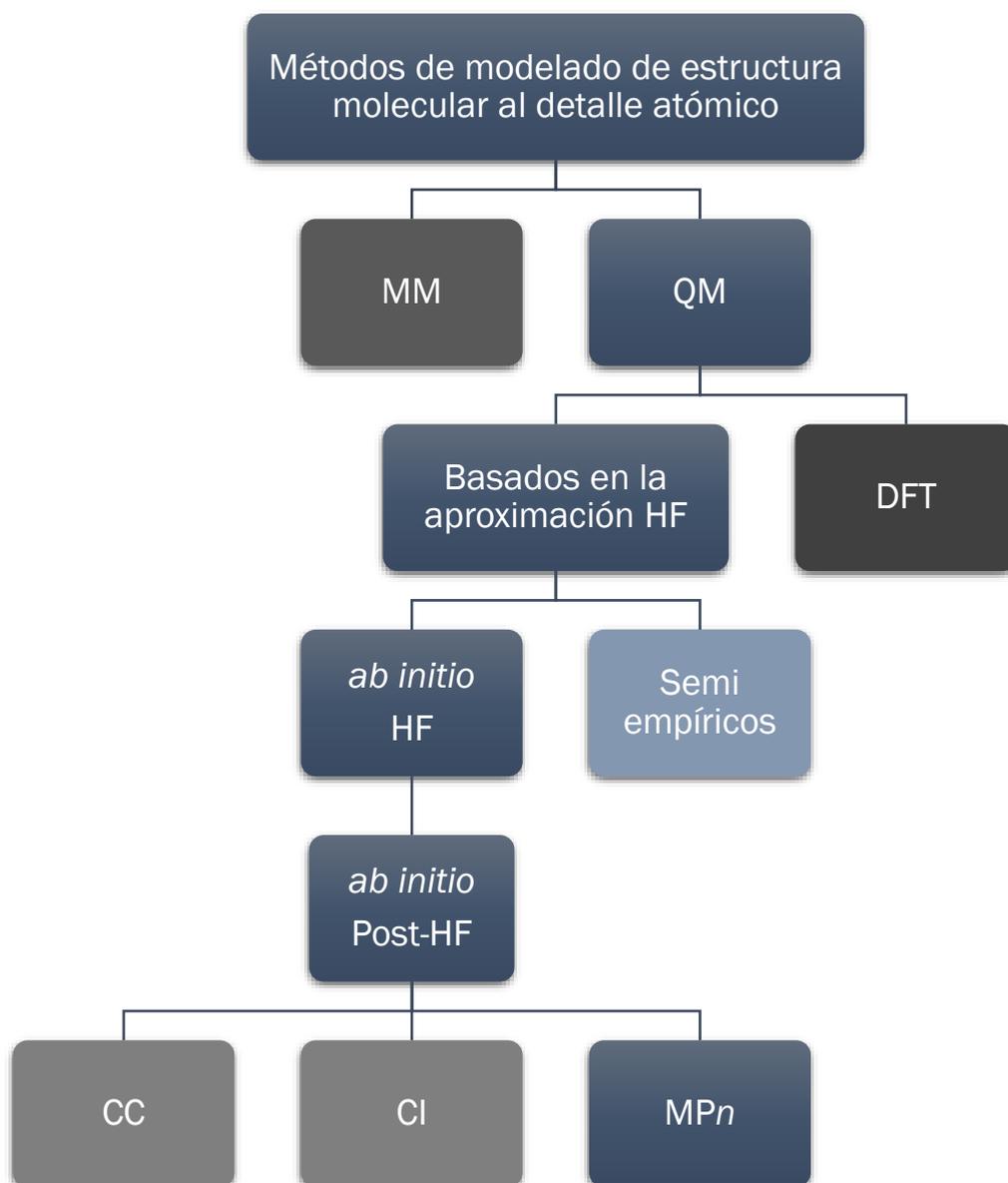
2.1. Generalidades

Los estudios llevados a cabo en el desarrollo de esta tesis constan de dos componentes, una de modelado computacional, que comprende la mayor parte de los estudios realizados, y otra de experimentación empírica, que complementa y/o valida los resultados obtenidos a partir del modelado. En este capítulo se describirán los fundamentos de los métodos –tanto computacionales como experimentales– más importantes empleados para realizar los estudios llevados a cabo en este trabajo de Tesis.

2.2. Métodos teórico-computacionales para el modelado de la estructura molecular

La química teórica y computacional es la rama de la química que desarrolla y usa teorías, conceptos (*e.g.* enlace químico, reacción química, orbitales moleculares, superficie de energía potencial) y modelos físico-matemáticos (*e.g.* modelos continuos que representan el entorno molecular) para describir la estructura de los sistemas moleculares en conexión con el resto de sus propiedades. Dependiendo del problema químico a resolver, su contexto, y el grado de detalle necesario para la descripción de la organización de la materia (molecular, atómico, electrónico) se han desarrollado distintas teorías y modelos, junto con métodos para su aplicación e interpretación de los resultados, con distintos grados de aproximación, con mayor o menor sofisticación y exactitud.

En forma aplicada, la química computacional permite el modelado y la simulación de sistemas moleculares, aplicando los modelos y métodos de la química teórica, valiéndose del uso de computadoras como laboratorio, para resolver los problemas químicos. Los resultados obtenidos aplicando la química teórica y computacional no sólo complementan aquellos provenientes de la actividad experimental, ayudando a explicarlos, sino que también permiten predecir fenómenos químicos complejos, aún no observados que llevan a diseñar nuevos experimentos empíricos para responder a nuevas preguntas que surgen de los modelos. En el **Esquema 2.1** se muestran los principales métodos de modelado de estructura molecular al detalle atómico, incluyendo los usados para los cálculos realizados en este trabajo de tesis.



Esquema 2.1. Principales métodos para el modelado de estructura molecular al detalle atómico. MM: Mecánica molecular. QM: Mecánica cuántica. HF: Hartree-Fock. DFT: Teoría del funcional de la densidad. CC: Coupled-cluster. CI: Interacción de configuraciones. MP: Møller-Plesset.

En los siguientes apartados, se explicarán las bases de los métodos computacionales usados para los cálculos llevados a cabo en este trabajo de tesis.

2.2.1. Métodos clásicos para modelar estructura molecular al detalle atómico

Los métodos clásicos, también llamados de mecánica molecular (MM) [240] se basan en la mecánica clásica para modelar los sistemas moleculares. En el caso de la mecánica molecular atomística, los átomos de la molécula son representados por partículas esféricas con radio –usualmente el radio de van der Waals–, carga (derivadas de cálculos cuánticos, ver más adelante) y polarizabilidad asignados por

tipo de átomo (átomo de un elemento químico determinado más información de su entorno químico) y los enlaces por resortes con distancias de equilibrio iguales a la longitud del enlace –determinada experimentalmente o calculada– en cuestión. La energía potencial, E , de la molécula puede describirse como:

$$E = E_{\text{cov}} + E_{\text{nc}} \quad (2.1)$$

donde E_{cov} y E_{nc} representan en forma global a términos covalentes y no covalentes, respectivamente.

Los *términos covalentes* se describen como una suma de términos de tensión o *stretching* de enlaces, E_{str} , flexión o *bending* de ángulos de enlace, E_{bnd} , y torsión de ángulos diedros o rotación de enlaces o grupos, E_{trs} :

$$E_{\text{cov}} = \sum_{\text{enlaces}} E_{\text{str}} + \sum_{\text{ángulos}} E_{\text{bnd}} + \sum_{\text{diedros}} E_{\text{trs}} \quad (2.2)$$

Los términos de *stretching* y *bending* se pueden describir como potenciales armónicos o emplear formas más complejas que incorporan términos de mayor orden para considerar efectos anarmónicos; en todos los tratamientos clásicos usados en los estudios que forman parte de esta tesis se emplearon métodos que recurren a tratamientos armónicos de la energía potencial molecular del estilo de las expresiones que se detallan a continuación:

$$E_{\text{str}} = k_{\text{str}}(x - x_0)^2 \quad (2.3)$$

$$E_{\text{bnd}} = k_{\text{bnd}}(\theta - \theta_0)^2 \quad (2.4)$$

donde k_{str} y k_{bnd} son respectivamente constantes de fuerza de *stretching* y *bending*, x y θ son respectivamente los valores de distancias y ángulos de enlace determinados por las posiciones de los pares/ternas de átomos involucrados en cada tipo de interacción entre átomos químicamente enlazados, y x_0 y θ_0 son parámetros que corresponden respectivamente a los valores de equilibrio de esas distancias y ángulos de enlace.

Los términos torsionales pueden ser descritos como una serie de Fourier:

$$E_{\text{trs}} = \sum_{n=1} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \quad (2.5)$$

donde n (la multiplicidad o número de mínimos de energía potencial en una rotación de 360°) y V_n (altura de la barrera de rotación) son parámetros característicos de cada torsión, definida por cuatro átomos enlazados, ω es el ángulo diedro en cuestión, y γ es el desplazamiento de fase. Adicionalmente, para mantener la planaridad de ciertos grupos (es decir $\omega = 0$ o 180°) se pueden incluir términos de *bending* fuera del plano, E_{oop} , aplicando un portencial V :

$$E_{\text{oop}} = V(1 - \cos 2\omega) \quad (2.6)$$

Los términos no covalentes describen en general interacciones repulsivas y de *van der Waals*, E_{ij}^{vdW} e interacciones electrostáticas, E_{ij}^{el} :

$$E_{\text{nc}} = \sum_j^{n-1} \sum_{i=j+1}^n f_{ij} (E_{ij}^{\text{vdW}} + E_{ij}^{\text{el}}) \quad (2.7)$$

Los términos repulsivos y de van der Waals suelen describirse como *potenciales de Lennard-Jones*:

$$E_{ij}^{\text{vdW}} = \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{0ij}}{R_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{0ij}}{R_{ij}} \right)^6 \right] \quad (2.8)$$

donde R_{ij} es la distancia entre cada par de átomos i y j , R_{0ij} es el valor de equilibrio para la misma y ϵ_{ij} es la profundidad del pozo de energía potencial. Los términos electrostáticos se describen como *potenciales de Coulomb*:

$$E_{ij}^{\text{el}} = \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 R_{ij}} \quad (2.9)$$

Donde adicionalmente, q_i y q_j son las cargas de cada par de átomos i y j , respectivamente y ϵ_0 es la permitividad o constante dieléctrica en el vacío.

Al conjunto de la forma funcional y los parámetros usados para calcular la energía potencial se lo denomina *campo de fuerza*, determinado por la *expresión analítica*

que vincula a la energía potencial E con las posiciones atómicas (R, θ, ω) o (x, y, z) a través de expresiones como las apenas introducidas u otras similares, los *tipos de átomos* considerados en el mismo y los valores de los *parámetros* introducidos, determinados a partir de datos empíricos o de cálculos de alto nivel de exactitud o de su combinación. Algunos campos de fuerza incluyen *términos específicos para describir enlaces de hidrógeno* dentro de las contribuciones no electrostáticas, en tanto otros los incluyen dentro de las contribuciones covalentes.

Los métodos clásicos son mucho menos costosos en términos de recursos de cálculo que los métodos cuánticos de los que se hablará a continuación, y permiten modelar la estructura y energía relativa de sistemas con varios miles de átomos, como, por ejemplo, las proteínas y su entorno. Sin embargo, como los electrones son descritos implícitamente en ellos, los métodos clásicos no pueden ser utilizados, en general, para el modelado de reacciones químicas, ya que éstas involucran cambios en la estructura electrónica de los sistemas moleculares. Sin embargo, existen campos de fuerza tales como el *ReaxFF* [241] y o el EVB (del inglés *Empirical Valence Bond*) [242] cuyos parámetros se ajustan según la variación de una coordenada de reacción y permiten estudiar reacciones químicas. Para proteínas se han desarrollado varios campos de fuerza, entre ellos los campos de fuerza AMBER [243] y CHARMM [244]. Asimismo, existen campos de fuerza generalizados, como el campo de fuerza *gaff* [245], para moléculas compuestas por C, N, O, H, S, P, F, Cl, Br e I, y el campo de fuerza UFF [246], disponible para todos los elementos. Para los cálculos MM llevados a cabo en este trabajo de tesis se usó el campo de fuerza AMBER en su versión *ff99SB* [247], que incluye parámetros para los 20 residuos proteicos estándar en diferentes estados de protonación, complementado con el campo de fuerza *gaff* que incluye parámetros para grupos presentes en residuos no estándar (*e.g.* el grupo ácido sulfénico, $-\text{SOH}$) y moléculas pequeñas como el H_2O_2 .

2.2.2. Métodos cuánticos

2.2.2.1. Generalidades: La ecuación de Schrödinger y su resolución

Para modelar reactividad y reacciones químicas como las abordadas en este trabajo de tesis, es necesario describir el comportamiento de los electrones en las moléculas de forma explícita, por lo que es necesario recurrir a métodos basados en la *mecánica cuántica* (QM), centrándose en la *ecuación de Schrödinger independiente del tiempo* que tiene la siguiente expresión general para sistemas en estado estacionario:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (2.10)$$

donde \hat{H} es el operador hamiltoniano (los acentos circunflejos denotan operadores) asociado a la energía total del sistema, E es la energía total del sistema y Ψ es la función de onda del sistema.

El operador hamiltoniano para un sistema molecular puede separarse en operadores de energía cinética nuclear \hat{T}_n , energía cinética electrónica, \hat{T}_e , energía potencial de repulsión nuclear \hat{V}_{nn} , energía potencial de atracción entre núcleos y electrones, \hat{V}_{ne} , y energía potencial de repulsión electrónica \hat{V}_{ee} .

$$\hat{H} = \hat{T}_n + \hat{T}_e + \hat{V}_{nn} + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{ee} \quad (2.11)$$

La ecuación de Schrödinger para un sistema molecular en estado estacionario no puede ser resuelta analíticamente, ya que se trata de un problema de interacciones de muchos cuerpos, por lo que es necesario introducir aproximaciones para resolverla, como la aproximación de Born-Oppenheimer, que se tratará en el siguiente apartado.

2.2.2.2. La aproximación de Born-Oppenheimer

En principio, la función de onda molecular Ψ depende de las posiciones de los núcleos, \mathbf{R} , y de las posiciones de los electrones, \mathbf{r} , pero como los primeros tienen una masa mucho mayor que los segundos, se puede considerar que el movimiento de los núcleos se da en una escala temporal mucho más lenta que el movimiento de los electrones, por lo que Ψ puede separarse en una función de onda nuclear, ψ_n , que depende solo de \mathbf{R} y una función de onda electrónica, ψ_e que depende de \mathbf{R} y \mathbf{r} :

$$\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \psi_e(\mathbf{r}, \mathbf{R})\psi_n(\mathbf{R}) \quad (2.12)$$

entonces, la ecuación de Schrödinger puede separarse en una *ecuación de Schrödinger nuclear*, que solo depende explícitamente del movimiento de los núcleos (los electrones se acomodan instantáneamente al movimiento nuclear, contribuyendo a la energía potencial nuclear) y pasa a tener solución exacta:

$$\hat{H}\psi_n(\mathbf{R}) = E\psi_n(\mathbf{R}) \quad (2.13)$$

y en una *ecuación de Schrödinger electrónica*, que no depende del movimiento nuclear más que en forma paramétrica (se resuelve a posiciones nucleares congeladas, convirtiendo a \hat{V}_{nn} en una constante, V_{nn}) y a la energía electrónica en una función de \mathbf{R} (lo que permite definir el concepto de superficie de energía potencial molecular):

$$\hat{H}_e \psi_e(\mathbf{R}, \mathbf{r}) = E_e(\mathbf{R}) \psi_e(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \quad (2.14)$$

$$\hat{H}_e = \hat{T}_e + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{ee} + V_{nn} \quad (2.15)$$

Esta aproximación se conoce como *aproximación de Born-Oppenheimer* [248] y resuelve el problema del acoplamiento entre el movimiento de los núcleos y el movimiento de los electrones. Resta aún resolver la ecuación de Schrödinger electrónica, que no tiene solución exacta debido al problema del acoplamiento del movimiento de los electrones. Para abordar este problema se puede recurrir a aproximaciones adicionales como la aproximación de Hartree-Fock (HF), o recurrir a teorías no basadas en HF como la teoría del funcional de la densidad (DFT, del inglés *density functional theory*). Las bases de estas metodologías se tratarán en los siguientes tres apartados.

2.2.2.3. Teoría de Hartree-Fock, método del campo autoconsistente y error de correlación electrónica

La ecuación de Schrödinger electrónica sigue sin tener solución exacta, por lo que debe introducirse otra aproximación para resolverla. Una posibilidad es aplicar la aproximación de Hartree-Fock (HF) [249], en la cual se considera que cada electrón se mueve en un campo eléctrico promedio generado por los núcleos en una configuración nuclear \mathbf{R} y por los demás electrones en posiciones representativas, lo que lleva a simplificar \hat{H}_e sustituyendo el operador de repulsión electrónica instantánea \hat{V}_{ee} por un término de repulsión electrónica promedio de HF, que es una suma de términos monoeléctricos y permite escribir \hat{H}_e como una suma de n hamiltonianos monoeléctricos, donde n es el número de electrones del sistema, y separar la ecuación de Schrödinger electrónica en ecuaciones de Schrödinger monoeléctricas, cuya solución da energías orbitales, ε_i , y funciones de onda monoeléctricas $\phi_i(\mathbf{r}_i)$, denominadas *orbitales moleculares* (nota: por simplicidad se omite la dependencia paramétrica con \mathbf{R}).

Entonces, la función de onda polielectrónica de HF, Ψ_{HF} , puede escribirse a partir de funciones de onda monoeléctricas $s_i\phi_i(\mathbf{r}_i)$ (spin-orbitales moleculares), que son el producto de una función de spin s_i (que para un electrón pueden representar dos estados, α o β , los cuales asociados a valores del número cuántico de spin azimutal de $+1/2$ y $-1/2$, respectivamente) por una función de onda espacial ϕ_i (llamadas orbitales moleculares). Para que se cumpla el principio de exclusión de Pauli, la función de onda polielectrónica puede escribirse como un determinante de Slater, que es una combinación lineal antisimétrica y normalizada de productos de spin-orbitales moleculares:

$$\Psi_{\text{HF}} = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} s_1\phi_1(\mathbf{r}_1) & s_2\phi_2(\mathbf{r}_1) & \cdots & s_n\phi_n(\mathbf{r}_1) \\ s_1\phi_1(\mathbf{r}_2) & s_2\phi_2(\mathbf{r}_2) & \cdots & s_n\phi_n(\mathbf{r}_2) \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ s_1\phi_1(\mathbf{r}_n) & s_1\phi_2(\mathbf{r}_n) & \cdots & s_n\phi_n(\mathbf{r}_n) \end{vmatrix} = \hat{A} \prod_{i=1}^n s_i\phi_i(\mathbf{r}_i) \quad (2.16)$$

donde \hat{A} es el operador de antisimetría para un sistema de n electrones.

La energía electrónica total (o energía HF) puede calcularse a partir de un conjunto de n ecuaciones de Schrödinger monoeléctricas o ecuaciones de Hartree-Fock:

$$\hat{F}_i\phi_i(\mathbf{r}_i) = \varepsilon_i\phi_i(\mathbf{r}_i) \quad (2.17)$$

siendo \hat{F}_i los *operadores de Fock*:

$$\hat{F}_i = \hat{h}_i + \sum_j^n (\hat{J}_{ij} - \hat{K}_{ij}) \quad (2.18)$$

donde \hat{h}_i es el hamiltoniano del electrón i en ausencia de los otros electrones (energía cinética del electrón más energía potencial de atracción de m núcleos del sistema molecular con carga $+Z_\mu$):

$$\hat{h}_i = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{\mu=1}^m \frac{Z_\mu}{r_{\mu i}} \quad (2.19)$$

$$\nabla_i^2 = \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2}$$

\hat{J}_{ij} es el *operador de Coulomb* para la interacción entre los electrones i y j :

$$\hat{J}_{ij}\phi_i(\mathbf{r}_1) = \left\langle \phi_j(\mathbf{r}_2) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \phi_j(\mathbf{r}_2) \right\rangle \phi_i(\mathbf{r}_1) \quad (2.20)$$

\hat{K}_{ij} es el *operador de intercambio* –que resulta de intercambiar posiciones entre los electrones i y j –:

$$\hat{K}_{ij}\phi_i(\mathbf{r}_1) = \left\langle \phi_j(\mathbf{r}_2) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \phi_i(\mathbf{r}_2) \right\rangle \phi_j(\mathbf{r}_1) \quad (2.21)$$

entonces, la energía orbital, ε_i , se calcula como:

$$\varepsilon_i = \sum_{i=1}^n h_i + \sum_{j=1}^n (J_{ij} - K_{ij}) \quad (2.22)$$

donde h_i representa las integrales monoeléctricas que reúnen la energía cinética del electrón y la energía potencial de atracción nuclear para cada electrón i con los m núcleos en la configuración nuclear \mathbf{R} :

$$h_i = \langle \phi_i | \hat{h}_i | \phi_i \rangle \quad (2.23)$$

J_{ij} representa las integrales bielectrónicas de Coulomb:

$$J_{ij} = \left\langle \phi_i(\mathbf{r}_1)\phi_j(\mathbf{r}_1) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \phi_i(\mathbf{r}_1)\phi_j(\mathbf{r}_1) \right\rangle \quad (2.24)$$

y K_{ij} representa las integrales bielectrónicas de intercambio:

$$K_{ij} = \left\langle \phi_i(\mathbf{r}_1)\phi_j(\mathbf{r}_2) \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \phi_i(\mathbf{r}_2)\phi_j(\mathbf{r}_1) \right\rangle \quad (2.25)$$

entonces, la energía HF se calcula como:

$$E_{\text{HF}} = \langle \Psi_{\text{HF}} | \hat{H} | \Psi_{\text{HF}} \rangle = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (J_{ij} - K_{ij}) + V_{nn} \quad (2.26)$$

En el método HF, que emplea el principio variacional (el cual sostiene que cualquier función de onda aproximada usada para describir un estado del sistema tendrá una energía mayor o igual que la energía de la función de onda exacta) se parte de una función de onda aproximada, $\Psi^{(0)}$, denominada *initial guess*:

$$\Psi^{(0)} = \hat{A} \prod_{i=1}^n s_i \phi_i^{(0)} \quad (2.27)$$

donde $\phi_i^{(0)}$ son las funciones de onda monoeléctricas (orbitales moleculares) de partida. Entonces se resuelven las ecuaciones HF, obteniendo versiones mejoradas de los orbitales moleculares de partida en forma iterativa, $\phi_i^{(1)}$, y se obtiene una función de onda polieletrónica mejorada, $\Psi^{(1)}$. El proceso se repite k ciclos hasta que se obtiene una función de onda $\Psi^{(k)}$ que describe un estado cuya energía difiere en menos de un umbral preestablecido (límite de convergencia) respecto al valor de energía asociado a la función $\Psi^{(k-1)}$. Esto se conoce como *método del campo autoconsistente* (SCF) [248].

Uno de los principales defectos del método de HF es que no tiene en cuenta las interacciones instantáneas entre los electrones (aunque sí lo hace de forma promediada), fenómeno denominado *correlación electrónica* y genera que todas las estimaciones obtenidas usando HF estén por encima del valor exacto de la energía del sistema, por lo que para corregir este error, es decir, recuperar la *energía de correlación electrónica*, se han desarrollado varios métodos, algunos basados en HF, conocidos como métodos post-HF, como por ejemplo los de interacción de configuraciones, los basados en la teoría *coupled-cluster*, y los basados en la teoría perturbacional de muchos cuerpos, y en particular dentro de ella, los métodos de Møller-Plesset (MP) [250]. Estos métodos recuperan parcial o totalmente la energía de correlación electrónica, con distinto costo computacional asociado. Al conjunto del método HF y los métodos post-HF se los denomina *métodos ab initio*. Otra clase de métodos que tienen en cuenta parcialmente la correlación electrónica son los basados en DFT [251], teoría que no se basa en HF para resolver la ecuación de Schrödinger electrónica de un sistema molecular. De estos métodos se hablará más adelante dado que se han usado en el trabajo desarrollado en esta tesis.

Adicionalmente más aproximaciones pueden realizarse a partir de la base teórica del método HF o SCF, dando lugar a distintos tipos de *métodos semiempíricos* [248],

que incluyen parámetros y de los que no se tratará aquí en mayor profundidad por no haber sido empleados en los estudios abordados aquí.

2.2.2.4. La aproximación LCAO y conjuntos de base

Los orbitales moleculares, ϕ_i , pueden construirse como combinaciones lineales de orbitales atómicos (LCAO, del inglés *linear combination of atomic orbitals*), χ_j [249]:

$$\phi_i = \sum_j c_j \chi_j \quad (2.28)$$

donde c_j son coeficientes de peso de los orbitales atómicos. Al conjunto de funciones matemáticas (también conocidas como *funciones de base*) usadas para construir los orbitales atómicos χ_j se le denomina *conjunto de base* [249]. El conjunto de base define la calidad de los cálculos basados en HF, y a mayor cantidad de funciones de base (*i.e.* tamaño del conjunto de base) usadas, el valor de energía calculado será más cercano al valor de *energía límite de HF* (que vendría a ser el valor de energía que se obtendría usando un conjunto de base infinito), y menor el *error de truncamiento del conjunto de base* (error introducido al usar un conjunto de base finito). Otra variable a tener en cuenta es el tipo de funciones de base utilizado.

La parte radial $R(r)$ de estos *orbitales atómicos* pueden ser representada por *orbitales tipo Slater* (STOs, del inglés *Slater-type orbitals*) [252], que son funciones matemáticas centradas en átomos que constituyen una buena aproximación a las funciones de onda atómicas exactas, cuya parte radial, $R(r)$ decae en forma exponencial con la distancia del electrón al núcleo, r :

$$R(r) \propto e^{-\zeta r} \quad (2.29)$$

donde ζ es una constante. Sin embargo, resolver algunas integrales bielectrónicas sobre cuatro centros empleando STOs se vuelve muy complicado y costoso en términos de recursos de cálculo. Una solución alternativa consiste en usar *orbitales tipo Gauss* (GTO, del inglés *Gauss-type orbitals*) [253], cuya parte radial decae en forma exponencial con el cuadrado de la distancia del electrón al núcleo:

$$R(r) \propto e^{-\zeta r^2} \quad (2.30)$$

Los GTOs permiten evaluar rápidamente las integrales bielectrónicas sobre funciones centradas sobre diferentes átomos, debido a que el producto de dos GTOs centrados en átomos diferentes es otro GTO centrado en un punto intermedio. Sin embargo, los GTOs no describen bien el comportamiento del electrón cuando está muy cerca del núcleo, ya que se pierde la característica del orbital atómico físico (*i.e.* la función de onda del movimiento del electrón en un átomo hidrogenoide) de tener derivada primera en el origen que tiende a infinito (los GTOs tienen derivada cero en el origen), o cuando está muy lejos, donde la función tipo Gauss decae mucho más rápidamente respecto a una función exponencial. Una solución es usar combinaciones lineales de GTOs –gaussianas primitivas– para aproximar un STO, dando lugar a una función gaussiana contraída (cGTO). Una solución es usar combinaciones lineales de GTOs para aproximar mejor cada STO a lo largo de un intervalo extenso de distancias al núcleo, usando GTOs con distintos exponentes ζ que permitan cubrir adecuadamente el comportamiento del electrón en el orbital atómico físico, dando lugar a un *orbital contraído tipo Gauss* (cGTO, del inglés *contracted Gauss-type orbital*).

Dentro de los conjuntos de base tipo cGTO, se distinguen varias categorías: a) conjuntos de base mínimos, en los que cada orbital atómico es descrito por un cGTO [254]; b) conjuntos de base extendidos (*e.g.* doble zeta, triple zeta) que los orbitales son descritos por más de un cGTO con distintos exponentes; y c) conjuntos de base *split-valence*, en los que se usa un solo cGTO para los orbitales internos y más de uno para los orbitales de valencia [255]. Asimismo, para mejorar la descripción de los orbitales atómicos, pueden agregarse *funciones de polarización*, es decir funciones de onda con número cuántico de momento angular mayor que el del orbital atómico en el estado fundamental del átomo cuya deformación en la molécula se busca describir mejor. En el caso de especies con electrones que están muy alejados del núcleo, como por ejemplo aniones o estados excitados, suele agregarse *funciones difusas*, que son GTOs con parte angular esférica cuyo exponente ζ es muy pequeño, para describir mejor la distribución y el movimiento de esos electrones. Los cálculos cuánticos realizados en este trabajo de tesis emplearon conjuntos de base *split-valence* de Pople 6-31+G(d) [255] y 6-311++G(3df,p) [256].

2.2.2.5. Teoría perturbacional de Møller-Plesset

En la teoría perturbacional de muchos cuerpos [257], al hamiltoniano de HF, \hat{H}_0 , se le agrega una perturbación externa pequeña, \hat{V} , que se dirige a reintroducir parte de

los efectos de correlación electrónica que son dejados de lado en HF, ponderada por un parámetro, λ . Entonces la ecuación de Schrödinger queda como:

$$(\hat{H}_0 + \lambda\hat{V})\Psi = E\Psi \quad (2.31)$$

Si la perturbación es fiable, la función de onda y la energía perturbadas en la ecuación de Schrödinger puede reescribirse en series de potencias de λ :

$$(\hat{H}_0 + \lambda\hat{V})\left(\sum_{i=0}^n \lambda^i \Psi^{(i)}\right) = \left(\sum_{i=0}^n \lambda^i E^{(i)}\right)\left(\sum_{i=0}^n \lambda^i \Psi^{(i)}\right) \quad (2.32)$$

Después de reorganizar términos, los términos de acuerdo a la potencia que aparece elevado el parámetro λ se obtienen las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} \lambda^0 : \hat{H}_0 \Psi^{(0)} &= E^{(0)} \Psi^{(0)} \\ \lambda^1 : \hat{H}_0 \Psi^{(1)} + \hat{V} \Psi^{(0)} &= E^{(0)} \Psi^{(1)} + E^{(1)} \Psi^{(0)} \\ \lambda^2 : \hat{H}_0 \Psi^{(2)} + \hat{V} \Psi^{(1)} &= E^{(0)} \Psi^{(2)} + E^{(1)} \Psi^{(1)} + E^{(2)} \Psi^{(0)} \\ \lambda^n : \hat{H}_0 \Psi^{(n)} + \hat{V} \Psi^{(n-1)} &= \sum_{i=0}^n E^{(i)} \Psi^{(n-i)} \end{aligned} \quad (2.33)$$

Un caso particular de la teoría perturbacional es la teoría de Moller-Plesset (MP) [250] se define \hat{H}_0 como la suma de los operadores de Fock, \hat{F}_i :

$$\hat{H}_0 = \sum_{i=1}^n \hat{F}_i \quad (2.34)$$

y la perturbación \hat{V} como \hat{V}_{ee} menos dos veces su valor esperado, $\langle \hat{V}_{ee} \rangle$:

$$\hat{V} = \hat{V}_{ee} - 2\langle \hat{V}_{ee} \rangle = \hat{V}_{ee} - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (J_{ij} - K_{ij}) \quad (2.35)$$

entonces, multiplicando las ecuaciones por $\Psi^{(0)}$ e integrando en el espacio:

$$E^{(0)} = \langle \Psi^{(0)} | \hat{H}_0 | \Psi^{(0)} \rangle = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i \quad (2.36)$$

$$E^{(1)} = \langle \Psi^{(0)} | \hat{V} | \Psi^{(0)} \rangle = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (J_{ij} - K_{ij})$$

por lo que:

$$E_{\text{HF}} = E^{(0)} + E^{(1)} \quad (2.37)$$

y la energía de correlación de orden n queda como la suma de las energías de órdenes iguales o mayores a 2:

$$E_{\text{corr}} = \sum_{i=2}^n E^{(i)} \quad (2.38)$$

El primer término de esta serie proporciona la energía MP2, el segundo la energía MP3 y así sucesivamente. La energía MP2 sería:

$$E^{(2)} = \langle \Psi^{(0)} | \hat{V} | \Psi^{(1)} \rangle \quad (2.39)$$

$\Psi^{(1)}$ se puede construir como una combinación lineal de funciones propias de \hat{H}_0 :

$$\Psi^{(1)} = \sum_{i>0} c_i \Psi_i^{(0)} \quad (2.40)$$

entonces:

$$E^{(2)} = \sum_{i>0} c_i \langle \Psi^{(0)} | \hat{V} | \Psi_i^{(0)} \rangle = \sum_{i>0} \frac{\langle \Psi^{(0)} | \hat{V} | \Psi_i^{(0)} \rangle \langle \Psi_i^{(0)} | \hat{V} | \Psi^{(0)} \rangle}{E_0 - E_i} \quad (2.41)$$

La energía se puede escribir basándose en determinantes de Slater doblemente excitados (debido al teorema de Brillouin [258]), Ψ_{ij}^{ab} , con energías E_{ij}^{ab} :

$$E^{(2)} = \sum_{i < j}^{occ} \sum_{a < b}^{vir} \frac{\langle \Psi^{(0)} | \hat{V} | \Psi_{ij}^{ab} \rangle \langle \Psi_{ij}^{ab} | \hat{V} | \Psi^{(0)} \rangle}{E_0 - E_{ij}^{ab}} \quad (2.42)$$

La energía puede expresarse en base a orbitales moleculares y sus energías, por lo que la energía MP2 queda:

$$E^{(2)} = \sum_{i < j}^{occ} \sum_{a < b}^{vir} \frac{(\langle \phi_i \phi_j | \phi_a \phi_b \rangle - \langle \phi_i \phi_a | \phi_j \phi_b \rangle)^2}{\varepsilon_i + \varepsilon_j - \varepsilon_a - \varepsilon_b} \quad (2.43)$$

La corrección MP2 recupera entre el 80 y el 90 % de la energía de correlación electrónica dinámica [251], y es el método post-HF menos costoso, si bien presenta la característica desfavorable de no ser variacional y que la convergencia de la energía es lenta a lo largo de la serie de perturbaciones. Si bien los métodos DFT que se introducen en el siguiente apartado son en general una opción más eficiente para el cálculo de estructuras y propiedades en sistemas moleculares de grandes dimensiones, el método MP2 sigue siendo una alternativa muy útil para describir correctamente problemas donde las fuerzas de dispersión tienen un papel importante en las interacciones que no se logra describir adecuadamente a otros niveles de cálculo. En parte de los estudios de llevados a cabo en esta tesis se emplea para obtener una mejor descripción energética que la obtenida usando métodos basados en DFT.

2.2.2.6. Teoría del funcional de la densidad

A diferencia de la *teoría de Hartree-Fock* que se basa resolver la Ecuación de Schrödinger realizando aproximaciones en el hamiltoniano molecular para lograr obtener la función de onda Ψ (que carece de significado físico directo), la *teoría del funcional de la densidad* (DFT, del inglés *density functional theory*) [249] se basa en resolver la Ecuación de Schrödinger en forma exacta, trabajando con la *densidad electrónica*, ρ , que es una medida de la probabilidad de encontrar electrones en un punto del espacio. A diferencia de la función de onda, que no tiene significado físico directo, *la densidad electrónica es un observable físico*.

El *primer teorema de Hohenberg y Kohn* [259] sostiene que todas las propiedades de una molécula en su estado electrónico basal son determinadas por densidad

electrónica del estado basal, $\rho_0(\mathbf{r})$, que es función de las coordenadas espaciales, \mathbf{r} . Esto significa que la energía, E_0 , es un funcional de la densidad electrónica:

$$E_0 = F[\rho_0(\mathbf{r})] = E_0[\rho_0(\mathbf{r})] \quad (2.44)$$

El *segundo teorema de Hohenberg y Kohn* [259] sostiene que, análogamente al principio variacional, cualquier densidad electrónica aproximada, ρ , dará lugar a una energía, E , mayor o igual que la energía del estado basal:

$$E[\rho] \geq E_0[\rho_0] \quad (2.45)$$

La densidad electrónica aproximada debe satisfacer las siguientes condiciones:

$$\begin{aligned} \rho(\mathbf{r}) &\geq 0 \\ \int \rho(\mathbf{r})d\mathbf{r} &= n \end{aligned} \quad (2.46)$$

siendo n el número de electrones del sistema molecular.

El problema que presenta la teoría DFT es que no se conoce el funcional de la densidad exacto que relaciona la energía con la densidad electrónica. Entonces se introduce el *modelo de Kohn-Sham* (KS) [260]. En primer lugar, se separa la energía en una parte que se puede calcular sin usar DFT, y en otra que requiere el funcional “desconocido”. La energía puede describirse como:

$$E_0[\rho_0] = T_e[\rho_0] + V_{ne}[\rho_0] + V_{ee}[\rho_0] \quad (2.47)$$

donde T_e es la energía cinética de los electrones, V_{ne} es el potencial de atracción entre núcleos y electrones y V_{ee} es el potencial de repulsión entre electrones. Aplicando la aproximación de Born-Oppenheimer (ver **Apartado 2.2.2.2**), el término V_{ne} puede describirse como un potencial electrostático clásico:

$$V_{ne}[\rho_0] = \int \rho_0(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} \quad (2.48)$$

Para usar los otros dos términos, se introduce como referencia un sistema ficticio de electrones que no interactúan, que da lugar a la misma densidad electrónica que el sistema real. Entonces se definen los términos delta, ΔT_e y ΔV_{ee} . ΔT_e se define como

la desviación de la energía cinética del sistema real con respecto a la energía cinética del sistema de referencia, $T_e[\rho_0]_r$:

$$\Delta T_e[\rho_0] = T_e[\rho_0] - T_e[\rho_0]_r \quad (2.49)$$

ΔV_{ee} se define como la desviación del potencial de repulsión electrónica del sistema real con respecto a un potencial clásico de repulsión de una nube cargada, $J[\rho_0]$:

$$\begin{aligned} \Delta V_{ee}[\rho_0] &= V_{ee}[\rho_0] - J[\rho_0] \\ J[\rho_0] &= \frac{1}{2} \iint \frac{\rho_0(\mathbf{r}_1)\rho_0(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \end{aligned} \quad (2.50)$$

La energía cinética de los electrones del sistema de referencia puede describirse como el valor esperado de la suma de los operadores de energía cinética monoeléctricos ∇_i^2 respecto a la función de onda polieletrónica del sistema referencia, ψ_r :

$$T_e[\rho_0]_r = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{2n} \langle \psi_r | \nabla_i^2 | \psi_r \rangle \quad (2.51)$$

La función ψ_r se construye como un determinante de Slater (ver **Ecuación 2.16**) de funciones de onda auxiliares, denominadas *orbitales de KS*, ϕ_i^{KS} .

Los dos términos delta pueden combinarse, dando lugar a la *energía de correlación-intercambio* (XC, del inglés *exchange-correlation*), E_{XC} , que es un funcional de la densidad electrónica:

$$E_{XC}[\rho_0] = \Delta T_e[\rho_0] + \Delta V_{ee}[\rho_0] \quad (2.52)$$

Entonces, la energía del sistema puede describirse como:

$$E_0[\rho_0] = V_{ne}[\rho_0] + J[\rho_0] + T_e[\rho_0]_r + E_{XC}[\rho_0] \quad (2.53)$$

Siendo E_{XC} el único término que se desconoce.

Análogamente a las ecuaciones de Hartree-Fock, para buscar los orbitales que minimicen la energía, se puede recurrir a las *ecuaciones de KS* siendo ε_i las energías de los orbitales de KS, ϕ_i^{KS} :

$$\hat{h}_i^{\text{KS}} \phi_i^{\text{KS}} = \varepsilon_i \phi_i^{\text{KS}}$$

$$\hat{h}_i^{\text{KS}} = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{k=1}^m \frac{Z_k}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_k|} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' + v_{\text{XC}} \quad (2.54)$$

$$\nabla_i^2 = \frac{\partial^2}{\partial x_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_i^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_i^2}$$

v_{XC} es el potencial de correlación-intercambio, que se calcula como derivada del funcional de E_{XC} respecto a la densidad electrónica:

$$v_{\text{XC}} = \frac{\delta E_{\text{XC}}}{\delta \rho} \quad (2.55)$$

Dado que las ecuaciones de KS dependen de E_{XC} , y que E_{XC} se desconoce, para resolverlas resulta necesario introducir aproximaciones. E_{XC} puede descomponerse en dos funcionales, uno de intercambio, E_{X} , y otro de correlación, E_{C} :

$$E_{\text{XC}}[\rho] = E_{\text{X}}[\rho] + E_{\text{C}}[\rho] \quad (2.56)$$

La más sencilla de las aproximaciones al funcional exacto de correlación e intercambio es la *aproximación de densidad local* (LDA, del inglés *local-density approximation*) [261] y su variante aproximación de densidad de spin local (LSDA, del inglés *local-spin-density approximation*) [262]. En ellas se considera que, en cada punto del espacio molecular, la densidad de energía –energía por electrón– tiene el mismo valor que para un gas electrónico homogéneo con la misma densidad electrónica. El funcional de intercambio LDA, $E_{\text{X}}^{\text{LDA}}$, tiene la forma:

$$E_{\text{X}}^{\text{LDA}}[\rho] = -\frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi}\right)^{1/3} \int \rho(\mathbf{r})^{4/3} d\mathbf{r} \quad (2.57)$$

y el funcional de intercambio LSDA ($E_{\text{X}}^{\text{LSDA}}$, que introduce la polarización de spin):

$$E_X^{\text{LSDA}}[\rho_\alpha, \rho_\beta] = -\frac{3}{4} \left(\frac{6}{\pi}\right)^{1/3} \int (\rho_\alpha(\mathbf{r})^{4/3} + \rho_\beta(\mathbf{r})^{4/3}) d\mathbf{r} \quad (2.58)$$

donde ρ_α y ρ_β representan densidades electrónicas de spin α y β , respectivamente. En un sistema de capa cerrada, LSDA y LDA son equivalentes. Se han desarrollado varios funcionales LSDA de correlación, siendo uno de ellos el funcional de Vosko-Wilk-Nusair (VWN), E_C^{VWN} , cuya expresión matemática resulta muy complicada [263]. La aproximación LSDA introduce un error en la energía de intercambio mayor que la energía de correlación, por lo que no suele usarse para sistemas moleculares. Entonces resulta necesario introducir una aproximación mejorada, la aproximación de gradiente generalizado (GGA, del inglés *generalized gradient approximation*), en la que además de depender de la densidad electrónica, los funcionales de correlación e intercambio tienen en cuenta su gradiente, $\nabla\rho(\mathbf{r})$, es decir, la derivada primera de la densidad respecto a su posición. Ejemplos son el funcional de intercambio de Becke (B), E_X^{B} [264]:

$$E_X^{\text{B}} = E_X^{\text{LSDA}} + \Delta E_X^{\text{B}}$$

$$\Delta E_X^{\text{B}}[\rho] = -\gamma \int \frac{\rho(\mathbf{r})^{4/3} x^2}{1 + 6\gamma \sinh^{-1} x} d\mathbf{r} \quad (2.59)$$

$$x = \frac{|\nabla\rho(\mathbf{r})|}{\rho(\mathbf{r})^{4/3}}$$

donde γ es un parámetro, y entre los funcionales de correlación por ejemplo el de Lee-Yang-Parr (LYP), E_C^{LYP} , cuya expresión matemática resulta muy complicada [265], y el de Perdew-Wang de 1991 (PW91) [266]. Si bien se mejora la energía de intercambio en dos órdenes de magnitud con respecto a la aproximación LSDA, la teoría HF describe la componente de intercambio en forma exacta, por lo que una opción sería usar el intercambio de HF, pero esto sería correcto sólo si los orbitales KS fueran idénticos a los orbitales HF. Otra opción sería usar parte del intercambio de HF, E_X^{HF} , para describir mejor la energía de intercambio (usando funcionales de intercambio denominados híbridos, siendo un ejemplo muy exitoso el funcional B3 de Becke [267]) y otra parte usando un funcional GGA como por ejemplo el funcional B3LYP [268]:

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a)E_X^{LSDA} + aE_X^{HF} + b\Delta E_X^B + (1 - c)E_C^{VWN} + cE_C^{LYP} \quad (2.60)$$

donde a , b y c son parámetros de ajuste a datos termodinámicos, determinados empleando el funcional PW91 para la parte de correlación (B3PW91). La inclusión del intercambio exacto de HF suele mejorar los resultados, aunque esto depende de la propiedad a modelar. Este tipo de funcionales híbridos, en particular B3LYP, han sido utilizados en los estudios llevados a cabo en este trabajo de tesis (**Capítulos 5, 7 y 8**) dado que son adecuados para la búsqueda de estructuras y cálculos de modos normales de vibración. Una de las deficiencias conocidas es su incapacidad para describir adecuadamente la dispersión en interacciones no covalentes y que subestiman energías de activación de procesos químicos reactivos, aspecto que se complementó con cálculos a nivel MP2.

Finalmente, existen otros tipos de funcionales, como los meta-GGA, ampliación de los funcionales GGA [258], que además de incluir la derivada primera de la densidad electrónica respecto a la posición, incluyen la derivada segunda, y los funcionales doble-híbridos [269], que incluyen parte de la energía de correlación de MP2.

2.2.2.7. Análisis de la densidad electrónica, orbitales moleculares y orbitales de KS

A partir del análisis de la función de onda y/o de la densidad electrónica ρ se pueden obtener descriptores de diversas propiedades moleculares, globales y locales como cargas atómicas, índices de enlace (densidad electrónica entre un par de átomos que forman enlaces covalentes o enlaces de hidrógeno), descriptores de reactividad global (*e.g.* dureza y blandura químicas), descriptores de nucleofilia y electrofilia (global y local), los cuales son de gran utilidad para una caracterización detallada hasta el nivel electrónico de una especie química y las interacciones con su entorno las que pueden modular propiedades como su acidez, reactividad general o específica, e incluso pueden ser útiles para seguir la evolución a lo largo del tiempo o de una coordenada de reacción específica a su transformación química. Este tipo de estudios han sido incluidos en esta tesis en los **Capítulos 5, 7 y 8**.

La densidad electrónica puede calcularse a partir de orbitales moleculares, los cuales pueden construirse a partir de orbitales atómicos:

$$\rho = \sum_{i=1}^n n_i |\phi_i|^2 \quad (2.61)$$

$$|\phi_i|^2 = \sum_{\alpha, \beta} c_{i\alpha} c_{i\beta} \chi_{\alpha} \chi_{\beta}$$

Reordenando queda:

$$\rho = \sum_{\alpha, \beta} \sum_{i=1}^n n_i c_{i\alpha} c_{i\beta} \chi_{\alpha} \chi_{\beta} \quad (2.62)$$

Resulta conveniente definir las matrices de densidad, \mathbf{D} , y de solapamiento, \mathbf{S} :

$$\begin{aligned} \mathbf{S} &= [S_{\alpha\beta}]; S_{\alpha\beta} = \chi_{\alpha} \chi_{\beta} \\ \mathbf{D} &= [D_{\alpha\beta}]; D_{\alpha\beta} = \sum_{i=1}^n n_i c_{i\alpha} c_{i\beta} \end{aligned} \quad (2.63)$$

Para obtener cargas atómicas hace falta realizar lo que se conoce como *análisis poblacional*, en el que se calcula la cantidad de electrones que corresponde a cada átomo integrando la densidad electrónica en el volumen que se asigna a cada átomo según ciertos criterios arbitrarios para definir los límites del espacio atómico dentro de la molécula y la forma de distribuir electrones compartidos en enlaces entre dos o más átomos. Las cargas atómicas surgen de la diferencia entre la carga nuclear del átomo y la cantidad de electrones asignados al mismo.

