

*Aportando piezas clave para entender el
mecanismo de apertura de la
glucopiranososa en seroalbúmina humana
camino a su glicación temprana en Lys195*

Autor: Federico Ortiz

Tutora: Dra. E. Laura Coitiño

Co-Tutor: Lic. Jenner Bonanata

*Laboratorio de Química Teórica y Computacional
Instituto de Química Biológica – Facultad de Ciencias - UdelaR*

Tesina de Graduación

Licenciatura en Bioquímica

Universidad de la República

Julio 2016

Índice de contenidos

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
2.1	GLUCOSA: ASPECTOS FÍSICOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS	2
2.2	APERTURA DE ALFA-D-GLUCOPIRANOSA: MECANISMO, TERMODINÁMICA Y CINÉTICA	4
2.3	ALBÚMINA SÉRICA HUMANA (HSA): ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.....	5
2.4	LAS REACCIONES DE GLICACIÓN EN SERES VIVOS: UNA VISIÓN GENERAL.....	8
2.5	DIABETES Y GLICACIÓN: RELEVANCIA DEL PROBLEMA	11
2.6	GLICACIÓN DE HSA	11
3	OBJETIVOS	18
3.1	OBJETIVOS GENERALES.....	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4	METODOLOGÍA	19
4.1	ESTRATEGIA GENERAL: MODELOS MATERIALES Y TIPOS DE MÉTODOS.....	19
4.1.1	<i>Modelos reducidos</i>	20
4.1.2	<i>Sistema real completo</i>	20
4.2	VALIDACIÓN METODOLÓGICA: MODELO REDUCIDO DEL MECANISMO DE APERTURA DE A-D-GLUCOPIRANOSA A NIVEL PCM-DFT	20
4.3	ESTRUCTURA Y DINÁMICA EN SOLUCIÓN DE HSA, COMPLEJOS 1:1 HSA-GLUCOSA, MODIFICACIONES EN LYS195.....	21
4.4	COMPARACIÓN DE LA NUCLEOFILIA DE LYS DE HSA: DUREZA A NIVEL QM/MM	22
4.5	POSIBLE MECANISMO PARA APERTURA DE GLUCOPIRANOSA EN HSA.....	22
4.6	ESTUDIO DE MECANISMO EN SOLUCIÓN DE LAS PRIMERAS ETAPAS DE GLICACIÓN EN LYS POR D-GLUCOSA	24
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1.	VALIDACIÓN METODOLÓGICA EN LA REACCIÓN DE APERTURA DE GLUCOPIRANOSA	25
5.2	ESTRUCTURA Y DINÁMICA EN SOLUCIÓN DE HSA, COMPLEJOS 1:1 HSA-GLUCOSA, MODIFICACIONES EN LYS195.....	26
5.3	NUCLEOFILIA DE LISINAS RELEVANTES DE HSA: SU DUREZA A NIVEL QM/MM.....	28
5.4	PROPUESTA DE UN MECANISMO PARA LA APERTURA DE GLUCOPIRANOSA EN HSA	29
5.5	MECANISMO DE LAS PRIMERAS ETAPAS DE GLICACIÓN EN LYS POR D-GLUCOSA.....	33
5.5.1	<i>Adición nucleofílica de EtNH₂ sobre D-glucosa</i>	33
5.5.2	<i>Deshidratación de carbinolamina asistida por MeNH₃⁺</i>	34
6	CONCLUSIONES	37
7	GLOSARIO	39
8	INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	44
9	REFERENCIAS	46