En el esquema más sencillo, el esquema de Mulliken, la densidad electrónica sobre el átomo A , ρ_A , se calcula como:

$$\rho_A = \sum_{\alpha \in A} \sum_{\beta} D_{\alpha\beta} S_{\alpha\beta} \quad (2.64)$$

y la *carga atómica de Mulliken* se calcula como:

$$q_A = Z_A - \int \rho_A(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (2.65)$$

Las cargas de Mulliken sufren el problema de que son sensibles a variaciones en el nivel de cálculo y en el conjunto de base. Un esquema más complicado, pero que da mejores resultados en términos cuantitativos, deriva del análisis de *naturales de enlace* (NBO del inglés *natural bonding orbital*) desarrollado por Weinhold [270]. Se trata de un procedimiento de varios pasos, que a grandes rasgos consiste en: (1) los orbitales asociados a prácticamente un solo átomo se localizan como orbitales atómicos naturales (NAOs, del inglés *natural atomic orbitals*); (2) los orbitales enlazantes/antienlazantes entre pares de átomos se localizan como NBOs usando AOs de dichos átomos; (3) el resto de los orbitales (*orbitales de Rydberg*) son identificados; (4) todos los orbitales son ortogonalizados. El resultado del procedimiento es que los NAOs y los orbitales de Rydberg se describen usando orbitales atómicos de un átomo, y los NBOs se describen usando orbitales atómicos de un par de átomos (los NBOs pueden describirse sobre más de dos átomos en casos donde haya deslocalización de electrones). Para derivar las cargas atómicas (*Natural Population Analysis, NPA*), se puede realizar un procedimiento similar al de Mulliken [271].

A partir del análisis de la función de onda se pueden calcular órdenes de enlace o índices que permiten cuantificar la fuerza del enlace. El índice de enlace de Wiberg (WBI, del inglés *Wiberg bond index*) entre los átomos A y B, B_{AB} , se calcula a partir de los elementos de la matriz producto \mathbf{DS} :

$$B_{AB} = \sum_{\alpha \in A} \sum_{\beta \in B} (\mathbf{DS})_{\alpha\beta} (\mathbf{DS})_{\beta\alpha} \quad (2.66)$$

Los WBIs pueden calcularse a partir de los orbitales atómicos de base, y también a partir de NAOs y NBOs.

Por su parte, a partir de la DFT se ha desarrollado un marco conceptual (*DFT conceptual o químico*) que permite extraer descriptores y propiedades de relevancia química directamente a partir de la densidad electrónica y derivadas de distinto orden de la misma [272].

El *potencial químico*, μ , es un indicador de la tendencia del sistema molecular a intercambiar densidad electrónica con el entorno, y se calcula como:

$$\mu = \frac{\partial E(n)}{\partial n} \quad (2.67)$$

donde n es el número de electrones del sistema. Usando el método de las diferencias finitas queda:

$$\mu \approx -\frac{1}{2}[E(n+1) - E(n)] = -\frac{1}{2}(I + A) \quad (2.68)$$

donde A e I son la afinidad electrónica y el potencial de ionización de la molécula. Usando la aproximación *frozen core* (donde se desprecia un eventual relajamiento orbital en la reorganización de carga electrónica) esta propiedad usando la aproximación *frozen core* se puede estimar a partir de las energías de los orbitales de KS de frontera, ϵ_{HOMO} y ϵ_{LUMO} :

$$\mu \approx \frac{1}{2}(\epsilon_{\text{HOMO}} + \epsilon_{\text{LUMO}}) \quad (2.69)$$

La *dureza química*, η , indica la resistencia del sistema molecular participar en procesos de transferencia de densidad electrónica (*i.e.* es un indicador global de reactividad molecular ante procesos de naturaleza covalente), y se calcula como:

$$\eta = \frac{1}{2} \frac{\partial^2 E(n)}{\partial n^2} = \frac{1}{2} \frac{\partial \mu}{\partial n} \quad (2.70)$$

$$\eta \approx \frac{1}{2} E(n+1) - 2E(n) + E(n-1) = \frac{1}{2}(I - A) \approx \frac{1}{2}(\epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}})$$

La *blandura*, S , indica que tan polarizable es el sistema molecular:

$$S = \frac{1}{2\eta} = \frac{\partial n}{\partial \mu} \quad (2.71)$$

Combinando los conceptos de potencial químico y dureza se obtiene un descriptor la electrofilia molecular, ω :

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} = \frac{(I + A)^2}{8(I - A)} \approx \frac{(\epsilon_{\text{HOMO}} + \epsilon_{\text{LUMO}})^2}{8(\epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}})} \quad (2.72)$$

Las *funciones de Fukui*, f , indican la tendencia de una región de la molécula a intercambiar electrones, y se calcula:

$$f = \frac{\partial \rho(n)}{\partial n} \quad (2.73)$$

Usando el método de las diferencias finitas, se puede obtener una *función de Fukui electrofílica*, f^+ (para procesos que implican una ganancia de electrones) y una *función de Fukui nucleofílica*, f^- (para procesos que implican una pérdida de electrones):

$$f^+ = \rho(n + 1) - \rho(n) \quad (2.74)$$

$$f^- = \rho(n) - \rho(n - 1) \quad (2.75)$$

Resulta conveniente definir las *funciones de Fukui condensadas* sobre el átomo k (f_k^+ , f_k^-):

$$f_k^+ = q_k(n + 1) - q_k(n) \quad (2.76)$$

$$f_k^- = q_k(n) - q_k(n - 1) \quad (2.77)$$

donde q_k es la carga atómica sobre dicho átomo. La región de la molécula con mayor valor positivo de f_k^+/f_k^- más grande será la región con mayor carácter electrofílico/nucleofílico. Las funciones de Fukui sirven para comparar la electrofilia o la nucleofilia de regiones distintas de la misma molécula. Para comparar la electrofilia/nucleofilia de regiones distintas de distintas moléculas aparece el concepto de blandura local, s :

$$s = \frac{\partial \rho}{\partial \mu} = \frac{\partial n}{\partial \mu} \cdot \frac{\partial \rho}{\partial n} = S f \quad (2.78)$$

Es conveniente calcular la blandura local a partir de las funciones de Fukui condensadas, entonces se obtiene la blandura local s_k (electrofílica, s_k^+ ; nucleofílica, s_k^-) sobre el átomo k :

$$s_k = S f_k \quad (2.79)$$

El concepto de blandura local puede extenderse a un grupo funcional, G :

$$s_G = \sum_{k \in G} s_k \quad (2.80)$$

lo cual resulta muy útil para comparar la nucleofilia/electrofilia de distintos grupos funcionales.

2.2.3. Métodos mixtos QM/MM

En principio, para modelar una reacción química, es necesario utilizar un método cuántico (*ab initio* o basado en DFT). Sin embargo, dado que las proteínas son sistemas con varios miles de átomos, describirlas en forma completa con un método cuántico *ab initio* o DFT se vuelve inviable en términos de costo computacional. Teniendo en cuenta este problema, se cuenta con dos soluciones, ambas empleadas en distintas partes de los estudios llevados a cabo en este trabajo de tesis. La primera estrategia consiste en realizar un recorte del sistema, dejando en el sistema material los grupos de átomos involucrados en la reacción y aquéllos que interactúan directamente con ellos. Este tipo de aproximación se conoce como estrategia tipo *cluster*. Los efectos del entorno pueden ser introducidos usando un modelo de solvente continuo (esto se tratará en la **Sección 2.5.2**), usando una constante dieléctrica ϵ adecuada, selección que no es trivial (aunque se suele recomendar valores de ϵ de 4 [273]).

La segunda estrategia consiste en dividir el sistema en dos regiones (**Figura 2.1**). La primera, la *región cuántica* o QM, contiene los átomos involucrados en la reacción y aquellos grupos que interactúan con los primeros, es decir, el recorte del sistema anteriormente mencionado. La segunda, la *región clásica* o MM, contiene el resto del sistema molecular, que no está involucrado *directamente* en la reacción química. A este tratamiento se le denomina *métodos mixtos* o QM/MM [274].

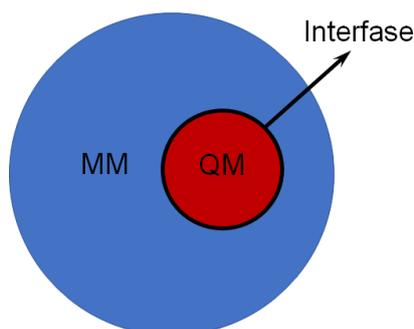


Figura 2.1. Ilustración de la separación de sub-sistemas QM y MM en un sistema complejo descrito con estrategias QM/MM.

El sistema QM/MM presenta tres clases de interacciones que aportan al cálculo de la energía del sistema completo: a) las que se dan entre átomos de la región QM; las que se dan entre átomos de la región MM; y c) las que se dan entre átomos de la región MM y átomos de la región MM. Esta última clase de interacciones se denomina *acoplamiento QM-MM*.

Para evaluar la energía QM/MM del sistema, se pueden distinguir dos esquemas de cálculo diferentes, el *esquema aditivo*, y el *esquema sustractivo*.

Esquema sustractivo. Este esquema, también conocido como IMOMM (del inglés *Integrated Molecular Orbital Molecular Mechanics*) [275] u ONIOM(QM:MM) [276], trata las interacciones entre las regiones QM y MM según la ecuación 2.81:

$$E_{\text{sist}}^{\text{QM/MM}} = E_{\text{mod}}^{\text{QM}} + E_{\text{sist}}^{\text{MM}} - E_{\text{mod}}^{\text{MM}} \quad (2.81)$$

donde $E_{\text{sist}}^{\text{QM/MM}}$ es la energía del *sistema real* calculada a nivel integrado QM/MM; $E_{\text{mod}}^{\text{QM}}$ es la energía del *sistema modelo* obtenida a nivel QM; $E_{\text{sist}}^{\text{MM}}$ es la energía del *sistema real* obtenida a nivel MM y $E_{\text{mod}}^{\text{MM}}$ es la energía del *sistema modelo* a nivel MM. Este esquema tiene la ventaja de ser fácil de implementar computacionalmente, pero presenta las desventajas de requerir parámetros del *campo de fuerza* de MM para los átomos de la región del *sistema modelo* y de tratar, en principio, el *acoplamiento QM-MM* a nivel clásico (MM). Como en una reacción química las posiciones de los átomos cambian al avanzar la transformación, por lo general es necesario recalculas las cargas atómicas MM a asignar a los átomos del sistema modelo para cada especie participante de la reacción, usualmente recalculadas a partir del potencial electrostático [277].

Esquema aditivo. En este esquema, se introduce explícitamente un término explícito de acoplamiento QM-MM, $E_{\text{QM-MM}}$:

$$E_{\text{QM/MM}} = E_{\text{QM}} + E_{\text{MM}} + E_{\text{QM-MM}} \quad (2.82)$$

tiene la ventaja de no necesitar parámetros de mecánica molecular para los átomos de la región QM y utilizar cargas de los átomos QM calculadas a nivel cuántico para las interacciones entre átomos de la frontera QM-MM. La desventaja es que es más difícil de implementar que el esquema sustractivo.

En ambos tipos de esquemas de cálculo de la energía QM/MM se puede evaluar el acoplamiento QM-MM de distintas maneras, incluyendo las interacciones *enlazantes* (átomos enlazados, a cada lado de la frontera entre las regiones QM y MM) e *interacciones no enlazantes* (de van der Waals y electrostáticas). Siendo crucial en el resultado del acoplamiento QM-MM sobre los átomos de cada región, en particular sobre aquéllos de la región QM, la componente electrostática del acoplamiento QM-MM puede tratarse de distintas formas, lo que se conoce como esquemas de *embedding*.

En el más sencillo de estos esquemas, el esquema de *embedding mecánico* (ME, del inglés *mechanical embedding*) [274], los cálculos QM se realizan sobre el sistema reducido sin considerar al resto del sistema y el acoplamiento QM-MM se trata a nivel MM, con todas las componentes de interacción previstas en el campo de fuerza correspondiente. Las cargas de los átomos MM no polarizan al hamiltoniano QM. Los cálculos ONIOM(QM:MM) desarrollados en este trabajo de tesis para obtener estructuras de complejos y estados de transición en distintas variantes de HSA (**Capítulos 5, 7y 8**) corresponden a este esquema ME.

Un esquema más sofisticado es el esquema de *embedding electrónico* (EE, del inglés *electronic embedding*) [278], en el que el cálculo QM sobre los átomos de la región modelo incluye en su hamiltoniano efectivo la influencia del resto del sistema, a través de operadores monoeléctricos que describen su interacción electrostática. El resto de las interacciones se describen igual que en el esquema ME, a nivel MM. Cuando se usa un campo de fuerza de cargas puntuales, como los campos de fuerza AMBER, las cargas de los átomos MM polarizan al hamiltoniano QM, \hat{H}_{QM} :

$$\hat{H}_{\text{QM}}^{\text{EE}} = \hat{H}_{\text{QM}} - \sum_i \sum_n \frac{s_n q_n}{R_{in}} + \sum_j \sum_n \frac{Z_j s_n q_n}{R_{jn}} \quad (2.83)$$

donde n , j e i denotan respectivamente los átomos MM, los átomos QM y los electrones, q_n y s_n son respectivamente la carga y un factor de escalado para el átomo n , R_{in} y R_{jn} son respectivamente la distancia entre el átomo n y el electrón i y la distancia entre el átomo n y el átomo j , y Z_j es la carga nuclear del átomo j .

Si bien este esquema tiene en cuenta la polarización, suele sobreestimarla (*i.e.* sobrepolarización) en la interfase entre las regiones QM y MM. Este esquema de *embedding* se utilizó en este trabajo de tesis para obtener estructuras de especies estables y estados de transición usando QM/MM aditivo (**Capítulo 7**), para obtener una mejor descripción de la energética usando ONIOM (**Capítulos 5, 7 y 8**), y para los cálculos QM/MM de descriptores de la reactividad intrínseca (**Capítulo 8**).

Para resolver el problema de la sobrepolarización, se cuenta con otro esquema de *embedding*, que es el más sofisticado, el esquema de *embedding polarizable*. En este esquema, además de las interacciones ya contempladas en el esquema EE, se considera que las cargas de los átomos QM polarizan a las cargas de los átomos MM, especialmente en la región de frontera [279]. Si bien este esquema corrige el problema de la sobrepolarización en la interfase QM-MM, requiere el empleo de campos de fuerza polarizables en la descripción MM, no siempre disponibles para proteínas modificadas. Además, el cálculo de las nuevas cargas MM debe realizarse en cada paso del proceso SCF del cálculo QM, por lo que este esquema de *embedding* es muy costoso.

Un tercer y último aspecto clave que completa la definición de las características del método QM/MM a usar, es el relativo al tratamiento de la frontera QM-MM. En reacciones que involucran proteínas, por lo general, la frontera entre las regiones QM y MM corta uno o más enlaces covalentes, lo que en principio dejaría átomos con valencia abierta en la región QM, los cuales en realidad están formando enlaces covalentes con átomos de la región MM. Para resolver este problema existen distintos tipos de soluciones, resumidas en la Figura 2.2, cuya base conceptual será descrita a continuación.

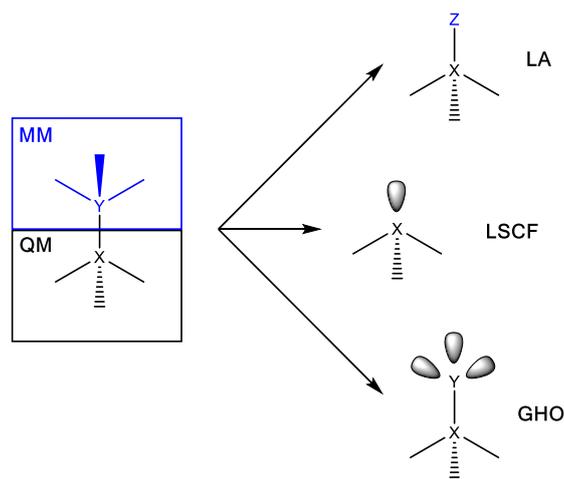


Figura 2.2. Formas de tratamiento de la frontera QM/MM. LA: Átomo de enlace. LSCF: campo local autoconsistente. GHO: Orbital híbrido generalizado.

Átomo de enlace. La solución más sencilla –y más usada– consiste en sustituir el enlace roto por un átomo monovalente, generalmente un átomo de hidrógeno, para completar la valencia. Este átomo, denominado átomo de enlace, no se encuentra presente en el sistema real, y para evitar agregar más grados de libertad al sistema, se encuentra en una posición fija a lo largo del segmento formado por el enlace covalente roto. Este es el tratamiento que utiliza en los dos métodos QM/MM aplicados en parte de los estudios de esta tesis.

Orbitales fantasma. Otra posible solución es reemplazar el enlace por un orbital molecular doblemente ocupado, asumiendo que la estructura electrónica del enlace es insensible a cambios en la región QM [280]. Las dos estrategias más usadas son el campo local autoconsistente (LSCF, del inglés *local self consistent field*) [281] y el orbital híbrido generalizado (GHO, del inglés *generalized hybrid orbital*) [282]. En la estrategia LSCF, los enlaces de frontera son descritos por orbitales de enlace localizados definidos, denominados orbitales congelados, que son excluidos del cálculo SCF. En la estrategia GHO, se colocan orbitales híbridos sobre el átomo MM de frontera. El orbital que forma enlace con el átomo QM es incluido en el SCF, mientras que el resto es excluido. Este tipo de aproximaciones requieren parametrizaciones y hacen que el sistema QM sea más grande, por lo que la solución del átomo de enlace es la más usada.

2.3. Caracterización de especies estables y estados de transición

2.3.1. La superficie de energía potencial de los sistemas moleculares

La *superficie de energía potencial* (PES, del inglés *potential energy surface*) de un sistema molecular establece una relación entre la arquitectura molecular –las posiciones de los núcleos en el espacio– y la energía potencial del sistema. Como se mencionó anteriormente, en el caso de los métodos cuánticos, la aproximación de Born-Oppenheimer permite separar el tratamiento del movimiento de los electrones del correspondiente a los núcleos, lo que permite construir una PES que relaciona la energía electrónica con las posiciones de los núcleos. En el caso de los métodos clásicos, es la propia representación gráfica de la función analítica que vincula la energía del sistema molecular con las posiciones nucleares en el campo de fuerza la que permite obtener la PES.

Dos tipos de estructuras, asociadas a puntos de la PES, tienen relevancia química y corresponden a *puntos estacionarios* sobre la PES (*i.e.*: estructuras cuyas derivadas primeras de la energía potencial respecto a las posiciones nucleares son cero en todas las direcciones en ese punto de la PES) [240]. Los *mínimos* (puntos estacionarios en los que las derivadas segundas de la energía potencial tienen valor positivo en todas las direcciones del movimiento nuclear, correspondiendo en la PES a un pozo de energía potencial, o lo que es lo mismo, un punto en el que la *matriz hessiana* o *hessiano* del sistema molecular tiene exclusivamente valores propios positivos) que se corresponden con *especies estables*, cuya vida media se asocia a la profundidad del pozo de energía potencial correspondiente (a mayor profundidad, más estable es la especie y mayor su vida media). Los *puntos de ensilladura de primer orden* (puntos estacionarios en los que las derivadas segundas de la energía potencial tienen valor positivo en todas las direcciones del movimiento nuclear menos una (en la que es negativo) y se corresponde con la *coordenada de reacción*, *s*, es decir que la PES, o lo que es lo mismo, un punto en el espacio de configuración nuclear en el que el hessiano del sistema molecular tiene $3N-7$ ($3N-6$ en sistemas lineales) valores propios positivos y un único valor propio negativo que coincide con la dirección del proceso químico) que se corresponden con *estados de transición* (TS, del inglés *transition state*) especies químicas inestables cuya vida media se encuentra en el rango de entre 10^{-18} y 10^{-15} s.

2.3.2. Búsqueda de estructuras de especies relevantes: optimización de geometría

La búsqueda de un punto estacionario sobre una PES en particular implica un proceso que se denomina *optimización de geometría*. Para poder llevarlo a cabo hace falta partir de una estructura inicial y deformarla siguiendo instrucciones presentes en un algoritmo de búsqueda hasta llegar al punto estacionario más cercano que reúna las características deseadas (mínimo o punto de ensilladura de primer orden), obteniéndose como resultado por lo menos la estructura tridimensional del sistema molecular y su energía potencial relativa (y otras propiedades en caso de utilizar métodos QM). De acuerdo a la cantidad de información requerida por el algoritmo de búsqueda (estructura, energía y sus derivadas primera y segunda) existen tres categorías de métodos [240] que permiten localizar puntos estacionarios sobre una PES (básicamente se distinguen los que usan solamente la energía, aquéllos que usan la energía y su gradiente y aquéllos que recurren a la energía, su gradiente y el hessiano), cada uno con ventajas y desventajas, a continuación se detallan aquéllos que han sido empleados en este trabajo de tesis.

El más sencillo de todos –que sólo sirve para la búsqueda de mínimos– es el método *steepest descent* (SD), en el cual se minimiza la energía “moviéndose” sobre la PES en sentido contrario al gradiente –el vector que contiene las derivadas primeras de la energía respecto a las posiciones \mathbf{x}_n de los núcleos–, \mathbf{g}_n . El tamaño de paso de búsqueda, $\Delta\mathbf{x}$, se define como:

$$\Delta\mathbf{x} = \mathbf{x}_{n+1} - \mathbf{x}_n = -\mathbf{g}_n \quad (2.84)$$

Este método tiene el inconveniente que la convergencia se vuelve más lenta al acercarse a un mínimo, al punto que nunca se llega al punto estacionario, por eso se lo recomienda para búsquedas iniciales, si se está muy lejos del mínimo la convergencia comienza siendo rápida.

Si se desea mejor convergencia cerca del mínimo, ese puede recurrir los métodos gradiente-conjugados (CG, del inglés *conjugated gradient*), que son versiones mejoradas del método SD en las que para moverse sobre la PES se tiene en cuenta también el gradiente de puntos previos de la PES. El paso de búsqueda se calcula:

$$\Delta\mathbf{x} = -\mathbf{g}_n + \beta_n\mathbf{g}_{n-1} \quad (2.85)$$

El coeficiente β_n puede calcularse de varias formas, siendo la correspondiente al algoritmo de Polak-Ribière [283]:

$$\beta_n = \frac{\mathbf{g}_n^T \Delta \mathbf{g}}{\mathbf{g}_{n-1}^T \mathbf{g}_{n-1}} \quad (2.86)$$

$$\Delta \mathbf{g} = \mathbf{g}_n - \mathbf{g}_{n-1}$$

Si bien los métodos CG convergen más rápido que el método SD, en algunos casos la convergencia es lenta y tampoco puede ser usado para la búsqueda de estados de transición.

Si la convergencia en la búsqueda de un mínimo es muy lenta, o se desea buscar un estado de transición, se puede recurrir al uso de métodos newtonianos como el *algoritmo de Newton-Raphson* (NR) [284], en el cual se realiza una aproximación cuadrática de la PES (cuya validez depende de que los pasos de optimización no sean demasiado grandes), donde la energía del paso \mathbf{x}_{n+1} se estima empleando información de la energía, gradiente y derivadas segundas correspondientes al punto previo en la PES según:

$$E_{n+1} \approx E_n + \mathbf{g}_n^T \Delta \mathbf{x} + \frac{1}{2} \Delta \mathbf{x}^T \mathbf{H} \Delta \mathbf{x} \quad (2.87)$$

$$\Delta \mathbf{x} = -\mathbf{H}^{-1} \mathbf{g}_n$$

donde \mathbf{H} es hessiano.

Una forma de controlar el tamaño de paso para asegurar la validez de la aproximación cuadrática es la usada en el método *Rational Function Optimization* (RFO) [285, 286], en el que se introduce un denominador dependiente del tamaño de paso que previene que los pasos sean demasiado grandes:

$$E_{n+1} \approx E_n + \frac{\mathbf{g}_n^T \Delta \mathbf{x} + \frac{1}{2} \Delta \mathbf{x}^T \mathbf{H} \Delta \mathbf{x}}{1 + \Delta \mathbf{x}^T \mathbf{S} \Delta \mathbf{x}} \quad (2.88)$$

donde \mathbf{S} es una matriz de regularización, usualmente una matriz identidad.

Otra método de optimización de geometría es el método GDIIS (del inglés *geometry optimization using direct inversion of the iterative subspace*) [287] en el que el

objetivo es construir una nueva geometría, \mathbf{x}^* , como una combinación de n geometrías previas, \mathbf{x}_i , para minimizar el tamaño de paso de Newton:

$$\mathbf{x}^* = \sum_i^n c_i \mathbf{x}_i ; \sum_i^n c_i = 1 \quad (2.89)$$

donde c_i son coeficientes de peso que se calculan minimizando $\|\mathbf{x}_{n+1} - \mathbf{x}^*\|^2$. La geometría

$$\mathbf{x}_{n+1} = \mathbf{x}^* - \mathbf{H}^T \mathbf{g}^* ; \mathbf{g}^* = \sum_i^n c_i \mathbf{g}_i \quad (2.90)$$

donde \mathbf{g}^* es el gradiente correspondiente a \mathbf{x}^* . Los coeficientes c_i se calculan minimizando $\|\mathbf{x}_{n+1} - \mathbf{x}^*\|^2$ resolviendo la **Ecuación 2.92**:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{A} & \mathbf{1} \\ \mathbf{1} & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mathbf{c} \\ \lambda \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{0} \\ \mathbf{1} \end{bmatrix} \quad (2.91)$$

$$A_{ij} = (\mathbf{H}^{-1} \mathbf{g}_i)^T (\mathbf{H}^{-1} \mathbf{g}_j)$$

donde \mathbf{c} es el vector de los coeficientes c_i y λ es el multiplicador lagrangiano que corresponde a minimizar $\|\mathbf{x}_{n+1} - \mathbf{x}^*\|^2$. Una variante de GDIIS es el método GEDIIS (del inglés *geometry optimization using energy-corrected direct inversion of the iterative subspace*) [288], que difiere en cómo se definen los elementos de \mathbf{A} :

$$A_{ij} = (\mathbf{g}_i - \mathbf{g}_j)(\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j) \quad (2.92)$$

Si bien la convergencia lograda con estos métodos es mucho más rápida que con los métodos CG, el cálculo del Hessiano exacto suele ser muy costoso, por lo que aparecen también los *métodos cuasi-newtonianos*, en los que se puede realizar una aproximación al Hessiano a partir de los gradientes de puntos anteriores de la búsqueda. Un ejemplo de este grupo es el *método de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno* (BFGS) [289, 290] en el que el hessiano aproximado se calcula a partir del hessiano del paso anterior:

$$\mathbf{H}_{n+1} = \mathbf{H}_n + \frac{\Delta \mathbf{g} \Delta \mathbf{g}^T}{\Delta \mathbf{g}^T \Delta \mathbf{x}} - \frac{\mathbf{H}_n \Delta \mathbf{x} (\mathbf{H}_n \Delta \mathbf{x})^T}{\Delta \mathbf{g}^T \mathbf{H}_n \Delta \mathbf{x}} \quad (2.93)$$

Los métodos cuasi-newtonianos tienen un costo similar a los métodos SD y CG, pero tienen mejor convergencia. El hessiano exacto inicial puede calcularse de forma analítica, o se pueden obtener aproximaciones del mismo usando métodos menos costosos, como los métodos clásicos. El problema es que al alejarse del hessiano inicial, la aproximación será cada vez menos adecuada.

Finalmente, uno de los métodos más robustos para optimizaciones de geometría es el de Schlegel (también conocido como Berny) [288, 291]. En este algoritmo se construye una serie de pasos que llevan a un punto estacionario que conducen a un punto estacionario. Cada paso consta de las siguientes acciones:

- Se estima el hessiano de la geometría actual a partir del hessiano de su valor anterior.
- Cualquier componente del gradiente que corresponde a variables congeladas se fija en cero.
- Si se busca un mínimo, se actualiza el radio de confianza (*i.e.* el tamaño máximo permitido para un paso NR).
- Si se busca un mínimo, se realiza una búsqueda lineal entre el punto actual y el punto anterior de menor energía. Si se cuenta con hessiano de ambos puntos, se ajusta una función quíntica a las energías y a los gradientes direccionales de ambos puntos, con la condición de que las derivadas segundas sean cero en el mínimo. En caso de no cumplirse esta condición o si el paso resultante (quíntico) no es aceptable, se ajusta una función cuártica. Si esto falla o el paso resultante (cuártico) no es aceptable, se ajusta una función cúbica. Si todos los ajustes fallan y el último punto no es el de menor energía, se toma un paso lineal al punto medio de la línea que conecta el último punto con el de menor energía. Un paso quíntico o cuártico se considera aceptable si el último punto es el de menor energía o si el último paso no es el de menor energía y la búsqueda lineal da un punto entre el último paso y el de menor energía. Un paso cúbico es aceptado si se encuentra entre los dos puntos, o es más pequeño que el paso previo.
- Si el último punto es el de más baja energía, o se busca un estado de transición, se toma un paso cuadrático usando el hessiano actual. Si se hizo una búsqueda lineal, el paso cuadrático se toma desde el punto extrapolado usando la búsqueda lineal y usa fuerzas (*i.e.* los opuestos de las derivadas primeras) estimadas interpolando entre las fuerzas en los dos puntos usados en la búsqueda lineal. Para este paso se puede usar los métodos NR, RFO, GDIIS y GEDIIS.

- Cualquier componente del paso cuadrático que corresponda a variables congeladas es fijado en cero.
- Si el paso cuadrático excede el radio de confianza y se busca un mínimo, la longitud del paso se reduce buscando un mínimo de la función cuadrática en la esfera que tiene como radio al radio de confianza. Si se busca un estado de transición, el paso cuadrático se reduce a la del radio de confianza.
- La convergencia se determina comparando con criterios para la fuerza máxima, la fuerza media cuadrática, el componente máximo del paso y la media cuadrática de las componentes del paso. Dicho paso es la suma de los pasos cuadráticos y lineales.

El método de Schlegel se usó para todas las optimizaciones de geometría a nivel QM y QM/MM, con excepción de las optimizaciones usando QM/MM aditivo, en las que se usó el método RFO (**Capítulo 7**).

2.3.3. Caminos de reacción

En la representación de una reacción hay tres puntos estacionarios importantes de la PES: los mínimos que corresponde a los reactivos, el punto de ensilladura de primer orden que corresponde al TS y los mínimos que corresponden a los productos. Una vez que se encuentra el TS de un proceso, se debe corroborar que conecta con reactivos y productos. Para ello se debe determinar el *camino de mínima energía* (MEP, del inglés *minimum energy path*), también conocido como *camino de reacción* desde el TS hasta los mínimos. Si el MEP está dado en coordenadas pesadas por la masa, éste se denomina *coordenada de reacción intrínseca* (IRC, del inglés *intrinsic reaction coordinate*) [292] y al recorrerlo se puede también verificar si hay intermediarios en el mecanismo entre reactivos y productos. El IRC se calcula resolviendo la ecuación diferencial:

$$\frac{d\mathbf{x}}{ds} = -\frac{\mathbf{g}}{\|\mathbf{g}\|} = \mathbf{v} \quad (2.94)$$

donde \mathbf{x} es el vector de las coordenadas, s , es la longitud del camino (representa la coordenada de reacción), \mathbf{g} es el gradiente y \mathbf{v} es el gradiente normalizado. El método más simple para resolver la ecuación es el *método de Euler* [293], en el que se toma una serie de pasos a una distancia Δs en dirección opuesta al gradiente normalizado:

$$\mathbf{x}_{n+1} = \mathbf{x}_n + \Delta s \mathbf{v} \quad (2.95)$$

Un método más preciso para resolver la ecuación diferencial es el método de la *aproximación cuadrática local* (LQA, del inglés *linear quadratic approximation*) [294, 295], que además usa información del hessiano. Un paso LQA tiene la forma:

$$\begin{aligned} \mathbf{x}_{n+1} &= \mathbf{x}_n + \mathbf{A} \mathbf{g} \\ \mathbf{A} &= \mathbf{U} \boldsymbol{\alpha} \mathbf{U}^T \end{aligned} \quad (2.96)$$

donde \mathbf{U} es la matriz de los vectores-columna propios del hessiano y $\boldsymbol{\alpha}$ es una matriz diagonal cuyos elementos α_{ii} son:

$$\alpha_{ii} = \frac{e^{-\lambda_{ii}t} - 1}{\lambda_{ii}} \quad (2.97)$$

donde λ_{ii} son los valores propios del hessiano. El parámetro t se puede obtener integrando la ecuación:

$$\begin{aligned} \frac{ds}{dt} &= \sqrt{\sum_i \|\mathbf{g}'\|^2 e^{-\lambda_{ii}t}} \\ \mathbf{g}' &= \mathbf{U}^T \mathbf{g} \end{aligned} \quad (2.98)$$

Otro tipo de métodos de integración son los llamados *predictor-corrector* (PC) [296]. En los métodos PC, primero se realiza un paso predictor (P), uno o más pasos de evaluación de la energía y el gradiente (E), y un paso corrector o de integración (C). Usando la información del paso E y de otros puntos previos del IRC, se construye una superficie local y se integra la ecuación diferencial usando el *método de Euler*. Según el algoritmo usado en el paso predictor, se tienen dos variantes del método: *HPC* y *EulerPC*, donde el paso P corresponde a un paso LQA o a un paso de Euler, respectivamente. Si bien el método HPC es más preciso –debido a que usa información del hessiano– que el método EulerPC, este último es más adecuado para sistemas grandes (*e.g.* proteínas) dado que requiere de menos recursos computacionales. Ambos métodos PC Se utilizaron en la generación de caminos de reacción en este trabajo de tesis.

2.4. Simulaciones de dinámica molecular

2.4.1. Generalidades

Las simulaciones de dinámica molecular (MD) son métodos que permiten estudiar la evolución temporal de átomos que forman parte de un sistema molecular bajo distintas condiciones. Se considera a los núcleos suficientemente pesados como para comportarse como partículas clásicas, entonces la dinámica de los núcleos puede estudiarse resolviendo la segunda ecuación de Newton:

$$\frac{dU}{d\mathbf{r}} = m \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} \quad (2.99)$$

donde U es la energía potencial, \mathbf{r} es el vector de las posiciones nucleares, m es la masa y t es el tiempo. Las posiciones después de un paso Δt están dadas por la serie de Taylor:

$$\mathbf{r}_{n+1} = \sum_{i=0}^k \frac{1}{i!} \frac{d^i \mathbf{r}}{dt^i} \Delta t^i \quad (2.100)$$

Considerando que la derivada primera es la velocidad \mathbf{v}_n y la derivada segunda es la aceleración \mathbf{a}_n :

$$\mathbf{r}_{n+1} = \mathbf{r}_n + \mathbf{v}_n \Delta t + \frac{1}{2} \mathbf{a}_n \Delta t^2 + \dots \quad (2.101)$$

Uno de los algoritmos más usados para resolver la ecuación de Newton es el *velocity Verlet* [297] en el que se trunca la serie de Taylor en $k=2$:

$$\begin{aligned} \mathbf{r}_{n+1} &= \mathbf{r}_n + \mathbf{v}_n \Delta t + \frac{1}{2} \mathbf{a}_n \Delta t^2 \\ \mathbf{v}_{n+1} &= \mathbf{v}_n + \frac{1}{2} (\mathbf{a}_n + \mathbf{a}_{n+1}) \Delta t \end{aligned} \quad (2.102)$$

$$\mathbf{a}_n = \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} = -m \frac{dU}{d\mathbf{r}}$$

2.4.2. Termostatos y baróstatos

En una simulación MD estándar el número de moléculas N , el volumen V y la energía total E son constantes, pero la temperatura T y la presión P varían.

$$E = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m \|\mathbf{v}_i\|^2 + U \quad (2.103)$$

La temperatura es proporcional de la energía cinética promedio, E_K^{avg} :

$$T \propto E_K^{\text{avg}} \quad (2.104)$$

Si se desea controlar la temperatura, se puede recurrir al *termostato de Berendsen* [298] que gradualmente agrega o quita energía cinética al sistema para que la temperatura se mantenga en el valor deseado, T_0 , con una constante de acoplamiento de temperatura τ_T y un factor de escalado de velocidad λ_v :

$$\frac{dT}{dt} = \frac{(T_0 - T)}{\tau_T} \quad (2.105)$$

$$\lambda_v = \sqrt{1 + \frac{\Delta t}{\tau_T} \left(\frac{T_0}{T} - 1 \right)}$$

Análogamente, si se desea controlar la presión (ensemble NPT), se puede recurrir al *baróstato de Berendsen*:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{(P_0 - P)}{\tau_P} \quad (2.106)$$

$$\lambda_r = \sqrt[3]{1 + \frac{\kappa \Delta t (P_0 - P)}{\tau_P}}$$

donde P_0 es la presión deseada τ_P es la constante de acoplamiento de presión, λ_r es el factor de escalado de las coordenadas y κ es la compresibilidad del sistema. Con el termostato (baróstato) de Berendsen la temperatura (presión) se mantiene aproximadamente constante. Si se desea un control más estricto se puede recurrir al termostato/baróstato de Nosé-Hoover [299, 300], que sí mantienen la temperatura/presión constante. Otra forma de controlar la temperatura

(*termostato de Langevin*) es usar la ecuación de Langevin [301] en lugar de la de Newton:

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} = \mathbf{F}_0 - \gamma \frac{d\mathbf{r}}{dt} + \mathbf{F}_{\text{rnd}} \quad (2.107)$$

donde \mathbf{F}_0 es la fuerza intramolecular, γ es un coeficiente de fricción y \mathbf{F}_{rnd} es una fuerza aleatoria con promedio cero. La fuerza aleatoria y el coeficiente de fricción dan lugar a un control de temperatura estricto. Una forma alternativa de controlar la presión es mediante el *baróstato de Monte Carlo* [302], en el que la presión se mantiene realizando cambios de volumen ΔV , los cuales se aceptan o se rechazan usando el algoritmo de Metrópolis [303] con una probabilidad $P(\Delta V)$:

$$P(\Delta V) = \min \left(1, e^{-\frac{1}{k_B T} [\Delta E + P \Delta V - N k_B T \ln \frac{V - \Delta V}{V}]} \right) \quad (2.108)$$

siendo ΔE el cambio en la energía asociado a cambiar el volumen. Cabe destacar que para una simulación MD a temperatura y presión constantes, como las realizadas para la HSA en este trabajo de tesis (**Capítulos 4, 6 y 8**), en términos de tiempos de cálculo, la combinación del *termostato de Berendsen* y el *baróstato de Monte Carlo* es la menos costosa.

2.4.3. Condiciones de contorno periódicas

Para simular un sistema grande –prácticamente infinito– como es el caso de una solución, es necesario realizar aproximaciones. Una de estas aproximaciones es aplicar condiciones de contorno periódicas (PBC), en la que las moléculas son colocadas en una caja –la celda unidad–, la cual es replicada en todas las direcciones. Si una molécula de solvente sale de la caja, ingresa a la misma por el lado opuesto, desde una caja contigua. Las interacciones electrostáticas (ecuación 2.9) son de largo alcance, por lo que se extienden más allá de la celda unidad y el costo computacional escalaría con N^2 . Una solución sería truncar las interacciones, introduciendo un *cutoff* –generalmente de 8-12 Å–, pero esto daría lugar a artefactos. Una forma de eliminar estos artefactos, el método de Ewald [304], consiste en dividir las interacciones electrostáticas en interacciones de corto alcance (dentro del *cutoff*) e interacciones de largo alcance (más allá del *cutoff*). Las interacciones de corto alcance se tratan en el espacio real, mientras que para las de largo alcance son tratadas como una transformada de Fourier. Una variante del

método de Ewald, llamada *Particle-mesh-Ewald* (PME) [305], reduce el costo computacional de N^2 a $N \ln N$.

2.4.4. Análisis post-trayectoria

La trayectoria de una simulación MD muestra la evolución de las posiciones de los átomos del sistema a lo largo del tiempo, es decir, contienen toda la información del comportamiento dinámico del sistema durante el tiempo estudiado [306]. Del análisis de la trayectoria se puede obtener la evolución de parámetros estructurales, tales como distancias, ángulos, diedros y superficie de exposición al solvente (SASA), así como parámetros que indican la convergencia de la trayectoria, como la desviación media cuadrática de las posiciones atómicas (RMSD), y parámetros que indican qué regiones del sistema son más o menos rígidas, como la fluctuación media cuadrática de las posiciones atómicas (RMSF). Para cada tiempo hay un valor de RMSD, y éste se calcula como:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|\mathbf{r}_{ij} - \mathbf{r}_{i0}\|^2} \quad (2.109)$$

donde \mathbf{r}_{ij} es la posición del átomo i a tiempo t_j y \mathbf{r}_{i0} es la posición del átomo i a tiempo t_0 . Para cada átomo hay un valor de RMSF, y éste se calcula como:

$$\text{RMSF} = \sqrt{\frac{1}{t} \sum_{j=1}^t \|\mathbf{r}_{ij} - \mathbf{r}_{i0}\|^2} \quad (2.110)$$

En el caso de las proteínas, tanto para el RMSD como para el RMSF suelen usarse las posiciones de los carbonos alfa ($\text{C}\alpha$ -RMSD; $\text{C}\alpha$ -RMSF). Para obtener estructuras representativas, las estructuras correspondientes a cada tiempo pueden agruparse y ser analizadas (análisis de *clustering*). Hay varios algoritmos de *clustering*, uno de los más usados es el algoritmo jerárquico aglomerativo [307].

También se puede estudiar la evolución de presuntos enlaces de hidrógeno (EdH) de acuerdo a criterios geométricos [306]. Si se tiene un presunto EdH D–H...A (D es el átomo dador de EdH y A es el átomo aceptor) se considera que el EdH está presente cuando la distancia entre D y A es *menor* que un valor de corte (por lo

general 3-4 Å), y el ángulo formado entre D, H y A es *mayor* que un valor de corte (por lo general 120-150°).

2.5. Descripción del solvente

2.5.1. Solvente explícito

Dado que las reacciones químicas de interés biológico ocurren en solución, es necesario describir, de alguna forma, al solvente. Una forma consiste en incluir explícitamente las moléculas del solvente en el sistema. Esto suele hacerse cuando se realizan cálculos MM (o QM/MM).

2.5.2. Solvente implícito

Cuando se realizan cálculos QM, resulta inviable describir explícitamente al solvente, por lo que es necesario modelarlo de forma implícita. Para ello se puede recurrir a un modelo continuo [308], en el que se considera al solvente como un medio polarizable con constante dieléctrica ϵ (cuyo valor puede ser uniforme o cambiar con la orientación y/o la posición respecto a los átomos del soluto) que rodea a una cavidad en la que se encuentra el soluto [309]. La energía libre de solvatación, ΔG_s , se calcula como:

$$\Delta G_s = \Delta G_{\text{cav}} + \Delta G_{\text{dr}} + \Delta G_{\text{el}} \quad (2.111)$$

donde ΔG_{cav} es el costo en energía libre asociado a generar la cavidad (componente de cavitación), ΔG_{dr} es la componente de dispersión-repulsión (interacciones de *van der Waals* y repulsión entre átomos del soluto y del solvente) y ΔG_{el} es la componente electrostática. Actualmente, para cálculos QM, el tipo de modelo de continuo más usado es el del *campo de reacción auto-consistente* (SCRF, del inglés *self consistent reaction field*) [248], en el que la interacción entre el solvente y el soluto se calcula iterativamente –el solvente polariza al soluto y viceversa. Dentro de los modelos SCRF, está el *modelo del continuo polarizable* en su implementación IEF (IEF-PCM) que se resuelve en forma analítica [310, 311], y en el que se construye una cavidad de forma adaptada al sistema molecular intersecando esferas centradas en las posiciones atómicas del soluto, generadas usando distintos tipos de radios (*e.g.* los radios de Van der Waals determinados experimentalmente por Bondi [312]) y se usa una descripción detallada del potencial electrostático y las componentes de

dispersión, repulsión y cavitación se parametrizan basándose en la superficie molecular.

2.6. Cálculo de termoquímica y cinética

2.6.1. Termodinámica estadística, colectivos, función de partición molecular

Los experimentos por lo general se realizan sobre muestras macroscópicas, por lo que resulta necesario conectar las propiedades del sistema corpuscular a nivel sub-microscópico con las de la muestra. Esta conexión la provee la *Termodinámica Estadística* (TE) [248]. Una vez que se determinan las condiciones del sistema (NVE, NVT, NPT) y el tipo de colectivo o *ensemble* que corresponde, el conocimiento de la *función de partición molecular*, q , permite llegar al cálculo de todas las propiedades macroscópicas, y se calcula:

$$q(N, V, T) = \sum_i^{\infty} e^{-\frac{\varepsilon_i}{k_B T}} \quad (2.112)$$

donde ε_i representa la energía de los estados del sistema molecular.

La entropía (molar, $n = 1$ mol) del sistema, S , se calcula como:

$$S = R \left[1 + \ln q + T \left(\frac{\partial \ln q}{\partial T} \right)_V \right] \quad (2.113)$$

La energía interna (molar, $n = 1$), E , se calcula:

$$E = RT^2 \left(\frac{\partial \ln q}{\partial T} \right)_V \quad (2.114)$$

La entalpía (molar, gas ideal), H , y la energía libre de Gibbs (molar), G , se calculan usando las formulas de la termodinámica clásica:

$$H = E + nRT \quad (2.115)$$

$$G = H - TS \quad (2.116)$$

2.6.2. La función de partición y la aproximación del gas ideal, rotor rígido y oscilador armónico

Entre las aproximaciones más populares empleadas en la química teórica y computacional para evaluar la energía molecular ε_i y a partir de allí la *función de partición molecular* q (según la **Ecuación 2.112**) se incluyen junto a la aproximación de Born-Oppenheimer otras aproximaciones tales como las del *gas ideal, rotor rígido y oscilador armónico* [248, 313], que permiten evaluar cada tipo de contribución energética molecular en forma sencilla. En condiciones de validez de la aproximación de Born-Oppenheimer y ausencia de acoplamiento vibro-rotacional, la energía de los estados moleculares puede escribirse como suma de términos de energía traslacional, ε_i^t , rotacional, ε_i^r , vibracional, ε_i^v , y electrónica, ε_i^e , y la función de partición puede escribirse como un producto de funciones de partición traslacional q_t , rotacional q_r , vibracional, q_v , y electrónica, q_e :

$$\varepsilon_i \approx \varepsilon_i^t + \varepsilon_i^r + \varepsilon_i^v + \varepsilon_i^e \quad (2.117)$$

$$q \approx q_t q_r q_v q_e \quad (2.118)$$

Teniendo en cuenta la aproximación del gas ideal, la función de partición traslacional y su derivada parcial respecto a la temperatura quedan:

$$q_t = \left(\frac{2\pi m k_B T}{h^2} \right)^{3/2} \frac{k_B T}{P} \quad (2.119)$$

$$\left(\frac{\partial \ln q_t}{\partial T} \right)_V = \frac{3}{2T}$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, m es la masa del sistema, h es la constante de Planck, T es la temperatura del sistema y V es el volumen del sistema.

Las contribuciones a la entropía y a la energía interna quedan:

$$S_t = R \left(\ln q_t + \frac{5}{2} \right) \quad (2.120)$$

$$E_t = \frac{3}{2} RT \quad (2.121)$$

Usando la aproximación del rotor rígido para una molécula no lineal, la función de partición rotacional y su derivada quedan:

$$q_r = \frac{\sqrt{\pi}}{\sigma} \left(\frac{8\pi^2 k_B T}{h^2} \right)^{3/2} \sqrt{I_x I_y I_z} \quad (2.122)$$

$$\left(\frac{\partial \ln q_r}{\partial T} \right)_V = \frac{3}{2T}$$

donde I_x , I_y e I_z son los momentos de inercia del sistema molecular en las direcciones x , y y z , y σ es un factor de simetría rotacional. Las contribuciones a la entropía y a la energía interna quedan:

$$S_r = R \left(\ln q_r + \frac{3}{2} \right) \quad (2.123)$$

$$E_r = \frac{3}{2} RT \quad (2.124)$$

Usando la aproximación del oscilador armónico, la función de partición vibracional se calcula como el producto de las funciones de partición de los modos normales vibracionales (los cuales se calculan a partir del hessiano):

$$q_v = \prod_k \frac{e^{-\frac{h\nu_k}{2k_B T}}}{1 - e^{-\frac{h\nu_k}{k_B T}}} \quad (2.125)$$

La derivada respecto a la temperatura queda como:

$$\left(\frac{\partial \ln q_v}{\partial T} \right)_V = T \left[\sum_k \frac{h\nu_k}{2k_B T^2} + \sum_k \frac{h\nu_k e^{-\frac{h\nu_k}{2k_B T}}}{k_B T^2 \left(1 - e^{-\frac{h\nu_k}{k_B T}} \right)} \right] \quad (2.126)$$

donde ν_k es la frecuencia vibracional del modo normal k .