Listado de figuras y tablas

Figura 1	Estructura 2D de la D-glucosa en sus formas α -D-Glucopiranosica cíclica y lineal	2
Figura 2	Mutarrotación de la Glucosa	3
Figura 3	Algunos de los hallazgos clave para entender la reactividad de la Glucosa en solución	3
Figura 4	Estructura de homodímero de albúmina libre de ácidos grasos	6
Figura 5	Representación de dominios de HSA	7
Figura 6	Esquema de posibles modificaciones en las macromoléculas biológicas al reaccionar con azúcares reductores	8
Figura 7	Esquema para glicación de biomoléculas por un azúcar simple	9
Figura 8	Estructura de AGEs	10
Figura 9	Localización de los residuos básicos Lys/Arg de HSA	12
Figura 10	Cantidad de artículos que reportan modificaciones por glicación en HSA discriminados por residuo centro de ataque (Lys/Arg)	15
Figura 11	pKa de Lys y Arg de HSA	15
Figura 12	Estructura de HSA libre de ligandos. Se muestran los residuos de Trp214 y Lys525	16
Figura 13	Representación 2D del Sistema de trabajo para la validación metodológica	21
Figura 14	Propuesta mecanística para la apertura de glucosa catalizada por HSA en el sitio Sudlow I	23
Figura 15	Sistema reducido empleado para estudiar la apertura de la glucopiranosica catalizada por Lys195 y Lys199	23
Figura 16	Representación 2D del sistema reducido utilizado para estudiar la adición de una amina genérica sobre D-glucosa	24
Figura 17	Propuesta mecanística para la deshidratación de la carbinolamina en el entorno particular del sitio Sudlow I de HSA	24
Figura 18	Perfil de energía potencial relativa correspondiente al IRC para la apertura de α -D-glucopiranosica	25
Figura 19	Distancias atómicas utilizadas para estudiar la permanencia de α -D-glucopiranosica y D-glucosa en el sitio Sudlow I de la HSA	26
Figura 20	Distancias atómicas usadas para estudiar el entorno de la carbinolamina en HSA	27
Figura 21	Representación del Sitio Sudlow I con Lys 195/199 y la región de Lys525	28
Figura 22	Representaciones de la red de EdH en el sitio Sudlow I	30
Figura 23	Estructuras optimizadas y verificadas de IC, TS y FC para la reacción de apertura de α -D-glucopiranosica catalizada por el par $\text{MeNH}_2/\text{MeNH}_3^+$	31
Figura 24	Perfiles de Energía y gradiente RMS de la apertura de glucopiranosica catalizada por $\text{MeNH}_2/\text{MeNH}_3^+$	31
Figura 25	PES para la apertura de glucopiranosica catalizada por $\text{MeNH}_2/\text{MeNH}_3^+$	32
Figura 26	Perfiles de Energía y gradiente RMS de la adición nucleofílica	34

Figura 27	Estructuras optimizadas de IC, TS y FC para la reacción de deshidratación	35
Figura 28	Perfiles de Energía y RMS del gradiente de la deshidratación de la carbinolamina	35
Figura S1	Recortes mínimos de los sistemas para estudiar la red de EdH en el sitio Sudlow I.	42
Figura S2	RMSD de backbone mínimo de HSA libre de ligandos en solución acuosa.	42
Figura S3	RMSD de backbone mínimo de HSA-GCA en solución acuosa	43
Figura S4	Representación de distribución de cargas en los sistemas recortados del Sitio Sudlow I	43
Tabla 1	Modelos mecanísticos propuestos para la apertura de la glucopiranososa	4
Tabla 2	Energías libres de activación determinada a nivel experimental y teórico para la mutarrotación de la D-glucopiranososa en solución acuosa	5
Tabla 3	Sitios de modificación y tipo de aductos reportados para HSA modificada	13
Tabla 4	Órdenes de enlace de Wiberg utilizados como indicadores del avance de reacción de apertura	26
Tabla 5	Propiedades fisicoquímicas empleadas para hacer análisis de nucleofilia	28
Tabla 6	Análisis de parámetros termodinámicos para la reacción de apertura de glucopiranososa catalizada por el par $\text{MeNH}_2/\text{MeNH}_3^+$ a 298 K	33
Tabla 7	Análisis de parámetros termodinámicos para la reacción de deshidratación de carbinolamina asistida por MeNH_3^+ a 298 K	36

1 Resumen

El aumento de la concentración de glucosa en sangre acelera la glicación (glucosilación no enzimática) de aminas biológicas, una compleja cascada de reacciones que inicia por ataque nucleofílico de la amina (Lys/Arg y residuos $-NH_2$ terminales en péptidos y proteínas) sobre el carbonilo reactivo de la glucosa acíclica (forma minoritaria en solución acuosa, donde $\sim 99\%$ se halla como glucopiranososa) dando lugar a la formación reversible de *productos de glicación temprana* (Bases de Schiff, BS, y Productos de Amadori, PA) e irreversible de *productos de glicación avanzada* (AGEs). La acumulación de AGEs *in vivo* se ha asociado al origen de patologías derivadas de la diabetes. Así, el conocimiento detallado del mecanismo de glicación temprana de proteínas clave para el normal funcionamiento del organismo (p.ej., la albúmina sérica humana, HSA, por sus funciones como transportadora de ligandos endógenos/exógenos y antioxidante protectora, entre otras) puede ser utilizado para establecer métodos de detección precoz del avance de la enfermedad y diseñar fármacos específicos para inhibir/revertir la glicación y sus efectos deletéreos en el organismo.