Las contribuciones vibracionales a la entropía y a la energía interna se calculan como:

$$S_v = R \sum_k \left[\frac{h\nu_k}{k_B T \left(e^{\frac{h\nu_k}{k_B T}} - 1 \right)} - \ln \left(1 - e^{-\frac{h\nu_k}{k_B T}} \right) \right] \quad (2.127)$$

$$E_v = R \sum_k \frac{h\nu_k}{k_B T} \left[\frac{h\nu_k}{k_B T \left(e^{\frac{h\nu_k}{k_B T}} - 1 \right)} \right] \quad (2.128)$$

Considerando que a temperatura ambiente las moléculas se encuentran en su estado electrónico fundamental, función de partición electrónica es:

$$q_e = \omega_0 \quad (2.129)$$

donde ω_0 es la multiplicidad del sistema. La derivada respecto a la temperatura es cero por lo que la contribución electrónica a la energía interna es cero, y la contribución a la entropía es:

$$S_r = R \ln q_e \quad (2.130)$$

2.6.3. Teoría del estado de transición

La constante de velocidad de una reacción, k , es una propiedad macroscópica que puede ser vinculada con las propiedades microscópicas usando la *teoría del estado de transición* (TST, del inglés *transition state theory*) [314]. Esta teoría asume que, al evolucionar según una *coordenada de reacción* desde reactivos a productos pasando a través de una especie inestable, el *estado de transición* (TS), el sistema que reacciona se moverá clásicamente sobre el *camino de mínima energía* en la PES pudiendo haber efectos cuánticos sobre las *coordenadas transversales* a dicho camino. Esta teoría asume la separabilidad de la coordenada de reacción y las restantes coordenadas transversales y que el TS es un *cuello de botella dinámico*. Una vez que el sistema llega a dicha configuración no hay otra evolución posible que transformarse en productos, por lo tanto, no considera la posibilidad de que haya recruzamiento (*i.e.* trayectorias que una vez que llegan al TS en lugar de transformarse en productos regresan a la región de reactivos). La probabilidad de encontrar un estado a lo largo de ese camino sigue una *distribución de Boltzmann*.

En la formulación inicial de esta teoría, se asumió que el *estado de transición* está en cuasi-equilibrio con los reactivos (hipótesis que se demostró innecesaria en las formulaciones dinámicas más modernas de esta teoría), la *constante de velocidad*, k , se puede calcular como:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (2.131)$$

donde ΔG^\ddagger es la energía libre de activación, que se calcula a partir de las energías libres de los reactivos, G_R , y del estado de transición, G_{TS} :

$$\Delta G^\ddagger = G_{TS} - G_R \quad (2.132)$$

La **Ecuación 2.131** se conoce como *ecuación de Eyring-Polanyi* [315], y permite también (en su forma inversa) calcular *energías libres de activación* a partir de datos experimentales de constantes cinéticas y así comparar experimento y teoría:

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln \frac{kh}{k_B T} \quad (2.133)$$

2.7. Fundamentos de los métodos experimentales usados

2.7.1. Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía trata la interacción de la radiación electromagnética con las moléculas. En la espectroscopía de absorción, la muestra se irradia con un haz monocromático, y se mide la absorción neta, A :

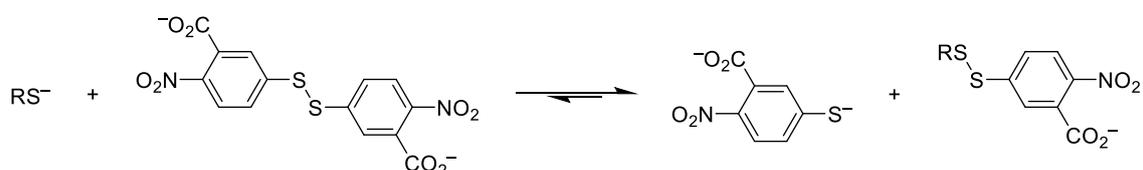
$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (2.134)$$

Donde I_0 es la intensidad del haz incidente e I es la intensidad transmitida. A nivel corpuscular, una molécula absorbe un fotón de energía $h\nu$ y experimenta una transición desde un estado molecular que corresponde a un nivel de energía inferior a otro superior. La espectroscopía infrarroja (IR) trata las transiciones vibracionales de las moléculas. Las moléculas poliatómicas presentan $3N-5$ o $3N-6$ (siendo N el número de átomos) modos normales de vibración independientes, los cuales

pueden corresponder a tensión de enlaces (*stretching*), flexiones de ángulos de enlace (*bending*) y diedros (*torsiones*), o una combinación de flexiones y tensiones característicos, que se reflejan cada uno en una única señal específica de esa transición en el espectro IR. Estos modos normales de vibración pueden ser activos o no en la espectroscopía IR, según que la transición vibracional considerada implique o no reorganización de carga neta en la molécula. Por ello la espectroscopía IR resulta útil para identificar –y cuantificar– grupos funcionales. En proteínas, el enlace S–H del grupo tiol es activo en el infrarrojo, absorbiendo en el rango de 2550 a 2620 cm^{-1} , presentando una señal muy débil [316-318]. En este trabajo de tesis, se usó esta técnica para verificar el estado de protonación del tiol de la HSA (**Capítulo 4**) y para seguir la formación de ácido sulfónico en la HSA (**Capítulo 7**).

2.7.2. Cuantificación de tioles

Como se mencionó anteriormente, los tioles pueden reaccionar con disulfuros. Uno de los posibles métodos para cuantificar tioles es el método de Ellman, que consiste en hacer reaccionar el tiol con 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) para dar 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) y un disulfuro mixto (**Esquema 2.2**) [319].



Esquema 2.2. Reacción de un tiolato con DTNB para dar TNB y un disulfuro mixto.

El TNB así formado es cuantificado por espectroscopía electrónica (UV-Visible) a 412 nm, longitud de onda a la que esta especie absorbe con un coeficiente de extinción de $14150 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en tanto el DTNB, el tiol y el disulfuro mixto no presentan absorción. Como el equilibrio en estas reacciones en general está desplazado hacia la derecha –salvo en el caso de tioles excepcionalmente ácidos– y se suele agregar un exceso de DTNB, se considera que la concentración inicial de tioles es prácticamente igual a la concentración de TNB medida. Otro método similar de cuantificación de tioles es el de la ditiopiridina (dtdpy), otro disulfuro que reacciona de forma más rápida con los tioles –incluso aquellos que son excepcionalmente ácidos– y de forma irreversible [319] formando un producto tiol 4-mercaptopiridina que tautomeriza a una tiona, la 4-tiopiridona. En este trabajo de tesis se usó el método de Ellman para cuantificar tioles de HSA (**Capítulos 4 a 8**).

2.7.3. Dependencia de la cinética de reacción con la temperatura

La *ecuación de Arrhenius* (Ecuación 2.134) vincula la constante de velocidad de la reacción, k , con la temperatura, T :

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (2.135)$$

donde E_a es la energía de activación de la reacción y A es un factor pre-exponencial característico de cada reacción. Transformando la **Ecuación 2.135** a su forma logarítmica, queda:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (2.136)$$

Graficando $\ln k$ en función de $1/T$ (gráfico de Arrhenius) se puede determinar los valores de E_a y A . La pendiente del gráfico corresponde a $-E_a/R$ mientras que la ordenada en el origen corresponde a $\ln A$. Este tipo de análisis se conoce como *análisis de Arrhenius*.

Transformando la *ecuación de Eyring-Polanyi* (**Ecuación 2.131**) y combinándola con la **Ecuación 2.116** se obtiene la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \ln k &= \ln \frac{k_B T}{h} - \frac{\Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} \\ \ln \frac{k}{T} &= \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} \end{aligned} \quad (2.137)$$

Donde ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger son la entalpía y la entropía de activación de la reacción, respectivamente. Graficando $\ln k/T$ en función de $1/T$ (gráfico de Eyring) se puede obtener el valor de ΔH^\ddagger a partir de la pendiente ($-\Delta H^\ddagger/R$) y el valor de ΔS^\ddagger a partir de la ordenada en el origen ($\Delta S^\ddagger/R + k_B/h$). Este tipo de análisis se conoce como *análisis de Eyring* y se aplicó en la determinación de la entalpía de la reacción del tiol de HSA con H_2O_2 presentada en el **Capítulo 5** de esta tesis.

2.7.4. Separación de isoformas de HSA a nivel del residuo Cys34

En los últimos años, se desarrolló un procedimiento cromatográfico (cromatoenfoco) para separar distintas isoformas de la HSA, de acuerdo a su punto

isoelectric (pI) [178]. Este procedimiento fue puesto a punto para separar isoformas de HSA oxidadas a nivel de Cys34 [320].

El procedimiento consiste en hacer pasar la HSA por una columna de intercambio aniónico débil, aplicando un gradiente de pH externo. Considerando que el pI de la HSA es de alrededor de ~ 4.9 , se aplica un gradiente de pH de negativo (disminuye el pH) partiendo de un pH de 5.35. Para ello se usa una mezcla de amortiguadores NH_4Ac 0.01 M, el amortiguador A (pH 5.35) y el amortiguador B (pH 3.95). Se comienza con 100 % de amortiguador A, y se aumenta el porcentaje de amortiguador B hasta llegar a 40 %, llegando a un pH aproximado de 8.3. Las isoformas eluirán según su pI, de mayor a menor, por lo que es posible separarlas. Esta técnica permite separar isoformas cuyos valores de pI difieren en 0.02.

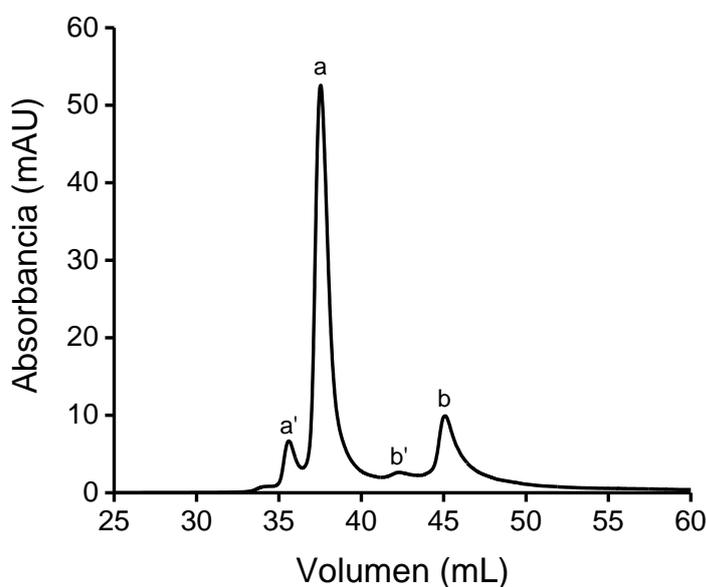


Figura 2.3. Cromatograma de HSA. El pico **a** corresponde a las isoformas HSA-SH, HSA-SOH y HSA-SX, mientras que el pico **b** corresponde a la isoforma HSA-SO₂H. Los picos **a'** y **b'** corresponden a HSA a la que le faltan los dos primeros residuos.

Dado que los ácidos sulfínicos son relativamente fuertes, se espera que la isoforma HSA-SO₂H eluya antes que las isoformas HSA-SH, HSA-SOH y HSA-SX. En un cromatograma típico de HSA tratada con H₂O₂ se observan dos picos importantes (**Figura 2.3**), uno que corresponde a las isoformas HSA-SH, HSA-SOH y HSA-SX (pico **a**) y otro que corresponde a la isoforma HSA-SO₂H (pico **b**), por lo que es posible cuantificar la formación de ácido sulfínico por este método. Los picos **a'** y **b'** son análogos a los picos **a** y **b**, pero corresponden a variantes de HSA a las que le faltan los dos primeros residuos.

En este trabajo de tesis se usó esta técnica para cuantificar el ácido sulfínico de la HSA, y el producto de decaimiento del ácido sulfénico (**Capítulo 6**).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

En este trabajo se plantea abordar mediante un conjunto de técnicas experimentales y de modelado computacional la reactividad del tiol en Cys34 y la estructura y dinámica del entorno local de la albúmina sérica humana (HSA) y de su derivado oxidado, el ácido sulfénico. Asimismo, se plantea estudiar la interacción entre la glicación de la HSA y la oxidación del tiol.

3.2. Objetivos específicos

1. Estudiar la estructura y dinámica del entorno local del residuo Cys34 en HSA libre cuando éste se encuentra en las formas tiol y tiolato, y evaluar la acidez del tiol.
2. Determinar los elementos que modulan la reactividad de Cys34 en HSA libre, elucidando aspectos del mecanismo y cinética de las reacciones de oxidación de este tiolato con peróxidos (H_2O_2 y $HOONO$).
3. Estudiar la estructura y dinámica del entorno local del residuo Cys34 en HSA oxidada a las formas ácido sulfénico y sulfenato, aportando indicios sobre cuál podría ser el producto del decaimiento espontáneo, y evaluar la acidez del ácido sulfénico.
4. Determinar los elementos que modulan la reactividad del sulfenato en Cys34 de HSA libre, elucidando aspectos del mecanismo y cinética de las reacciones de oxidación de este sulfenato con de la reacción del sulfenato de la HSA con H_2O_2 ,
5. Validar esquemas de modelado QM/MM sustractivo y aditivo en la descripción del mecanismo de la reacción de oxidación del derivado sulfénico de HSA libre con H_2O_2 .
6. Estudiar el efecto de la glicación de HSA por glucosa en Lys195 y por metilglioxal en Arg410 sobre el entorno y reactividad del tiol en Cys 34 de HSA.
7. Evaluar la influencia de la oxidación de Cys34 de HSA (en la forma de disulfuro mixto con Cys) sobre la tendencia a glicarse en residuos Arg y Lys.
8. Caracterizar en forma computacional-experimental el proceso reactivo entre MGO con el tiol en Cys34 de HSA libre.

4. El entorno local del tiol de la HSA

4.1. Antecedentes

Como ya fue mencionado en la **Sección 1.3.1**, con respecto al entorno del residuo Cys34 en HSA-S(H), se cuenta con información estructural previa proveniente de experimentos cristalográficos, que muestran que el S_{γ} de Cys34 se encuentra ubicado en un hendidura del dominio I de la HSA, cercano a las cadenas laterales de los residuos ionizables Tyr84, Asp38 e His39 [147]. Además, en la literatura hay estudios de cinética (a 10 °C) a diferentes valores de pH para la reacción de HSA-SH con DTNB usando las mutantes Tyr84Phe e His39Leu y la proteína nativa [181], donde se observa que a pH entre 6 y 8, la reacción en la mutante Tyr84Phe es aproximadamente 4 veces más rápida que en HSA nativa, mientras que en His39Leu la reacción es más lenta. Al aumentar el pH a 10.2, la reacción es 170 veces más rápida en Tyr84Phe, mientras que en His39Leu la reacción es tres veces más rápida. Asimismo, se observa que el pK_a del tiol en ambas mutantes es 0.5 unidades mayor que en HSA nativa. Los autores plantearon que la reactividad del tiolato se vería principalmente modulada por interacciones del átomo S_{γ} de Cys34 con el grupo OH η de Tyr84 y en menor proporción por His39, no quedando claro en qué estado de ionización estaría presente este último residuo (se presume neutro en el rango de valores de pH estudiados). No obstante lo anterior, y si bien se han realizado varios estudios de simulaciones MD de HSA abarcando escalas de tiempo que superan los 100 ns [321-323], no se cuenta hasta el momento con información estructural y dinámica detallada del entorno de Cys34 en HSA en solución, ya que ninguno de estos trabajos está centrado en estudiar el entorno de Cys34.

Por otro lado, tal como se mencionó en la **Sección 1.3.1** existe controversia sobre el estado de protonación del S_{γ} , con valores de pK_a reportados para el tiol de Cys34 en de entre 5.0 y 8.8 [156, 179-183], aunque los experimentos más recientes sugieren valores de pK_a de alrededor de 8.1 [185]. Sin embargo, en todos estos trabajos, el pK_a se estimó de forma indirecta, exceptuando los experimentos de titulación UV-visible, lo que da cierta robustez a dicho valor.

Debido a esto, en función del **Objetivo específico N.º 1**, se estudió mediante simulaciones MD la estructura y dinámica mayores a 100 ns (sub-microsegundo) del entorno del residuo Cys34 en HSA-S(H), y también se intentó determinar el pK_a del tiol de Cys34 en forma directa usando espectroscopía infrarroja.

4.2. Metodología

4.2.1. Dinámica molecular de HSA con el residuo Cys34 en las formas tiol y tiolato

Partiendo de una estructura cristalográfica de HSA sin ligandos ni modificaciones (PDB: 1A06, cadena A) [147] se construyeron dos sistemas, HSA con Cys34 tiol (HSA-SH) y con Cys34 tiolato (HSA-S⁻). Se determinó el estado de protonación a pH 7.4 de residuos ionizables –excepto Cys34– y la posición del átomo de H unido al de N imidazólico en residuos His usando el servidor H⁺⁺ [324]. Se agregaron los átomos de H y enlaces disulfuro faltantes, solvatando los sistemas con cajas octaédricas truncadas de agua, extendidas hasta 12 Å alrededor de la proteína. Se neutralizó con iones Na⁺ (14 para HSA-SH y 15 para HSA-S⁻) con el módulo *leap* del programa AMBER 14 [325]. Previo a las dinámicas de producción, ambos sistemas se minimizaron siguiendo un protocolo por etapas: 500 pasos *steepest descent* (SD) con un potencial armónico de 500 kcal mol⁻¹ Å⁻² sobre los átomos de la proteína, más 500 pasos SD y 500 pasos CG sin restricciones; luego se calentó a 310 K (*i.e.* 100 ps de MD clásica NVT, termostato de Langevin [326] con constantes de colisión y acoplamiento de T de 2 ps⁻¹ y 1.0 ps, respectivamente) y se equilibró la densidad de cada sistema a 1 atm (*i.e.* 1 ns de MD clásica NPT, termostato de Langevin con constantes de colisión y acoplamiento de T de 2 ps⁻¹ y 1.0 ps respectivamente, baróstato de Berendsen [298] con constante de acoplamiento de P de 1.0 ps). Las dinámicas de producción fueron simulaciones MD clásica de 200 ns en ensemble NPT, termostato de Berendsen [298] con constante de acoplamiento de temperatura de 10.0 ps, y el baróstato de Monte Carlo [302] con constante de acoplamiento de presión de 10.0 ps. Se usó el algoritmo SHAKE [327] para restringir enlaces y ángulos que involucran átomos de H y un paso de integración de 2 fs. Para las minimizaciones y MD se asignó el campo de fuerza AMBER *ff99SB* a los residuos de HSA y usaron los módulos *pmemd* y *pmemd.cuda* del programa AMBER 14, respectivamente. Las interacciones electrostáticas de larga distancia se trataron con el método *Particle Mesh Ewald* (PME) [305], *cutoff* de 8.0 Å. El análisis de trayectoria se realizó con el módulo *cpptraj* del programa AmberTools 15. Sobre los tramos convergidos de cada MD se realizó análisis de *clustering* con el algoritmo jerárquico-aglomerativo, agrupando las estructuras de cada sistema en 5 *clusters*, tomando como criterio de agrupamiento la desviación media cuadrática de los Ca

(C α -RMSD) de los residuos 1-100, extrayendo estructuras representativas de los *clusters* con mayor población.

4.2.2. Espectroscopia infrarroja (FT-IR) de HSA con Cys34 en estado reducido

Preparación de soluciones de HSA con Cys34 en estado reducido. Se usó HSA de Sigma-Aldrich, deslipidada por el método del carbón activado [328] y reducida por incubación con β -mercaptoetanol (10 mM) a T ambiente (t = 15 min.) y gel-filtrada en columnas PD10 (GE Healthcare) equilibradas con amortiguador de fuerza iónica constante (ácido acético 0.01 M; MES 0.01M; tris 0.02 M). Las muestras se concentraron por centrifugación a 12000 *g* usando concentradores VivaSpin 500 (GE Healthcare), obteniéndose una solución muy viscosa con concentración de HSA de 3.84 mM (determinada por absorbancia a 279 nm, $\epsilon = 32579 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, dilución 10:1000) y concentración de tioles de 3.54 mM (determinada por el método de Ellman [319] en amortiguador pirofosfato 0.1 M pH 9, dilución 20:1000, t = 5 min). El pH de la solución se determinó usando papel pH (pH \sim 7) y electrodo de pH en una dilución 1:10 de la muestra (pH 6.8). Como control, una alícuota de la solución concentrada se alcalinizó hasta pH 8.8 con NaOH.

Espectroscopía infrarroja de soluciones de HSA y glutatión. Se colocaron alícuotas de 50 μL de las muestras de HSA entre dos ventanas de CaF₂ sin separación. Se registraron espectros IR entre 2500 y 2600 cm^{-1} con un espectrofotómetro FT-IR Shimadzu IR Prestige 21. Para construir los espectros se acumularon 1000 interferogramas con 4 cm^{-1} de resolución. Como blanco se utilizó el amortiguador HAc/MES/tris usado para preparar las soluciones de HSA. Como control –espectro infrarrojo de un tiol de bajo peso molecular– se hizo lo mismo con una solución de glutatión 6 mM en agua. Los experimentos de FT-IR se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias (UdelaR) bajo supervisión de los Dres. Santiago Botasini y Eduardo Méndez.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Estructura y dinámica del entorno del residuo Cys34 de la HSA en las formas tiol y tiolato

Los valores de la desviación cuadrática media de las posiciones de los carbonos α (C α -RMSD) respecto al primer punto de la simulación se estabilizan a los 60 ns y a los 100 ns para las simulaciones de los sistemas HSA–SH y HSA–S⁻ respectivamente,

lo que indica que las trayectorias se estabilizan en dichos tiempos. Dado esto, sólo se analizó el tramo comprendido entre 100 y 200 ns para ambos sistemas (**Figura 4.1A**). Se observa que los valores de la fluctuación cuadrática media por residuo de las posiciones de los carbonos α ($C\alpha$ -RMSF) son bajos –salvo en la región C-terminal– para ambos sistemas (**Figura 4.1B**). Esto quiere decir que la estructura de la HSA es más bien rígida independientemente del estado de protonación de Cys34, con excepción de la región comprendida por los residuos 500-585 (región C-terminal del subdominio IIIB). Entrando en detalle, en HSA-S⁻ se observa una reducción en el $C\alpha$ -RMSF –por lo tanto, una reducción en la flexibilidad– del *loop* en el que se encuentra Cys34 y en la región comprendida por los residuos 80-140.

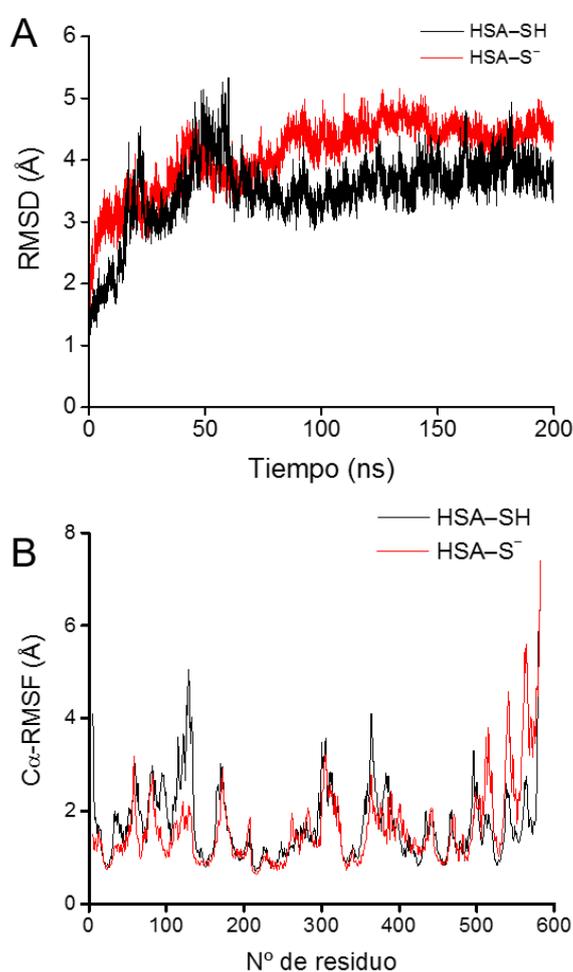


Figura 4.1. $C\alpha$ -RMSD de los sistemas HSA-SH y HSA-S⁻ a lo largo de la simulación (A); $C\alpha$ -RMSF de los sistemas HSA-SH y HSA-S⁻ en el intervalo comprendido entre 100 y 200 ns (B).

Del análisis de *clustering* de la trayectoria de HSA-SH (100-200 ns) se obtuvieron tres *clusters* con población significativa: c0 (45 %), c1 (32 %) y c2 (20 %). Las estructuras representativas de los *clusters* se muestran en la **Figura 4.2**. La

estructura representativa del *cluster* c0 corresponde a los intervalos en los que el átomo Sy se encuentra en posición de formar enlaces de hidrógeno (EdH) actuando como aceptor desde el grupo HO η de Tyr84, al mismo tiempo que se encuentra en posición de formar enlace de hidrógeno –esta vez como dador– con el carboxilato de Asp38, puentado por una molécula de agua. En los *clusters* c1 y c2 el EdH entre el Sy y el OH η de Tyr84 no se encuentra presente, pero el EdH entre el tiol y el carboxilato sigue presente, puentado por una (c1) y por dos (c2) moléculas de agua.

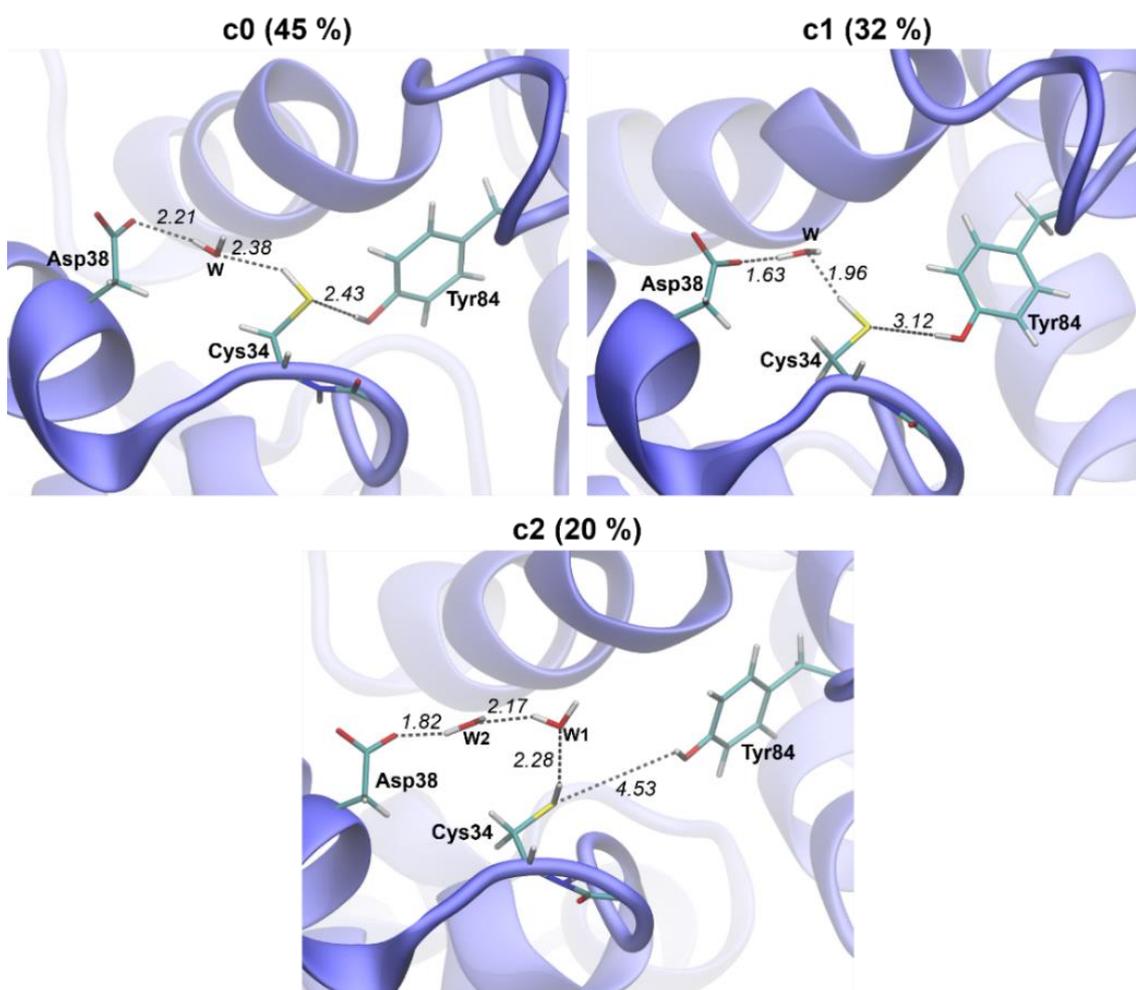


Figura 4.2. Estructuras representativas de los *clusters* con población apreciable de la simulación de HSA-SH en el tramo comprendido entre 100 y 200 ns.

Consistente con lo observado en las estructuras de los *clusters*, el análisis geométrico a lo largo de la trayectoria muestra que el EdH Cys34-Sy \cdots H-O η -Tyr84 se encuentra presente solamente durante un 19 % del tiempo, mientras que el EdH Cys34-Sy-H \cdots OH $_2$ se observa durante 64 % del mismo (**Tabla 4.1**). La presencia de esta última interacción en forma persistente plantea un posible camino para la desprotonación del tiol.

Tabla 4.1. Ocupación de presuntos EdH relevantes en el entorno de Cys34 durante el intervalo comprendido entre 100-200 ns de las simulaciones de HSA-S(H)

Enlace de hidrógeno ^a	Ocupación ^b
HSA-SH	
$S\gamma_{Cys34}\cdots H-O\eta_{Tyr84}$	19 %
$S\gamma_{Cys34}-H\cdots OH_2$	64 %
$S\gamma_{C34}\cdots H-OH'$	47 %
$S\gamma_{Cys34}-H\cdots O(H)-H'\cdots O\delta(1,2)_{Asp38}$	43 %
$N\epsilon_{His39}-H\cdots O=C_{Leu31}$	69 %
$N\epsilon_{His39}-H\cdots O=C_{Leu24}$	18 %
HSA-S⁻	
$S\gamma_{Cys34}\cdots H-O\eta_{Tyr84}$	86 %
$S\gamma_{Cys34}\cdots H-OH'$	381 %
$S\gamma_{Cys34}\cdots H-O-H'\cdots O\delta(1,2)_{Asp38}$	107 %
$N\epsilon_{His39}-H\cdots O=C_{Leu31}$	61 %
$N\epsilon_{His39}-H\cdots O=C_{Cys34}$	16 %

^a Criterio de corte de distancia D...A de 4 Å y de ángulo D-H...A de 120°. ^b La ocupación se define como el porcentaje del tiempo que la interacción está presente. Valores de más del 100 % indican interacciones con más de una molécula de agua.

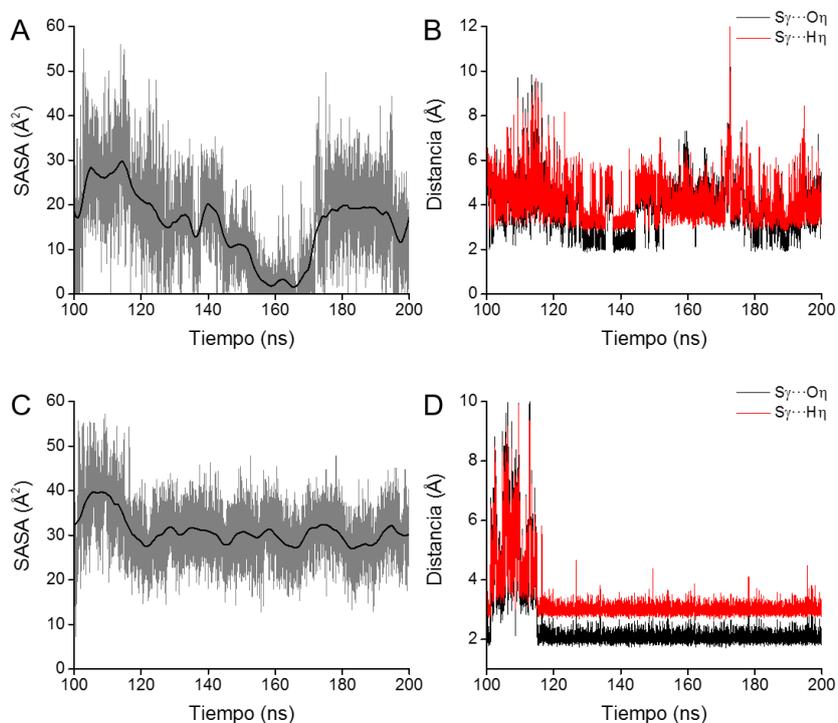


Figura 4.3. Evolución de la superficie expuesta al solvente del Sγ de Cys34 en los sistemas HSA-SH (A) y HSA-S⁻ (B). Evolución de las distancias $S\gamma_{Cys34}\cdots O\eta_{Tyr84}$ y $S\gamma_{Cys34}\cdots H\eta_{Tyr84}$ en los sistemas HSA-SH (C) y HSA-S⁻ (D).

Con respecto a la exposición al solvente, el $S\gamma$ de Cys34 presenta en HSA-SH valores de superficie de exposición al solvente (SASA) que varían a lo largo del tiempo (**Figura 4.3A**), habiendo intervalos en los que el átomo $S\gamma$ se encuentra moderadamente expuesto (valores de SASA promedio de 20-30 Å²) y otros en los que se encuentra oculto (valores de SASA promedio menores a 5 Å²), lo cual es consistente con la baja tendencia del grupo -SH a formar enlaces de hidrógeno fuertes, que tiene origen en la posibilidad de rotación del enlace $C\alpha-C\beta$ de Cys34 (**Figura 4.4**).

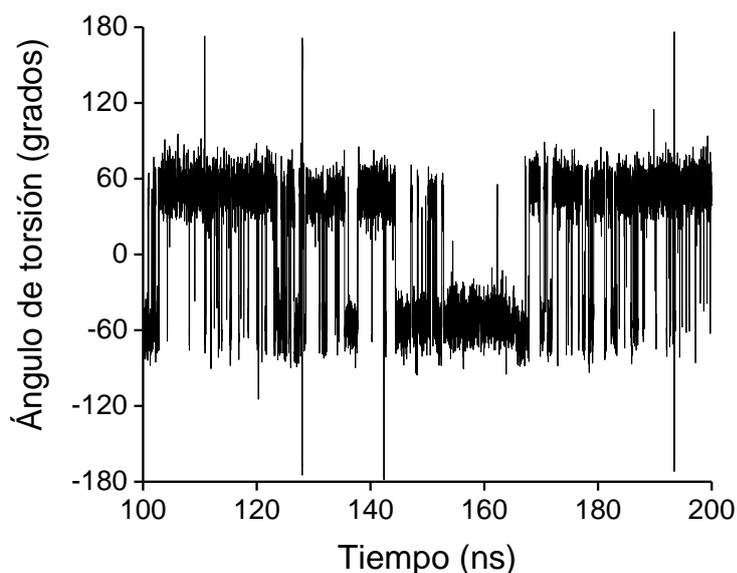


Figura 4.4. Evolución del ángulo torsional definido por el enlace $C\alpha-C\beta$ de Cys34 en el tramo comprendido entre 100 y 200 ns de la dinámica de HSA-SH.

En HSA-S⁻, el análisis estructural muestra un *cluster* (c0) principal, con una población de 68 %. La estructura representativa de c0 (**Figura 4.5A**) muestra que el átomo $S\gamma$ se encuentra formando EdH con el grupo $OH\eta$ de Tyr84, y con moléculas de agua, que actúan como puente con el carboxilato de Asp38 (W1 y W2) y con el carbonilo del *backbone* de Gln33 (W3). Asimismo, la estructura de c0 muestra que el $S\gamma$ se encuentra protegido en una hendidura (**Figura 4.5B**), lo que explicaría que no se observe la formación de dímeros HSA-SS-HSA. Esto también explicaría la observación de que frente a moléculas grandes como el DTNB, el tiol de Cys34 reacciona de forma lenta en comparación a tiolatos de bajo peso molecular [156, 329], debido al impedimento que representa tal ubicación para una aproximación adecuada al $S\gamma$. Siendo consistente con el análisis de *clustering*, el análisis de parámetros geométricos a lo largo de la trayectoria de la simulación muestra que el EdH Cys34- $S\gamma\cdots HO\eta$ -Tyr84 se encuentra presente el 86 % del tiempo y que el

átomo de Sy forma EdH con más de una molécula de agua durante el intervalo estudiado (**Tabla 4.1**). Respecto a la accesibilidad al solvente del Sy, superados los 115 ns de simulación de MD éste presenta un valor de exposición al solvente moderado (valores de SASA promedio de alrededor de 30 \AA^2 , **Figura 4.3C**) debido a la formación del enlace de hidrógeno con el OH η (**Figura 4.3D**).

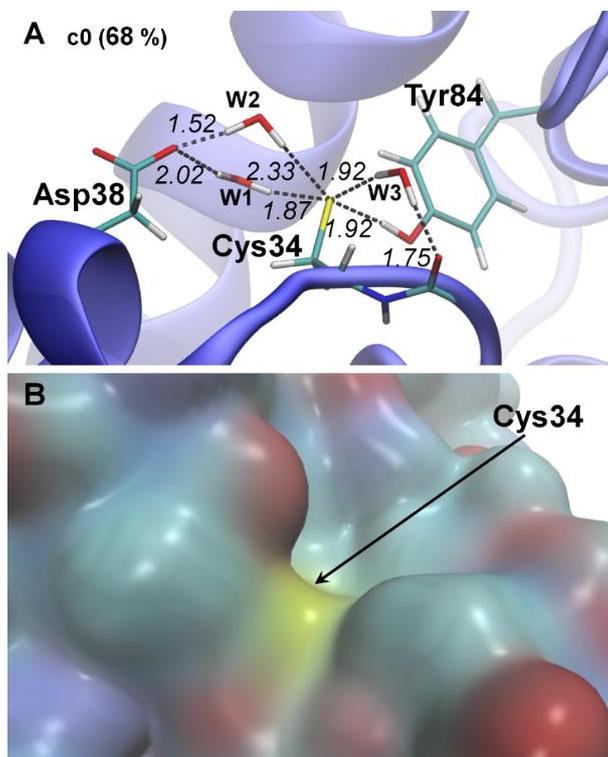


Figura 4.5. (A) Estructura representativa del entorno de Cys34 en HSA-S⁻ extraída del *cluster* mayoritario del análisis del tramo 100-200 ns de la simulación de MD. (B) Ubicación de Cys34 en la superficie molecular, coloreada por elemento.

Estos resultados sugieren que Tyr84 cumple un papel fundamental modulando la accesibilidad del tiolato a otras especies reactivas del medio, además de estabilizarlo. Esto es consistente con los experimentos de mutagénesis mencionados al abrir este capítulo, que ya se señaló dieron pie para considerar que Tyr84 tiene un rol fundamental en modular la reactividad y acidez de Cys34, dado que la mutación Tyr84Phe aumenta el pK_a de Cys34 y la reactividad del tiolato frente a DTNB [181]. Por otro lado, la carga negativa de Asp38 podría desestabilizar al tiolato, a menos que, como se plantea previamente en este capítulo a partir de los hallazgos estructurales, sea el destino del protón del tiol que lo neutraliza, en un camino de desprotonación de Cys34 mediado por una o dos moléculas de agua. En la albúmina sérica bovina (BSA), la posición de Asp38 la ocupa un glutamato [182], el cual es más flexible y puede alejarse del Sy. En BSA el pK_a de Cys34 es algo menor que en HSA.

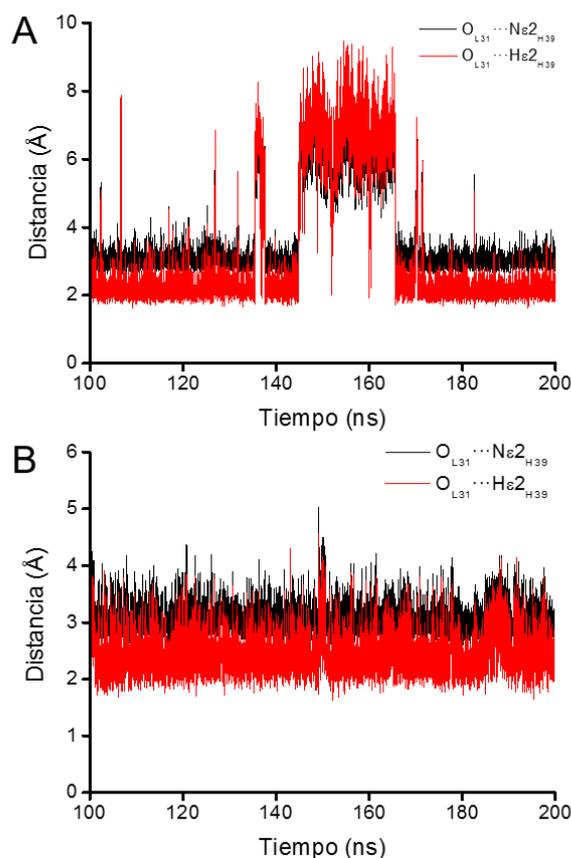


Figura 4.6. Evolución temporal de las distancias relevantes para un presunto EdH entre el NHε de His39 y el O carbonílico de Leu31 en los tramos de 100 a 200 ns de las dinámicas de HSA-SH (A) y HSA-S⁻ (B).

Con respecto al grupo imidazol de His39, del cual se había sugerido que podría tener un rol modulando las propiedades de Cys34 [181], a partir de los estudios de esta tesis, se llega a que el mismo parece tener un papel estructural tanto en HSA-SH como en HSA-S⁻, estableciendo EdH con el carbonilo del *backbone* de Leu31 (O_{Leu31}···H-Nε2_{His39}, **Figura 4.6, Tabla 4.1**) y estabilizando así el *loop* en el que se encuentra Cys34 entre dos α-hélices (una de ellas contiene a Asp38) y manteniendo a Asp38 en posición adecuada para formar parte de la red de EdH (que involucra 1-3 moléculas de agua) y pronto para recibir el protón del tiol. En tanto en HSA-S⁻ este EdH estructural entre His39 y el *backbone* de Leu31 está presente a lo largo de todo el tramo convergido de la simulación (y tiene una ocupación de 61 %) alterna en la función de enganche estableciendo también un EdH con el carbonilo de Cys34 (ocupación 16 %). En HSA-SH se aprecia que la interacción O_{Leu31}···H-Nε2_{His39} se interrumpe en el tramo comprendido entre 145 y 165 ns, durante el cual el grupo imidazol de His39 se encuentra formando EdH con el carbonilo de Leu24 (ocupación 18%, **Tabla 4.1**).

4.3.2. Espectroscopía infrarroja del tiol de la HSA

En el espectro infrarrojo de la HSA a pH ~ 7 (**Figura 4.7A**), específicamente en la derivada segunda de la absorbancia respecto al número de onda, se encontró una señal a 2553 cm^{-1} (**Figura 4.7B**), la cual fue asignada al estiramiento del enlace S–H del tiol de Cys34, teniendo en cuenta datos reportados en proteínas, incluyendo HSA [316-318] así como el espectro infrarrojo de glutatión a pH 7.4 (**Figura 4.8**). En un control de HSA a pH 8.8 (**Figura 4.7C**) no se observó dicha señal.

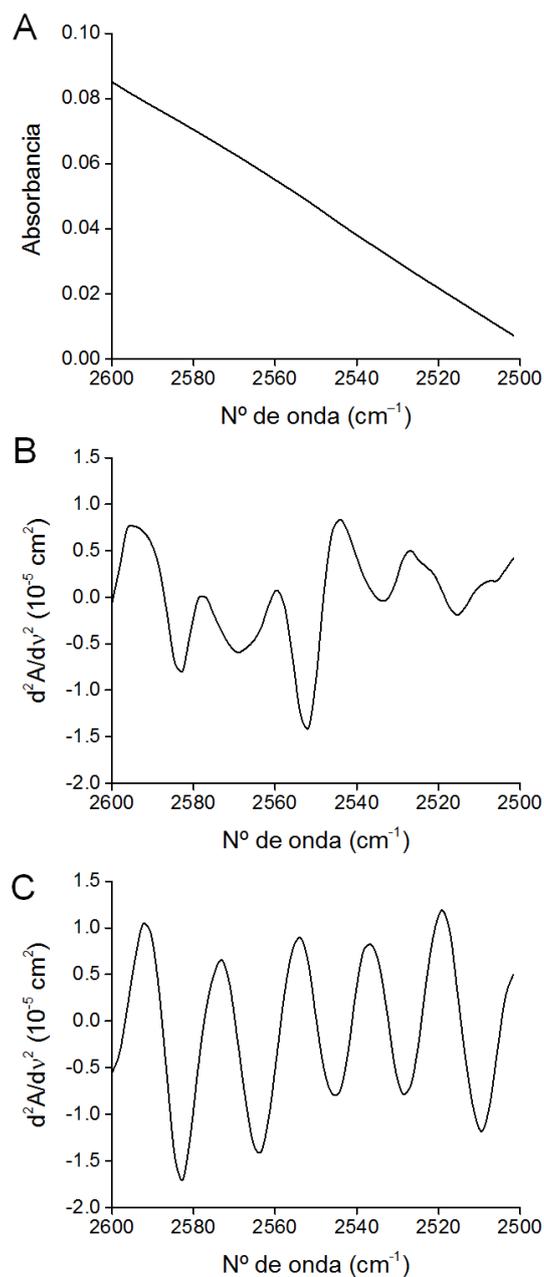


Figura 4.7. Espectro infrarrojo de HSA–SH 3.54 mM (RSH) en amortiguador HAc/MES/tris 0.01/0.01/0.02 M pH ~ 7 (A). Derivada segunda del espectro infrarrojo de HSA–SH a pH ~ 7 (B) y a pH ~ 8.8 (C).

No obstante, no se pudo obtener datos cuantitativos precisos, debido a varios factores tales como la baja intensidad de la banda del estiramiento S-H –que además llevó a que se usaran muestras de HSA muy concentradas, por lo tanto, viscosas y difíciles de manejar–, el ruido característico de los espectros infrarrojos en solución acuosa, la imposibilidad de medir el pH de manera precisa –debido a la viscosidad– y a que no se pudo usar un paso óptico constante. Sin embargo, estos resultados son consistentes con experimentos de reactividad del tiol frente a H_2O_2 dependiente del pH y titulación por espectroscopía UV-visible que sugieren un valor de pK_a de 8.1 para el tiol de la HSA [185] y que fueron realizados en el *Laboratorio de Enzimología* (Facultad de Ciencias, Universidad de la República) en forma previa a los estudios de esta tesis.

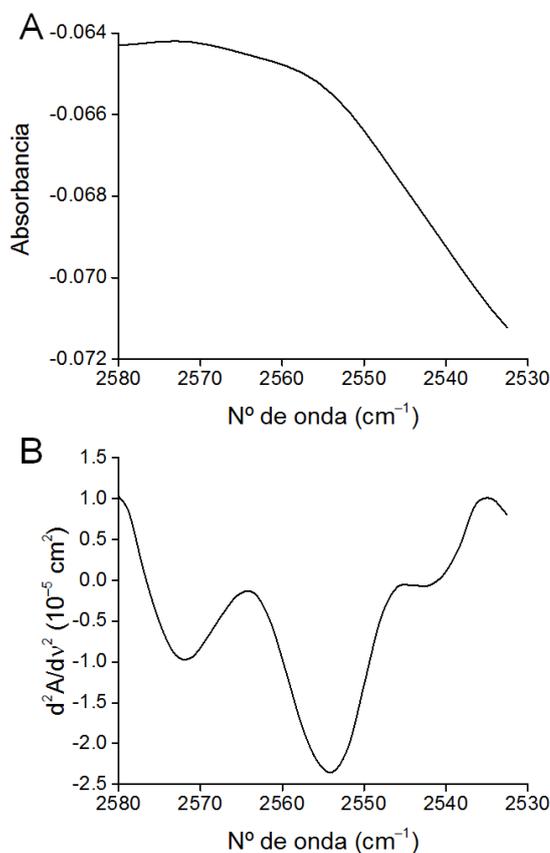


Figura 4.8. Espectro infrarrojo de glutatión 6 mM en agua (A) y derivada segunda de la absorbancia respecto al número de onda (B).

4.4. Conclusiones

En esta sección se presentaron los resultados del abordaje del estudio del entorno de Cys34 en las formas tiol (HSA-SH) y tiolato (HSA-S⁻) desarrollado mediante simulaciones de dinámica molecular y experimentos de espectroscopía infrarroja del tiol de la HSA.

Con respecto a HSA-SH, se determinó que el grupo SHy se encuentra próximo a los residuos Tyr84 y Asp38 y levemente expuesto al solvente. Durante la mayor parte del tiempo, el grupo tiol establece EdH con moléculas de agua presentes en la hendidura que lo alberga que con alta frecuencia actúan como puentes entre el SH y el carboxilato de Asp38, proporcionando un camino para la desprotonación aún dentro del entorno protegido y poco accesible en que se encuentra este tiol. En HSA-S⁻, se observa que el tiolato se encuentra moderadamente expuesto al solvente, formando EdH con el hidroxilo de Tyr84 (el cual se presume modula reactividad y basicidad del tiolato) y con moléculas de agua que lo estabilizan interactuando con el *backbone* de Gln33 y el carboxilato de Asp38. Por otro lado, si bien His39 no establece interacciones directas con el tiol(ato), tiene un papel estructural estabilizando el *loop* donde se ubica Cys34.

De la espectroscopía infrarroja, si bien no se pudo obtener resultados cuantitativos, sí se puede decir que Cys34 a pH 7 se encuentra fundamentalmente en la forma tiol, mientras que a pH 8.8 se encuentra en la forma tiolato.

Todos estos resultados ayudan a comprender en profundidad la estructura y dinámica del entorno de Cys34 en las formas tiol y tiolato, y explican y apoyan resultados experimentales previos que sugieren un pK_a de 8.1 para el tiol de la HSA.

5. Oxidación del tiol de la HSA por peróxidos

5.1. Antecedentes

Como se mencionó en la **Sección 1.1.3**, se cuenta con numerosos estudios de modelado de la reacción de tiolatos, tanto de bajo peso molecular como proteicos, con peróxidos. En líneas generales los mismos sugieren que estas reacciones siguen un mecanismo tipo S_N2 . En el caso particular de la reacción con H_2O_2 se han reportado cálculos de trayectorias a partir de simulaciones QM/MM o bien de caminos de reacción IRC determinados a nivel QM para este tipo de procesos donde ha sido puesta en evidencia –con mayor o menor atención a discutir origen e implicancias de este fenómeno– la presencia de *transferencias protónicas post-estado de transición* entre el ácido sulfénico formado tras la sustitución nucleofílica y el grupo hidroxilo saliente como parte del mecanismo global de estos procesos [36-39, 41]. En general, como resultado combinado de la reacción S_N2 y esas transferencias protónicas, se suele llegar a obtener agua y sulfenatos como productos. Para el caso particular de la enzima peroxirredoxina 5 (Prdx5) se ha aportado por su parte evidencia acerca de una segunda transferencia protónica que ocurriría desde el grupo guanidinio de un residuo Arg127 altamente conservado en el sitio activo hacia el sulfenato resultante de la primera transferencia protónica, formando finalmente un ácido sulfénico y un grupo guanidino [38]. Por su parte, cuando el peróxido es el ácido peroxinitroso (HOONO) en la reacción con cisteína libre no se observa la transferencia protónica, y los productos son ácido sulfénico y NO_2^- [40].

En esta parte de los estudios de la tesis, en función del **Objetivo específico N.º 2**, se modeló a nivel QM/MM la reacción de oxidación del tiolato de Cys34 de HSA por dos hidroperóxidos diferentes: H_2O_2 y ácido peroxinitroso, teniendo especialmente en cuenta el entorno cercano a Cys34. También se realizó para la reacción con H_2O_2 un estudio cinético a distintas temperaturas.

5.2. Metodología

5.2.1. Preparación de los sistemas reactivos QM/MM

Los complejos iniciales HSA- H_2O_2 y HSA-HOONO se construyeron a partir de la estructura representativa del *cluster* más poblado en la simulación MD de HSA-S⁻. Se eliminaron moléculas de agua e iones Na^+ y por *docking manual* se colocó una molécula de H_2O_2 o HOONO en posición de formar EdH con el átomo S_γ de Cys34.

Se solvató con una caja octaédrica de agua TIP3P extendida hasta 12 Å alrededor de la proteína, neutralizando con 15 iones Na⁺ con la utilidad *leap* de AMBER 14 [325]. Luego, se minimizó la energía de cada sistema (10000 pasos SD aplicando restricciones sobre la proteína y H₂O₂/HOONO y 5000 pasos SD seguidos de 5000 pasos CG del sistema sin restricciones) usando el módulo *pmemd* de AMBER 14. Se describieron los residuos estándar de HSA con el campo de fuerza *ff99SB*, mientras que el H₂O₂ y el HOONO se describieron con el campo de fuerza *gaff* y sus cargas MM se determinaron usando el procedimiento RESP [277].

5.2.2. Cálculos QM/MM

Para modelar la reacción a nivel QM/MM, se utilizó el método ONIOM(QM:MM) implementado en Gaussian 09 [330]. La región QM está comprendida por Cys34 y Pro35 completos, *backbone* de Gln33, cadena lateral de Tyr84 y cuatro moléculas de agua cercanas, junto a H₂O₂ en HSA-H₂O₂ (o residuos Cys34 y Pro35, *backbone* de Gln33, cadena lateral de Tyr84 y tres moléculas de agua cercanas junto a HOONO en HSA-HOONO) y la región MM comprende el resto del sistema. Se eliminaron las moléculas de agua ubicadas a más de 12 Å de cualquier átomo QM. Se optimizaron parcialmente con el *algoritmo* de Schlegel [288] las estructuras de reactivos (RC), estado de transición (TS) y productos (PC) al nivel ONIOM-ME (B3LYP/6-31+G(d):AMBER96) flexibilizando únicamente la posición de los átomos de la región QM y residuos con átomos ubicados hasta 8 Å de los primeros. La naturaleza de las especies se verificó por análisis de valores propios del hessiano analítico. La termoquímica a 298 K y 1 atm se calculó mediante el análisis de modos normales de vibración, usando aproximaciones usuales de la termodinámica estadística. Para conectar el TS con RC y PC se calculó el *camino de reacción* IRC [292] usando el algoritmo EulerPC [296]. Dado que el *acoplamiento QM-MM* se evalúa aquí a nivel MM, las cargas parciales de los átomos de la región QM se actualizaron (calculadas con el procedimiento RESP [277]), y se optimizó la geometría nuevamente. Para mejorar la estimación energética, se aplicaron cálculos *single-point* ONIOM-EE(MP2/6-311++G(3df,2p):AMBER96) sobre las estructuras optimizadas. Asimismo, para estudiar cambios sobre la densidad electrónica y evaluar el grado de asincronía de los procesos involucrados en la reacción en el TS, se obtuvieron *cargas atómicas* NPA e *índices de enlace de Wiberg* (WBI) a partir de un análisis de *orbitales naturales de enlace* NBO realizado a nivel *single-point* B3LYP/6-31+G(d) sobre el sistema modelo con los enlaces de frontera cerrados con átomos de enlace

(hidrógeno). El grado de avance de la reacción, X , se calculó usando la **Ecuación 5.1** [331]:

$$X = \frac{B_{TS} - B_{RC}}{B_{PC} - B_{RC}} \quad (5.1)$$

Donde B_{TS} , B_{RC} y B_{PC} son los índices de enlace WBI para TS, RC y PC, respectivamente.

5.2.3. Cinética de la reacción de HSA-S⁻ con H₂O₂

Se incubó HSA reducida y deslipidada (0.173-0.238 mM; 0.100-0.190 mM RSH) con H₂O₂ (2.22 mM) en amortiguador fosfato (0.05 M, pH 7.4, 0.1 mM dtpa) a distintas temperaturas (25, 30, 35 °C). Se tomaron alícuotas a intervalos de tiempo crecientes, se detuvo la reacción con catalasa (actividad 0.46 s⁻¹ [332], suficiente para descomponer 90 % del H₂O₂ en 5 s) y se midieron las concentraciones de tioles usando el método de Ellman y a partir de éstas se determinaron las constantes de velocidad de *pseudo-primer orden*, k_{obs} . Las *constantes de velocidad de segundo orden independientes del pH*, k , se calcularon asumiendo un valor de pK_a de 8.1 para HSA-SH:

$$k = \frac{k_{obs}}{[H_2O_2]} \cdot \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (5.2)$$

A partir de los valores de k se realizaron *análisis de Arrhenius* y *de Eyring* para determinar los valores de la entalpía, ΔH^\ddagger , y entropía, ΔS^\ddagger , de activación.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Reacción del tiolato de la HSA con H₂O₂

La reacción ocurre a través de un mecanismo S_N2, con un estado de transición lineal (TS, **Figura 5.1**) que involucra la formación del enlace S γ -O_{prox} y la ruptura del enlace O_{prox}-O_{dist}. Se trata de un proceso ligeramente asíncrono a nivel del TS, ya que la ruptura del enlace O_{prox}-O_{dist} se encuentra ligeramente más avanzada ($X = 0.49$) que la formación del enlace S γ -O_{prox} ($X = 0.40$), como muestran los índices de enlace de Wiberg para dichos pares de átomos (**Tabla 5.1**).

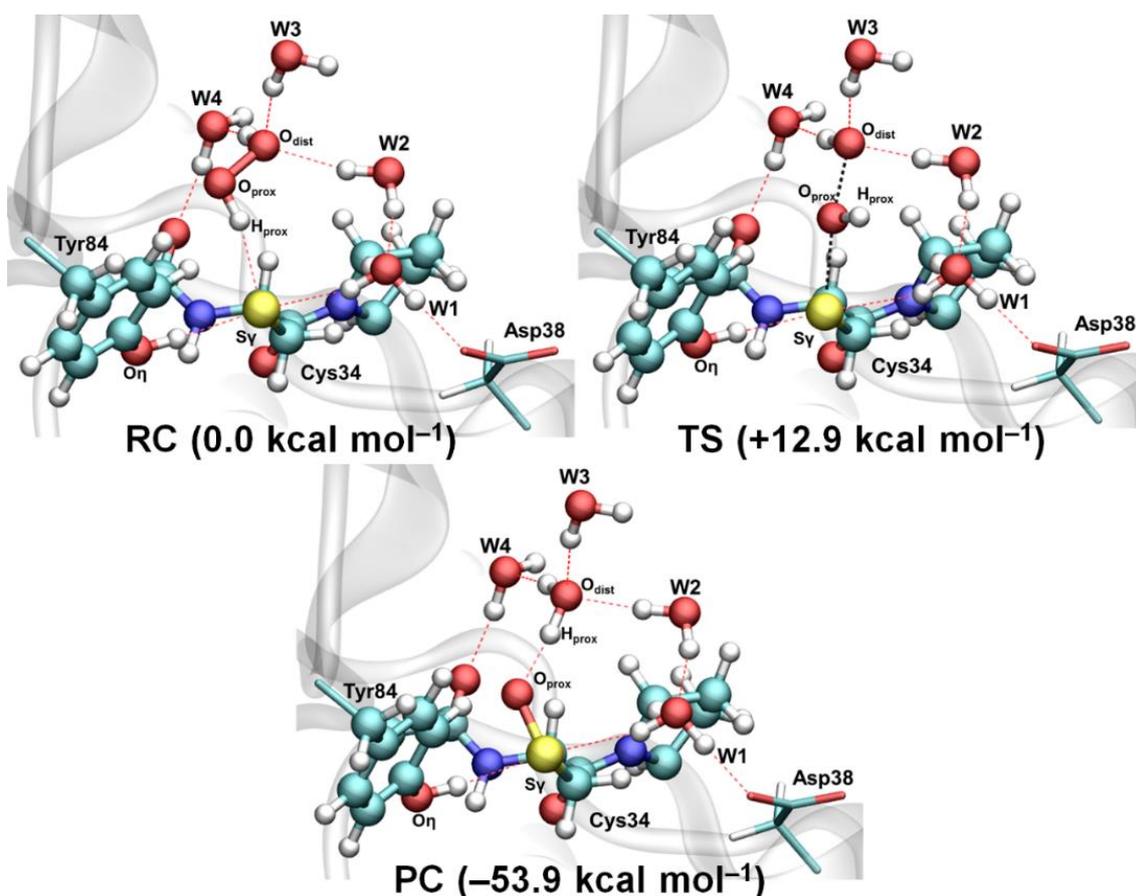


Figura 5.1. Estructuras del entorno de Cys34 y el H_2O_2 en los puntos estacionarios (RC, TS, PC) de la reacción de HSA-S⁻ con H_2O_2 optimizadas al nivel de teoría ONIOM-ME(B3LYP/6-31+G(d):AMBER96). Los valores entre paréntesis corresponden a entalpías a 298 K calculadas al nivel ONIOM-EE-(MP2/6-311++G(3df,2p):AMBER96)// ONIOM-ME(B3LYP/6-31+G(d):AMBER96).

Respecto a la red de EdH, a nivel del TS se pierde el enlace de hidrógeno establecido entre los átomos de H_{prox} y S_γ , que está presente en RC, mientras que la fuerza del resto de los enlaces de hidrógeno que involucran al tiolato en S_γ y/o a la molécula de H_2O_2 varía de forma poco significativa, como muestran los índices de enlace de Wiberg correspondientes (**Tabla 5.1**).

Es de resaltar que se observa la presencia de un hombro en el perfil energético analizado a lo largo del camino de reacción IRC (**Figura 5.2A**). El mismo está asociado a una transferencia protónica post-estado de transición de O_{prox} a O_{dist} , según muestra la evolución de las distancias $\text{O}_{\text{prox}}\cdots\text{H}_{\text{prox}}$ y $\text{H}_{\text{prox}}\cdots\text{O}_{\text{dist}}$ a lo largo del mismo (**Figura 5.2B**), por lo que los productos de esta reacción con HSA son sulfenato y agua (PC, **Figura 5.1**) en lugar de ácido sulfénico y anión hidróxido como se determinó previamente en nuestro grupo para el caso de la peroxirredoxina Prdx5 [38]. El comportamiento del tiol de HSA es en este sentido similar a lo que muestran

trabajos previos de modelado de la reacción de tioles de bajo peso molecular con H_2O_2 [36, 37, 39], lo cual es consistente con que el anión hidróxido es una base fuerte ($\text{p}K_a = 15.7$), mientras que los sulfenatos son bases relativamente débiles ($\text{p}K_a = 7.5$ en el caso de cisteínsulfenato [42]).

Tabla 5.1. Distancias (\AA)^a e índices de enlace de Wiberg (a.u., en negrita)^b de pares de átomos seleccionados para los puntos estacionarios de la reacción entre HSA-S⁻ y H_2O_2 .

Par atómico	RC	TS	PC
<i>Coordenada de reacción</i>			
S γ -O _{prox}	3.17/ 0.039	2.27/ 0.459	1.61/ 1.085
O _{prox} -O _{dist}	1.46/ 1.005	1.84/ 0.529	2.63/ 0.031
<i>Enlaces de H</i>			
S γ ···H _{prox}	2.19/ 0.124	2.42/ 0.004	2.90/ 0.004
S γ ···H η_{Tyr84}	2.14/ 0.139	2.15/ 0.125	2.22/ 0.108
S γ ···H _{W1}	2.32/ 0.080	2.50/ 0.047	2.47/ 0.066
O _{dist} ···H _{W2}	2.05/ 0.031	1.78/ 0.074	1.84/ 0.060
O _{dist} ···H _{W3}	1.95/ 0.037	1.79/ 0.063	1.84/ 0.052
H _{dist} ···O _{W4}	1.79/ 0.072	2.02/ 0.032	1.95/ 0.041
O _{W1} ···H' _{W2}	1.92/ 0.039	2.21/ 0.014	2.03/ 0.025
H' _{W4} ···O _{Gln33}	1.79/ 0.051	1.83/ 0.041	1.83/ 0.042
H' _{W1} ···O δ_{Asp38}	1.68 ^c	1.61 ^c	1.65 ^c

^a Al nivel ONIOM-ME(B3LYP/6/31+G(d):Amber96). ^b Sobre la región QM al nivel B3LYP/6-31+G(d) ^c WBI no calculado debido a que Asp38 se ubica en la región MM.

De manera similar a lo que se observa en la enzima Prdx5 [38], se observa un aumento en la nucleofilia del tiolato de HSA hasta llegar a un máximo en el punto del IRC donde la *coordenada de reacción* vale -3.0 Bohr, disminuyendo posteriormente hasta llegar al TS (**Figura 5.2C**).

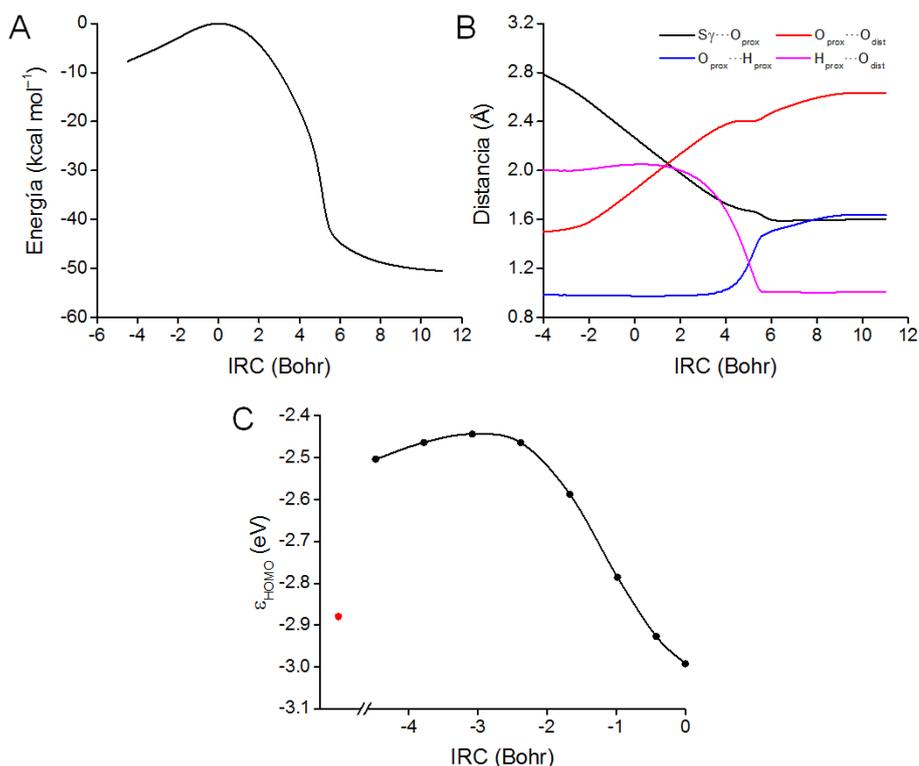


Figura 5.2. Evolución de la energía ONIOM (A), de los parámetros estructurales relevantes (B) y de la nucleofilia del tiolato de Cys34 (C), dada por ϵ_{HOMO} , a lo largo del camino de reacción IRC calculado al nivel ONIOM-ME(B3LYP/6-31+G(d):AMBER96) para la reacción de HSA-S⁻ con H₂O₂.

Con respecto a las barreras de activación, los valores calculados para ΔH^\ddagger y ΔG^\ddagger de la reacción con HSA son 12.9 y 14.2 kcal mol⁻¹, respectivamente, lo que indica que la misma tiene un costo entrópico asociado ($-T\Delta S^\ddagger$) de 1.3 kcal mol⁻¹, que posiblemente se deba al ordenamiento de las moléculas de agua en el sitio de reacción. Paralelamente se realizó el estudio experimental de la cinética de la reacción a distintas temperaturas. Del *análisis de Arrhenius* (**Figura 5.3**) se obtiene un valor de *energía de activación*, E_a , de 13.1 ± 1.3 kcal mol⁻¹, que se traduce en un valor de ΔH^\ddagger de 13.7 ± 1.3 kcal mol⁻¹ a 298 K, por lo que los valores provenientes del modelado y el experimento son consistentes entre sí (la diferencia es de apenas 0.8 kcal mol⁻¹).

Del *análisis de Eyring* (**Figura 5.3**, inserto) se obtiene un valor de ΔS^\ddagger de -11.3 ± 4.3 cal mol⁻¹ K⁻¹, que se traduce en un costo entrópico de 3.4 ± 1.3 kcal mol⁻¹ a 298 K, llevando a un valor de ΔG^\ddagger de 17.1 ± 1.8 kcal mol⁻¹. En este caso el valor calculado se desvía del valor experimental en mayor medida (2.9 kcal mol⁻¹) pero corresponde señalar que la determinación experimental de ΔS^\ddagger es más propensa a acumular un error mayor, porque depende de los valores de la k independiente del pH (el de ΔH^\ddagger

se puede obtener a partir de valores de k_{obs}) y además se obtiene extrapolando a $1/T = 0$. De todas formas, el signo de ΔS^\ddagger es consistente con el obtenido para la misma magnitud evaluada por modelado computacional, marcando una coincidencia semi-cuantitativa entre teoría y experimento.

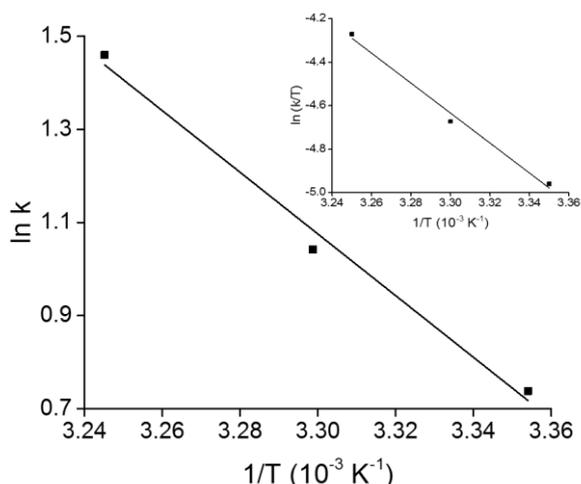


Figura 5.3. Gráficos de Arrhenius y de Eyring (inserto) para la reacción entre HSA-SH (0.173-0.238 mM; 0.100-0.190 mM RSH) y H_2O_2 (2.22 mM) a 25, 30 y 35 °C. Los símbolos corresponden a los promedios de $\ln k$ determinados en 4-5 experimentos independientes. Las constantes k fueron determinadas siguiendo la reacción (en amortiguador fosfato 0.05 M pH 7.4) por la disminución en la concentración de tioles y asumiendo un valor de $\text{p}K_a$ de 8.1 para HSA-SH.

Con respecto a la redistribución de densidad electrónica (**Tabla 5.2**), a nivel del TS se observan cambios importantes de dirección opuesta sobre O_{dist} ($\Delta q = -0.263$ a.u.) que aumenta y sobre el S_γ ($\Delta q = +0.372$ a.u.) que disminuye. También se observa un aumento de menor magnitud ($\Delta q = -0.118$ a.u.) sobre O_{prox} . Fenómenos similares se observan en tiolatos de bajo peso molecular y proteicos [38, 39, 41].

Tabla 5.2. Cargas atómicas NPA (a.u.) sobre átomos seleccionados para los puntos estacionarios de la reacción de HSA-S⁻ con H_2O_2 , calculadas sobre la región QM al nivel B3LYP/6-31+G(d).

Átomo	RC	TS	PC
S_γ	-0.564	-0.192	+0.454
O_{prox}	-0.517	-0.645	-1.032
O_{dist}	-0.580	-0.843	-1.085
H_{prox}	+0.486	+0.513	+0.536

Resumiendo, a grandes rasgos, la reactividad del tiolato de la HSA es similar a la de los tiolatos de bajo peso molecular, principalmente debido a la falta de características de sitio activo que tiene el entorno de Cys34 para estabilizar

diferencialmente al TS. En enzimas especializadas para catalizar esta reacción (*i.e.* peroxirredoxinas como Prdx5), el sitio activo presenta un residuo de Thr y un residuo Arg altamente conservados [333]. En las peroxirredoxinas, el grupo guanidinio del residuo Arg conservado interactúa con el H₂O₂ mediante enlaces de hidrógeno, y la carga positiva del primero, estabilizaría diferencialmente al TS, que concentra mayor densidad electrónica en O_{dist} [38, 41]. Por otro lado, en Prdx5, el H_{prox} se encuentra formando EdH con el residuo Thr44 en lugar de hacerlo directamente con el S_γ, y dicho EdH se encuentra presente aún en el TS, lo cual no sucede en HSA. Más aún, el modelado ONIOM(QM:MM) de la reacción correspondiente en una Prdx5 mutante Thr44Val, muestra un aumento en la energía libre de activación y EdH entre el H₂O₂ y el tiolato (S. Portillo-Ledesma y E. L. Coitiño, comunicación personal, sin publicar) en forma consistente con el comportamiento cinético determinado experimentalmente para la misma [38]. El entorno de Cys34 en la HSA no presenta las características típicas de los sitios activos en proteínas eficientes frente a la reducción de H₂O₂, molécula que llega a un sitio de reacción bastante ordenado en la hendidura alrededor del tiolato (que está protegido por una red de EdH con moléculas de agua que puentean con Asp38 y una interacción directa con Tyr84) y forma EdH solamente con moléculas de agua y el S_γ de Cys34. Estos aspectos podrían explicar por qué las peroxirredoxinas son tan eficientes y el tiol de la HSA se comporta como un tiol ordinario.

5.3.2. Reacción del tiolato de la HSA con ácido peroxinitroso

Al igual que la reacción con H₂O₂, la reacción ocurre a través de un mecanismo S_N2, con un estado de transición lineal (TS, **Figura 5.4**) e involucra la formación del enlace S_γ-O_{prox} y la ruptura del enlace O_{prox}-O_{dist}. La reacción es asíncrona a nivel del TS, estando más avanzada la ruptura del enlace O_{prox}-O_{dist} que la formación del enlace S_γ-O_{prox}, como muestran los índices de enlace de Wiberg para dichos pares de átomos (**Tabla 5.3**). También se observan durante la reacción el fortalecimiento del enlace O_{dist}-N y el debilitamiento del enlace N-O_{NO}. No se observa transferencia protónica post-TS, a diferencia de lo que ocurre en la reacción análoga con H₂O₂, por lo que los productos son ácido sulfénico y nitrito (**Figura 5.4**), similar a lo observado en la reacción de cisteína con HOONO. Esta diferencia probablemente se deba a que a diferencia del ion hidróxido, el nitrito (pK_a = 3.3) probablemente sea una base mucho más débil que los sulfenatos (pK_a = 7.5 para el ácido cisteinsulfénico).

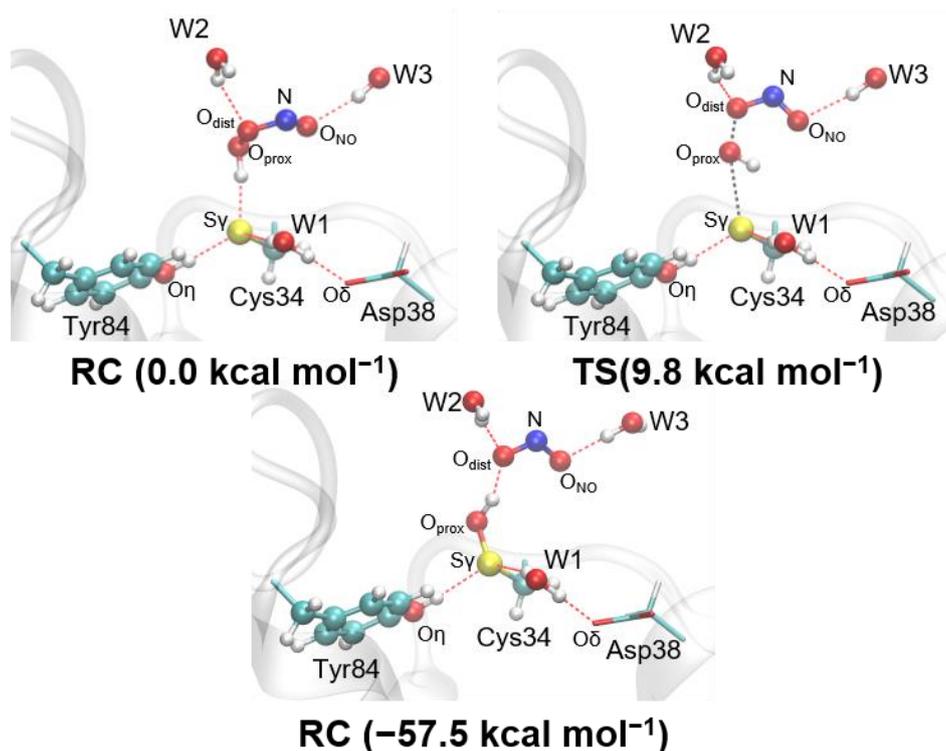


Figura 5.4. Estructuras del entorno de Cys34 y el HOONO en los puntos estacionarios (RC, TS, PC) de la reacción de HSA-S⁻ con HOONO optimizadas al nivel de teoría ONIOM-ME(B3LYP/6-31+G(d):AMBER96). Los valores entre paréntesis corresponden a entalpías a 298 K calculadas al nivel ONIOM-EE-(MP2/6-311++G(3df,2p):AMBER96)// ONIOM-ME(B3LYP/6-31+G(d):AMBER96).

Respecto a la red de enlaces de hidrógeno (**Tabla 5.3**), se observa un debilitamiento importante del enlace de hidrógeno entre Sy y el H_{prox} (-0.176 a.u.) a nivel del TS con respecto a RC, mientras que el resto no sufre cambios relevantes. La entalpía de activación a 25 °C es 9.8 kcal mol⁻¹, 3.1 kcal mol⁻¹ más baja que para la reacción con H₂O₂. Esto puede deberse a la naturaleza del grupo saliente, el nitrito, que es una base mucho más débil que el anión hidróxido. Asimismo, se observa un costo entrópico muy pequeño de 0.6 kcal mol⁻¹, la mitad de lo observado para la reacción con H₂O₂, que da lugar a una energía libre de activación de 10.4 kcal mol⁻¹. A partir de un valor experimental de k de $3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 37 °C) [160], asumiendo valores de pK_a de 8.1 para el tiol y 6.8 para el HOONO, usando la **Ecuación 2.133**, se estima un valor de energía libre de activación de 11.0 kcal mol⁻¹, lo que indica que el valor obtenido a partir del modelado es consistente con los datos experimentales.

Tabla 5.3. Distancias (\AA)^a e índices de enlace de Wiberg (a.u., en negrita)^b de pares de átomos seleccionados para los puntos estacionarios de la reacción entre HSA-S⁻ y HOONO.

Par atómico	RC	TS	PC
<i>Coordenada de reacción</i>			
S γ -O _{prox}	3.01/ 0.065	2.74/ 0.178	1.66/ 0.964
O _{prox} -O _{dist}	1.43/ 0.967	1.57/ 0.750	2.66/ 0.034
O _{dist} -N	1.39/ 1.110	1.31/ 1.289	1.27/ 1.472
N-O _{NO}	1.19/ 1.849	1.21/ 1.730	1.25/ 1.562
<i>Enlaces de H</i>			
S γ ···H _{prox}	1.97/ 0.247	2.29/ 0.071	2.25/ 0.007
S γ ···H η _{Tyr84}	2.12/ 0.142	2.12/ 0.140	2.28/ 0.092
S γ ···H _{W1}	2.52/ 0.049	2.52/ 0.051	2.71/ 0.027
O _{dist} ···H _{W2}	2.21/ 0.016	2.24/ 0.015	1.89/ 0.048
O _{NO} ···H _{W3}	2.07/ 0.023	2.13/ 0.021	1.90/ 0.053
H _{W1} ···O δ _{Asp38}	1.67	1.64	1.63

^a Al nivel ONIOM-ME(B3LYP/6/31+G(d):Amber96)

^b Sobre la región QM al nivel B3LYP/6-31+G(d)

5.4. Conclusiones

En esta sección se modelaron a nivel QM/MM las reacciones del tiolato de la HSA (HSA-S⁻) con dos peróxidos distintos, por un lado el H₂O₂ y por otro el ácido peroxinitroso (HOONO). Asimismo, se realizó un estudio cinético dependiente de la temperatura de la reacción de HSA-S⁻ con H₂O₂ para validar los resultados del modelado QM/MM.

Ambas reacciones siguen un mecanismo S_N2, con un estado de transición lineal. En la reacción con H₂O₂ se observa una transferencia protónica post-estado de transición, análogamente a lo observado en tiolatos de bajo peso molecular y en otras proteínas y que no se observa en la reacción con HOONO. Esto se debe posiblemente a que el NO₂⁻ (pK_a = 3.3 para el HNO₂) es una base mucho más débil que el sulfenato (pK_a = 7.5 para Cys-SOH), mientras que el OH⁻ (pK_a = 15.7 para el H₂O) es una base mucho más fuerte. En ambas reacciones se observa el debilitamiento o la ruptura del EdH entre el S γ y el peróxido del RC, que se observa también en los RCs de las mismas reacciones en tiolatos de bajo peso molecular, pero que no se observa el RC de la reacción del tiolato de Prdx5 con H₂O₂, en la que el H₂O₂ está formando EdH con el OH de Thr44.

Respecto a la energética, las entalpías de activación a 298 K son 12.9 kcal mol⁻¹ para la reacción con H₂O₂, y 9.8 kcal mol⁻¹ para la reacción con HOONO. La entalpía de activación determinada por el estudio cinético a distintas temperaturas de la reacción H₂O₂ de 13.7 kcal mol⁻¹ a 298 K valida el valor obtenido por QM/MM. Ambas reacciones tienen un costo entrópico asociado, siendo los valores de la energía libre de activación a 298 K de 14.2 kcal mol⁻¹ para la reacción con H₂O₂ y 10.4 kcal mol⁻¹ para la reacción con HOONO. Por otro lado, el valor de la energía libre de activación que se estima de datos experimentales previos (para la reacción con HOONO) es de 11.0 kcal mol⁻¹ a 310 K, de nuevo encontrándose consistencia entre el modelado computacional y los trabajos experimentales.

En resumen, el tiolato de la HSA reacciona con peróxidos como un tiolato ordinario, debido a la falta de características de sitio activo, es decir, residuos que formen EdH con el grupo saliente, y cargas positivas a este último (que es de carga positiva), que sí se observan en otras proteínas cuyo tiolato reacciona de forma mucho más rápida con H₂O₂, como las peroxirredoxinas, que tienen barreras de reacción más bajas.

6. El entorno local del ácido sulfénico de la HSA: Estructura y dinámica

6.1. Antecedentes

Como se mencionó anteriormente, HSA-S⁻ puede reaccionar con peróxidos para dar un ácido sulfénico de vida media relativamente larga [154], el cual puede seguir tres destinos: reaccionar con un tiolato de bajo peso molecular ($k = 21.6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37°C y pH 7.4 para la reacción con cisteína [165]) para dar un disulfuro mixto, reaccionar de forma irreversible con un peróxido ($k = 0.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37°C y pH 7.4 para la reacción con H₂O₂ [56]) dando un ácido sulfínico, o decaer espontáneamente ($k = 1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ a 37°C y pH 7.4 [165]) a un producto no caracterizado (HSA-SX). Tanto experimentos de reactividad con TNB dependientes del pH como el seguimiento del decaimiento espontáneo a distintos valores de pH muestran un aumento en la reactividad al disminuir el pH [185], lo que sugieren que la especie reactiva en estos casos sería el ácido sulfénico. En cambio, en las reacciones de otros ácidos sulfénicos (*i.e.* AhpE y ácido 9-fluoro-10-tripticensesulfénico) con H₂O₂ se ve un aumento en la reactividad al aumentar el pH [52, 54], lo que apunta a que en este caso la especie reactiva es el sulfenato, que actuaría como nucleófilo.

Con respecto a la estructura del entorno del ácido sulfénico, debido al decaimiento espontáneo del ácido sulfénico, y a la dificultad de cristalización de la HSA, no se cuenta con estructuras de HSA con Cys34 en la forma ácido sulfénico.

Respecto a la acidez del ácido sulfénico de la HSA, al momento no se cuenta con un valor de la constante de acidez. Tanto la reactividad frente a TNB como la constante de velocidad del decaimiento espontáneo aumentan a valores de pH menores a 5, lo que sugiere un valor de pK_a menor a 5 [185]. No obstante, esto puede deberse a una transición de la HSA, o al cambio en el estado de protonación de un residuo vecino (*e.g.* Asp38).

En esta sección, en función del **Objetivo específico N.º 3**, se estudió la estructura y dinámica del entorno de Cys34 en las formas ácido sulfénico y sulfenato, arrojando luz sobre interacciones que pueden modular la reactividad y la acidez del ácido sulfénico, y también una idea de cuál podría ser el producto del decaimiento espontáneo. También se intentó determinar el valor del pK_a del ácido sulfénico teniendo en cuenta los aspectos mencionados anteriormente.

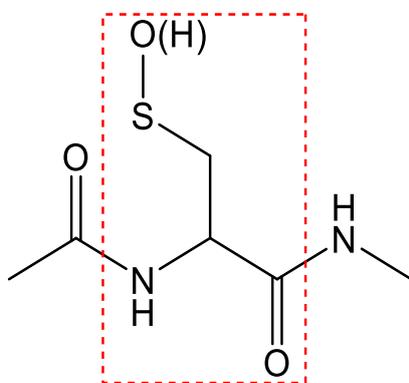
6.2. Metodología

6.2.1. Simulaciones de dinámica molecular

Se consideraron dos sistemas, HSA con Cys34 en la forma ácido sulfénico (HSA-SOH) y HSA con Cys34 en la forma sulfenato (HSA-SO⁻). Como estructuras de partida se tomaron las estructuras de los productos de las reacciones de HSA-S⁻ con H₂O₂ (HSA-SO⁻) y con HOONO (HSA-SOH). Para preparar los sistemas y llevar a cabo las simulaciones MD se siguió el protocolo seguido en la **Sección 4.2.1**, exceptuando que los estados de protonación ya estaban previamente asignados, y que la extensión de las simulaciones fue 600 ns para HSA-SOH y 400 ns para HSA-SO⁻. Dado que los residuos ácido cisteinsulfénico y cisteinsulfenato no están definidos en el campo de fuerza *ff99SB*, resulta necesario parametrizarlos, lo que se describirá a continuación.

6.2.2 Parametrización de residuos no estándar: ácido sulfénico y sulfenato

Para parametrizar los residuos se construyeron las moléculas ácido *N*¹-acetil-*N*²-metilcisteinamida-sulfénico y *N*¹-acetil-*N*²-metilcisteinamida-sulfenato, las cuales fueron optimizadas y verificadas (mediante análisis de valores propios del hessiano) en presencia de agua como solvente implícito (modelo continuo IEF-PCM [310] incluyendo componentes no electrostáticas; cavidades construidas usando los radios de Bondi [312]) al nivel B3LYP/6-31+G(d). Luego, las cargas parciales fueron calculadas usando el procedimiento RESP [277]. Luego con la utilidad *residuegen* del programa AmberTools 15 [325] se definió el residuo no estándar de acuerdo al **Esquema 6.1**. Los parámetros de enlaces, ángulos y diedros se obtuvieron del campo de fuerza *ff99SB*, mientras que los parámetros faltantes se obtuvieron del campo de fuerza *gaff*.



Esquema 6.1. Definición del residuo modificado.

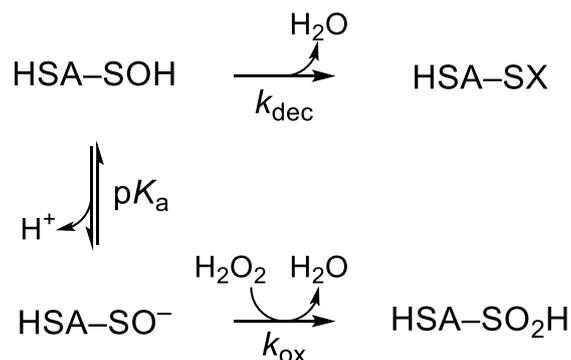
6.2.3. Determinación de la constante de acidez del ácido sulfénico de la HSA

6.2.3.1. Generalidades de la técnica: cromatoenfoque

Junto a Matías Deambrosi, y en el contexto de su Tesina de Graduación de la Licenciatura en Bioquímica (Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, UdelaR) [320], se intentó determinar el pK_a del ácido sulfénico por reactividad frente a H_2O_2 a distintos valores de pH. Se usaron las aproximaciones de punto final y de velocidades iniciales. Para ello fue necesario cuantificar las fracciones e HSA-SX y HSA-SO₂H. Esto se realizó usando el procedimiento cromatográfico (cromatoenfoque) descrito en la **Sección 2.7.4** [178, 320]. Las muestras de HSA se eluyeron por una columna de intercambio aniónico débil de alta resolución TSKgel DEAE-5PW (75 × 8 mm; tamaño de partícula 10 μm; Tosoh Bioscience LLC), usando un cromatógrafo HPLC Agilent Infinity 1260. Para la elución se aplicó un gradiente de pH externo usando dos amortiguadores NH₄Cl 0.01 M (amortiguador A: pH 5.35; amortiguador B: pH 3.95). Partiendo de 100 % de A, se realizó un gradiente de 0 a 40 % de B en 60 minutos.

6.2.3.2. Aproximación de punto final

Esta aproximación asume que el decaimiento espontáneo requiere que el ácido sulfénico esté en forma neutra, mientras que para reaccionar con el H_2O_2 , el ácido sulfénico debe encontrarse desprotonado (**Esquema 6.2**).



Esquema 6.2. Ionización, decaimiento espontáneo y oxidación del ácido sulfénico de la HSA por H_2O_2 .

Cuando dos reacciones de (pseudo)primer compiten (en este caso la oxidación del ácido sulfénico y el decaimiento espontáneo, **Esquema 6.2**), el cociente de las concentraciones de productos (en este caso HSA-SO₂H y HSA-SX) equivale al cociente de las constantes de velocidad de (pseudo)primer orden dependientes del pH ($[H_2O_2]k'_{\text{ox}}$ y k'_{dec}):

$$\frac{[\text{HSA-SO}_2\text{H}]}{[\text{HSA-SX}]} = \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]k'_{\text{ox}}}{k'_{\text{dec}}} \quad (6.1)$$

Las constantes dependientes del pH pueden escribirse en función de las constantes independientes del pH (k_{ox} y k_{dec}):

$$k'_{\text{ox}} = \frac{[\text{HSA-SO}^-]}{[\text{HSA-SOH}]_0} k_{\text{ox}} \quad (6.2)$$

$$k'_{\text{dec}} = \frac{[\text{HSA-SOH}]}{[\text{HSA-SOH}]_0} k_{\text{dec}}$$

entonces se puede escribir la ecuación 6.1 de forma que dependa de las concentraciones de HSA-SOH y HSA-SO⁻:

$$\frac{[\text{HSA-SO}_2\text{H}]}{[\text{HSA-SX}]} = \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]k_{\text{ox}}}{k_{\text{dec}}} \cdot \frac{[\text{HSA-SO}^-]}{[\text{HSA-SOH}]} \quad (6.3)$$

Teniendo en cuenta que el cociente de concentraciones se puede vincular con el $\text{p}K_{\text{a}}$ y el pH:

$$\frac{[\text{HSA-SO}^-]}{[\text{HSA-SOH}]} = \frac{K_{\text{a}}}{[\text{H}^+]} = 10^{\text{pH}-\text{p}K_{\text{a}}} \quad (6.4)$$

entonces se puede escribir la ecuación 6.1 como función del pH

$$\frac{[\text{HSA-SO}_2\text{H}]}{[\text{HSA-SX}]} = A \cdot 10^{\text{pH}-\text{p}K_{\text{a}}} \quad (6.5)$$

$$A = \frac{[\text{H}_2\text{O}_2]k_{\text{ox}}}{k_{\text{dec}}}$$

Entonces se puede graficar el cociente de las concentraciones (que es igual al cociente de concentraciones, $[\text{HSA-SO}_2\text{H}]/[\text{HSA-SX}]$) en función del pH ajustando a la función de la ecuación 6.5 y así obtener el $\text{p}K_{\text{a}}$.

El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera: primero se preformó el ácido sulfénico incubando HSA reducida y deslipidada (0.59 mM, 0.95 RSH/HSA) con H₂O₂ 4 mM durante 4 min (37 °C, amortiguador fosfato 0.1 M pH 7.4 mM; luego las muestras se incubaron durante 30 min con H₂O₂ 4 mM en HAc/MES/tris 0.15 M/0.15 M/0.30 M a distintos valores de pH a 37 °C; y finalmente se determinaron las fracciones de HSA-SO₂H y HSA-SX usando el procedimiento cromatográfico descrito en la **Sección 2.7.4** usando el protocolo descrito en el **Apartado 6.2.3.1**. El

cociente $[HSA-SO_2H]/[HSA-SX]$ se graficó en función del pH ajustando a la función de la **Ecuación 6.5**.

6.2.3.2. Aproximación de velocidades iniciales

En esta aproximación, también se asume que la especie que reacciona con el H_2O_2 es el sulfenato. La concentración de sulfenato se relaciona con el pK_a de acuerdo a la ecuación 6.6:

$$[HSA-SO^-] = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} [HSA-SOH]_0 \quad (6.6)$$

La velocidad inicial, v_0 , se escribe como:

$$v_0 = k_{ox}[HSA-SO^-][H_2O_2] \quad (6.7)$$

Sustituyendo queda:

$$v_0 = k_{ox} \frac{[HSA-SOH]_0}{1 + 10^{pK_a - pH}} [H_2O_2] \quad (6.8)$$

Finalmente, la concentración de $HSA-SO_2H$ se puede relacionar con v_0 :

$$[HSA-SO_2H] = v_0 t \quad (6.9)$$

Sustituyendo, la concentración de $HSA-SO_2H$ se puede relacionar con el pH y el pK_a :

$$[HSA-SO_2H] = [HSA-SOH]_0 [H_2O_2] t \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (6.10)$$

Dividiendo la ecuación 6.10 por la concentración de HSA total, $[HSA]$, se puede relacionar la fracción de ácido sulfínico, $[HSA-SO_2H]/[HSA]$ con el pH y el pK_a :

$$\frac{[HSA-SO_2H]}{[HSA]} = A \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (6.11)$$

$$A = \frac{[HSA-SOH]_0 [H_2O_2] t}{[HSA]}$$

Si se usa la misma concentración de H_2O_2 y se detiene la reacción a iguales valores de t , entonces la **Ecuación 6.11** pasa a ser una función del pH. Entonces, ajustando a esta función, es posible determinar el valor del pK_a del ácido sulfénico.

El experimento fue llevado a cabo de la siguiente manera: en primer lugar, se preformó el ácido sulfénico incubando HSA reducida y deslipidada (0.59 mM, 0.95 RSH/HSA) con H_2O_2 4 mM durante 8 min (25 °C, amortiguador fosfato 0.1 M pH 7.4

mM); luego la muestra se mezcló con H_2O_2 en HAc/MES/tris 0.15 M/0.15 M/0.30 M a distintos valores de pH (entre 5 y 8), siendo las concentraciones usadas de HSA y H_2O_2 respectivamente 0.219 mM y 30 mM, y a los 20 s la reacción se detuvo con catalasa ($k' = 0.46 \text{ s}^{-1}$ para descomponer el 90 % del H_2O_2 a los 5 s [332]) con el fin de que la formación de ácido sulfínico HSA-SO₂H sea igual o menor al 20 %; y finalmente la fracción de HSA-SO₂H, $[\text{HSA-SO}_2\text{H}]/[\text{HSA}]$, se determinó usando el usando el procedimiento cromatográfico descrito en la **Sección 2.7.4** usando el protocolo descrito en el **Apartado 6.2.3.1**. Los valores de $[\text{HSA-SO}_2\text{H}]/[\text{HSA}]$ en función del pH se graficaron de acuerdo a la función dada por la **Ecuación 6.11**.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Dinámica de HSA-SOH

La simulación converge a los 380 ns, como indica el gráfico de $\text{C}\alpha$ -RMSD (**Figura 6.1**).

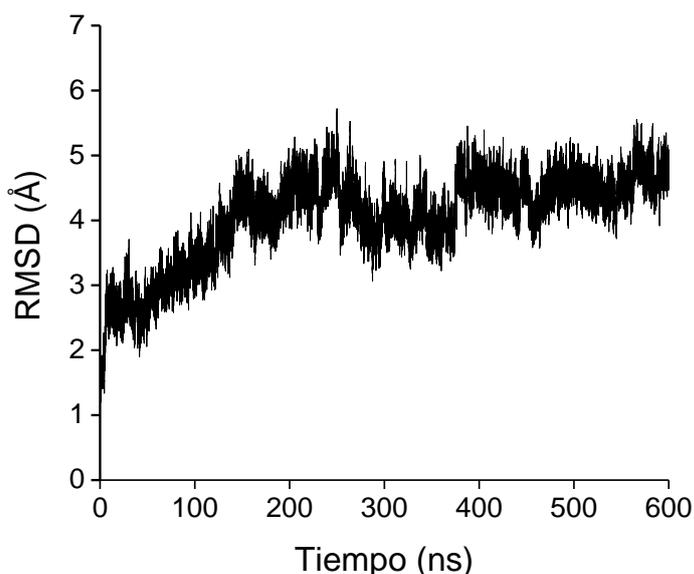


Figura 6.1. Evolución temporal del $\text{C}\alpha$ -RMSD de la simulación MD de HSA-SOH.

Con respecto a la accesibilidad al solvente del ácido sulfénico, el S_γ de $\text{Cys34}_{\text{SOH}}$ se encuentra oculto, con valores promedio de SASA de entre alrededor de 5 \AA^2 (**Figura 6.2A**), lo que, junto con lo observado para HSA-S⁻, puede explicar por qué la formación de dímeros HSA-S-S-HSA y HSA-S(O)-S-HSA es un evento muy infrecuente [334-336].

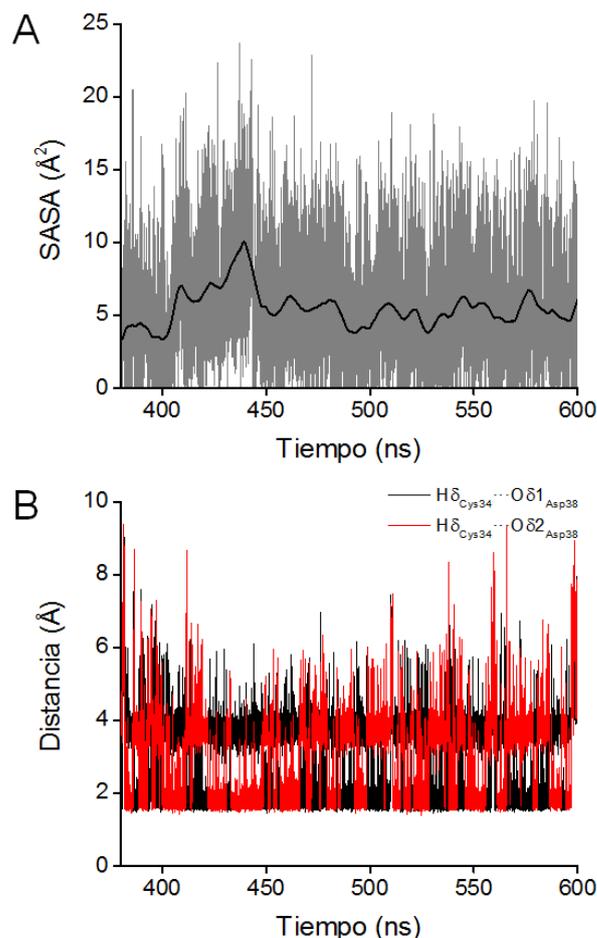


Figura 6.2. Exposición al solvente del Sy del ácido sulfénico formado en la HSA en el intervalo comprendido entre 380 y 600 ns (A). Distancias entre el OH δ del ácido sulfénico y los O δ de Asp38 en el tramo comprendido entre 380 y 600 ns (B).

Respecto a la red de EdH del ácido sulfénico, se observa que durante 93 % del tramo convergido de la simulación, el OH δ sulfénico se encuentra formando enlace de hidrógeno con los O δ del carboxilato de Asp38 (**Tabla 6.1; Figura 6.2B**), y también formando EdH con moléculas de agua, un 10 % del tiempo actuando como dador y un 43 % actuando como aceptor (**Tabla 6.1**). La presencia de este enlace de hidrógeno explicaría el aumento en la reactividad del ácido sulfénico frente a TNB a valores de pH menores a 5 [185], ya que al protonarse el carboxilato (se asume un pK_a de ~ 4 para un residuo Asp ordinario [337]) se pierde una carga negativa, lo que estabilizaría el estado de transición, el cual se presume tiene carga negativa. La proximidad de Asp38 y la baja exposición al solvente del Sy explicarían por qué el ácido sulfénico no es demasiado reactivo frente a tiolatos, y su larga vida media [165].

Tabla 6.1. Ocupación de presuntos enlaces de hidrógeno en el tramo convergido de la dinámica de HSA-SOH.

Enlace de hidrógeno ^a	Ocupación ^b
Asp38-O δ (1,2)···HO δ -Cys34	93 %
H ₂ O···HO δ -Cys34	10 %
Cys34-O δ ···H-O-H	43 %
His39>N δ 1···H-O(H)···H-N<Cys34	75 %
His39>N ϵ 2-H···O=Gln24	69 %

^a Criterio de corte de distancia D···A de 3.5 Å y de ángulo D-H···A de 120°. ^b La ocupación se define como el porcentaje del tiempo que la interacción está presente.

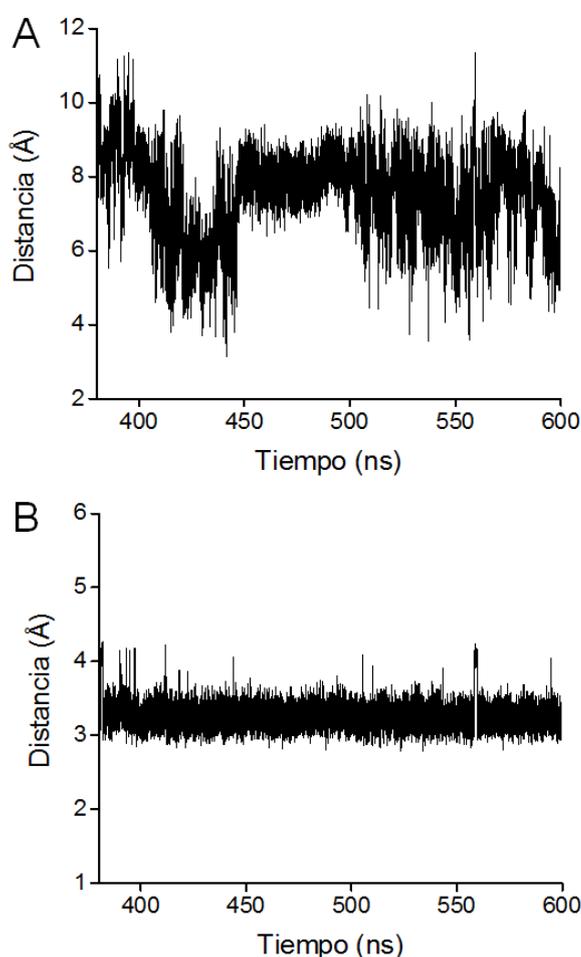


Figura 6.3. Distancia entre el N ϵ de Gln33 y el S γ de Cys34 durante el tramo de la simulación de HSA-SOH comprendido entre 380 y 600 ns (A); distancia entre el N peptídico y el S γ de Cys34 durante el tramo de la simulación comprendido entre 380 y 600 ns (B).

También se observa que, por momentos el N ϵ de Gln33 se acerca al S γ a distancias menores a 4 Å (**Figura 6.3A**), lo que apoya la idea de que el producto de decaimiento del ácido sulfénico sería una sulfenilamida formada con el grupo amida de Gln33,

como fue sugerido por Grigoryan *et al.* [166], aunque con muy pobre evidencia experimental. No obstante, el N peptídico de Cys34 se encuentra a una distancia de entre 3.0 y 3.6 Å del Sy durante todo el tramo convergido de la simulación (**Figura 6.3B**). Este N podría atacar al Sy. Aunque la formación de un ciclo de 4 miembros no suele estar favorecida, no debe descartarse esta hipótesis. Experimentos de espectrometría de masas (L. Turell y B. Álvarez, comunicación personal, sin publicar) muestran que el producto de decaimiento es una modificación en la secuencia Leu31-Gln32-Gln33-Cys34, lo que es consistente con ambas hipótesis.

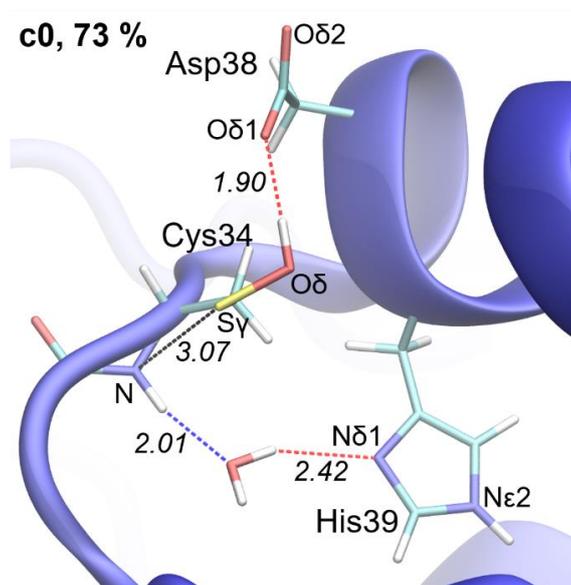


Figura 6.4. Estructura representativa del *cluster* más poblado (c0, población 73 %) del tramo convergido de la dinámica de HSA-SOH. Los números en cursiva corresponden a distancias interatómicas (en Å).

El análisis de *clustering* muestra un *cluster* mayoritario (c0, población 73 %) cuya estructura representativa se muestra en la **Figura 6.4**. Esta estructura muestra al O δ del ácido sulfénico formando EdH con uno de los O δ del carboxilato de Asp38, y un EdH –puenteado por una molécula de agua– entre el NH peptídico de Cys34 y el N δ 1 imidazólico de His33. Este EdH está presente un 75 % del tiempo de la simulación (**Tabla 6.1**), lo que podría favorecer la formación de una sulfenilamida con el N peptídico de Cys34, en un proceso catalizado por el imidazol de His39 que actuaría como base, desprotonando el NH y aumentando la nucleofilia del grupo amida. Más aún, un trabajo de modelado QM/MM de Dokainish y Gauld [338] propone un mecanismo similar para el decaimiento del ácido sulfénico de la PTP1B a una sulfenilamida, en el grupo amida peptídico de un residuo vecino es desprotonado por un residuo Glu –a través de una molécula de agua–, junto con la protonación del O de dicha amida por un residuo básico, mejorando así la nucleofilia

del N peptídico, que ataca nucleofílicamente al $S\gamma$ del ácido sulfénico, formándose así una sulfenilamida protonada en el O amida, la cual es desprotonada de nuevo por un residuo básico.

Por otro lado, el grupo imidazol de His39 también tendría un papel estructural ya que se encuentra formando EdH con el carbonilo de Leu24 un 69 % del tiempo (**Tabla 6.1**).

6.3.2. Dinámica de HSA-SO⁻

La simulación converge a los 100 ns, como muestra el gráfico de $C\alpha$ -RMSD (**Figura 6.5**).

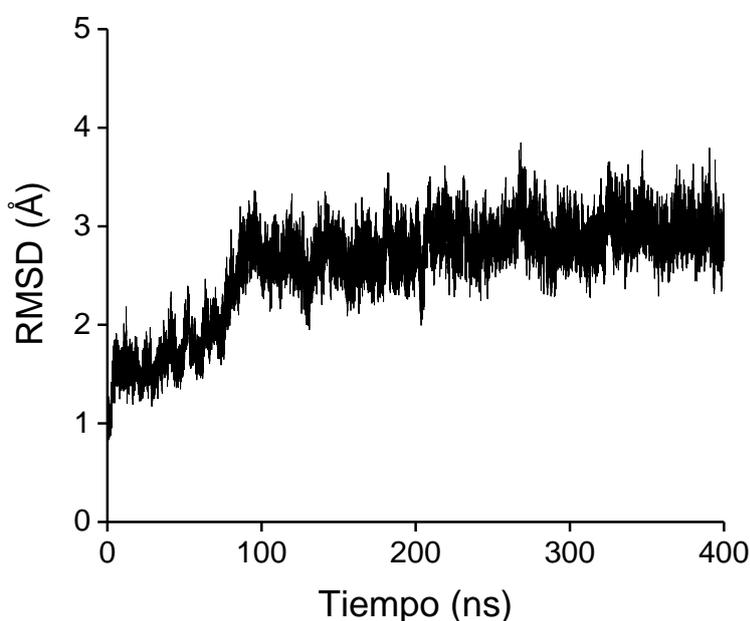


Figura 6.5. Evolución temporal del $C\alpha$ -RMSD de la simulación MD de HSA-SO⁻.

Respecto a la accesibilidad al solvente del $S\gamma$, se observa que éste presenta una exposición al solvente variable, entre baja y moderada, con valores promedio de SASA de 5-15 Å², llegándose a picos de hasta 35 Å² (**Figura 6.6A**). Durante gran parte de la simulación el O δ del sulfenato se encuentra formando enlace de hidrógeno con el OH η de Tyr84 (ocupación 57 %, **Tabla 6.2**), sin embargo, este enlace de hidrógeno es lábil (**Figura 6.6B**), por lo que se espera que los efectos de Tyr84 sobre la reactividad del sulfenato sean mucho menos importantes que en HSA-S⁻. Coincide que, los períodos en los que el $S\gamma$ se encuentra más expuesto al solvente es cuando dicho EdH no se encuentra presente.

Tabla 6.2. Ocupación de presuntos enlaces de hidrógeno en el tramo convergido de la dinámica de HSA-SO⁻.

Enlace de hidrógeno ^a	Ocupación ^b
Cys34-Oδ···HOη-Tyr84	57 %
Cys34-Oδ···H-O-H	384 %
Cys34-Oδ···H-O-H···Oδ(1,2) -Asp38	110 %

^a Criterio de corte de distancia D···A de 3.5 Å y de ángulo D-H···A de 120°. ^b La ocupación se define como el porcentaje del tiempo que la interacción está presente.

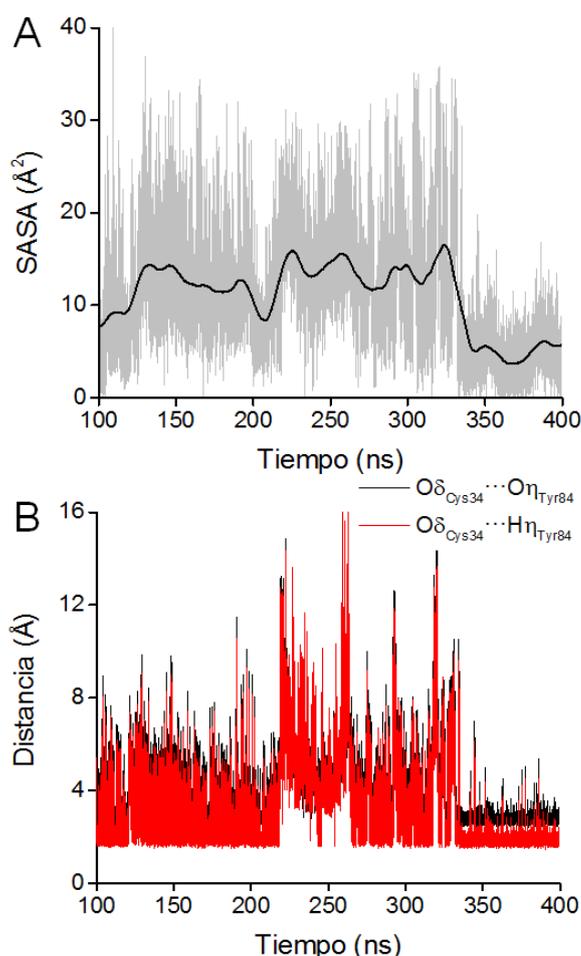


Figura 6.6. Evolución de la superficie expuesta al solvente del Sy durante el intervalo de 100 a 400 ns de la dinámica de HSA-SO⁻(A). Evolución de las distancias entre el Oδ del sulfenato y el OHη de Tyr84.

El análisis de *clustering* muestra dos *clusters* con población importante (**Figura 6.7**), c0 (población 58 %) y c1 (población 30 %). El *cluster* c0 se corresponde con los tramos en los que el sulfenato forma EdH con el OH de Tyr84 –y el Sy se encuentra menos expuesto al solvente–, mientras que el *cluster* c1 se corresponde con los tramos en los que este EdH no se observa –y el Sy se encuentra más expuesto–. En c1 se observa que el sulfenato forma EdH puenteados por moléculas de agua con

Asp38, lo cual se observa en un tramo importante de la simulación (**Tabla 6.2**). Estos resultados sugieren que Asp38 podría tener un rol en la modulación de la reactividad del sulfenato.

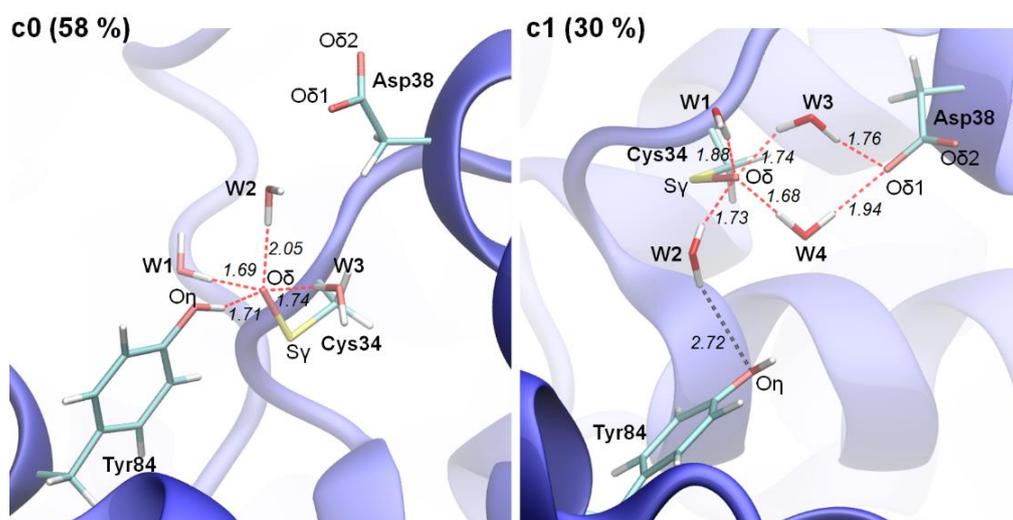


Figura 6.7. Estructura representativa de los *clusters* más poblados (c0, población 58 %; c1, población 30 %) del tramo convergido de la dinámica de HSA-SO₂⁻. Los números en cursiva corresponden a distancias interatómicas (en Å).

6.3.3. Determinación del pK_a del ácido sulfénico

6.3.3.1. Aproximación de punto final

Usando esta aproximación, descrita en el **Apartado 6.3.3.2**, se graficó el cociente de las fracciones de HSA-SO₂H y de HSA-SX (que es igual a [HSA-SO₂H]/[HSA-SX]), en función del pH. En primer lugar, el gráfico (**Figura 6.8**) muestra que, al aumentar el pH, la formación de HSA-SO₂H es mayor. En segundo lugar, el gráfico arroja un valor de pK_a de 7.61, si se ajustan los puntos a la función dada por la **Ecuación 6.5**. Sin embargo, en el gráfico no se tuvo un buen ajuste. Contrariamente a lo que se esperaría, no se observa una tendencia a cero al ir a valores de pH más ácidos. De acuerdo a la **Ecuación 6.12**:

$$\frac{\delta q}{|q|} = \frac{\delta x}{|x|} + \frac{\delta y}{|y|} \quad (6.12)$$

$$q = \frac{[\text{HSA-SO}_2\text{H}]}{[\text{HSA-SX}]}$$

cuando un cociente q tiende a cero o a infinito, el error relativo del mismo, $\delta q/|q|$, tiende a infinito, por lo que esta aproximación no es muy robusta. Entonces se decidió seguir con la aproximación de velocidades iniciales.

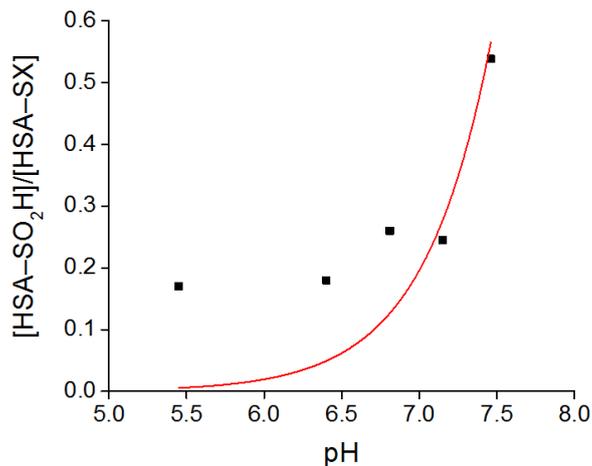


Figura 6.8. Gráfico de $[HSA-SO_2H]/[HSA-SX]$ en función del pH. Se preformó el ácido sulfénico incubando HSA reducida y deslipidada (0.59 mM, 0.95 RSH/HSA) con H_2O_2 4 mM durante 4 min (37 °C, amortiguador fosfato 0.1 M pH 7.4 mM), luego las muestras se incubaron durante 30 min con H_2O_2 4 mM en HAc/MES/tris 0.15 M/0.15 M/0.30 M a distintos valores de pH a 37 °C y se determinaron las fracciones de HSA-SO₂H y HSA-SX por cromatoenfoco

6.3.3.2. Aproximación de velocidades iniciales

Usando esta aproximación, descrita en el **Apartado 6.3.3.2**, se graficó de la relación $[HSA-SO_2H]/[HSA]$ en función del pH sugiere un valor de pK_a de 7.58 (**Figura 6.9**). No obstante, los dos últimos puntos no satisfacen la condición de velocidad inicial (formación de ácido sulfínico menor o igual al 20 %), por lo que este valor de pK_a debe tomarse como un límite máximo. Si se toman los 5 primeros puntos y se ajustan a la función definida en la **Ecuación 6.11**, fijando el factor A en 0.2 (20 % de formación de ácido sulfínico) se estima un valor de pK_a de 7.02 ± 0.38 .

A pesar de que no fue posible determinar un valor de pK_a , estos resultados indican que encuentra en el intervalo de entre 7.0 y 7.6, contrario a lo que sugieren trabajos previos de reactividad del ácido sulfénico de la HSA frente a TNB que sugieren un valor de pK_a menor a 5 [185]. Como muestra el análisis de la dinámica molecular de HSA-SOH (**Sección 6.3.1**), el aumento en la reactividad a pH menores a 5 puede atribuirse al cambio en la protonación de Asp38 (el pK_a de la cadena lateral de un residuo Asp ordinario es de ~ 4 [337]) que se encuentra formando EdH con el ácido sulfénico durante toda la simulación.

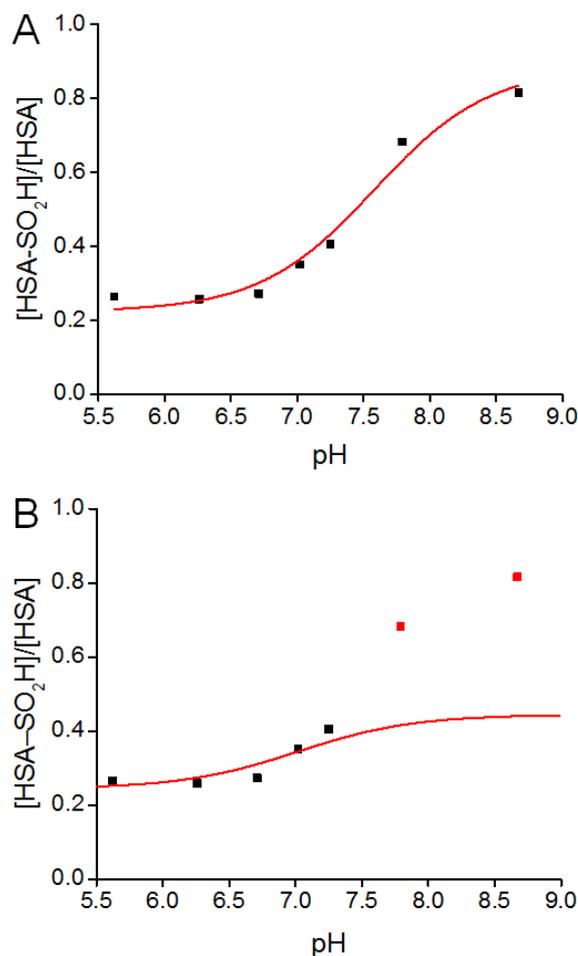


Figura 6.9. Gráfico de la relación entre HSA en la forma ácido sulfínico y HSA total, $[HSA-SO_2H]/[HSA]$ en función del pH (A). El mismo gráfico se realizó eliminando los dos últimos puntos y fijando el valor de A en 0.2 (B). Se preformó HSA-SOH incubando HSA (0.59 mM, 0.95 RSH/HSA) con H_2O_2 4 mM durante 8 min (25 °C, amortiguador fosfato 0.1 M pH 7.4 mM), luego la muestra se mezcló con H_2O_2 en HAc/MES/tris 0.15 M/0.15 M/0.30 M a distintos valores de pH (Tubo: $[HSA] = 0.219$ mM; $[H_2O_2] = 30$ mM), y a los 20 s la reacción se detuvo con catalasa ($k' = 0.46$ s⁻¹). La fracción de HSA-SO₂H se determinó por cromatoenfoco.

6.4. Conclusiones

En primer lugar, se estudió la estructura y dinámica del entorno del ácido sulfénico de la HSA. La baja exposición al solvente del Sy y la presencia de un EdH entre el ácido sulfénico y el carboxilato de Asp38 explicarían por qué la formación de dímeros HSA-S-S-HSA o HSA-S(=O)-HSA es un evento raro [334-336]. Por otro lado, se observó que el NH peptídico de Cys34 se encuentra cercano al Sy y, además, el NH forma un EdH puenteado por una molécula de agua con el imidazol de His39, lo que podría sugerir la formación de una sulfenilamida cíclica, aunque se trataría de un anillo de cuatro miembros. Asimismo, también se observó que por momentos

el grupo amida de Gln33 se acerca al $S\gamma$, por lo que este grupo amida sería otro candidato a reaccionar con el ácido sulfénico.

En segundo lugar, se estudió la estructura y dinámica del entorno del sulfenato de la HSA. El EdH con Tyr84 observado en las simulaciones de HSA-S⁻ es mucho más lábil, por lo que el rol de dicho residuo sería menos importante. No obstante, Asp38 sigue cercano al sulfenato, por lo que dicho residuo aún podría tener un rol modulando la reactividad del sulfenato.

En tercer lugar, en experimentos realizados en conjunto con Matías Deambrosi, en los que se analizaron las isoformas de HSA a nivel de Cys34 mediante cromatoenfoco, se estimó que el pK_a del ácido sulfénico de la HSA tiene un valor de entre 7.0 y 7.6, siendo consistente con los resultados de las simulaciones MD y con el hecho de que la isoforma ácido sulfénico coeluye con la isoforma tiol en los experimentos de cromatoenfoco [178]. El aumento de la reactividad del ácido sulfénico frente a DTNB –como electrófilo– a valores de pH menores a 5 [185] puede deberse a un cambio en la protonación del carboxilato de Asp38.

7. Oxidación de ácidos sulfénicos

7.1. Antecedentes

Como se mencionó anteriormente, los ácidos sulfénicos pueden oxidarse por reacción con peróxidos para dar ácidos sulfínicos, los cuales a su vez pueden oxidarse a ácidos sulfónicos. La oxidación de ácidos sulfénicos a ácidos sulfínicos, también conocida como sobreoxidación de tioles, es de especial relevancia biológica, ya que generalmente los ácidos sulfínicos no pueden reducirse a ácidos sulfénicos por reacción con tioles, por lo que en general se trata de un proceso irreversible. Esto quiere decir que, una vez que un residuo de Cys con función catalítica o señalizadora se sobreoxida, éste pierde su función. Una excepción la constituyen algunas peroxirredoxinas, cuyo ácido sulfínico puede reducirse a ácido sulfénico por la reacción con un tiol, a expensas de una molécula de ATP, catalizada por las sulfirredoxinas. Con respecto a la HSA, alrededor de un 2 % de la HSA circulante se encuentra en las formas HSA-SO₂H y HSA-SO₃H [144], las cuales no pueden ser reducidas a HSA-SOH.

Con respecto al mecanismo de la oxidación de ácidos sulfénicos por H₂O₂, se cuenta con escasa información, principalmente debido a que se trata de intermediarios de vida corta. Especialmente en sistemas de bajo peso molecular, esta reacción es difícil de estudiar ya que los ácidos sulfénicos reaccionan con tioles, y también autorreaccionan.

Trabajos de modelado computacional asumen un mecanismo S_N2, en el que el sulfenato actúa como nucleófilo, atacando por el S [33, 58]. Esto es apoyado por datos experimentales que muestran un aumento en la reactividad del ácido sulfénico de la AhpE y del ácido 9-fluoro-10-tripticensulfénico frente a H₂O₂ al aumentar el pH [52, 54] y además, por el hecho de que la reacción de este último con ²H₂O₂ no presenta efectos cinéticos isotópicos del solvente cuando la reacción se estudia en metanol deuterado [54].

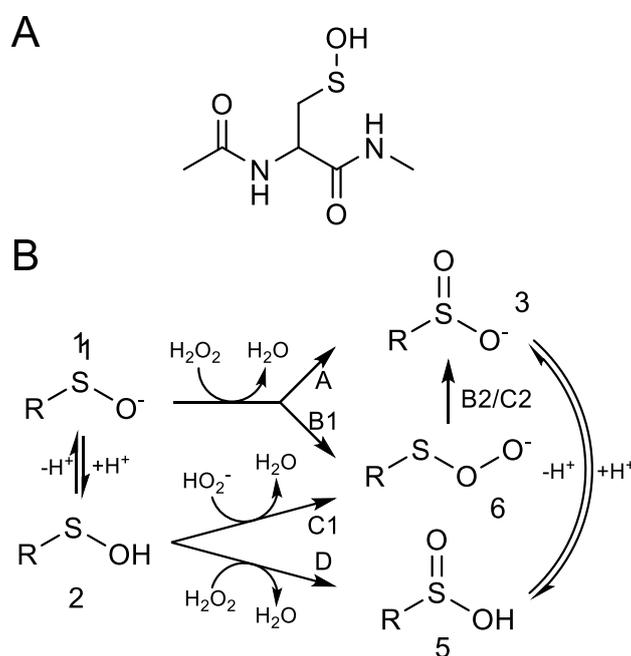
No obstante, no se ha considerado un ataque nucleofílico del O del sulfenato, ni la posibilidad de un ataque nucleofílico del HO⁻ sobre el ácido sulfénico. Por otro lado, no se cuenta con antecedentes del modelado de la oxidación de ácidos sulfénicos en proteínas.

En función de los **Objetivos específicos N.º 4 y 5**, en esta sección se plantea explorar mecanismos alternativos para la oxidación de ácidos sulfénicos, con el fin de establecer cuál es el mecanismo más probable, y además modelar la reacción en el contexto de la HSA.

7.2. Metodología

7.2.1. Estudio DFT del mecanismo oxidación de un ácido sulfénico de bajo peso molecular por H_2O_2

Como modelo de bajo molecular de un ácido sulfénico proteico se utilizó el ácido N^1 -acetil- N^2 -metilcisteinamida-sulfénico (**Esquema 7.1A**).



Esquema 7.1. Ácido N^1 -acetil- N^2 -metilcisteinamida-sulfénico (A), mecanismos propuestos para la reacción de ácidos sulfénicos con H_2O_2 (B).

Para tener una primera idea de que estado de protonación es más reactivo se calcularon descriptores de la reactividad (nucleofilia del grupo funcional, s_g^- ; energía del orbital KS ocupado de mayor energía, ϵ_{HOMO} ; función de Fukui nucleofílica condensada, f_k^-) al nivel B3LYP/6-31+G(d). Luego se procedió a modelar la reacción del ácido sulfénico con H_2O_2 al nivel considerando cuatro mecanismos alternativos (**Esquema 7.1B**): ataque nucleofílico del S del sulfenato, **1**, sobre el H_2O_2 para dar sulfenato, **3** (A); ataque nucleofílico del O de **1**, sobre el H_2O_2 para dar persulfenato, **4** (B1), que rearreglaría a **3** (B2); (C) ataque nucleofílico del anión hidropéroxido (HO_2^-) sobre el S del ácido sulfénico, **2**, para dar **4** (C1), el cual rearreglaría a **3** (C2); y ataque nucleofílico del S del ácido sulfénico, **2**, sobre el

H₂O₂ para dar ácido sulfínico, **5** (D). Para ello se optimizaron (usando el algoritmo de Schlegel [288]) y verificaron (mediante el análisis de valores propios del hessiano, ver **Sección 2.3.1**) las estructuras de reactivos, estados de transición, productos y complejos de reactivos y de productos al nivel B3LYP/6-31+G(d) [255, 268], implementado en Gaussian 09 [330]. La termoquímica a 298 K fue calculada mediante el análisis de modos normales vibracionales y usando las aproximaciones usuales de la termodinámica estadística. Para conectar las estructuras de estados de transición con las de los complejos de reactivos y de productos se realizaron cálculos de camino de reacción IRC usando el algoritmo HPC [296]. Para evaluar los cambios en la distribución de la densidad electrónica y la asincronía de la reacción, se realizaron cálculos NBO y de índices de enlace de Wiberg. Para obtener una mejor descripción de la energética, se realizaron cálculos *single-point* al nivel B3LYP/6-311++G(3df,2p). Los efectos del solvente fueron introducidos mediante el modelo continuo IEF-PCM [310], considerando componentes electrostáticas y no electrostáticas, usando agua como solvente ($\epsilon = 78.3$) y los radios de Bondi para construir las cavidades, y se consideraron para todos los cálculos (optimizaciones de geometría y cálculos *single point*).

7.2.2. Preparación de sistemas de HSA para QM/MM

Los sistemas se prepararon siguiendo el protocolo descrito en la **Sección 5.2.1**, usando los dos *clusters* más poblados (c0 y c1) de la simulación de HSA-SO⁻. Se construyeron dos modelos, el modelo 1, construido a partir de c0, y el modelo 2, construido a partir de c1. En lugar de remover las moléculas de agua ubicadas a más de 12 Å de los residuos y moléculas que definen la región QM (cadenas laterales de Cys34 y Tyr84, H₂O₂ y cuatro moléculas de agua vecinas en el modelo 1; cadena lateral de Cys34, H₂O₂ y cinco moléculas de agua vecinas en el modelo 1) se eliminaron únicamente las que se encontraban a más de 15 Å de dicha región.

7.2.3. Modelado del mecanismo oxidación del ácido sulfénico de la HSA por H₂O₂ usando un esquema de QM/MM aditivo

Para los cálculos QM/MM se usó el programa ChemShell 3.4 [339], que actúa como interfaz entre los programas Gaussian 09 [330] y DL_POLY [340]. La región QM comprende los grupos de átomos mencionados en la sección anterior, mientras que la región MM comprende el resto del sistema. Las estructuras de reactivos (RC), estado de transición (TS) y complejo de productos (PC) se optimizaron (usando el

método RFO [285, 286]) y verificaron (mediante el análisis de valores propios del hessiano, ver **Sección 2.3.1**) usando para la región QM el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d). Para conectar el TS con RC y PC, se realizó un muestreo de la coordenada, ξ , definida por:

$$\xi = d(S\gamma, O_{\text{prox}}) - d(O_{\text{prox}}, O_{\text{dist}}) \quad (7.1)$$

El muestreo se realizó de -2 a 1.2 Å con un tamaño de paso de 0.1 Å. Para obtener una mejor descripción de la energética, se realizaron cálculos single-point usando el nivel B3LYP/6-311++G(3df,2p) para la región QM. En todos los casos se usó el campo de fuerza AMBER *ff99SB* para la región clásica. El esquema de QM/MM usado fue el esquema aditivo usando embedding electrónico. A fin de comparar ambos modelos se realizó un cálculo *single-point* con regiones QM idénticas y no se observaron cambios en la energética. El modelado QM/MM con ChemShell se realizaron en el marco de una pasantía en el Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la supervisión de los Dres. Àngels González-Lafont y Josep Maria Lluch.

7.2.4. Modelado ONIOM del mecanismo oxidación del ácido sulfénico de la HSA por H_2O_2

Se partió de la estructura del TS del modelo 1, para la cual se calcularon las cargas MM (usando el procedimiento RESP [277]) de la región QM, y se optimizó la geometría del TS al nivel ONIOM-ME(B3LYP/6-31+G(d):AMBER96) [276] implementado en Gaussian 09 [330]. Dado que el acoplamiento QM-MM se trató al nivel MM, dicha estructura se le recalcularon las cargas MM mediante el procedimiento RESP [277], se la reoptimizó y verificó. Luego se realizó (al mismo nivel de teoría) un cálculo de camino de reacción IRC usando el algoritmo EulerPC [296] para obtener estructuras de partida de RC y PC. Las estructuras de éstos fueron optimizadas, las cargas MM de la región QM fueron recalculadas, las estructuras fueron reoptimizadas y verificadas. Las regiones QM y MM, y las regiones móviles/fijas fueron las usadas para los cálculos QM/MM usando el esquema aditivo. Para mejorar la energética se realizaron cálculos *single-point* a los niveles ONIOM-EE(QM/6-311++G(3df,2p): AMBER96). Los métodos QM utilizados fueron la teoría DFT con el funcional B3LYP y la teoría MP2.

7.2.5. Cinética de la reacción del ácido sulfínico de la HSA con H₂O₂

La idea original trataba de estudiar la cinética de la reacción del ácido sulfénico de la HSA con H₂O₂ por espectroscopía infrarroja, siguiendo la formación de ácido sulfínico. Para ubicar donde se ubican las bandas características de los grupos sulfinato y sulfonato (producto de oxidación del ácido sulfínico) en el infrarrojo, se registraron los espectros infrarrojos de hipotaurina (⁺H₃N-CH₂-SO₂⁻) 0.1 M, y taurina (⁺H₃N-CH₂-SO₃⁻) 0.1M, respectivamente, en amortiguador tris 0.1 M pH 7.4 a 25 °C. Las muestras se colocaron entre dos ventanas de BaF₂ con una separación de 0.025 mm y los espectros se registraron acumulando 500 interferogramas con una resolución de 4 cm⁻¹, en un espectrofotómetro FT-IR Shimadzu IRPrestige 21. El grupo sulfinato presenta una banda característica a 1009 cm⁻¹, mientras que el grupo sulfonato presenta una banda característica a 1047 cm⁻¹ (**Figura 7.1**).

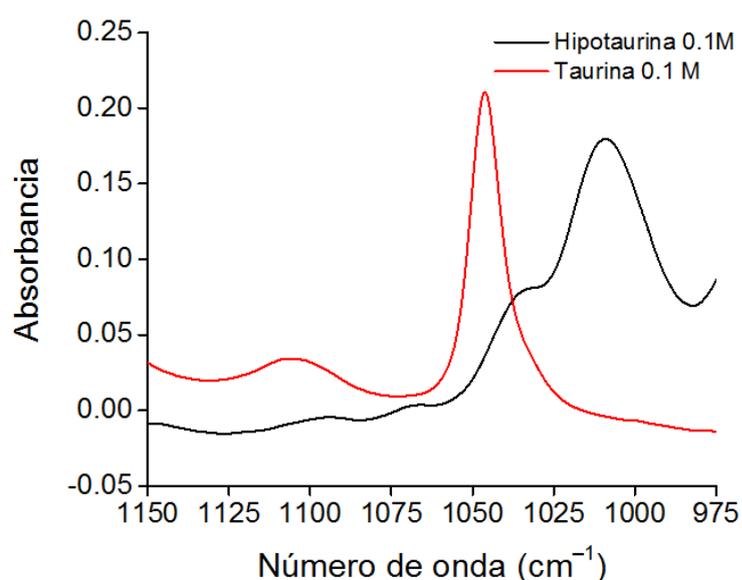


Figura 7.1. Espectros infrarrojos de hipotaurina (⁺H₃N-CH₂-SO₂⁻) 0.1 M y taurina (⁺H₃N-CH₂-SO₃⁻) 0.1 M en amortiguador tris 0.1 M pH 7.4.

Dado que acumular 500 interferogramas con una resolución de 4 cm⁻¹ toma 11 minutos (*i.e.* 660 s), teniendo en cuenta que la reacción del ácido sulfénico con H₂O₂ tiene una constante de velocidad de 0.4 M⁻¹ s⁻¹ a 37 °C y pH 7.4 [56] (se espera que a 25 °C la reacción no sea mucho más lenta), que se tiene que usar un exceso de H₂O₂ para que la reacción esté en condiciones de pseudo primer orden y que el ácido sulfénico decae (reacción que compite) con una constante de 1.3 × 10⁻³ s⁻¹ [165], se optó por estudiar la cinética de la oxidación del ácido sulfínico en vez de la del ácido sulfénico, siguiendo la formación de ácido sulfónico.

El protocolo a seguir fue: se puso a reaccionar HSA 0.9 mM (0.8 mM RSH) con H₂O₂ en exceso (6.6 mM, concentración determinada usando el protocolo descrito en la **Sección 5.2.3**) en amortiguador tris 0.1 M pH 7.4 entre dos ventanas de BaF₂ sin separación, y se registró el espectro IR entre 800 y 4000 cm⁻¹ cada 11 min. Los espectros se generaron de la misma manera que para las soluciones de taurina e hipotaurina. Se siguió la reacción por el aumento de la intensidad de la banda a 1047 cm⁻¹ (formación de sulfonato). Los experimentos se realizaron a una temperatura ambiente de 25 °C.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1 Estudio DFT del mecanismo oxidación de un ácido sulfénico de bajo peso molecular por H₂O₂

7.3.1.1. Descriptores de la nucleofilia global y local de sulfenato y ácido sulfénico

Para tener una primera idea de qué forma de protonación del ácido sulfénico es más reactiva como nucleófilo, se evaluó la nucleofilia del grupo funcional del sulfenato, **1**, y del ácido sulfénico, **2**, dada por los valores de la blandura nucleofílica del grupo funcional, s_g^- (ver **Sección 2.2.2.7**). Un valor más alto de s_g^- indica mayor nucleofilia. Para **1**, el valor de s_g^- es 0.202 a.u. eV⁻¹, mientras que para **2** el valor es de 0.161 a.u. eV⁻¹ (**Tabla 7.1**), sugiriendo que el grupo sulfenato es más nucleófilo que el grupo ácido sulfénico, lo cual es consistente con trabajos previos [33, 52, 341].

Tabla 7.1. Energías del orbital KS ocupado de mayor energía, ϵ_{HOMO} , y blandura nucleofílica del grupo funcional, s_g^- , para **1**, **2** y el complejo de reactivos del mecanismo A, RC (**1**·H₂O₂), calculadas al nivel B3LYP/6-31+G(d)

Especie	ϵ_{HOMO} (eV)	s_g^- (a.u. eV ⁻¹)
1	-4.41	0.202
2	-6.54	0.161
RC (1 ·H ₂ O ₂)	-4.89	0.173

Asimismo, dado que el grupo sulfenato es un nucleófilo ambidentado [59] –es decir, podría atacar por el S o bien por el O–, para saber cuál es el sitio más nucleófilo del grupo sulfenato, se evaluaron los valores de las funciones de Fukui nucleofílicas condensadas f_k^- sobre el átomo de S y sobre el átomo de O. Los valores de f_k^- son 0.485 y 0.394 a.u. sobre los átomos S y O, respectivamente (**Tabla 7.2**), lo que

sugiere que el sitio más nucleofílico es el átomo de azufre, por lo que sería más probable un ataque por el S que por el O.

Tabla 7.2. Funciones de Fukui nucleofílicas condensadas (en a.u.) sobre el S, f_S^- , y sobre el O, f_O^- para **1** y RC (**1**·H₂O₂), calculadas al nivel B3LYP/6-31+G(d).

Especie	f_S^-	f_O^-
1	0.485	0.394
RC (1 ·H ₂ O ₂)	0.584	0.280

7.3.1.2. Caracterización estructural y energética de cuatro mecanismos alternativos de reacción

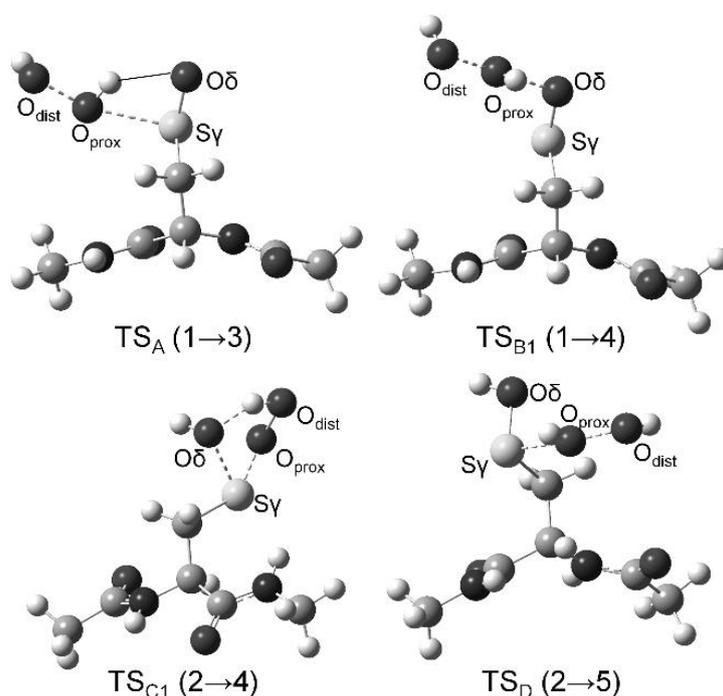


Figura 7.2. Estructuras de los estados de transición de los mecanismos A, B, C y D caracterizadas al nivel PCM-B3LYP/6-31+G(d) en presencia de agua como solvente.

Considerando lo anterior, en primer lugar, se consideró el Mecanismo A, el cual consiste en el ataque nucleofílico del S γ de **1** sobre el O_{prox} del H₂O₂, pasando por un estado de transición (TS) *cuasi*-lineal que corresponde a la ruptura del enlace O_{prox}-O_{dist} y a la formación del enlace S γ -O_{prox} (mecanismo S_N2). Los productos de reacción son sulfinato, **3**, y agua. El valor de la energía libre de activación a 298 K, ΔG^\ddagger , es de 16.4 kcal mol⁻¹, por lo que se trata de un mecanismo viable. La etapa B1 del Mecanismo B consiste en el ataque nucleofílico del O δ de **1** sobre el O_{prox} del H₂O₂, pasando por un TS lineal que corresponde a la ruptura del enlace O_{prox}-O_{dist} y a la formación del enlace O δ -O_{prox} (mecanismo S_N2). Los productos formados en esta

etapa son el intermediario persulfenato, **4**, y agua. El valor de ΔG^\ddagger es 25.5 kcal mol⁻¹, por lo que el Mecanismo B no es una alternativa viable al Mecanismo A, siendo consistente con el análisis de blandura local. La etapa C1 del Mecanismo C, consiste en el ataque nucleofílico del O_{prox} del HO₂⁻ sobre el S γ de **2**, pasando por un TS cíclico que corresponde a la ruptura del enlace S γ -O δ , la formación del enlace S γ -O_{prox} y la transferencia protónica de O_{dist} a O δ . Los productos de reacción son **4** y agua. El valor de ΔG^\ddagger es 40.3 kcal mol⁻¹, por lo que este mecanismo es muy poco probable que ocurra. Dado que las barreras de energía libre son demasiado elevadas, no se modeló el rearrreglo de **4** a **3**, es decir la etapa B2/C2. El Mecanismo D consiste en el ataque nucleofílico del S γ de **2** sobre el O_{prox} del H₂O₂, pasando por un TS lineal que corresponde a la ruptura del enlace O_{prox}-O_{dist} y a la formación del enlace S γ -O_{prox} (mecanismo S_N2). Los productos de la reacción son ácido sulfínico, **5**, y agua. El valor de ΔG^\ddagger es 28.2 kcal mol⁻¹, por lo que este mecanismo tampoco es una alternativa viable al mecanismo A, siendo consistente con el análisis de blandura de grupos funcionales, y con estudios computacionales [33] y experimentales [52, 341] previos. Las estructuras de los estados de transición de cada mecanismo se muestran en la **Figura 7.2**, mientras que la energética a 298 K se resume en la **Tabla 7.3**. En resumen, de las cuatro alternativas mecanísticas propuestas, la única viable es el Mecanismo A, del cual se entrará en detalle a continuación.

Tabla 7.3. Energías libres (a 298 K; en kcal mol⁻¹) de activación, ΔG_{298K}^\ddagger , y de reacción, $\Delta G_{R,298K}$, para los mecanismos estudiados para la oxidación de ácido N1-acetil-N2-metil-cisteínamida sulfénico por H₂O₂, calculadas al nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d)// B3LYP/6-311++G(3df,2p) en presencia de agua como solvente implícito.

Mecanismo	ΔG_{298K}^\ddagger Relativo a reactivos	ΔG_{298K}^\ddagger Relativo a RC	$\Delta G_{R,298K}$
A	16.4	15.1	-74.2
B	24.8	23.8	-6.1
C	39.6	28.8	-11.6
D	27.5	18.7	-82.9

7.3.1.3. Detalle mecanístico del Mecanismo A

Como se mencionó anteriormente, este mecanismo consiste en el ataque nucleofílico del S γ del sulfenato, **1**, sobre el O_{prox} del H₂O₂, a través de un TS cuasi-lineal que corresponde a la ruptura del enlace O_{prox}-O_{dist} y la formación del enlace S γ -O_{prox}. El análisis de los índices de enlace de Wiberg (**Tabla 7.4**) muestra que la coordenada

de reacción involucra la ruptura del enlace $O_{\text{prox}}-O_{\text{dist}}$ y la formación del enlace $S\gamma-O_{\text{prox}}$. A nivel del TS, los grados de avance (de acuerdo a la ecuación 5.1) son 0.269 y 0.298 para $S\gamma-O_{\text{prox}}$ y $O_{\text{prox}}-O_{\text{dist}}$, indicando que se trata de un proceso asíncrono. También se observa a nivel del TS el fortalecimiento del enlace $S\gamma-O\delta$ (aumento de 0.055 a.u. en el índice de enlace) respecto al RC. Este fortalecimiento es despreciable cuando el $O\delta$ se encuentra protonado, es decir en el mecanismo D.

Tabla 7.4. Distancias (\AA) e índices de enlace de Wiberg (a.u., en negrita) entre átomos seleccionados para los puntos estacionarios de la reacción entre **1** y H_2O_2 en solución acuosa al nivel B3LYP/6-31+G(d).

Par atómico	1 + H_2O_2	RC	TS	PC	3 + H_2O
$S\gamma-O\delta$	1.64/ 1.036	1.65/ 0.996	1.60/ 1.051	1.55/ 1.106	1.55/ 1.094
$S\gamma-O_{\text{prox}}$	—	2.53/ 0.009	2.41/ 0.327	1.56/ 1.053	1.55/ 1.096
$O_{\text{prox}}-O_{\text{dist}}$	1.45/ 1.008	1.46/ 1.008	1.75/ 0.612	2.72/ 0.024	—
$O\delta-H_{\text{prox}}$	—	1.47/ 0.192	2.02/ 0.040	3.11/ 0.004	—

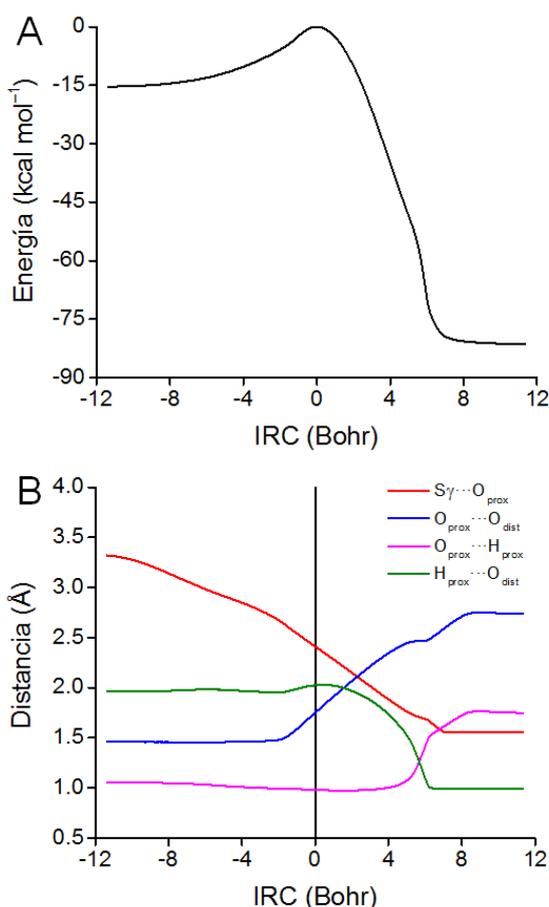


Figura 7.3. Evolución de la energía electrónica (A) y de las distancias asociadas a la coordenada de reacción y a la transferencia protónica post-TS (B) a lo largo del IRC en el mecanismo A a al nivel B3LYP/6-31+G(d). La línea vertical indica la ubicación del TS.

En el perfil de energía potencial a lo largo del camino de reacción IRC se observa un hombro en IRC = 5.46 Bohr (**Figura 7.3A**), lo cual se puede interpretar como un punto de inflexión cresta-valle (VRI) [342], en el que el camino de reacción se bifurca. Por la definición de IRC [292], la trayectoria seguirá el camino de mínima energía. A partir del punto VRI, comienza a darse una transferencia protónica de O_{prox} a O_{dist} , formándose así sulfinato, **3**, y agua, en lugar de formarse ácido sulfínico, **5**, y OH^- (**Figura 7.3B**), lo que es consistente con el hecho de que los efectos isotópicos son despreciables en la oxidación del ácido 9-fluoro-10-tripticensesulfénico por $^2\text{H}_2\text{O}_2$ en metanol deuterado [341]. Fenómenos similares se observan en las reacciones con tiolatos y H_2O_2 [36-38]. Respecto a la red de enlace de hidrógeno (EdH), se observa un importante debilitamiento (variación del índice de enlace de Wiberg de -0.152) del EdH entre $O\delta$ y H_{prox} a nivel del TS con respecto al RC. La presencia de este enlace de hidrógeno fuerte a nivel del RC disminuye la nucleofilia del grupo sulfenato (el valor de s_{g}^- del grupo sulfenato disminuye de 0.202 a 0.173 a.u. eV^{-1} en el RC con respecto a **1**, **Tabla 7.1**) y aumenta la diferencia en la nucleofilia local a favor del S_{y} (la diferencia de los valores de f_{k}^- de S_{y} con respecto a $O\delta$ aumenta de 0.091 a 0.268 a.u., **Tabla 7.2**). Esto sugiere que la presencia de EdH que involucren al $O\delta$ disminuiría la nucleofilia del grupo sulfenato, y a su vez volvería más nucleófilo al S_{y} respecto al $O\delta$.

La energía libre de activación de $16.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ es $1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ menos que la estimada para la oxidación de ácido 9-fluoro-10-tripticensesulfénico por H_2O_2 en metanol, de $17.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ [341]. Esta diferencia, aunque pequeña, puede deberse o a la naturaleza del ácido sulfénico, o más probablemente a que se la reacción se estudió en un medio menos polar como el metanol, teniendo en cuenta estudios de modelado computacional que sugieren que la barrera de reacción disminuye al aumentar la polaridad del medio [58]. Para tener una primera idea de lo que sucedería en el sitio activo de una enzima, se calculó la energía libre de activación respecto al RC en lugar de hacerlo con respecto a los reactivos aislados, cuyo valor es $15.1 \text{ kcal mol}^{-1}$. Este valor se encuentra en el intervalo de los valores de ΔG^\ddagger estimados (entre 14.0 y $15.3 \text{ kcal mol}^{-1}$) usando la ecuación de Eyring a partir de constantes de velocidad para la reacción en AhpE, Prdx1, MAP kinasa 3, fosfatasas Cdc25 y NADH peroxidasa de *Streptococcus* [20, 52, 55, 57]. En algunas proteínas, como Prdx2, Prdx3 y la NADH peroxidasa H10Q de *Streptococcus* [57], los valores de ΔG^\ddagger estimados son alrededor de 2 kcal mol^{-1} más bajos, posiblemente debido a características del sitio activo, como por ejemplo la red de EdH con el sulfenato o el

H_2O_2 , o la presencia de cargas positivas cercanas al H_2O_2 , que podrían estabilizar al TS de carga negativa.

7.3.2. Modelado QM/MM de la reacción del sulfenato de la HSA con H_2O_2

7.3.2.1. Modelo 1

En este modelo, que parte del *cluster* c0 (en el que el O_{δ} del sulfenato forma EdH con el OH_{η} de Tyr84) de la dinámica de HSA- SO^- , la reacción sigue un mecanismo S_N2 con un estado de transición lineal que involucra la formación del enlace $S_{\gamma}-O_{prox}$ y la ruptura del enlace $O_{prox}-O_{dist}$.

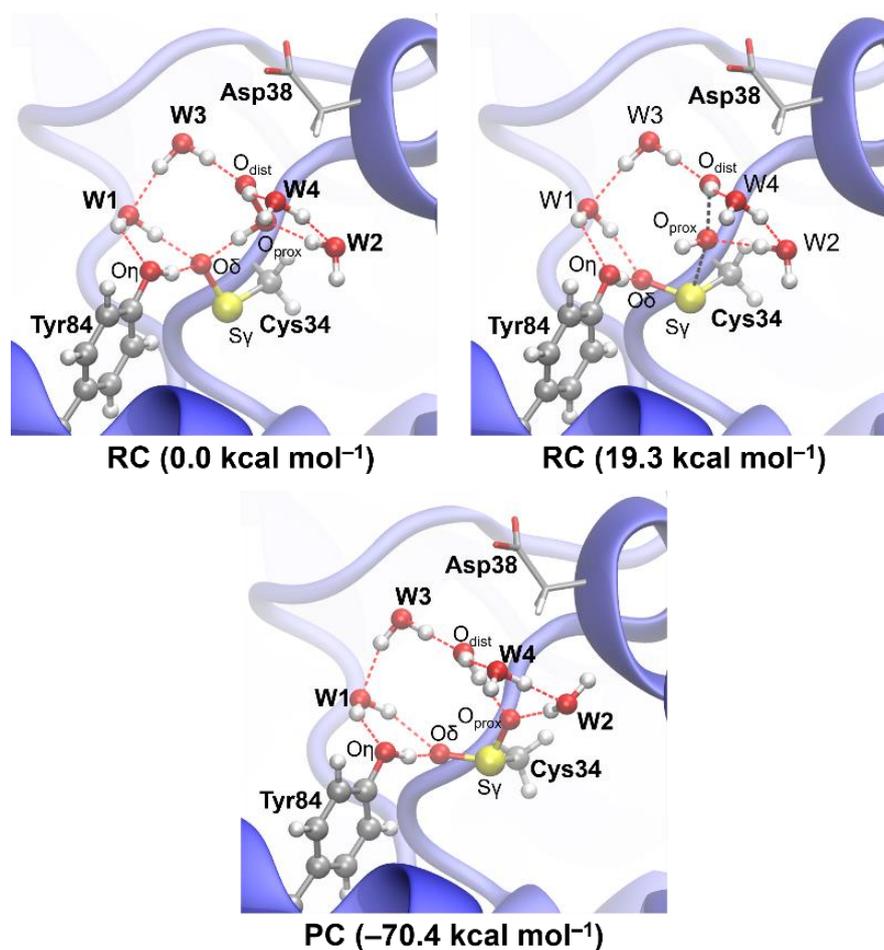


Figura 7.4. Estructuras de reactivos (RC), estado de transición (TS) y productos (PC) al nivel B3LYP/6-31+G(d)//ff99SB para el Modelo 1. Los valores entre paréntesis corresponden a valores de energía libre a 300 K al nivel B3LYP/6-311++G(3df,2p)//ff99SB//B3LYP/6-31+G(d)//ff99SB respecto a RC.

Usando la **Ecuación 5.1**, a partir de los índices de enlace reportados en la tabla 7.1, se obtienen grados de avance X a nivel del TS de 0.33 y 0.45 para la formación de $S_{\gamma}-O_{prox}$ y la ruptura de $O_{prox}-O_{dist}$, respectivamente, lo que indica que la reacción es un proceso asíncrono. Asimismo, se observa un fortalecimiento del enlace $S_{\gamma}-O_{\delta}$ a

nivel del TS ($\Delta B = +0.085$ a.u.) y del PC ($\Delta B = +0.117$ a.u.), Respecto a la red de EdH, se observa que ésta se debilita a nivel del TS ($\Delta B = -0.165$ a.u.), que debido principalmente a la ruptura del EdH $O\delta \cdots H_{\text{prox}}-O_{\text{prox}}$ ($\Delta B = -0.147$ a.u.) Los parámetros estructurales de la reacción e índices de enlace de Wiberg están reportados en la **Tabla 7.5**.

Tabla 7.5. Distancias (Å) e índices de enlace de Wiberg (en negrita, a.u.) entre átomos seleccionados para los puntos estacionarios para el Modelo 1 de la reacción entre HSA-SO⁻ y H₂O₂ al nivel B3LYP/6-31+G(d)//ff99SB.

Enlace	RC	TS	PC
<i>Coordenada de reacción</i>			
S γ -O δ	1.68/ 0.931	1.61/ 1.016	1.57/ 1.048
S γ -O _{prox}	3.34/ 0.005	2.33/ 0.363	1.55/ 1.078
O _{prox} -O _{dist}	1.45/ 1.006	1.78/ 0.566	2.72/ 0.020
<i>Enlaces de hidrógeno</i>			
O $\delta \cdots H_{\text{prox}}$	1.56/ 0.147	2.76/ 0.000	3.09/ 0.002
O $\delta \cdots H_{\eta}$	1.66/ 0.109	1.64/ 0.122	1.67/ 0.107
O $\delta \cdots H_{W1}$	1.73/ 0.083	1.80/ 0.059	2.09/ 0.024
O _{prox} $\cdots H_{W2}$	1.82/ 0.060	1.86/ 0.046	1.90/ 0.039
H _{prox} $\cdots O_{\eta}$	3.23/ 0.001	2.40/ 0.010	3.69/ 0.000
O _{dist} $\cdots H_{W3}$	1.78/ 0.059	1.65/ 0.104	1.61/ 0.107
H _{dist} $\cdots O_{W4}$	1.79/ 0.069	1.93/ 0.037	1.91/ 0.042
H _{W3} $\cdots O_{W1}$	1.83/ 0.062	1.86/ 0.052	1.94/ 0.043
H _{W4} $\cdots O_{W2}$	1.89/ 0.049	1.93/ 0.042	1.78/ 0.070

De forma similar a lo observado en el modelo de bajo peso molecular, se observa un hombro en el perfil de reacción (**Figura 7.5A**) en dirección hacia los productos, asociado a una transferencia protónica post-TS (**Figuras 7.4 y 7.5B**) el cual corresponde con una transferencia protónica post TS de O_{prox} a O_{dist}. Asimismo, se observa otro hombro en el perfil, en dirección a los reactivos, que se puede asociarse con movimientos a nivel de la región MM, o a la formación del EdH H_{prox} $\cdots O_{\eta}$, presente solamente en el TS (**Tabla 7.3**). La energía libre de activación es de 19.3 kcal mol⁻¹ a 300 K (**Figura 7.4**), la cual sobreestima en 1.3 kcal mol⁻¹ el valor de ~18 kcal mol⁻¹, estimado a partir de una constante de velocidad independiente del pH de 1 M⁻¹ s⁻¹ (estimada a partir de la constante de 0.4 M⁻¹ s⁻¹ a pH 7.4 y 37 °C, y asumiendo un valor de pK_a de 7.58 para HSA-SOH).

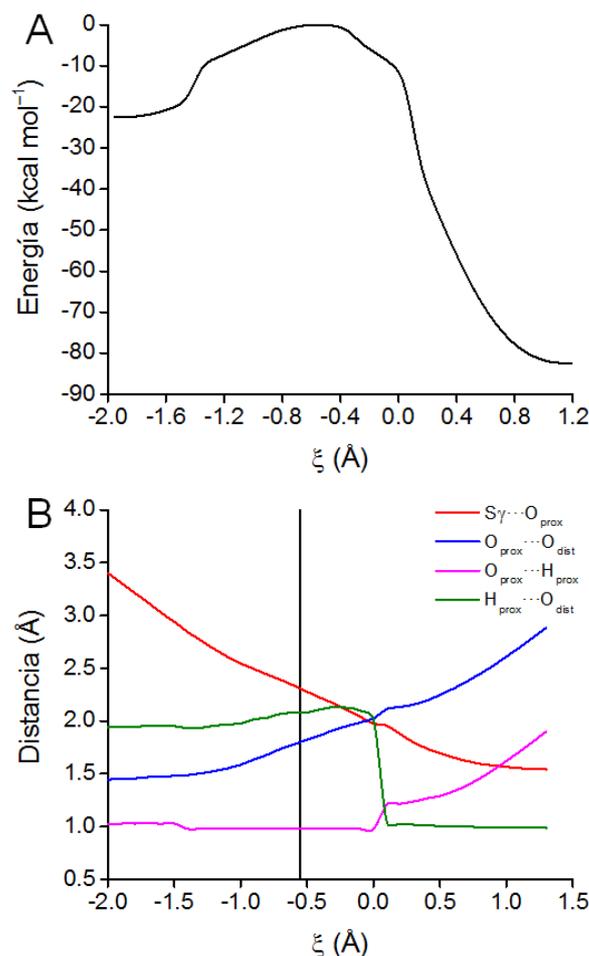


Figura 7.5. Evolución de la energía QM/MM (A) y de las distancias asociadas a la coordenada de reacción y a la transferencia protónica post-TS (B) a lo largo de la coordenada ξ en el Modelo 1 al nivel B3LYP/6-31+G(d)/ff99SB. La línea vertical corresponde al valor de ξ correspondiente al TS.

7.3.2.2. Modelo 2

En este modelo, que parte del *cluster* c1 (en el que el sulfenato no forma EdH con Tyr84) de la dinámica de HSA-SO⁻, la reacción ocurre de forma similar a lo que ocurre en el Modelo 1. Se trata también de un proceso asíncrono con valores de X de 0.34 para la formación de $S\gamma-O_{prox}$ y de 0.45 para la ruptura de $O_{prox}-O_{dist}$, respectivamente. Al igual que en el Modelo 1, observa un fortalecimiento de $S\gamma-O\delta$ a nivel del TS y del PC, aunque de mayor magnitud ($\Delta B = +0.127$ a.u. para el TS y $+0.158$ a.u. para el PC). Con respecto a la evolución de la red de EdH, se observa un debilitamiento a nivel del TS similar al observado en el Modelo 1 ($\Delta B = -0.162$ a.u.), que se debe en este caso al debilitamiento -y no a la ruptura- del EdH $O\delta \cdots H_{prox}-O_{prox}$ ($\Delta B = -0.142$ a.u.). Los parámetros estructurales relevantes a la reacción están reportados en la **Tabla 7.6**.

Tabla 7.6. Distancias (Å) e índices de enlace de Wiberg (a.u.; en negrita) entre átomos seleccionados para los puntos estacionarios para el Modelo 2 de la reacción entre HSA-SO⁻ y H₂O₂ al nivel B3LYP/6-31+G(d)//ff99SB.

Enlace	RC	TS	PC
<i>Coordenada de reacción</i>			
S _γ -O _δ	1.68/ 0.941	1.60/ 1.068	1.55/ 1.099
S _γ -O _{prox}	2.49/ 0.008	2.41/ 0.354	1.56/ 1.036
O _{prox} -O _{dist}	1.46/ 1.004	1.80/ 0.557	2.75/ 0.020
<i>Enlaces de hidrógeno</i>			
O _δ ···H _{prox}	1.41/ 0.218	1.97/ 0.076	3.46/ 0.002
O _δ ···H _{W1}	1.67/ 0.102	1.66/ 0.099	1.69/ 0.092
O _δ ···H _{W2}	1.87/ 0.054	2.04/ 0.022	2.02/ 0.024
O _{prox} ···H _{W3}	1.76/ 0.086	1.77/ 0.071	1.68/ 0.090
O _{dist} ···H _{W4}	1.70/ 0.087	1.57/ 0.136	1.62/ 0.111
H _{dist} ···O _{W5}	1.88/ 0.041	2.04/ 0.021	1.95/ 0.030

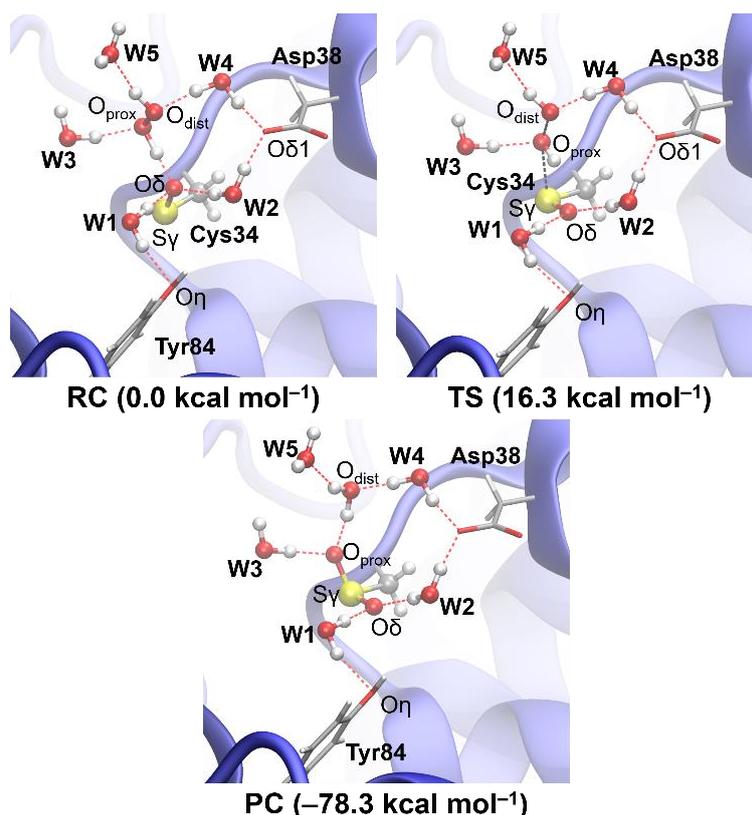


Figura 7.6 Estructuras de reactivos (RC), estado de transición (TS) y productos (PC) al nivel B3LYP/6-31+G(d)//ff99SB para el Modelo 2. Los valores entre paréntesis corresponden a valores de energía libre a 300 K al nivel B3LYP/6-311++G(3df,2p)//ff99SB//B3LYP/6-31+G(d)//ff99SB respecto a RC.

De forma análoga al Modelo 1 y al modelo de bajo peso molecular, se observa una transferencia post-TS de O_{prox} a O_{dist} (**Figuras 7.6 y 7.7B**).

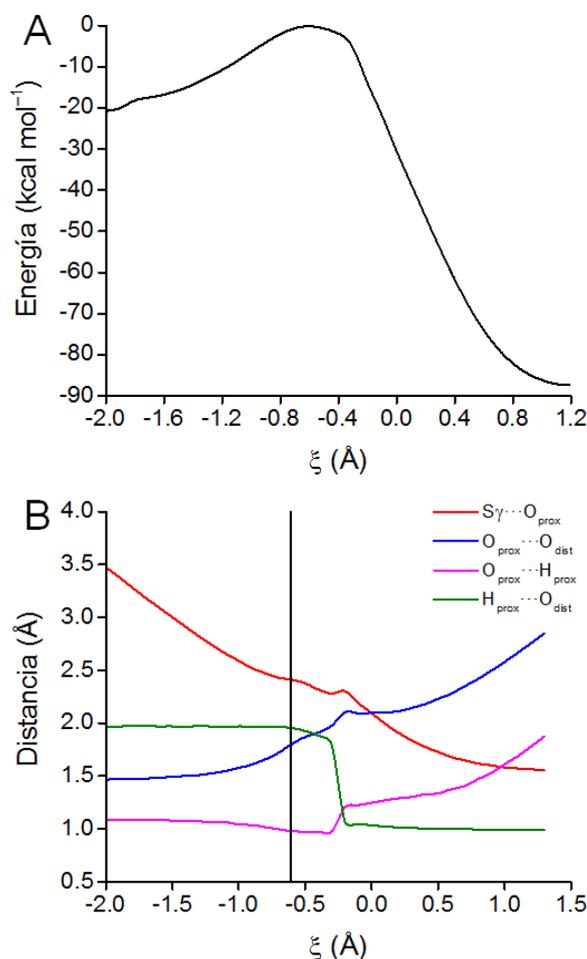


Figura 7.7. Evolución de la energía QM/MM(A) y de las distancias asociadas a la coordenada de reacción y a la transferencia protónica post-TS (B) a lo largo de la coordenada ξ en el Modelo 2 al nivel B3LYP/6-31+G(d)/ff99SB. La línea vertical corresponde al valor de ξ correspondiente al TS.

De forma similar al modelo de bajo peso molecular, no se observa el hombro en dirección hacia los reactivos en el perfil. La energía libre de activación es de 16.3 kcal mol⁻¹ a 300 K (**Figura 7.6**), la cual subestima el valor estimado experimentalmente en aprox. 1.7 kcal mol⁻¹ y 3.0 kcal mol⁻¹ menor que para el Modelo 1. Posiblemente esta diferencia se deba en parte, a que el fortalecimiento del enlace $S\gamma-O\delta$ a nivel del TS es mayor que en el Modelo 1. Teniendo en cuenta que el *cluster* c1 tiene una población de 30 %, y que el complejo $HSA-SO^-$, y que no necesariamente el complejo $HSA-SO^- \cdot H_2O_2$ es más estable, en términos de energía libre, que los reactivos separados (por ejemplo, en el modelo de bajo peso molecular, el complejo $RSO^- \cdot H_2O_2$ es 1.2 kcal mol⁻¹ menos estable que los reactivos separados),

éste modelo parece describir bien la reacción de oxidación del sulfenato de la HSA por H_2O_2 .

Tabla 7.7. Distancias (Å) e índices de enlace de Wiberg (a.u.) entre átomos seleccionados para los puntos estacionarios para el Modelo 2 de la reacción entre $HSA-SO^-$ y H_2O_2 al nivel ONIOM-ME(B3LYP/6-31+G(d):AMBER96).

Enlace	RC	TS
<i>Coordenada de reacción</i>		
$S\gamma-O\delta$	1.67/ 0.945	1.63/ 1.006
$S\gamma-O_{prox}$	3.50/ 0.009	2.50/ 0.268
$O_{prox}-O_{dist}$	1.46/ 0.991	1.66/ 0.705
<i>Enlaces de hidrógeno</i>		
$O\delta\cdots H_{prox}$	1.38/ 0.234	1.78/ 0.079
$O\delta\cdots HW_1$	1.81/ 0.060	1.71/ 0.073
$O\delta\cdots HW_2$	1.82/ 0.061	1.85/ 0.044
$O_{prox}\cdots HW_3$	1.78/ 0.058	1.86/ 0.043
$O_{dist}\cdots HW_3$	1.88/ 0.044	1.82/ 0.060
$O_{dist}\cdots HW_4$	2.11/ 0.023	1.89/ 0.041

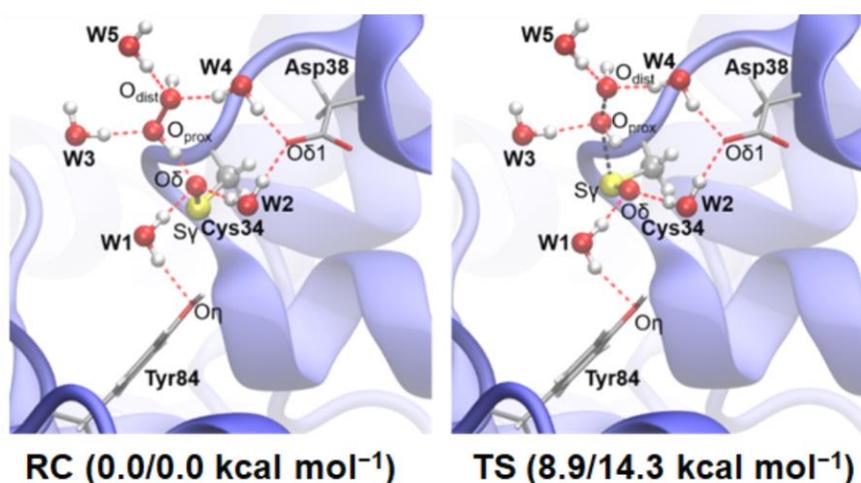


Figura 7.8. Estructuras de reactivos (RC), estado de transición (TS) y productos (PC) al nivel B3LYP/6-31+G(d)/amber99 para el Modelo 2. Los valores entre paréntesis corresponden a valores de energía libre a 298 K al nivel ONIOM-EE(B3LYP/6-311++G(3df,2p):AMBER96)//ONIOM-ME(B3LYP/6-31+G(d):AMBER96) respecto a RC.

Si en lugar del QM/MM aditivo se usa el método ONIOM, si bien la reacción sigue el mismo mecanismo (S_N2), se observan diferencias importantes a nivel estructural y energético (**Figura 7.8**). En primer lugar, la reacción tiene un carácter mucho más temprano, como muestran los índices de enlace de Wiberg (**Tabla 7.7**). En segundo

lugar, el cambio en los índices de enlace asociado a las componentes de la coordenada de reacción es de mayor magnitud (ONIOM: $\Delta B = 0.034$ a.u.; QM/MM aditivo: $\Delta B = 0.026$ a.u.). En tercer lugar, la red de EdH se ve alterada. El agua W5 en vez de actuar como aceptora de EdH con el O_{dist} , actúa como dadora. Si bien se observa un debilitamiento de la red de EdH, éste es de menor magnitud (ONIOM: $\Delta B = -0.140$ a.u.; QM/MM aditivo: $\Delta B = -0.163$ a.u.). La energía libre de activación es $8.9 \text{ kcal mol}^{-1}$, mucho menor que la calculada con el QM/MM aditivo. Si en lugar de usar B3LYP para los cálculos *single-point* se usa MP2, el valor de ΔG^\ddagger aumenta a $14.3 \text{ kcal mol}^{-1}$, que, si bien está por debajo del obtenido con QM/MM aditivo, la subestimación de la barrera es mucho menor. Posiblemente las diferencias estructurales anteriormente mencionadas, principalmente sobre la red de EdH, sean la causa de la subestimación de la barrera, y estas diferencias probablemente se deban a que las optimizaciones de geometría se llevaron a cabo usando el *embedding* mecánico (y luego se usó *embedding* electrónico para las correcciones *single-point*), mientras que con el QM/MM aditivo éstas se llevaron a cabo usando el *embedding* electrónico. En ONIOM, si bien es posible realizar optimizaciones de geometría usando *embedding* electrónico, estos cálculos requieren mucha memoria, y además la convergencia es difícil.

7.3.3. Cinética de la oxidación del ácido sulfínico de la HSA por H_2O_2

El espectro IR muestra una señal a 1047 cm^{-1} (**Figura 7.9**), la cual se presume que corresponde al grupo sulfonato, teniendo en cuenta que el espectro IR de taurina muestra una banda a dicha posición que corresponde al grupo sulfonato (**Figura 7.1**).

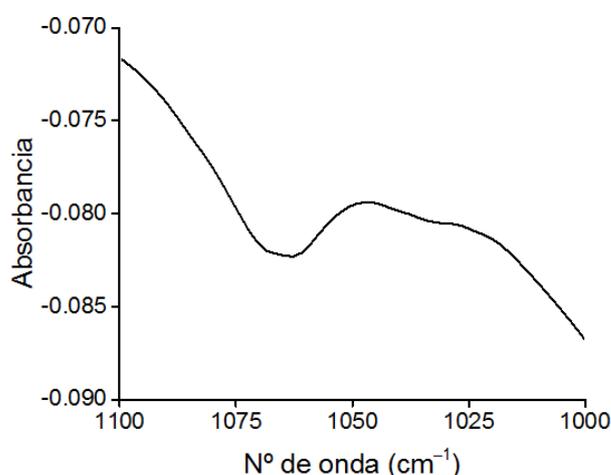


Figura 7.9. Espectro infrarrojo de HSA 0.8 mM (RSH) tratada con H_2O_2 6.6 mM. Espectro registrado a $t = 660$ s.

A fin de aislar la banda a 1047 cm^{-1} , el espectro se trató con una línea de base tipo *spline*, obteniendo un pico bien definido (**Figura 7.10A,C**), cuya amplitud corresponde a la intensidad, I , de la banda.

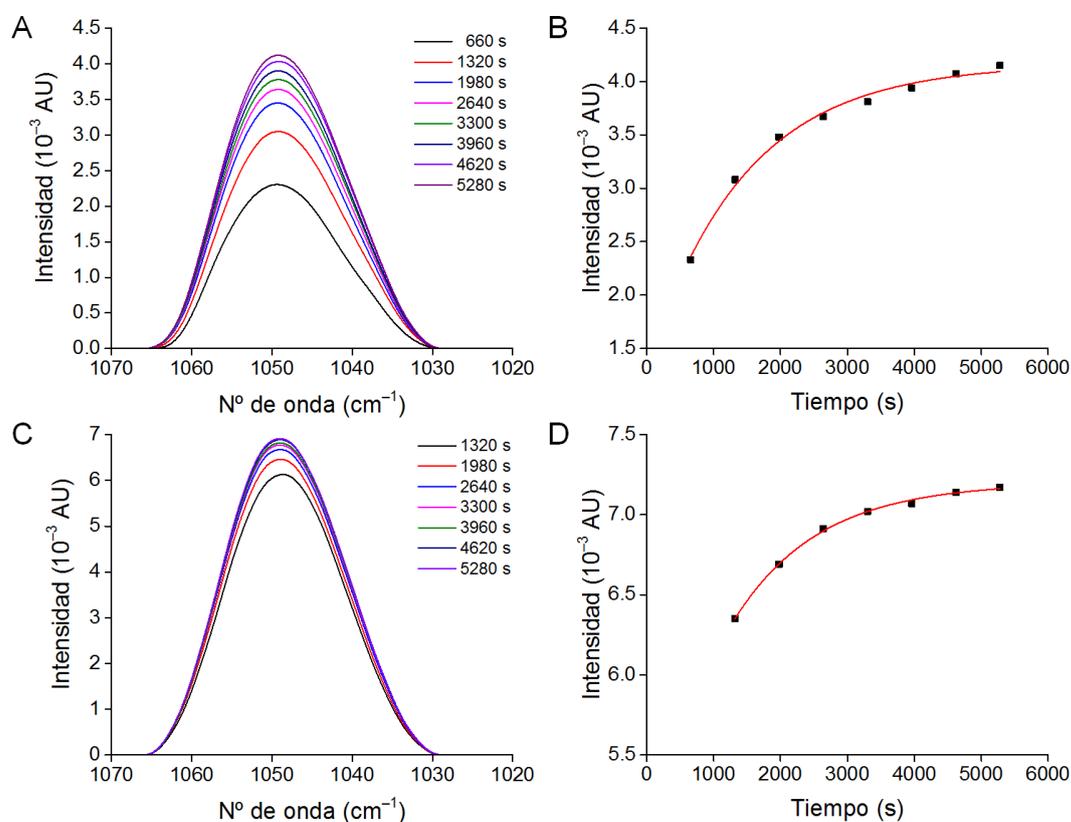


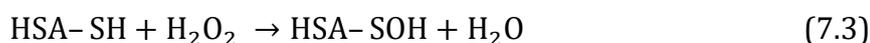
Figura 7.10. Banda a 1047 cm^{-1} –corregida por línea de base– del espectro infrarrojo de HSA 0.8 mM (RSH) tratada con H_2O_2 6.6 mM (A, C), y evolución temporal de la intensidad de la banda (B, D). Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes (experimento 1: A, B; experimento 2: C, D).

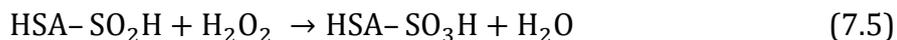
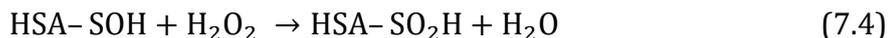
La intensidad de la banda a 1047 cm^{-1} se graficó en función del tiempo (**Figura 7.10B,D**), t , usando la función:

$$I = I_{max} - Ae^{-k_{obs}t} \quad (7.2)$$

$$k_{obs} = k[\text{H}_2\text{O}_2]$$

donde I_{max} es el valor al que tiende I cuando t tiende a infinito y A es un factor pre-exponencial. Se espera observar un retraso en la formación de ácido sulfónico ya que se parte de HSA-SH. Las reacciones (sucesivas) que ocurren en la celda de FT-IR están dadas por las ecuaciones 7.3 a 7.5:





En dos experimentos independientes (experimento 1, **Figura 7.10AB**; experimento 2, **Figura 7.10CD**) se obtuvieron valores de k de $0.105 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (experimento 1) y $0.118 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (experimento 2) para la formación de ácido sulfónico (ecuación 7.5). Promediando ambos valores se obtiene un valor de k de $0.112 \pm 0.007 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 25°C y pH 7.4.

7.4. Conclusiones

En esta sección, en primer lugar, se calcularon al nivel DFT (en solución acuosa), indicadores de la nucleofilia global y local de los grupos sulfenato y ácido sulfénico, indicando que el sulfenato es mejor nucleófilo y que el átomo de azufre es el sitio más reactivo.

Teniendo en cuenta estos resultados, se exploraron mediante modelado DFT en solución acuosa, cuatro posibles mecanismos para la oxidación de un ácido sulfénico de bajo peso molecular por H_2O_2 . De ellos, el único viable es el ataque nucleofílico del sulfenato para dar sulfinato y agua, con un valor de energía libre de activación de $16.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ a 298 K . En este mecanismo la reacción sigue un mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$, con estado de transición lineal y asíncrono, y al igual que en la reacción análoga con tiolatos, se observa una transferencia protónica post-TS que conduce a la formación de sulfinato y agua.

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a modelar a nivel QM/MM con esquema aditivo la oxidación del sulfenato formado en la HSA por H_2O_2 . La reacción sigue el mismo mecanismo que el modelo de bajo peso molecular, y la energía libre de activación es $16.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ a 300 K siendo consistente con trabajos experimentales previos que sugieren un valor de $\sim 18 \text{ kcal mol}^{-1}$. A fines comparativos, la misma reacción se modeló usando ONIOM en lugar del esquema aditivo. Los cálculos ONIOM subestiman la energía libre de activación en $\sim 9 \text{ kcal mol}^{-1}$, probablemente debido más que al esquema de QM/MM usado, al esquema de *embedding* usado para las optimizaciones. Si se cambia de nivel de teoría de DFT a MP2, la subestimación en la barrera es de $\sim 4 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Estos resultados contribuyen a establecer cuál es el mecanismo de oxidación de los ácidos sulfénicos, y también los efectos del entorno proteico sobre la reacción. Por

otro lado, estos resultados sugieren que para modelar reacciones de oxidación de ácidos sulfénicos en proteínas se necesita usar el esquema de *embedding* electrónico para realizar optimizaciones de geometría.

Finalmente, si bien no se pudo estudiar la oxidación del ácido sulfénico mediante espectroscopía infrarroja, se pudo estimar una constante de velocidad de para la oxidación del ácido sulfénico ($k = 0.112 \pm 0.007 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 25 °C; pH 7.4)

8. Interacción entre la oxidación de Cys34 y la glicación de la HSA

8.1. Antecedentes

Si bien no se cuenta con estudios previos sobre la estructura y dinámica del entorno de Cys34 en HSA glicada, como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que la glicación de la HSA favorece la oxidación del tiol [193, 235-237]. Por otro lado, otros estudios sugieren que la oxidación del tiol favorece la glicación de la HSA [234, 239].

También se ha reportado que la oxidación de Cys34 (formación de disulfuros mixtos con cisteína y homocisteína a nivel de Cys34, respectivamente HSA-SS-Cys y HSA-SS-Hcy) aumenta la nucleofilia del grupo amino de Lys525 [239].

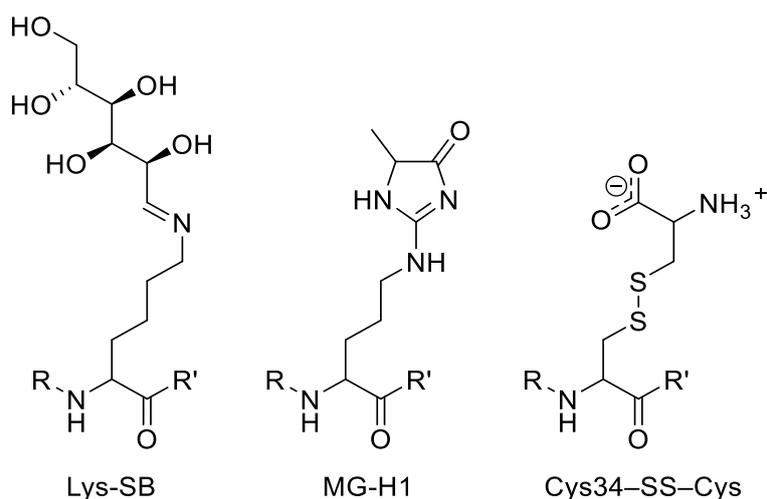
Por otro lado, dado que el MGO es un electrófilo altamente reactivo, se ha propuesto que el mismo es capaz de reaccionar con el tiol de la HSA (como lo hace con otros tioles, como glutatión), al parecer de forma lenta, aunque la constante de velocidad aún no ha sido determinada [89, 91].

En esta sección, función del **Objetivos específicos N.º 6, 7 y 8**, se estudió mediante simulaciones MD cómo la glicación en Lys195 y Arg410 afecta el entorno de Cys34, y se modeló a nivel QM/MM la reacción del tiolato de la HSA glicada por glucosa (formando base de Schiff en Lys195). Asimismo, mediante simulaciones MD y cálculos QM/MM se evaluaron los cambios en la nucleofilia en los residuos Lys195, Lys525 y Arg410 inducidos por la oxidación de Cys34 (formación de HSA-SS-Cys, la forma oxidada de HSA más abundante en plasma). Finalmente, se determinó en forma experimental la constante de velocidad para la reacción del tiol de la HSA con MGO.

8.2. Metodología

8.2.1. Parametrización de residuos modificados

Los residuos glicados (Lys formando base de Schiff con glucosa; Arg formando el producto MG-H1) y el disulfuro mixto entre Cys34 y cisteína libre (S-cisteinilación de Cys34, Cys34-SS-Cys) (**Esquema 8.1**) se parametrizaron de acuerdo a lo descrito en la **Sección 6.2.2**.



Esquema 8.1. Residuos modificados. Lys-SB denota un residuo de Lys formando base de Schiff con glucosa; MG-H1 denota el producto formado entre un residuo Arg y MGO; Cys34-SS-Cys denota un disulfuro mixto con cisteína a nivel de Cys34.

8.2.2. Dinámica molecular de HSA glicada

Los sistemas se prepararon y las simulaciones se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo seguido en la **Sección 4.2.1** para la preparación del sistema HSA-S⁻. Se consideraron dos sistemas, HSA formando base de Schiff con glucosa en Lys195 y HSA formando el producto MG-H1 en Arg410. La extensión de las dinámicas de producción fue de 200 ns.

8.2.3. Modelado QM/MM de la reacción entre HSA-S⁻ glicada y H₂O₂

El sistema se preparó y los cálculos QM/MM (ONIOM) se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito en las **Secciones 5.2.1 y 5.2.2**. La región QM quedó definida por las cadenas laterales de Cys34 y Tyr84, el residuo Pro35, el *backbone* de Gln33, el H₂O₂ y 5 moléculas de agua cercanas.

8.2.4. Efectos de la oxidación (formación de disulfuros mixtos con cisteína) de Cys34 sobre la reactividad de residuos de Lys y Arg

En primer lugar, se llevó a cabo una simulación MD de 700 ns (siguiendo protocolo descrito en la **Sección 4.2.1**), la cual convergió a los 500 ns (**Figura 8.1**). Luego, se generaron estructuras representativas por *clustering* y la estructura del *cluster* más poblado se usó, junto a la estructura del *cluster* c0 de la dinámica de HSA-SH como punto de partida para simulaciones MD de 20 ns con los residuos Lys195, Lys525 y Arg410 (los cuales son sitios preferenciales de glicación) en estado neutro, las cuales se llevaron a cabo usando el protocolo descrito en la **Sección 4.2.1**.

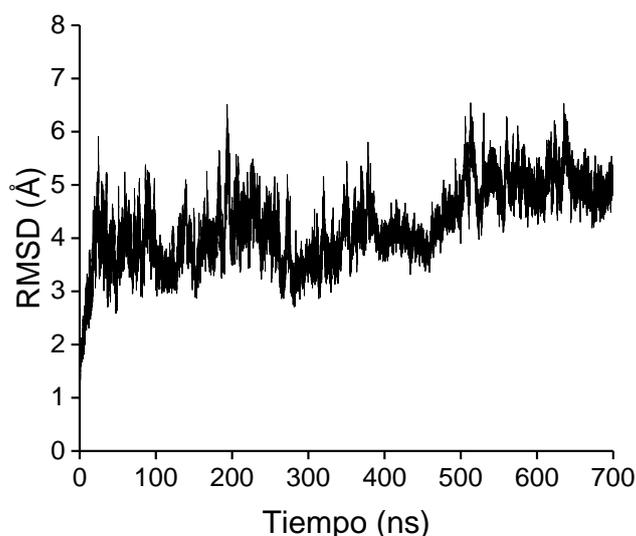


Figura 8.1. $C\alpha$ -RMSD de la simulación de HSA formando disulfuro mixto con cisteína a nivel de Cys34.

8.2.5. Cálculo QM/MM de descriptores de la reactividad

Para evaluar cambios en la nucleofilia, se calcularon descriptores de la reactividad (sobre estructuras representativas de los tramos convergidos de las simulaciones, obtenidas por *clustering*) a nivel QM/MM B3LYP/6-31+G(d)//ff99SB usando el programa AMBER 14. A los valores de los descriptores se les realizó un promedio ponderado de acuerdo a la ocupación de cada *cluster*, en los casos que haya más de un *cluster* con población importante.

8.2.6. Estudio cinético de la reacción del tiol de la HSA con MGO

En primer lugar, se incubó HSA previamente deslipidada y reducida (experimento 1: [HSA] = 0.713 mM, [HSA-SH] = 0.355 mM experimento 2: [HSA] = 1.09 mM, [HSA-SH] = 0.709 mM) con MGO 75 mM en amortiguador fosfato 0.1 M pH 7.4 a 37 °C, se tomaron alícuotas (100 μ L) a tiempos crecientes de hasta 1 hora y se determinó la concentración de tioles con DTNB 0.2 mM, en amortiguador pirofosfato 0.1 M ($V_f = 1$ mL), y la absorbancia a 412 nm se midió a los 5 min. Para dar cuenta de interferencias debidas a productos de reacción del MGO con otros residuos de la HSA, se midió la absorbancia a 412 nm pero sin usar DTNB. Entonces, se restó a la absorbancia con DTNB se le restó la absorbancia sin agregar DTNB y se calculó la concentración de tioles remanentes usando un coeficiente de extinción molar de 14150 $M^{-1} cm^{-1}$.

8.3. Resultados y discusión

8.3.1. Evaluación de cambios en el entorno local de Cys34 inducidos por glicación en residuos de Arg y Lys

8.3.1.1. Glicación en Arg410 por metilglioxal

La simulación converge a los 150 ns, como muestra el gráfico del C α -RMSD (**Figura 8.2**).

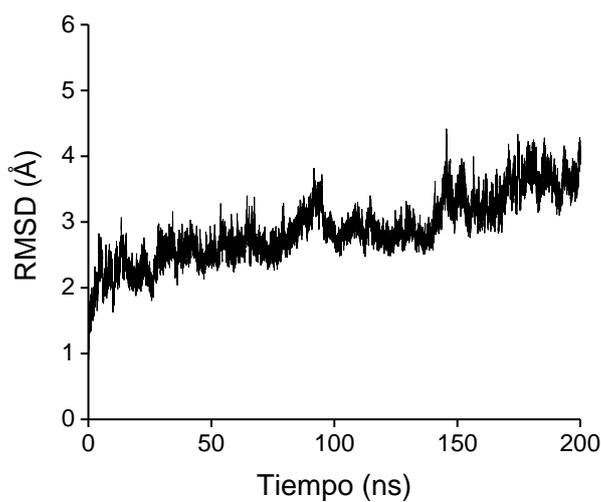


Figura 8.2. C α -RMSD de la simulación de HSA con Arg410 formando el producto de glicación MG-H1.

Con respecto a la accesibilidad al solvente del S γ , ésta no parece variar con respecto a HSA-S $^{-}$ sin glicar (**Figura 8.3A**), observándose valores promedio de SASA de ~ 32 Å 2 . Con respecto a la red de enlace de hidrógeno, se observa que el EdH con del S γ con el OH η de Tyr84 está presente durante todo el tramo convergido de la simulación (**Tabla 8.1**). El S γ interactúa también con varias moléculas de agua, y durante toda la simulación, al igual que en HSA-S $^{-}$ sin glicar, se establece un EdH puenteado por agua con el carboxilato de Asp38.

Tabla 8.1. Ocupación de presuntos EdH que involucran al S γ en HSA-S $^{-}$ formando el producto MG-H1 en Arg410, en el tramo de 150 a 200 ns.

Enlace de hidrógeno ^a	Ocupación ^b
S γ _{Cys34} ···H-O η _{Tyr84}	94 %
S γ _{Cys34} ···H $_2$ O	408 %
S γ _{Cys34} ···H-O-H···O $\delta(1,2)$ _{Asp38}	110 %

^a Criterio de corte de distancia D···A de 4 Å y de ángulo D-H···A de 120°. ^b La ocupación se define como el porcentaje del tiempo que la interacción está presente. Valores de más del 100 % indican interacciones con más de una molécula de agua.

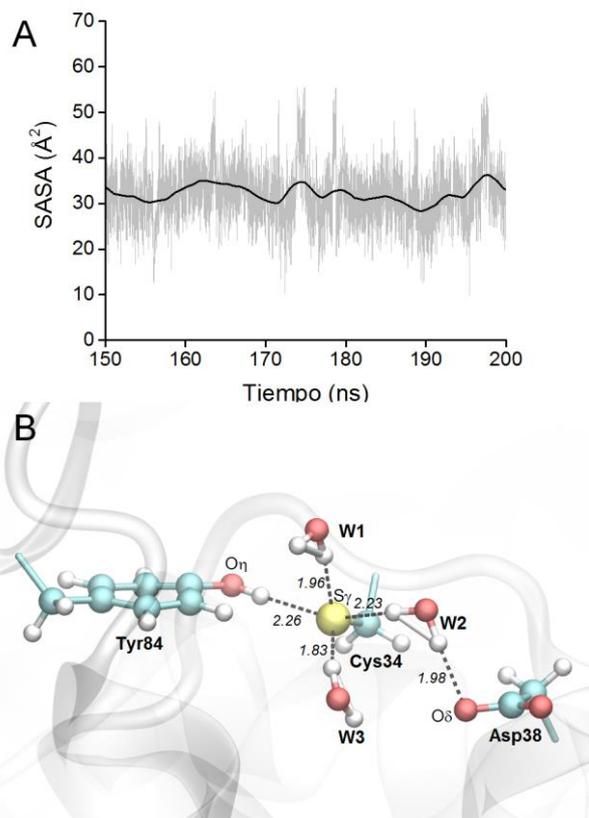


Figura 8.3. Evolución de la superficie expuesta al solvente del S γ en el tramo de 150 a 200 ns de la dinámica de HSA-S $^{-}$ formando el producto MG-H1 en Arg410 (A), y estructura representativa del cluster mayoritario del tramo convergido de la dinámica de HSA-S $^{-}$ modificada por MGO en Arg410 (B).

Respecto a la nucleofilia del tiolato, el valor de ϵ_{HOMO} del S γ (calculado sobre la estructura representativa *del cluster c0*, **Figura 8.3B**) es de -7.73 eV en HSA-S $^{-}$ modificada por MGO en Arg410 mientras que en HSA-S $^{-}$ sin glicar es de -8.00 eV, por lo que no se espera que la glicación en Arg410 tenga efectos sobre la reactividad de Cys34. No obstante, si bien el sitio preferencial de la HSA para la modificación por MGO es Arg410 [188], existen otros sitios susceptibles a la modificación por MGO, como Arg114, Arg186, Arg218 y Arg428, cuya modificación podría afectar el entorno de Cys34.

Tabla 8.2. Energía del orbital de Kohn-Sham ocupado de mayor energía, ϵ_{HOMO} , de la cadena lateral de Cys34 en las estructuras representativas de las dinámicas de HSA-S $^{-}$ glicadas (en Arg410 y Lys195) y de HSA-S $^{-}$ sin glicar, calculado al nivel B3LYP/6-31+G(d)//ff99SB.

Modificación	ϵ_{HOMO} (eV)
Ninguna	-8.00
MG-H1 en Arg410	-7.73
Base de Schiff en Lys195	-2.92

8.3.1.2. Glicación en Lys195

La simulación converge a los 100 ns, como muestra el gráfico de $C\alpha$ -RMSD (**Figura 8.4**).

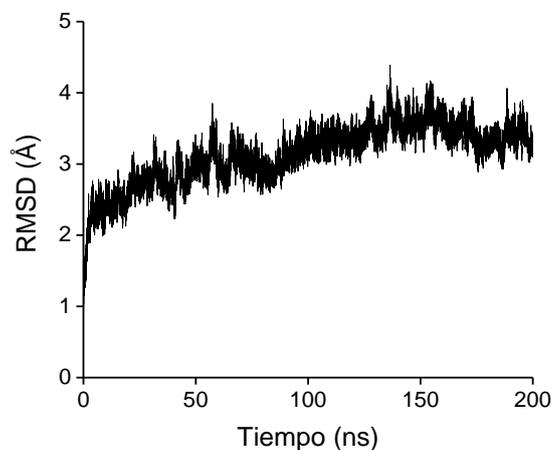


Figura 8.4. $C\alpha$ -RMSD de la simulación de HSA con Lys195 formando base de Schiff con glucosa.

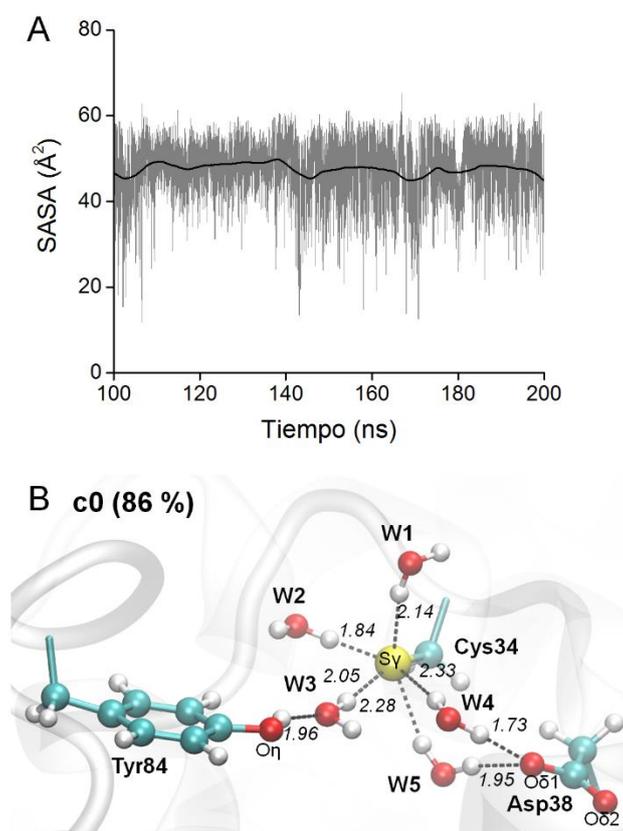


Figura 8.5. Evolución de la superficie expuesta al solvente del Sy de Cys34 en el tramo que va de 100 a 200 ns de la dinámica de HSA-S⁻ formando base de Schiff con glucosa en Lys195 (A). Estructura representativa del *cluster* más poblado del tramo convergido de la dinámica de HSA-S⁻ formando base de Schiff con glucosa en Lys195 (B).

Con respecto a la accesibilidad al solvente del Sy, se observa que éste presenta una mayor exposición ($\sim 50 \text{ \AA}^2$, **Figura 8.5A**) que en HSA-S⁻ no glicada ($\sim 30 \text{ \AA}^2$, **Figura 4.3C**), debido a que no se encuentra formando EdH con el OH η de Tyr84 (**Tabla 8.2**). Como se mencionó anteriormente se ha propuesto que dicho EdH modula la reactividad del tiolato [181], por lo que se espera que éste último sea más reactivo en HSA-S⁻ glicada en Lys195 que en HSA-S⁻ sin glicar.

Tabla 8.3. Ocupación de presuntos EdH que involucran al Sy en HSA-S⁻ formando base de Schiff con glucosa en Lys195, en el tramo de 100 a 200 ns.

Enlace de hidrógeno ^a	Ocupación ^b
S $\gamma_{\text{Cys34}} \cdots \text{H}-\text{O}\eta_{\text{Tyr84}}$	1 %
S $\gamma_{\text{Cys34}} \cdots \text{H}_2\text{O}$	550 %
S $\gamma_{\text{Cys34}} \cdots \text{H}-\text{O}-\text{H} \cdots \text{O}\delta(1,2)_{\text{Asp38}}$	170 %
S $\gamma_{\text{Cys34}} \cdots \text{H}_2\text{O} \cdots \text{H}-\text{O}\eta_{\text{Tyr84}}$	39 %

^a Criterio de corte de distancia D \cdots A de 4 Å y de ángulo D-H \cdots A de 120°. ^b La ocupación se define como el porcentaje del tiempo que la interacción está presente. Valores de más del 100 % indican interacciones con más de una molécula de agua.

Por otro lado, se observa que el Sy forma EdH con hasta 5 moléculas de agua (**Tabla 8.3, Figura 8.5B**), de las cuales hasta dos puentean con Asp38, y por momentos también se observa un EdH puenteados con Tyr84 (**Tabla 8.3**).

Respecto a la nucleofilia del tiolato, el valor de ϵ_{HOMO} (calculada sobre la estructura representativa del *cluster* c0, Figura 8.5B) es de -2.92 eV en HSA-S⁻ formando Base de Schiff en Lys195, mientras que en HSA-S⁻ sin glicar es de -8.00 a.u. (**Tabla 8.2**), lo cual indicaría que la glicación de la HSA en Lys195 aumentaría sensiblemente la nucleofilia del tiolato. Para examinar en detalle los efectos de la glicación en Lys195 sobre la oxidación del tiolato por H₂O₂, se realizó el modelado QM/MM de la reacción, de la cual se tratará en la siguiente sección.

8.3.2. Modelado QM/MM de la oxidación del tiol de Cys34 en HSA glicada

Al igual que en HSA sin glicar (HSA-S⁻), la reacción ocurre a través de un mecanismo S_N2 con un estado de transición lineal y se da una transferencia protónica de O_{prox} a O_{dist}, llevando a la formación de sulfenato y agua (**Figura 8.6**). La energía libre de activación es 14.4 kcal mol⁻¹, lo que sugiere que los cambios en el entorno del tiolato que induce la glicación en Lys195 no afectarían sustancialmente la reactividad del tiolato frente a H₂O₂. No obstante, como se mencionó en la **Sección 1.1.3**,

exceptuando a las peroxirredoxinas y la GAPDH, los distintos tiolatos presentan una reactividad similar frente a H_2O_2 .

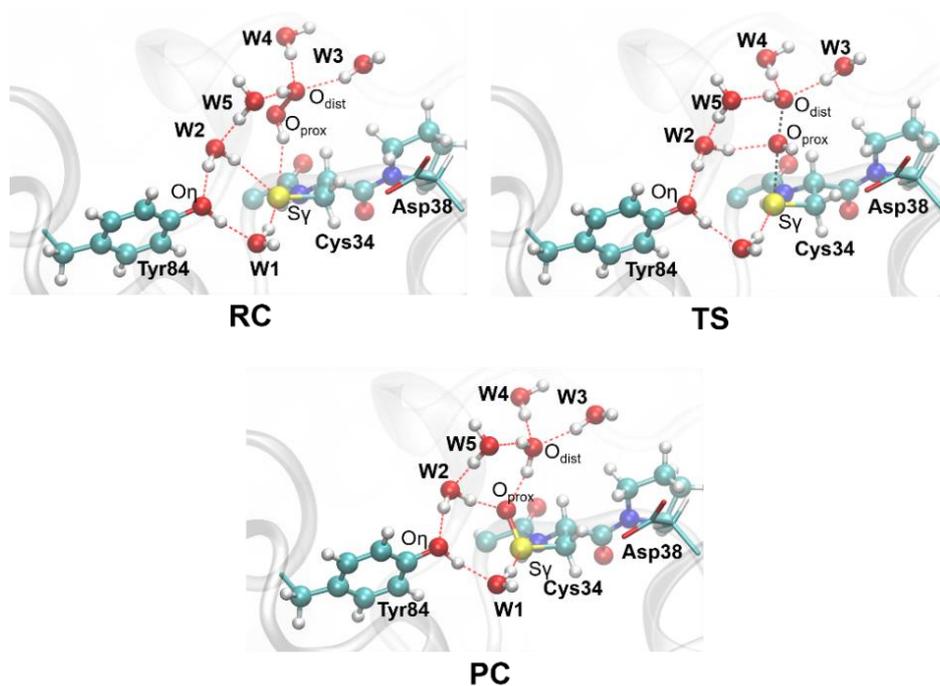


Figura 8.6. Estructuras de reactivos (RC), estado de transición (TS) y productos (PC) optimizados al nivel ONIOM-ME(B3LYP/6-31+G(d):AMBER96) para la reacción del tiolato de la HSA (glicada en Lys195) con H_2O_2 .

8.3.3. Efectos de la S-cisteinilación de la HSA sobre la tendencia de residuos de Arg y Lys a glicarse

Se evaluaron los valores de ϵ_{HOMO} de las cadenas laterales de Lys195, Lys525 y Arg410 en HSA-SH y HSA-SS-Cys (**Tabla 8.4**).

Tabla 8.4. Energías del orbital de Kohn-Sham ocupado de mayor energía, ϵ_{HOMO} , de residuos de Lys y Arg en HSA reducida (HSA-SH) y HSA oxidada (HSA-SS-Cys).

Residuo	ϵ_{HOMO} (eV) ^a	
	HSA-SH	HSA-SS-Cys
Lys195	-8.26	-8.52
Lys525	-7.62	-6.23
Arg410	-2.63	-8.71

^a Calculadas al nivel B3LYP/6-31+G(d)//ff99SB sobre estructuras representativas de *clusters* de las simulaciones MD, realizando un promedio ponderado de acuerdo a la población de cada *cluster*.

Mientras que al S-cisteinilarse la HSA el valor de ϵ_{HOMO} disminuye en 0.26 eV para Lys195, éste aumenta en 1.39 eV para Lys525, lo que indica que Lys195 disminuiría

su nucleofilia de manera poco importante, mientras que Lys525 la aumentaría. Esto último es consistente con experimentos que sugieren que la formación de disulfuros mixtos aumentaría la nucleofilia de Lys525 [239]. Un aumento en la nucleofilia sugiere un aumento en la tendencia a glicarse.

Con respecto a Arg410, se observa una disminución importante del valor de ϵ_{HOMO} de 6.08 eV, lo cual en principio sugiere que Arg410 disminuye la tendencia a glicarse. Cabe destacar que la HSA tiene 59 residuos de Lys y 24 residuos de Arg, por lo que para predecir qué residuos aumentan/disminuyen su nucleofilia al S-cisteinilar la HSA implicaría realizar 166 simulaciones (teniendo en cuenta que los residuos deben estar en estado neutro, que es la forma reactiva), lo cual es poco viable.

8.3.4. Cinética de la reacción del tiol de la HSA con metilglioxal

Como se observa en la **Figura 8.4**, la concentración de tioles, [RSH], calculada a partir de la absorbancia a 412 nm correspondiente al TNB y corregida por contribuciones de productos de la reacción con el MGO a nivel de otros residuos, disminuye linealmente con el tiempo.

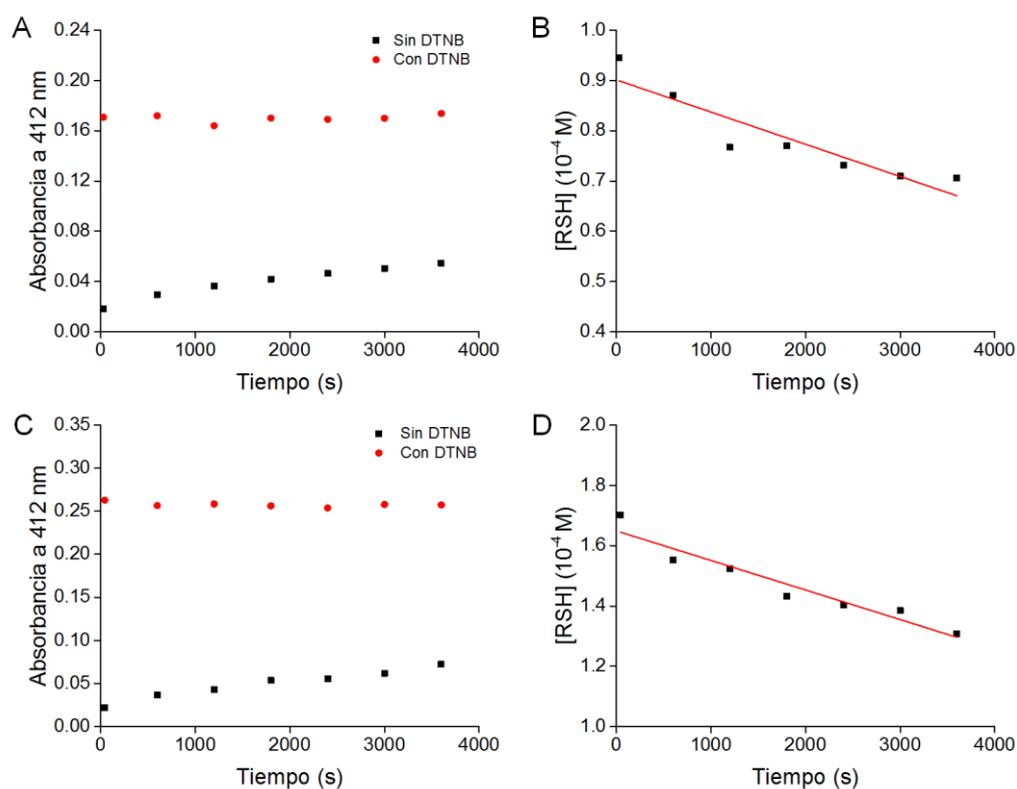


Figura 8.7. Gráficos de absorbancia a 412 nm (A, C) y de concentración de tioles (B, D) en función del tiempo para la reacción de HSA con MGO a pH 7.4 y 37 °C. Los gráficos corresponden a dos experimentos independientes (experimento 1: A y B; experimento 2: D y C).

El opuesto del valor de la pendiente corresponde al valor de la velocidad inicial, v_0 , mientras que la ordenada en el origen corresponde a la concentración inicial de tioles, $[RSH]_0$. Usando la aproximación de velocidades iniciales se puede calcular la constante de velocidad, k :

$$v_0 = k[RSH]_0[MGO]_0 \quad (8.1)$$

$$k = \frac{v_0}{[RSH]_0[MGO]_0} \quad (8.2)$$

Tabla 8.5. Velocidad inicial y concentración inicial de tioles para dos experimentos independientes de la reacción del tiol de la HSA con MGO.

Experimento	v_0 (M s ⁻¹)	$[RSH]_0$ (M)
1	6.41×10^{-9}	9.01×10^{-5}
2	9.81×10^{-9}	1.65×10^{-4}

Considerando una concentración inicial de MGO $[MGO]_0 = 7.5 \times 10^{-2}$ M, usando la **Ecuación 8.2** y los datos de la **Tabla 8.5** se obtienen valores de k de $9.48 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (experimento 1) y $7.92 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (experimento 2). Promediando, el valor de k es $(8.7 \pm 0.8) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37°C y pH 7.4, lo cual indica que se trata de una reacción muy lenta, tal como sugieren trabajos previos.

Teniendo en cuenta que la concentración plasmática de metilglioxal se ubica entre 150 nM y 2.5 μM en condiciones patológicas [110-124] y que la concentración de tioles de HSA es de $\sim 422 \mu\text{M}$, usando la **Ecuación 8.1** (usando un valor de 2.5 μM para la concentración de MGO) se obtiene un valor de v_0 de $9.5 \times 10^{-13} \text{ M s}^{-1}$. Usando la **Ecuación 8.3** se puede calcular el tiempo, Δt , que tomaría que para que disminuya una cierta concentración de tioles, $\Delta[RSH]$, siempre y cuando se esté en condición de velocidades iniciales:

$$\Delta t = \frac{\Delta[RSH]}{v_0} \quad (8.3)$$

$$\Delta t = \frac{4.22 \times 10^{-6} \text{ M}}{9.5 \times 10^{-13} \text{ M s}^{-1}} = 4.4 \times 10^6 \text{ s} = 51 \text{ d}$$

Entonces, tomaría 51 días para modificar un 1 % de los tioles de HSA circulantes ($\Delta[RSH] = 4.22 \times 10^{-6} \text{ M}$). Considerando que la vida media de la HSA es de ~ 21 días, no se espera que la reacción entre el tiol de la HSA y MGO sea de relevancia biológica.

A nivel del plasma, se espera que el principal destino del MGO sea reaccionar con las cadenas laterales de los residuos de Arg de las proteínas plasmáticas.

8.4. Conclusiones

En primer lugar, se observa que, a grandes rasgos, la glicación en Arg410 (formación del producto de glicación avanzada MG-H1 con metilglioxal) no afectaría la estructura y dinámica del entorno de Cys34, pero la glicación en Lys195 (formación de una base de Schiff con glucosa), sí. Más específicamente, la glicación en Lys195 lleva a la pérdida del EdH entre Cys34 y Tyr84, aumentando la nucleofilia del tiolato.

En segundo lugar, se observa que la oxidación (S-cisteinilación, es decir, formación de un disulfuro mixto con cisteína) de Cys34 aumenta la nucleofilia del grupo amino de Lys525, pero disminuye la nucleofilia del grupo guanidino de Arg410.

En tercer lugar, el estudio cinético de la reacción del tiol de la HSA con metilglioxal muestra que dicha reacción es muy lenta como para ser relevante biológicamente, teniendo en cuenta las concentraciones plasmáticas de HSA y de MGO. Se espera que el principal destino del MGO en plasma sea reaccionar con las cadenas laterales de Arg de las proteínas plasmáticas.

9. Conclusiones generales y perspectivas

En este trabajo de tesis, mediante un abordaje mixto experimental-computacional se estudiaron propiedades del tiol libre de la HSA y de su derivado ácido sulfénico, más específicamente la estructura y dinámica del entorno local de Cys34, la acidez del tiol y del ácido sulfénico y la reactividad de éstos frente a peróxidos. Asimismo, también se estudió la posible interacción entre la glicación de la HSA y la oxidación de su tiol libre.

Entrando más en detalle, en primer lugar, se estudiaron la estructura y la dinámica del entorno de Cys34 en las formas tiol y tiolato, mediante simulaciones de dinámica molecular. Se encontró que el hidroxilo de Tyr84 forma un enlace de hidrógeno con el tiolato durante el tramo convergido de la simulación, siendo esto consistente con estudios de cinética en mutantes de HSA previos que sugieren que dicho residuo modula la nucleofilia y basicidad del tiolato [181]. Los estudios de esta tesis muestran que dicha modulación se debe al enlace de hidrógeno previamente mencionado. Asimismo, se observó que el carboxilato de Asp38 se encuentra cercano al tiol/tiolato durante todo el tramo convergido de la simulación, formando enlaces de hidrógeno puenteados por moléculas de agua. Estos resultados sugieren que Asp38 podría tener un papel importante en la modulación de la basicidad del tiolato y también facilitar la desprotonación del tiol. Una forma de evaluar los efectos de Asp38 sobre las propiedades de Cys34 sería realizar experimentos de mutagénesis en el que Asp38 se muta por Ala, perdiendo la carga negativa y la capacidad de formar enlaces de hidrógeno.

En segundo lugar, se modeló usando QM/MM la reacción de oxidación del tiolato de la HSA por peróxidos (H_2O_2 y ácido peroxinitroso), caracterizando su mecanismo de reacción detallado. Dependiendo de la basicidad del grupo saliente en cuestión se observó que un grupo saliente más básico lleva asociada una energía de activación más alta y, si el grupo saliente es mucho más básico que el anión sulfenato –la base conjugada del ácido sulfénico– se da una transferencia protónica post estado de transición. Por otro lado, se compararon los parámetros de activación de la reacción con H_2O_2 calculados respecto a los determinados experimentalmente, encontrando consistencia entre el modelado y los experimentos. Continuando con esta línea, se prevé estudiar la cinética experimental de la reacción del tiolato de la HSA con ácido peroxinitroso a distintas temperaturas.

En tercer lugar, se estudiaron la estructura y dinámica del entorno de Cys34 en las formas ácido sulfénico y sulfenato mediante simulaciones de dinámica molecular. Estos resultados muestran la cercanía de Asp38, esta vez formando enlace de hidrógeno directamente con el ácido sulfénico, lo que, junto con la baja exposición al solvente de este último, explicaría la larga vida media de este ácido sulfénico. Por otro lado, se identificaron dos posibles grupos que podrían reaccionar con el ácido sulfénico y explicar el decaimiento espontáneo [165]. Estos serían, el NH₂ε amida de Gln33 y el NH peptídico de Cys34. La idea de la reacción con el NH peptídico de Cys34 es apoyada por el hecho que el imidazol de His39 se encuentra como aceptor de enlace de hidrógeno respecto al NH de Cys34 –puenteado por una molécula de agua– durante gran parte de la simulación de HSA–SOH. Entonces el imidazol podría actuar como base, catalizando el ataque nucleofílico del N amida sobre el ácido sulfénico. Si bien no se pudo determinar la constante de acidez de este último, se estimó experimentalmente, a partir del aumento en la formación de ácido sulfínico al aumentar el pH, un rango de valores de pK_a de entre 7.0 y 7.6. El aumento de la velocidad de la reacción con TNB y del decaimiento espontáneo (ambos procesos asociados con la electrofilia del ácido sulfénico) a valores de pH menores a 5 [185] probablemente se deba a un cambio en el estado de protonación de Asp38, el cual se encuentra formando enlace de hidrógeno con el OH del ácido sulfénico en la dinámica de HSA–SOH.

En cuarto lugar, se estudiaron a nivel DFT en solución acuosa los posibles mecanismos para la oxidación de ácidos sulfénicos por H₂O₂ en un sistema de bajo peso molecular, determinando que el mecanismo más probable es el ataque nucleofílico (S_N2) del S del anión sulfenato sobre el O del H₂O₂, dando lugar a la formación de agua y anión sulfinato. Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a modelar la reacción a nivel QM/MM (con esquema aditivo) en el contexto de la HSA, siguiendo el mismo mecanismo que en el modelo de bajo peso molecular, siendo estos resultados consistentes con los datos experimentales. Con fines comparativos, se modeló la misma reacción a nivel QM/MM usando un esquema sustractivo (ONIOM), observándose que dicho esquema subestima de forma importante la energía de activación, aunque este fenómeno se debe posiblemente a que mientras que con el QM/MM aditivo se usó *embedding* electrónico para optimizar, con ONIOM se utilizó *embedding* mecánico. Esto sugiere que para modelar las reacciones que involucran ácidos sulfénicos es crucial tener en cuenta

cómo la electrostática del entorno proteico y del solvente afectan la estructura electrónica.

En quinto lugar, se sondeó si la glicación de residuos de Lys y Arg afecta la reactividad del tiolato de Cys34 y también si a su vez la oxidación de Cys34 afecta la reactividad de residuos de Lys y Arg. Se concluye que, por un lado, la glicación en Lys195 afecta el entorno local del tiolato, llevando a la pérdida del enlace de hidrógeno que éste establece con Tyr84, lo implica un aumento en la nucleofilia del tiolato, que no se ve reflejado en la reacción con H₂O₂. En cambio, la glicación en Arg410 no parece afectar las propiedades del tiolato. Cabe destacar que si bien otros sitios de la HSA son susceptibles a la glicación (la HSA posee 59 residuos Lys y 24 residuos Arg), estudiar el efecto de cada modificación mediante modelado computacional resulta poco viable. El paso a seguir sería realizar un estudio experimental, estudiando la cinética de reacciones del tiol de la HSA frente a disulfuros y peróxidos en HSA glicada y sin glicar, y también evaluando la acidez del tiol. Por otro lado, la oxidación de Cys34 a un disulfuro mixto con cisteína (HSA-SS-Cys) parece inducir un aumento en la nucleofilia de Lys525. Esto sugiere que dicho residuo aumenta la tendencia a glicarse. Lo opuesto se observa para Arg410. Se desconoce si la formación de disulfuros mixtos a nivel de Cys34 favorece la aparición de nuevos sitios de glicación. Esto podría estudiarse de forma experimental, poniendo a reaccionar HSA reducida y HSA formando disulfuros mixtos con glucosa y metilglioxal y luego analizar los sitios de glicación por espectrometría de masas.

Finalmente, se estudió la cinética experimental de la reacción del tiol de la HSA con metilglioxal. La reacción resultó ser muy lenta, con una constante de velocidad de $(8.7 \pm 0.8) \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 37 °C y pH 7.4. Teniendo en cuenta los bajos niveles plasmáticos de metilglioxal (menores a 2.5 μM en condiciones patológicas), este resultado sugiere que la reacción del tiol de la HSA con metilglioxal no es relevante biológicamente.

En su conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis contribuyen a la comprensión de la reactividad de los tioles, especies con gran relevancia a nivel biológico, que participan en procesos como la catálisis enzimática, señalización redox y detoxificación de especies electrófilas oxidantes y no oxidantes. Entre ellos se encuentra el tiol de la HSA, el más abundante en el plasma, al cual se le atribuye la función de capturar especies electrófilas en dicho medio. También, estos

resultados arrojan información acerca de la interacción entre la oxidación de Cys34 y la glicación de la HSA, dos procesos que ocurren *in vivo* y cuyo aumento se encuentra asociado a condiciones patológicas.

Referencias

- [1] A. Miseta, P. Csutora. Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms. *Mol. Biol. Evol.* **17** (2000) 1232-1239.
- [2] D. E. Fomenko, S. M. Marino, V. N. Gladyshev. Functional diversity of cysteine residues in proteins and unique features of catalytic redox-active cysteines in thiol oxidoreductases. *Mol. Cells* **26** (2008) 228-235.
- [3] C. S. Sevier, C. A. Kaiser. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3** (2002) 836-847.
- [4] C. O. Pabo, E. Peisach, R. A. Grant. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **70** (2001) 313-340.
- [5] S. J. Lippard, J. M. Berg. Principles of Bioinorganic Chemistry, University Science Books, 1994.
- [6] C. J. Reedy, M. M. Elvekrog, B. R. Gibney. Development of a heme protein structure–electrochemical function database. *Nucleic Acids Res.* **36** (2008) D307-D313.
- [7] S. M. Marino, V. N. Gladyshev. A structure-based approach for detection of thiol oxidoreductases and their catalytic redox-active cysteine residues. *PLoS Comput. Biol.* **5** (2009) e1000383.
- [8] A. Holmgren. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 13963-13966.
- [9] B. Wilkinson, H. F. Gilbert. Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* **1699** (2004) 35-44.
- [10] J. Moskovitz. Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1703** (2005) 213-219.
- [11] M. R. Jackson, S. L. Melideo, M. S. Jorns. Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry* **51** (2012) 6804-6815.
- [12] H. A. Chapman, R. J. Riese, G. P. Shi. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59** (1997) 63-88.
- [13] J. M. Denu, J. E. Dixon. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2** (1998) 633-641.
- [14] Z. A. Wood, E. Schroder, J. Robin Harris, L. B. Poole. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* **28** (2003) 32-40.
- [15] S. Hasim, N. A. Hussin, F. Alomar, K. R. Bidasee, K. W. Nickerson, M. A. Wilson. A glutathione-independent glyoxalase of the DJ-1 superfamily plays an important role

in managing metabolically generated methylglyoxal in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **289** (2014) 1662-1674.

[16] K. P. Subedi, D. Choi, I. Kim, B. Min, C. Park. Hsp31 of *Escherichia coli* K-12 is glyoxalase III. *Mol. Microbiol.* **81** (2011) 926-936.

[17] R. Banerjee, D. F. Becker, M. B. Dickman, V. N. Gladyshev, S. W. Ragsdale. *Redox Biochemistry*, Wiley-Interscience, 2008.

[18] N. Brandes, S. Schmitt, U. Jakob. Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **11** (2009) 997-1014.

[19] D. M. Ziegler. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **54** (1985) 305-329.

[20] D. Seth, J. Rudolph. Redox regulation of MAP kinase phosphatase 3. *Biochemistry* **45** (2006) 8476-8487.

[21] M. Karin, Z. Liu, E. Zandi. AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** (1997) 240-246.

[22] A. Salmeen, J. N. Andersen, M. P. Myers, T. C. Meng, J. A. Hinks, N. K. Tonks, D. Barford. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenylamide intermediate. *Nature* **423** (2003) 769-773.

[23] T. Kortemme, T. E. Creighton. Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family. *J. Mol. Biol.* **253** (1995) 799-812.

[24] T. K. Harris, G. J. Turner. Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life* **53** (2002) 85-98.

[25] M. Trujillo, B. Alvarez, R. Radi. One- and two-electron oxidation of thiols: mechanisms, kinetics and biological fates. *Free Radic. Res.* **50** (2016) 150-171.

[26] V. Gupta, K. S. Carroll. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim. Biophys. Acta* **1840** (2014) 847-875.

[27] T. J. Jönsson, W. T. Lowther. The peroxiredoxin repair proteins. *Subcell. Biochem.* **44** (2007) 115-141.

[28] A. Claiborne, T. C. Mallett, J. I. Yeh, J. Luba, D. Parsonage. Structural, redox, and mechanistic parameters for cysteine-sulfenic acid function in catalysis and regulation. *Adv. Protein Chem.* **58** (2001) 215-276.

[29] A. Claiborne, H. Miller, D. Parsonage, R. P. Ross. Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *FASEB J.* **7** (1993) 1483-1490.

[30] P. Wardman. Evaluation of the "radical sink" hypothesis from a chemical-kinetic viewpoint. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **232** (1998) 23-27.

- [31] C. C. Winterbourn, D. Metodiewa. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **27** (1999) 322-328.
- [32] M. Trujillo, R. Radi. Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* **397** (2002) 91-98.
- [33] L. A. van Bergen, G. Roos, F. De Proft. From thiol to sulfonic acid: modeling the oxidation pathway of protein thiols by hydrogen peroxide. *J. Phys. Chem. A* **118** (2014) 6078-6084.
- [34] C. Feliers, L. Patria, J. Morvan, A. Laplanche. Kinetics of oxidation of odorous sulfur compounds in aqueous alkaline solution with H₂O₂. *Environ. Technol.* **22** (2001) 1137-1146.
- [35] S. Portillo-Ledesma, G. Ferrer-Sueta. Peroxiredoxin-5: Mechanism of H₂O₂ Reduction, and the Competition between Resolution and Overoxidation. *Free Radical Biol. Med.* **76** (2014) S140.
- [36] B. Cardey, M. Enescu. A computational study of thiolate and selenolate oxidation by hydrogen peroxide. *ChemPhysChem* **6** (2005) 1175-1180.
- [37] B. Cardey, M. Enescu. Selenocysteine versus cysteine reactivity: a theoretical study of their oxidation by hydrogen peroxide. *J. Phys. Chem. A* **111** (2007) 673-678.
- [38] S. Portillo-Ledesma, F. Sardi, B. Manta, M. V. Tourn, A. Clippe, B. Knoops, B. Alvarez, E. L. Coitino, G. Ferrer-Sueta. Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochemistry* **53** (2014) 6113-6125.
- [39] A. Zeida, R. Babbush, M. C. Lebrero, M. Trujillo, R. Radi, D. A. Estrin. Molecular basis of the mechanism of thiol oxidation by hydrogen peroxide in aqueous solution: challenging the SN₂ paradigm. *Chem. Res. Toxicol.* **25** (2012) 741-746.
- [40] A. Zeida, M. C. Gonzalez Lebrero, R. Radi, M. Trujillo, D. A. Estrin. Mechanism of cysteine oxidation by peroxynitrite: An integrated experimental and theoretical study. *Arch. Biochem. Biophys.* **539** (2013) 81-86.
- [41] A. Zeida, A. M. Reyes, M. C. Lebrero, R. Radi, M. Trujillo, D. A. Estrin. The extraordinary catalytic ability of peroxiredoxins: a combined experimental and QM/MM study on the fast thiol oxidation step. *Chem. Commun. (Camb.)* **50** (2014) 10070-10073.
- [42] S. Enami, M. R. Hoffmann, A. J. Colussi. Simultaneous detection of cysteine sulfenate, sulfinate, and sulfonate during cysteine interfacial ozonolysis. *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 9356-9358.
- [43] D. D. Perrin. Ionization Constants of Inorganic Acids and Bases in Aqueous Solution, Pergamon Press, 1982.

- [44] J. N. LaButti, G. Chowdhury, T. J. Reilly, K. S. Gates. Redox regulation protein tyrosine phosphatase 1B by peroxyphosphate (=O₃POOH). *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 5320-5321.
- [45] S. D. Lewis, F. a. Johnson, J. a. Shafer. Potentiometric determination of ionizations at the active site of papain. *Biochemistry* **15** (1976) 5009-5017.
- [46] J. R. Stone. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems, in, 2004, pp. 119-124.
- [47] C. Little, P. J. O'Brien. Mechanism of peroxide-inactivation of the sulphhydryl enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **10** (1969) 533-538.
- [48] B. Manta, M. Hugo, C. Ortiz, G. Ferrer-Sueta, M. Trujillo, A. Denicola. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Arch. Biochem. Biophys.* **484** (2009) 146-154.
- [49] K. J. Nelson, D. Parsonage, A. Hall, P. A. Karplus, L. B. Poole. Cysteine pKa values for the bacterial peroxiredoxin AhpC. *Biochemistry* **47** (2008) 12860-12868.
- [50] D. Parsonage, P. A. Karplus, L. B. Poole. Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (2008) 8209-8214.
- [51] M. Trujillo, A. Clippe, B. Manta, G. Ferrer-Sueta, A. Smeets, J. P. Declercq, B. Knoop, R. Radi. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **467** (2007) 95-106.
- [52] M. Hugo, L. Turell, B. Manta, H. Botti, G. Monteiro, L. E. Netto, B. Alvarez, R. Radi, M. Trujillo. Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. *Biochemistry* **48** (2009) 9416-9426.
- [53] G. Ferrer-Sueta, B. Manta, H. Botti, R. Radi, M. Trujillo, A. Denicola. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem. Res. Toxicol.* **24** (2011) 434-450.
- [54] J. R. Chauvin, D. A. Pratt. On the Reactions of Thiols, Sulfenic Acids, and Sulfinic Acids with Hydrogen Peroxide. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **56** (2017) 6255-6259.
- [55] J. Sohn, J. Rudolph. Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction. *Biochemistry* **42** (2003) 10060-10070.
- [56] L. Turell, H. Botti, S. Carballal, G. Ferrer-Sueta, J. M. Souza, R. Duran, B. A. Freeman, R. Radi, B. Alvarez. Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry* **47** (2008) 358-367.

- [57] E. J. Crane, D. Parsonage, A. Claiborne. The Active-Site Histidine-10 of Enterococcal NADH Peroxidase Is Not Essential for Catalytic Activity. *Biochemistry* **35** (1996) 2380-2387.
- [58] C. A. Bayse. Transition states for cysteine redox processes modeled by DFT and solvent-assisted proton exchange. *Org. Biomol. Chem.* **9** (2011) 4748-4751.
- [59] D. R. Hogg, A. Robertson. Sulphenate ions as ambident nucleophiles. *Tetrahedron Lett.* **15** (1974) 3783-3784.
- [60] G. Maitro, G. Prestat, D. Madec, G. Poli. An escapade in the world of sulfenate anions: generation, reactivity and applications in domino processes. *Tetrahedron Asymmetry* **21** (2010) 1075-1084.
- [61] D. M. Davies, S. J. Foggo, P. M. Paradis. Structure–reactivity correlation for reactions of peroxide anion nucleophiles with substituted acyloxybenzenesulfonate bleach activators. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1998) 1381-1384.
- [62] R. G. Pearson, D. N. Edgington. Nucleophilic Reactivity of the Hydrogen Peroxide Anion: Distinction Between SN₂ and SN₁CB Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **84** (1962) 4607-4608.
- [63] L. N. Vakhitova, A. V. Skrypka, K. V. Bogutskaya, N. A. Taran, A. F. Popov. Nucleophilic reactivity of the peroxide anion in aqueous-alcoholic solutions in the presence of detergents. *Theor. Exp. Chem.* **43** (2007) 389-395.
- [64] B. Ramamurthy, P. Hook, A. D. Jones, L. Larsson. Changes in myosin structure and function in response to glycation. *FASEB J.* **15** (2001) 2415-2422.
- [65] M. U. Ahmed, E. Brinkmann Frye, T. P. Degenhardt, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* **324 (Pt 2)** (1997) 565-570.
- [66] P. A. Kumar, M. S. Kumar, G. B. Reddy. Effect of glycation on alpha-crystallin structure and chaperone-like function. *Biochem. J.* **408** (2007) 251-258.
- [67] S. Mukhopadhyay, M. Kar, K. P. Das. Effect of methylglyoxal modification of human alpha-crystallin on the structure, stability and chaperone function. *Protein J.* **29** (2010) 551-556.
- [68] L. K. Muranova, M. M. Perfilov, M. V. Serebryakova, N. B. Gusev. Effect of methylglyoxal modification on the structure and properties of human small heat shock protein HspB6 (Hsp20). *Cell Stress Chaperones* **21** (2016) 617-629.
- [69] K. M. Reiser. Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **196** (1991) 17-29.
- [70] J. P. Marschner, N. Rietbrock. Oxygen release kinetics in healthy subjects and diabetic patients. I: The role of 2,3-diphosphoglycerate. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **32** (1994) 533-535.

- [71] K. Nakajou, H. Watanabe, U. Kragh-Hansen, T. Maruyama, M. Otagiri. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1623** (2003) 88-97.
- [72] S. Awasthi, N. T. Saraswathi. Non-enzymatic glycation mediated structure-function changes in proteins: case of serum albumin. *RSC Adv.* **6** (2016) 90739-90753.
- [73] H. F. Bunn. Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes. *Am. J. Med.* **70** (1981) 325-330.
- [74] M. Koga, S. Kasayama. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr. J.* **57** (2010) 751-762.
- [75] E. Y. Lee, B.-W. Lee, D. Kim, Y.-h. Lee, K. J. Kim, E. S. Kang, B.-S. Cha, E. J. Lee, H. C. Lee. Glycated albumin is a useful glycation index for monitoring fluctuating and poorly controlled type 2 diabetic patients. *Acta Diabetol.* **48** (2011) 167-172.
- [76] M. Brownlee. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med.* **46** (1995) 223-234.
- [77] P. P. Nawroth, A. Bierhaus, G. E. Vogel, M. A. Hofmann, M. Zumbach, P. Wahl, R. Ziegler. [Non-enzymatic glycation and oxidative stress in chronic illnesses and diabetes mellitus]. *Med. Klin. (Munich)* **94** (1999) 29-38.
- [78] H. Vlassara, M. R. Palace. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J. Intern. Med.* **251** (2002) 87-101.
- [79] M. P. Cohen, F. N. Ziyadeh. Role of Amadori-modified nonenzymatically glycated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **7** (1996) 183-190.
- [80] N. A. Hasan. Effects of trace elements on albumin and lipoprotein glycation in diabetic retinopathy. *Saudi Med. J.* **30** (2009) 1263-1271.
- [81] N. Grossin, J. L. Wautier. [Protein glycation and endothelium dysfunction]. *J. Soc. Biol.* **201** (2007) 175-184.
- [82] Z. Hegab, S. Gibbons, L. Neyses, M. A. Mamas. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J. Cardiol.* **4** (2012) 90-102.
- [83] M. A. Grillo, S. Colombatto. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids* **35** (2008) 29-36.
- [84] D. G. Dyer, J. A. Blackledge, B. M. Katz, C. J. Hull, H. D. Adkisson, S. R. Thorpe, T. J. Lyons, J. W. Baynes. The Maillard reaction in vivo. *Z. Ernährungswiss.* **30** (1991) 29-45.

- [85] J. W. Baynes, N. G. Watkins, C. I. Fisher, C. J. Hull, J. S. Patrick, M. U. Ahmed, J. A. Dunn, S. R. Thorpe. The Amadori product on protein: structure and reactions. *Prog. Clin. Biol. Res.* **304** (1989) 43-67.
- [86] C. I. Neglia, H. J. Cohen, A. R. Garber, P. D. Ellis, S. R. Thorpe, J. W. Baynes. ¹³C NMR investigation of nonenzymatic glucosylation of protein. Model studies using RNase A. *J. Biol. Chem.* **258** (1983) 14279-14283.
- [87] A. Goldin, J. A. Beckman, A. M. Schmidt, M. A. Creager. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* **114** (2006) 597-605.
- [88] P. J. Thornalley, A. Langborg, H. S. Minhas. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* **344 Pt 1** (1999) 109-116.
- [89] J. M. Acimovic, B. D. Stanimirovic, N. Todorovic, V. B. Jovanovic, L. M. Mandic. Influence of the microenvironment of thiol groups in low molecular mass thiols and serum albumin on the reaction with methylglyoxal. *Chem. Biol. Interact.* **188** (2010) 21-30.
- [90] I. D. Pavicevic, V. B. Jovanovic, M. M. Takic, A. Z. Penezic, J. M. Acimovic, L. M. Mandic. Fatty acids binding to human serum albumin: Changes of reactivity and glycation level of Cysteine-34 free thiol group with methylglyoxal. *Chem. Biol. Interact.* **224** (2014) 42-50.
- [91] J. Acimovic, B. Stanimirovic, L. Mandic. The role of the thiol group in protein modification with methylglyoxal. *J. Serb. Chem. Soc.* **74** (2009) 867-883.
- [92] R. Milne, S. Brownstein. Advanced glycation end products and diabetic retinopathy. *Amino Acids* **44** (2013) 1397-1407.
- [93] J. M. Forbes, M. E. Cooper, M. D. Oldfield, M. C. Thomas. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14** (2003) S254-258.
- [94] J. Uribarri, S. Woodruff, S. Goodman, W. Cai, X. Chen, R. Pyzik, A. Yong, G. E. Striker, H. Vlassara. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **110** (2010) 911-916 e912.
- [95] T. Goldberg, W. Cai, M. Peppia, V. Dardaine, B. S. Baliga, J. Uribarri, H. Vlassara. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.* **104** (2004) 1287-1291.
- [96] N. Ahmed, O. K. Argirov, H. S. Minhas, C. A. Cordeiro, P. J. Thornalley. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.* **364** (2002) 1-14.

- [97] A. Bierhaus, S. Schiekofer, M. Schwaninger, M. Andrassy, P. M. Humpert, J. Chen, M. Hong, T. Luther, T. Henle, I. Kloting, M. Morcos, M. Hofmann, H. Tritschler, B. Weigle, M. Kasper, M. Smith, G. Perry, A. M. Schmidt, D. M. Stern, H. U. Haring, E. Schleicher, P. P. Nawroth. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* **50** (2001) 2792-2808.
- [98] H. Koyama, H. Yamamoto, Y. Nishizawa. RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol. Med.* **13** (2007) 625-635.
- [99] P. J. Thornalley. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* **44** (1998) 1013-1023.
- [100] C. Ott, K. Jacobs, E. Haucke, A. Navarrete Santos, T. Grune, A. Simm. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology* **2** (2014) 411-429.
- [101] C. Lu, J. C. He, W. Cai, H. Liu, L. Zhu, H. Vlassara. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004) 11767-11772.
- [102] S. Horiuchi, Y. Unno, H. Usui, K. Shikata, K. Takaki, W. Koito, Y. Sakamoto, R. Nagai, K. Makino, A. Sasao, J. Wada, H. Makino. Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043** (2005) 671-675.
- [103] D. Li, J. L. Mehta. Intracellular signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis. *Circ. Res.* **104** (2009) 566-568.
- [104] S. A. Phillips, P. J. Thornalley. The formation of methylglyoxal from triose phosphates. *Eur. J. Biochem.* **212** (1993) 101-105.
- [105] H. Lip, K. Yang, S. L. MacAllister, P. J. O'Brien. Glyoxal and methylglyoxal: autoxidation from dihydroxyacetone and polyphenol cytoprotective antioxidant mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* **202** (2013) 267-274.
- [106] S. Chetyrkin, M. Mathis, V. Pedchenko, O. A. Sanchez, W. H. McDonald, D. L. Hachey, H. Madu, D. Stec, B. Hudson, P. Voziyan. Glucose Autoxidation Induces Functional Damage to Proteins via Modification of Critical Arginine Residues. *Biochemistry* **50** (2011) 6102-6112.
- [107] I. Allaman, M. Belanger, P. J. Magistretti. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Front. Neurosci.* **9** (2015) 23.
- [108] G. Poli, M. U. Dianzani, K. H. Cheeseman, T. F. Slater, J. Lang, H. Esterbauer. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochem. J.* **227** (1985) 629-638.

- [109] F. W. Chaplen, W. E. Fahl, D. C. Cameron. Detection of methylglyoxal as a degradation product of DNA and nucleic acid components treated with strong acid. *Anal. Biochem.* **236** (1996) 262-269.
- [110] P. J. Beisswenger, S. K. Howell, R. M. O'Dell, M. E. Wood, A. D. Touchette, B. S. Szwegold. alpha-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care* **24** (2001) 726-732.
- [111] P. J. Beisswenger, S. K. Howell, A. D. Touchette, S. Lal, B. S. Szwegold. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* **48** (1999) 198-202.
- [112] Y. Han, E. Randell, S. Vasdev, V. Gill, V. Gadag, L. A. Newhook, M. Grant, D. Hagerty. Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* **305** (2007) 123-131.
- [113] A. J. Kandhro, M. A. Mirza, M. Y. Khuhawar. Capillary gas chromatographic determination of methylglyoxal from serum of diabetic patients by precolumn derivatization using meso-stilbenediamine as derivatizing reagent. *J. Chromatogr. Sci.* **46** (2008) 539-543.
- [114] X. Kong, M. Z. Ma, K. Huang, L. Qin, H. M. Zhang, Z. Yang, X. Y. Li, Q. Su. Increased plasma levels of the methylglyoxal in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *J. Diabetes* **6** (2014) 535-540.
- [115] A. Lapolla, R. Flamini, T. Tonus, D. Fedele, A. Senesi, R. Reitano, E. Marotta, G. Pace, R. Seraglia, P. Traldi. An effective derivatization method for quantitative determination of glyoxal and methylglyoxal in plasma samples by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 876-878.
- [116] J. Lu, E. Randell, Y. Han, K. Adeli, J. Krahn, Q. H. Meng. Increased plasma methylglyoxal level, inflammation, and vascular endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. *Clin. Biochem.* **44** (2011) 307-311.
- [117] J. Lu, G. A. Zello, E. Randell, K. Adeli, J. Krahn, Q. H. Meng. Closing the anion gap: contribution of D-lactate to diabetic ketoacidosis. *Clin. Chim. Acta* **412** (2011) 286-291.
- [118] I. Nemet, Z. Turk, L. Duvnjak, N. Car, L. Varga-Defterdarovic. Humoral methylglyoxal level reflects glycemic fluctuation. *Clin. Biochem.* **38** (2005) 379-383.
- [119] H. Odani, T. Shinzato, Y. Matsumoto, J. Usami, K. Maeda. Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256** (1999) 89-93.
- [120] S. Ogawa, K. Nakayama, M. Nakayama, T. Mori, M. Matsushima, M. Okamura, M. Senda, K. Nako, T. Miyata, S. Ito. Methylglyoxal is a predictor in type 2 diabetic

patients of intima-media thickening and elevation of blood pressure. *Hypertension* **56** (2010) 471-476.

[121] N. Rabbani, P. J. Thornalley. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22** (2011) 309-317.

[122] N. Rabbani, P. J. Thornalley. Measurement of methylglyoxal by stable isotopic dilution analysis LC-MS/MS with corroborative prediction in physiological samples. *Nat. Protoc.* **9** (2014) 1969-1979.

[123] Z. Turk, I. Nemet, L. Varga-Defteardarovic, N. Car. Elevated level of methylglyoxal during diabetic ketoacidosis and its recovery phase. *Diabetes Metab.* **32** (2006) 176-180.

[124] H. Wang, Q. H. Meng, J. R. Gordon, H. Khandwala, L. Wu. Proinflammatory and proapoptotic effects of methylglyoxal on neutrophils from patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin. Biochem.* **40** (2007) 1232-1239.

[125] P. J. Thornalley. Methylglyoxal, glyoxalases and the development of diabetic complications. *Amino Acids* **6** (1994) 15-23.

[126] N. Rabbani, P. J. Thornalley. The Critical Role of Methylglyoxal and Glyoxalase 1 in Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **63** (2014) 50-52.

[127] P. J. Thornalley. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* **27** (1996) 565-573.

[128] D. J. Creighton, M. Migliorini, T. Pourmotabbed, M. K. Guha. Optimization of efficiency in the glyoxalase pathway. *Biochemistry* **27** (1988) 7376-7384.

[129] C. Rae, S. J. Berners-Price, B. T. Bulliman, P. W. Kuchel. Kinetic analysis of the human erythrocyte glyoxalase system using ¹H NMR and a computer model. *Eur. J. Biochem.* **193** (1990) 83-90.

[130] T. W. Lo, M. E. Westwood, A. C. McLellan, T. Selwood, P. J. Thornalley. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 32299-32305.

[131] R. Nasiri, M. J. Field, M. Zahedi, A. A. Moosavi-Movahedi. Cross-linking mechanisms of arginine and lysine with alpha,beta-dicarbonyl compounds in aqueous solution. *J. Phys. Chem. A* **115** (2011) 13542-13555.

[132] R. Nasiri, M. J. Field, M. Zahedi, A. A. Moosavi-Movahedi. Comparative DFT study to determine if alpha-oxoaldehydes are precursors for pentosidine formation. *J. Phys. Chem. A* **116** (2012) 2986-2996.

- [133] R. Nasiri, M. Zahedi, H. Jamet, A. A. Moosavi-Movahedi. Theoretical studies on models of lysine-arginine cross-links derived from alpha-oxoaldehydes: a new mechanism for glucosepane formation. *J. Mol. Model.* **18** (2012) 1645-1659.
- [134] C. Solis-Calero, J. Ortega-Castro, A. Hernandez-Laguna, J. Frau, F. Munoz. A DFT study of the carboxymethyl-phosphatidylethanolamine formation from glyoxal and phosphatidylethanolamine surface. Comparison with the formation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine from glyoxal and L-lysine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17** (2015) 8210-8222.
- [135] A. A. Mostafa, E. W. Randell, S. C. Vasdev, V. D. Gill, Y. Han, V. Gadag, A. A. Raouf, H. El Said. Plasma protein advanced glycation end products, carboxymethyl cysteine, and carboxyethyl cysteine, are elevated and related to nephropathy in patients with diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* **302** (2007) 35-42.
- [136] J. Zeng, M. J. Davies. Protein and low molecular mass thiols as targets and inhibitors of glycation reactions. *Chem. Res. Toxicol.* **19** (2006) 1668-1676.
- [137] J. Xue, R. Ray, D. Singer, D. Bohme, D. S. Burz, V. Rai, R. Hoffmann, A. Shekhtman. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) specifically recognizes methylglyoxal-derived AGEs. *Biochemistry* **53** (2014) 3327-3335.
- [138] J. Xue, V. Rai, D. Singer, S. Chabierski, J. Xie, S. Reverdatto, D. S. Burz, A. M. Schmidt, R. Hoffmann, A. Shekhtman. Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGEs. *Structure* **19** (2011) 722-732.
- [139] P. J. Thornalley. Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by the glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and antiproliferative activity of glyoxalase I inhibitors. *Chem. Biol. Interact.* **111-112** (1998) 137-151.
- [140] P. J. Thornalley. Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem. Soc. Trans.* **31** (2003) 1343-1348.
- [141] D. L. Vander Jagt. Glyoxalase II: molecular characteristics, kinetics and mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* **21** (1993) 522-527.
- [142] T. Peters. All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications, Academic Press, 1996.
- [143] A. D. McLachlan, J. E. Walker. Evolution of serum albumin. *J. Mol. Biol.* **112** (1977) 543-558.
- [144] L. Turell, R. Radi, B. Alvarez. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic. Biol. Med.* **65** (2013) 244-253.
- [145] S. Wanwimolruk, D. J. Birkett. The effects of N-B transition of human serum albumin on the specific drug-binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* **709** (1982) 247-255.

- [146] J. Wilting, W. F. van der Giesen, L. H. Janssen, M. M. Weideman, M. Otagiri, J. H. Perrin. The effect of albumin conformation on the binding of warfarin to human serum albumin. The dependence of the binding of warfarin to human serum albumin on the hydrogen, calcium, and chloride ion concentrations as studied by circular dichroism, fluorescence, and equilibrium dialysis. *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 3032-3037.
- [147] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **12** (1999) 439-446.
- [148] A. A. Bhattacharya, T. Grune, S. Curry. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.* **303** (2000) 721-732.
- [149] P. A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, S. Curry. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct. Biol.* **3** (2003) 6.
- [150] P. A. Zunszain, J. Ghuman, A. F. McDonagh, S. Curry. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. *J. Mol. Biol.* **381** (2008) 394-406.
- [151] S. Yamaguchi, G. Aldini, S. Ito, N. Morishita, T. Shibata, G. Vistoli, M. Carini, K. Uchida. Delta12-prostaglandin J2 as a product and ligand of human serum albumin: formation of an unusual covalent adduct at His146. *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010) 824-832.
- [152] J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* **353** (2005) 38-52.
- [153] Y. Wang, H. Yu, X. Shi, Z. Luo, D. Lin, M. Huang. Structural mechanism of ring-opening reaction of glucose by human serum albumin. *J. Biol. Chem.* **288** (2013) 15980-15987.
- [154] S. Carballal, R. Radi, M. C. Kirk, S. Barnes, B. A. Freeman, B. Alvarez. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxyxynitrite. *Biochemistry* **42** (2003) 9906-9914.
- [155] M. G. Bonini, D. C. Fernandes, O. Augusto. Albumin oxidation to diverse radicals by the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase in the presence of bicarbonate or nitrite: diffusible radicals produce cysteinyl and solvent-exposed and -unexposed tyrosyl radicals. *Biochemistry* **43** (2004) 344-351.
- [156] M. J. Torres, L. Turell, H. Botti, L. Antmann, S. Carballal, G. Ferrer-Sueta, R. Radi, B. Alvarez. Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **521** (2012) 102-110.
- [157] R. M. Gatti, R. Radi, O. Augusto. Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. *FEBS Lett.* **348** (1994) 287-290.

- [158] M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* **582** (2008) 1783-1787.
- [159] M. Soriani, D. Pietraforte, M. Minetti. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **312** (1994) 180-188.
- [160] B. Alvarez, G. Ferrer-Sueta, B. A. Freeman, R. Radi. Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 842-848.
- [161] R. Radi, K. M. Bush, T. P. Cosgrove, B. A. Freeman. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* **286** (1991) 117-125.
- [162] L. Turell, D. A. Vitturi, E. L. Coitino, L. Lebrato, M. N. Moller, C. Sagasti, S. R. Salvatore, S. R. Woodcock, B. Alvarez, F. J. Schopfer. The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid. *J. Biol. Chem.* **292** (2017) 1145-1159.
- [163] F. J. Schopfer, C. Batthyany, P. R. Baker, G. Bonacci, M. P. Cole, V. Rudolph, A. L. Groeger, T. K. Rudolph, S. Nadtochiy, P. S. Brookes, B. A. Freeman. Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives. *Free Radic. Biol. Med.* **46** (2009) 1250-1259.
- [164] G. Aldini, G. Vistoli, L. Regazzoni, L. Gamberoni, R. M. Facino, S. Yamaguchi, K. Uchida, M. Carini. Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: a protective role against pro-atherogenic electrophilic reactive carbonyl species? *Chem. Res. Toxicol.* **21** (2008) 824-835.
- [165] L. Turell. Ácido sulfénico en albúmina sérica humana. Tesis de Doctorado en Química. Facultad de Química, Universidad de la República. Uruguay. 2012
- [166] H. Grigoryan, H. Li, A. T. Iavarone, E. R. Williams, S. M. Rappaport. Cys34 adducts of reactive oxygen species in human serum albumin. *Chem. Res. Toxicol.* **25** (2012) 1633-1642.
- [167] S. Sengupta, H. Chen, T. Togawa, P. M. DiBello, A. K. Majors, B. Budy, M. E. Ketterer, D. W. Jacobsen. Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine. *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 30111-30117.
- [168] A. F. Perna, E. Satta, F. Acanfora, C. Lombardi, D. Ingrosso, N. G. De Santo. Increased plasma protein homocysteinylation in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **69** 869-876.
- [169] K. Oettl, R. E. Stauber. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br. J. Pharmacol.* **151** (2007) 580-590.

- [170] A. Kawakami, K. Kubota, N. Yamada, U. Tagami, K. Takehana, I. Sonaka, E. Suzuki, K. Hirayama. Identification and characterization of oxidized human serum albumin. *FEBS J.* **273** (2006) 3346-3357.
- [171] M. A. Mansoor, A. M. Svardal, P. M. Ueland. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. *Anal. Biochem.* **200** (1992) 218-229.
- [172] A. Andersson, A. Isaksson, L. Brattstrom, B. Hultberg. Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization. *Clin. Chem.* **39** (1993) 1590-1597.
- [173] D. Bar-Or, R. Bar-Or, L. T. Rael, D. K. Gardner, D. S. Slone, M. L. Craun. Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use. *Crit. Care Med.* **33** (2005) 1638-1641.
- [174] K. Oettl, G. Marsche. Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. *Methods Enzymol.* **474** (2010) 181-195.
- [175] L. Musante, G. Candiano, A. Petretto, M. Bruschi, N. Dimasi, G. Caridi, B. Pavone, P. Del Boccio, M. Galliano, A. Urbani, F. Scolari, F. Vincenti, G. M. Ghiggeri. Active focal segmental glomerulosclerosis is associated with massive oxidation of plasma albumin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18** (2007) 799-810.
- [176] L. Musante, M. Bruschi, G. Candiano, A. Petretto, N. Dimasi, P. Del Boccio, A. Urbani, G. Rialdi, G. M. Ghiggeri. Characterization of oxidation end product of plasma albumin 'in vivo'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **349** (2006) 668-673.
- [177] J. L. Beck, S. Ambahera, S. R. Yong, M. M. Sheil, J. de Jersey, S. F. Ralph. Direct observation of covalent adducts with Cys34 of human serum albumin using mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **325** (2004) 326-336.
- [178] L. Turell, H. Botti, L. Bonilla, M. J. Torres, F. Schopfer, B. A. Freeman, L. Armas, A. Ricciardi, B. Alvarez, R. Radi. HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **944** (2014) 144-151.
- [179] A. O. Pedersen, J. Jacobsen. Reactivity of the thiol group in human and bovine albumin at pH 3--9, as measured by exchange with 2,2'-dithiodipyridine. *Eur. J. Biochem.* **106** (1980) 291-295.
- [180] S. D. Lewis, D. C. Misra, J. A. Shafer. Determination of interactive thiol ionizations in bovine serum albumin, glutathione, and other thiols by potentiometric difference titration. *Biochemistry* **19** (1980) 6129-6137.
- [181] A. J. Stewart, C. A. Blindauer, S. Berezenko, D. Sleep, D. Tooth, P. J. Sadler. Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *FEBS J.* **272** (2005) 353-362.
- [182] O. Spiga, D. Summa, S. Cirri, A. Bernini, V. Venditti, M. De Chiara, R. Priora, S. Frosali, A. Margaritis, D. Di Giuseppe, P. Di Simplicio, N. Niccolai. A structurally

driven analysis of thiol reactivity in mammalian albumins. *Biopolymers* **95** (2011) 278-285.

[183] G. C. Tong, W. K. Cornwell, G. E. Means. Reactions of acrylamide with glutathione and serum albumin. *Toxicol. Lett.* **147** (2004) 127-131.

[184] J. Steinhardt, J. Krijn, J. G. Leidy. Differences between bovine and human serum albumins. Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. *Biochemistry* **10** (2002) 4005-4015.

[185] L. Antmann. Aproximación a la constante de acidez del tiol de la albúmina y de su producto de oxidación, el ácido sulfénico. Tesina de Graduación de la Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 2008

[186] P. Rondeau, E. Bourdon. The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie* **93** (2011) 645-658.

[187] N. Shaklai, R. L. Garlick, H. F. Bunn. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J. Biol. Chem.* **259** (1984) 3812-3817.

[188] N. Ahmed, D. Dobler, M. Dean, P. J. Thornalley. Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 5724-5732.

[189] J. Anguizola, R. Matsuda, O. S. Barnaby, K. S. Hoy, C. Wa, E. DeBolt, M. Koke, D. S. Hage. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin. Chim. Acta* **425** (2013) 64-76.

[190] R. L. Garlick, J. S. Mazer. The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. *J. Biol. Chem.* **258** (1983) 6142-6146.

[191] N. Iberg, R. Fluckiger. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites. *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 13542-13545.

[192] M. J. Kimzey, H. N. Yassine, B. M. Riepel, G. Tsaprailis, T. J. Monks, S. S. Lau. New site(s) of methylglyoxal-modified human serum albumin, identified by multiple reaction monitoring, alter warfarin binding and prostaglandin metabolism. *Chem. Biol. Interact.* **192** (2011) 122-128.

[193] E. Bourdon, N. Loreau, D. Blache. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J.* **13** (1999) 233-244.

[194] V. Viswanathan, S. Kumpatla, P. Tilak, P. Muthukumar. Levels of glycated albumin at different stages of diabetic nephropathy in India. *Int. J. Diabetes Metab.* **17** (2009) 77-80.

[195] F. E. Vos, J. B. Schollum, R. J. Walker. Glycated albumin is the preferred marker for assessing glycaemic control in advanced chronic kidney disease. *NDT Plus* **4** (2011) 368-375.

- [196] R. Paroni, F. Ceriotti, R. Galanello, G. Battista Leoni, A. Panico, E. Scurati, R. Paleari, L. Chemello, V. Quaino, L. Scaldaferrri, A. Lapolla, A. Mosca. Performance characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycosylated albumin in plasma. *Clin. Biochem.* **40** (2007) 1398-1405.
- [197] N. Miyamoto, N. Shirakawa, Y. Kuroda, F. Abe, K. Shima. Serum levels of glycosylated albumin in non-diabetic and insulin-dependent diabetic children. *Acta Paediatr. Jpn.* **32** (1990) 249-256.
- [198] M. Inaba, S. Okuno, Y. Kumeda, S. Yamada, Y. Imanishi, T. Tabata, M. Okamura, S. Okada, T. Yamakawa, E. Ishimura, Y. Nishizawa, C. K. D. E. R. G. Osaka. Glycosylated albumin is a better glycemic indicator than glycosylated hemoglobin values in hemodialysis patients with diabetes: effect of anemia and erythropoietin injection. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18** (2007) 896-903.
- [199] L. J. Pu, L. Lu, W. F. Shen, Q. Zhang, R. Y. Zhang, J. S. Zhang, J. Hu, Z. K. Yang, F. H. Ding, Q. J. Chen, J. Shen, D. H. Fang, S. Lou. Increased serum glycosylated albumin level is associated with the presence and severity of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Circ. J.* **71** (2007) 1067-1073.
- [200] K. Yoshiuchi, M. Matsuhisa, N. Katakami, Y. Nakatani, K. Sakamoto, T. Matsuoka, Y. Umayahara, K. Kosugi, H. Kaneto, Y. Yamasaki, M. Hori. Glycosylated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycosylated hemoglobin in type 1 and type 2 diabetes. *Endocr. J.* **55** (2008) 503-507.
- [201] R. Kisugi, T. Kouzuma, T. Yamamoto, S. Akizuki, H. Miyamoto, Y. Someya, J. Yokoyama, I. Abe, N. Hirai, A. Ohnishi. Structural and glycation site changes of albumin in diabetic patient with very high glycosylated albumin. *Clin. Chim. Acta* **382** (2007) 59-64.
- [202] M. P. Cohen. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycosylated albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* **419** (2003) 25-30.
- [203] S. Chen, M. P. Cohen, F. N. Ziyadeh. Amadori-glycosylated albumin in diabetic nephropathy: pathophysiologic connections. *Kidney Int. Suppl.* **77** (2000) S40-44.
- [204] F. N. Ziyadeh, M. P. Cohen. Effects of glycosylated albumin on mesangial cells: evidence for a role in diabetic nephropathy. *Mol. Cell. Biochem.* **125** (1993) 19-25.
- [205] M. P. Cohen, S. Chen, F. N. Ziyadeh, E. Shea, E. A. Hud, G. T. Lautenslager, C. W. Shearman. Evidence linking glycosylated albumin to altered glomerular nephrin and VEGF expression, proteinuria, and diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **68** (2005) 1554-1561.
- [206] M. P. Cohen, E. Hud, V. Y. Wu, F. N. Ziyadeh. Albumin modified by Amadori glucose adducts activates mesangial cell type IV collagen gene transcription. *Mol. Cell. Biochem.* **151** (1995) 61-67.
- [207] F. N. Ziyadeh, D. C. Han, J. A. Cohen, J. Guo, M. P. Cohen. Glycosylated albumin stimulates fibronectin gene expression in glomerular mesangial cells: involvement of the transforming growth factor-beta system. *Kidney Int.* **53** (1998) 631-638.

- [208] M. P. Cohen, R. S. Clements, J. A. Cohen, C. W. Shearman. Glycated albumin promotes a generalized vasculopathy in the db/db mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218** (1996) 72-75.
- [209] M. P. Cohen, E. Hud, V. Y. Wu, F. N. Ziyadeh. Glycated albumin modified by Amadori adducts modulates aortic endothelial cell biology. *Mol. Cell. Biochem.* **143** (1995) 73-79.
- [210] J. P. Doweiko, B. R. Bistrain. The effect of glycosylated albumin on platelet aggregation. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **18** (1994) 516-520.
- [211] D. A. Rubenstein, W. Yin. Glycated albumin modulates platelet susceptibility to flow induced activation and aggregation. *Platelets* **20** (2009) 206-215.
- [212] D. A. Rubenstein, Z. Maria, W. Yin. Glycated albumin modulates endothelial cell thrombogenic and inflammatory responses. *J. Diabetes Sci. Technol.* **5** (2011) 703-713.
- [213] H. Candiloros, S. Muller, O. Ziegler, M. Donner, P. Drouin. Role of albumin glycation on the erythrocyte aggregation: an in vitro study. *Diabet. Med.* **13** (1996) 646-650.
- [214] C. Miele, A. Riboulet, M. A. Maitan, F. Oriente, C. Romano, P. Formisano, J. Giudicelli, F. Beguinot, E. Van Obberghen. Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 47376-47387.
- [215] H. Unoki, H. Bujo, S. Yamagishi, M. Takeuchi, T. Imaizumi, Y. Saito. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **76** (2007) 236-244.
- [216] H. Unoki, S. Yamagishi. Advanced glycation end products and insulin resistance. *Curr. Pharm. Des.* **14** (2008) 987-989.
- [217] N. R. Singh, P. Rondeau, L. Hoareau, E. Bourdon. Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic. Res.* **41** (2007) 1078-1088.
- [218] N. Singh. Identification of Up-Regulated Low Molecular Weight Proteins in Human Adipocytes Treated with Glycoxidized Albumin. *Open Obes. J.* **2** (2010) 110-115.
- [219] Z. Turk, S. Ljubic, N. Turk, B. Benko. Detection of autoantibodies against advanced glycation endproducts and AGE-immune complexes in serum of patients with diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* **303** (2001) 105-115.
- [220] Z. Turk, V. Mrzljak, N. Turk, Z. Metelko. Changes of autoantibodies against oxidatively modified low density lipoproteins during long-term LDL-apheresis. *Diabetes Nutr. Metab.* **12** (1999) 413-417.

- [221] R. Brandt, C. Landmesser, L. Vogt, B. Hehmke, R. Hanschke, J. Kasbohm, K. Hartmann, B. Jager, S. Krantz, D. Michaelis. Differential expression of fructosyllysine-specific receptors on monocytes and macrophages and possible pathophysiological significance. *Diabetologia* **39** (1996) 1140-1147.
- [222] R. Salazar, R. Brandt, S. Krantz. Binding of Amadori glucose-modified albumin by the monocytic cell line MonoMac 6 activates protein kinase C epsilon protein tyrosine kinases and the transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Glycoconj. J.* **18** (2001) 769-777.
- [223] M. P. Cohen, E. Shea, S. Chen, C. W. Shearman. Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells. *J. Lab. Clin. Med.* **141** (2003) 242-249.
- [224] M. Del Nogal-Avila, N. Troyano-Suarez, P. Roman-Garcia, J. B. Cannata-Andia, M. Rodriguez-Puyol, D. Rodriguez-Puyol, O. M. Kuro, M. P. Ruiz-Torres. Amadori products promote cellular senescence activating insulin-like growth factor-1 receptor and down-regulating the antioxidant enzyme catalase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45** (2013) 1255-1264.
- [225] V. Y. Wu, M. P. Cohen. Evidence for a ligand receptor system mediating the biologic effects of glycated albumin in glomerular mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207** (1995) 521-528.
- [226] K. Neelofar, J. Ahmad. Amadori albumin in diabetic nephropathy. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **19** (2015) 39-46.
- [227] V. Y. Wu, M. P. Cohen. Receptors specific for Amadori-modified glycated albumin on murine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198** (1994) 734-739.
- [228] A. Amore, P. Cirina, S. Mitola, L. Peruzzi, B. Gianoglio, I. Rabbone, C. Sacchetti, F. Cerutti, C. Grillo, R. Coppo. Nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells. *Kidney Int.* **51** (1997) 27-35.
- [229] A. Amore, P. Cirina, G. Conti, F. Cerutti, N. Bagheri, S. N. Emancipator, R. Coppo. Amadori-configured albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: a possible mechanism of diabetic vasculopathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19** (2004) 53-60.
- [230] K. Higai, A. Shimamura, K. Matsumoto. Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation. *Clin. Chim. Acta* **367** (2006) 137-143.
- [231] Y. Hattori, H. Kakishita, K. Akimoto, M. Matsumura, K. Kasai. Glycated serum albumin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281** (2001) 891-896.

- [232] Y. Hattori, N. Banba, S. S. Gross, K. Kasai. Glycated serum albumin-induced nitric oxide production in vascular smooth muscle cells by nuclear factor kappaB-dependent transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259** (1999) 128-132.
- [233] Z. M. Bian, V. M. Elner, N. W. Lukacs, R. M. Strieter, S. L. Kunkel, S. G. Elner. Glycated human serum albumin induces IL-8 and MCP-1 gene expression in human corneal keratocytes. *Curr. Eye Res.* **17** (1998) 65-72.
- [234] A. Vlassopoulos, M. E. Lean, E. Combet. Role of oxidative stress in physiological albumin glycation: a neglected interaction. *Free Radic. Biol. Med.* **60** (2013) 318-324.
- [235] S. Chesne, P. Rondeau, S. Armenta, E. Bourdon. Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine serum albumin on its structure and on cultured adipose cells. *Biochimie* **88** (2006) 1467-1477.
- [236] P. Faure, L. Troncy, M. Lecomte, N. Wiernsperger, M. Lagarde, D. Ruggiero, S. Halimi. Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. *Diabetes Metab.* **31** (2005) 169-177.
- [237] P. Faure, N. Wiernsperger, C. Polge, A. Favier, S. Halimi. Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *Clin. Sci. (Lond.)* **114** (2008) 251-256.
- [238] K. Neelofar, Z. Arif, K. Alam, J. Ahmad. Hyperglycemia induced structural and functional changes in human serum albumin of diabetic patients: a physico-chemical study. *Mol. BioSyst.* **12** (2016) 2481-2489.
- [239] R. Glowacki, H. Jakubowski. Cross-talk between Cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation. *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 10864-10871.
- [240] E. G. Lewars. Computational Chemistry - Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics, 2nd ed., Springer, 2011.
- [241] A. C. T. van Duin, S. Dasgupta, F. Lorant, W. A. Goddard. ReaxFF: A Reactive Force Field for Hydrocarbons. *J. Phys. Chem. A* **105** (2001) 9396-9409.
- [242] A. Warshel, J. Florián. The Empirical Valence Bond (EVB) Method, in: Encyclopedia of Computational Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd., 2002.
- [243] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 5179-5197.
- [244] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorcikiewicz-Kuczera,

- D. Yin, M. Karplus. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 3586-3616.
- [245] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **25** (2004) 1157-1174.
- [246] A. K. Rappe, C. J. Casewit, K. S. Colwell, W. A. Goddard, W. M. Skiff. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 10024-10035.
- [247] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, C. Simmerling. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* **65** (2006) 712-725.
- [248] F. Jensen. Introduction to computational chemistry, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- [249] A. Szabo, N. S. Ostlund. Modern Quantum Chemistry: Introduction to advanced electronic structure theory, Courier Corporation, 2012.
- [250] C. Møller, M. S. Plesset. Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems. *Phys. Rev.* **46** (1934) 618-622.
- [251] I. Levine. Quantum Chemistry, 7th ed., Prentice Hall, 2013.
- [252] J. C. Slater. Atomic Shielding Constants. *Phys. Rev.* **36** (1930) 57-64.
- [253] S. F. Boys. Electronic Wave Functions. I. A General Method of Calculation for the Stationary States of Any Molecular System. *Proc. Royal Soc. A* **200** (1950) 542-554.
- [254] W. J. Hehre, R. F. Stewart, J. A. Pople. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. I. Use of Gaussian Expansions of Slater-Type Atomic Orbitals. *J. Chem. Phys.* **51** (1969) 2657-2664.
- [255] R. Ditchfield, W. J. Hehre, J. A. Pople. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **54** (1971) 724-728.
- [256] A. D. McLean, G. S. Chandler. Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11-18. *J. Chem. Phys.* **72** (1980) 5639-5648.
- [257] E. Schrödinger. Quantisierung als Eigenwertproblem. *Ann. Physik* **385** (1926) 437-490.
- [258] C. J. Cramer. Essentials of Computational Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd., 2002.
- [259] P. Hohenberg, W. Kohn. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **136** (1964) B864-B871.

- [260] W. Kohn, L. J. Sham. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* **140** (1965) A1133-A1138.
- [261] P. A. M. Dirac. Note on Exchange Phenomena in the Thomas Atom. *Math. Proc. Cambridge Philos. Soc.* **26** (1930) 376.
- [262] G. L. Oliver, J. P. Perdew. Spin-density gradient expansion for the kinetic energy. *Phys. Rev. A* **20** (1979) 397-403.
- [263] S. H. Vosko, L. Wilk, M. Nusair. Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis. *Can. J. Phys.* **58** (1980) 1200-1211.
- [264] A. D. Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A Gen Phys* **38** (1988) 3098-3100.
- [265] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37** (1988) 785-789.
- [266] Y. Wang, J. P. Perdew. Correlation hole of the spin-polarized electron gas, with exact small-wave-vector and high-density scaling. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **44** (1991) 13298-13307.
- [267] A. D. Becke. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 1372-1377.
- [268] A. D. Becke. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648-5652.
- [269] S. Grimme. Semiempirical hybrid density functional with perturbative second-order correlation. *J. Chem. Phys.* **124** (2006) 034108.
- [270] J. P. Foster, F. Weinhold. Natural hybrid orbitals. *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 7211-7218.
- [271] A. E. Reed, R. B. Weinstock, F. Weinhold. Natural population analysis. *J. Chem. Phys.* **83** (1985) 735-746.
- [272] P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker. Conceptual density functional theory. *Chem. Rev.* **103** (2003) 1793-1873.
- [273] J. Antosiewicz, J. A. McCammon, M. K. Gilson. The determinants of pKas in proteins. *Biochemistry* **35** (1996) 7819-7833.
- [274] G. Groenhof. Introduction to QM/MM simulations. *Methods Mol. Biol.* **924** (2013) 43-66.
- [275] F. Maseras, K. Morokuma. IMOMM: A new integrated ab initio + molecular mechanics geometry optimization scheme of equilibrium structures and transition states. *J. Comput. Chem.* **16** (1995) 1170-1179.

- [276] T. Vreven, K. S. Byun, I. Komaromi, S. Dapprich, J. A. Montgomery, K. Morokuma, M. J. Frisch. Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM. *J. Chem. Theory Comput.* **2** (2006) 815-826.
- [277] C. I. Bayly, P. Cieplak, W. Cornell, P. A. Kollman. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **97** (1993) 10269-10280.
- [278] L. W. Chung, W. M. Sameera, R. Ramozzi, A. J. Page, M. Hatanaka, G. P. Petrova, T. V. Harris, X. Li, Z. Ke, F. Liu, H. B. Li, L. Ding, K. Morokuma. The ONIOM Method and Its Applications. *Chem. Rev.* **115** (2015) 5678-5796.
- [279] Y. Zhang, H. Lin, D. G. Truhlar. Self-Consistent Polarization of the Boundary in the Redistributed Charge and Dipole Scheme for Combined Quantum-Mechanical and Molecular-Mechanical Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **3** (2007) 1378-1398.
- [280] A. Warshel, M. Levitt. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **103** (1976) 227-249.
- [281] X. Assfeld, J.-L. Rivail. Quantum chemical computations on parts of large molecules: the ab initio local self consistent field method. *Chem. Phys. Lett.* **263** (1996) 100-106.
- [282] J. Gao, P. Amara, C. Alhambra, M. J. Field. A Generalized Hybrid Orbital (GHO) Method for the Treatment of Boundary Atoms in Combined QM/MM Calculations. *J. Phys. Chem. A* **102** (1998) 4714-4721.
- [283] E. Polak, G. Ribiere. Note sur la convergence de méthodes de directions conjuguées. *ESAIM Math. Model. Numer. Anal.* **3** (1969) 35-43.
- [284] P. Deufhard. Newton Methods for Nonlinear Problems. Affine Invariance and Adaptive Algorithms, Springer, 2004.
- [285] A. Banerjee, N. Adams, J. Simons, R. Shepard. Search for stationary points on surfaces. *J. Phys. Chem.* **89** (1985) 52-57.
- [286] J. Simons, P. Joergensen, H. Taylor, J. Ozment. Walking on potential energy surfaces. *J. Phys. Chem.* **87** (1983) 2745-2753.
- [287] P. Császár, P. Pulay. Geometry optimization by direct inversion in the iterative subspace. *J. Mol. Struct.* **114** (1984) 31-34.
- [288] X. Li, M. J. Frisch. Energy-Represented Direct Inversion in the Iterative Subspace within a Hybrid Geometry Optimization Method. *J. Chem. Theory Comput.* **2** (2006) 835-839.
- [289] J. M. Anglada, J. M. Bofill. How good is a Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno-like update Hessian formula to locate transition structures? Specific reformulation

of Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno for optimizing saddle points. *J. Comput. Chem.* **19** (1998) 349-362.

[290] D. C. Liu, J. Nocedal. On the limited memory BFGS method for large scale optimization. *Math. Prog.* **45** (1989) 503-528.

[291] H. B. Schlegel. Optimization of equilibrium geometries and transition structures. *J. Comput. Chem.* **3** (1982) 214-218.

[292] K. Fukui. The path of chemical reactions - the IRC approach. *Acc. Chem. Res.* **14** (1981) 363-368.

[293] U. M. Ascher, L. R. Petzold. *Computer Methods for Ordinary Differential Equations and Differential-Algebraic Equations*, Society for Industrial and Applied Mathematics, 1998.

[294] M. Page, C. Doubleday, J. W. McIver. Following steepest descent reaction paths. The use of higher energy derivatives with ab initio electronic structure methods. *J. Chem. Phys.* **93** (1990) 5634-5642.

[295] M. Page, J. W. McIver. On evaluating the reaction path Hamiltonian. *J. Chem. Phys.* **88** (1988) 922-935.

[296] H. P. Hratchian, H. B. Schlegel. Using Hessian Updating To Increase the Efficiency of a Hessian Based Predictor-Corrector Reaction Path Following Method. *J. Chem. Theory Comput.* **1** (2005) 61-69.

[297] W. C. Swope, H. C. Andersen, P. H. Berens, K. R. Wilson. A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters. *J. Chem. Phys.* **76** (1982) 637-649.

[298] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 3684-3690.

[299] S. Nosé. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 511-519.

[300] W. G. Hoover. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. *Phys Rev A Gen Phys* **31** (1985) 1695-1697.

[301] M. P. Allan, D. J. Tildesley. *Computer Simulations of Liquids*, Clarendon Press, 1987.

[302] J. Åqvist, P. Wennerström, M. Nervall, S. Bjelic, B. O. Brandsdal. Molecular dynamics simulations of water and biomolecules with a Monte Carlo constant pressure algorithm. *Chem. Phys. Lett.* **384** (2004) 288-294.

- [303] N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, E. Teller. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.* **21** (1953) 1087-1092.
- [304] P. P. Ewald. Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale. *Ann. Physik* **369** (1921) 253-287.
- [305] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103** (1995) 8577-8593.
- [306] D. R. Roe, T. E. Cheatham, 3rd. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 3084-3095.
- [307] T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman. The Elements of Statistical Learning, 2nd ed., Springer, 2013.
- [308] B. Roux, T. Simonson. Implicit solvent models. *Biophys. Chem.* **78** (1999) 1-20.
- [309] J. Tomasi, M. Persico. Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent. *Chem. Rev.* **94** (1994) 2027-2094.
- [310] B. Mennucci. Polarizable continuum model. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2** (2012) 386-404.
- [311] J. Tomasi, B. Mennucci, E. Cancès. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **464** (1999) 211-226.
- [312] A. Bondi. van der Waals Volumes and Radii. *J. Phys. Chem.* **68** (1964) 441-451.
- [313] J. W. Ochterski. Thermochemistry in Gaussian, in, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA, 2000.
- [314] E. V. Anslyn, D. A. Dougherty. Modern Physical Organic Chemistry, University Science Books, 2006.
- [315] J. C. Polanyi. Some concepts in reaction dynamics. *Science* **236** (1987) 680-690.
- [316] I. Baburina, D. J. Moore, A. Volkov, A. Kahyaoglu, F. Jordan, R. Mendelsohn. Three of four cysteines, including that responsible for substrate activation, are ionized at pH 6.0 in yeast pyruvate decarboxylase: evidence from Fourier transform infrared and isoelectric focusing studies. *Biochemistry* **35** (1996) 10249-10255.
- [317] V. Sampath, X. J. Zhao, W. S. Caughey. Anesthetic-like interactions of nitric oxide with albumin and hemeproteins. A mechanism for control of protein function. *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 13635-13643.

- [318] A. Dong, P. Huang, X. J. Zhao, V. Sampath, W. S. Caughey. Characterization of sites occupied by the anesthetic nitrous oxide within proteins by infrared spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 23911-23917.
- [319] C. K. Riener, G. Kada, H. J. Gruber. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* **373** (2002) 266-276.
- [320] M. Deambrosi. Puesta a punto de una técnica de cromatoenfoco para el análisis por HPLC de albúmina oxidada. Tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 2015
- [321] G. Paris, Ramseyer, C, and Enescu, M. A theoretical study of the unfolding pathway of reduced human serum albumin. *J. Mol. Model.* **21** (2015).
- [322] O. K. Abou-Zied, N. Al-Lawatia, M. Elstner, T. B. Steinbrecher. Binding of hydroxyquinoline probes to human serum albumin: combining molecular modeling and Forster's resonance energy transfer spectroscopy to understand flexible ligand binding. *J. Phys. Chem. B* **117** (2013) 1062-1074.
- [323] N. Diaz, D. Suarez. Role of the Protonation State on the Structure and Dynamics of Albumin. *J. Chem. Theory Comput.* **12** (2016) 1972-1988.
- [324] R. Anandakrishnan, B. Aguilar, A. V. Onufriev. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) W537-541.
- [325] D. A. Case, V. Babin, J. T. Berryman, R. M. Betz, Q. Cai, D. S. Cerutti, I. T. E. Cheatham, T. A. Darden, R. E. Duke, H. Gohlke, A. W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T. S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K. M. Merz, F. Paesani, D. R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C. L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R. C. Walker, J. Wang, R. M. Wolf, X. Wu, P. A. Kollman. AMBER 14. University of California. San Francisco. 2014.
- [326] R. J. Loncharich, B. R. Brooks, R. W. Pastor. Langevin dynamics of peptides: the frictional dependence of isomerization rates of N-acetylalanine-N'-methylamide. *Biopolymers* **32** (1992) 523-535.
- [327] J.-P. Ryckaert, G. Ciccotti, H. J. C. Berendsen. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23** (1977) 327-341.
- [328] R. F. Chen. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 173-181.
- [329] G. M. Whitesides, J. E. Lilburn, R. P. Szajewski. Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent. *J. Org. Chem.* **42** (1977) 332-338.

- [330] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, N. J. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox. Gaussian 09 Rev. D.01. Gaussian, Inc. Wallingford, CT, USA. 2013.
- [331] A. Moyano, M. A. Pericas, E. Valenti. A theoretical study on the mechanism of the thermal and the acid-catalyzed decarboxylation of 2-oxetanones (β -lactones). *J. Org. Chem.* **54** (1989) 573-582.
- [332] H. Aebi. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105** (1984) 121-126.
- [333] B. Pedre, L. A. van Bergen, A. Pallo, L. A. Rosado, V. T. Dufe, I. V. Molle, K. Wahni, H. Erdogan, M. Alonso, F. D. Proft, J. Messens. The active site architecture in peroxiredoxins: a case study on Mycobacterium tuberculosis AhpE. *Chem. Commun. (Camb.)* **52** (2016) 10293-10296.
- [334] Y. Ogasawara, T. Namai, T. Togawa, K. Ishii. Formation of albumin dimers induced by exposure to peroxides in human plasma: a possible biomarker for oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340** (2006) 353-358.
- [335] G. Scorza, M. Minetti. One-electron oxidation pathway of thiols by peroxynitrite in biological fluids: bicarbonate and ascorbate promote the formation of albumin disulphide dimers in human blood plasma. *Biochem. J.* **329 (Pt 2)** (1998) 405-413.
- [336] M. Naldi, M. Baldassarre, M. Nati, M. Laggetta, F. A. Giannone, M. Domenicali, M. Bernardi, P. Caraceni, C. Bertucci. Mass spectrometric characterization of human serum albumin dimer: A new potential biomarker in chronic liver diseases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **112** (2015) 169-175.
- [337] M. A. Hass, F. A. Mulder. Contemporary NMR Studies of Protein Electrostatics. *Annu Rev Biophys* **44** (2015) 53-75.
- [338] H. M. Dokainish, J. W. Gault. Formation of a Stable Iminol Intermediate in the Redox Regulation Mechanism of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B). *ACS Catalysis* **5** (2015) 2195-2202.
- [339] S. Metz, J. Kästner, A. A. Sokol, T. W. Keal, P. Sherwood. ChemShell-a modular software package for QM/MM simulations. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **4** (2014) 101-110.

[340] I. T. Todorov, W. Smith, K. Trachenko, M. T. Dove. DL_POLY_3: new dimensions in molecular dynamics simulations via massive parallelism. *J. Mater. Chem.* **16** (2006) 1911.

[341] J. R. Chauvin, D. A. Pratt. On the Reactions of Thiols, Sulfenic Acids, and Sulfinic Acids with Hydrogen Peroxide. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2016) n/a-n/a.

[342] W. Quapp, M. Hirsch, D. Heidrich. Bifurcation of reaction pathways: the set of valley ridge inflection points of a simple three-dimensional potential energy surface. *Theor. Chem. Acc.* **100** (1998) 285-299.

Agradecimientos

A Laura Coitiño, por introducirme a la química teórica y computacional, en especial al estudio de mecanismos de reacción, y por su dedicación constante en todos estos años de trabajo.

A Beatriz Álvarez por su generosidad y paciencia durante estos años de trabajo de mesada.

A Lucía Turell y a Ernesto Cuevasanta por la ayuda en muchos de los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de este trabajo de Tesis.

A Eduardo Méndez, Santiago Botasini y Fernanda Cerdà por la ayuda con los experimentos de espectroscopía infrarroja.

A Matías Deambrosi por las horas de experimentos con el HPLC.

A Alicia Merlino por la ayuda inicial con las simulaciones de dinámica molecular.

A Àngels González y Josep Maria Lluch por haberme recibido en la Universitat Autònoma, por su muy buena disposición y por la ayuda con los cálculos QM/MM con ChemShell.

A Darío Estrín y a Nano González Lebrero por haberme recibido en la UBA para entrenarme en el uso de su programa LIO.

A la gente del LQTC y de Enzimología por el compañerismo y por los buenos momentos.

Al NICCAD y a la Facultad de Ingeniería por brindar el acceso al Cluster FING, donde se realizaron parte de los cálculos de este trabajo de Tesis.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por las becas de posgrado (POS_NAC_2013_1_11831 y POS_NAC_1_3287) y por el incentivo del SNI (SNI_2015_5907).

A CSIC por la financiación del proyecto de Iniciación a la Investigación “Efectos de la glicación por metilgloxal sobre propiedades de la albúmina humana y su tiol libre”.

A PEDECIBA-Química por el apoyo económico para llevar a cabo este trabajo de Tesis y para realizar pasantías en el exterior.

Anexo: Publicaciones

El desarrollo de este trabajo de Tesis dio lugar a la publicación del siguiente artículo en una revista arbitrada internacional:

J. Bonanata, L. Turell, L. Antmann, G. Ferrer-Sueta, S. Botasini, E. Méndez, B. Álvarez, E. L. Coitiño. The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid. *Free Radical Biology and Medicine* **108**, 952-962 (2017).

De forma paralela, usando conocimientos adquiridos y validados para el estudio de tioles en el marco de esta tesis, colaboró en el siguiente artículo:

E. Cuevasanta, M. Lange, J. Bonanata, E. L. Coitiño, G. Ferrer-Sueta, M. R. Filipovic, B. Alvarez. Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 26866-26880 (2015).

Actualmente se está trabajando en la escritura de tres artículos derivados de los **Capítulos 6 y 7**.