En este trabajo se utilizaron métodos de modelado computacional a nivel PCM-DFT y ONIOM(DFT:AMBER) para estudiar la factibilidad de un mecanismo de apertura de α -D-glucopiranososa que involucra residuos Lys195/199 del sitio de Sudlow I en HSA, propuesto por Wang *et al.* (*J.Biol.Chem*, 2013) a partir de evidencia cristalográfica que señala la formación de una BS (o PA) Lys195-glucosa y la presencia de glucopiranososa en ese sitio. Se validó la metodología usada centralmente (B3LYP/6-31+G(d,p)-PCM) sobre el mecanismo de apertura de glucopiranososa asistido por una molécula de agua en solución y se calculó la nucleofilia relativa de residuos Lys525/199/195 de HSA a nivel ONIOM(DFT:AMBER), estimando sus pKa con el servidor H++. Mediante simulación de dinámica molecular clásica (MD) se determinaron estructuras representativas en condiciones quasi-fisiológicas para los complejos 1:1 de HSA con α -D-glucopiranososa y D-glucosa (cuya vida es breve, ~ 10 y 50 ns, respectivamente) y la carbinolamina primer producto intermedio de glicación en Lys195 (HSA-GCA). Una exploración preliminar de la red de enlaces de hidrógeno (EdH) en el sitio de Sudlow I antes, tras ingresar D-glucopiranososa y tras formar la BS en Lys195, permitió asignar a Lys195/199 un papel clave diferente al planteado por Wang *et al.* en la apertura de glucopiranososa y glicación en Lys195. Estos hallazgos llevaron a proponer un mecanismo alternativo, caracterizado aquí a nivel DFT-PCM con un sistema modelo reducido que emula la asistencia por Lys195/199 el cual si bien no compite con la catálisis bifuncional por agua en solución, sí podría ser viable en el entorno proteico. También se exploró con modelos reducidos la adición de Lys195 a D-Glucosa, no descartándose la posibilidad de una reacción concertada directa en HSA (inviabile sin asistencia en solución) visto que el costo entrópico de formar complejos intermediarios iniciales y la polaridad del entorno inciden significativamente sobre la barrera de este paso. Se identificó además a Lys436 de HSA como posible facilitador de la deshidratación de HSA-GCA para formar la BS en Lys195, siendo necesario incorporar la dispersión electrónica en el funcional de la densidad usado para caracterizar el estado de transición de este paso de la glicación temprana (localizado aquí a nivel ω B97X-D/6-31G(d,p)). Estos resultados darían pie para pensar que la deshidratación asistida por Lys436 en la proteína es un proceso viable y reversible y que podría no ser el paso limitante del proceso de glicación en este caso.

Palabras clave: Glucosa; apertura glucopiranososa; albúmina sérica humana; sitio de Sudlow I; Glicación; mecanismos de reacción; modelado computacional.

2 Introducción

2.1 Glucosa: aspectos fisicoquímicos y biológicos

La D-glucosa es una de las principales fuentes de energía y carbono en los organismos vivos. Se la encuentra principalmente en forma cíclica (> 99%), pudiéndose formar dos tipos de anillos de seis miembros que difieren en la configuración absoluta de su átomo C1 (carbono anomérico): α -D-glucopiranososa o β -D-glucopiranososa. En la **Figura 1** se muestra la numeración clásica utilizada para identificar con facilidad a los átomos de carbono y a los hidroxilos en sus respectivas posiciones, en este caso para las formas α -D-glucopiranososa y D-glucosa. Más detalles sobre la nomenclatura de carbohidratos puede encontrarse en la bibliografía especializada del campo [1]. Este tipo especial de estereoisómeros de la glucopiranososa que difieren en la ubicación axial o ecuatorial de hidroxilo OH, se denominan anómeros.

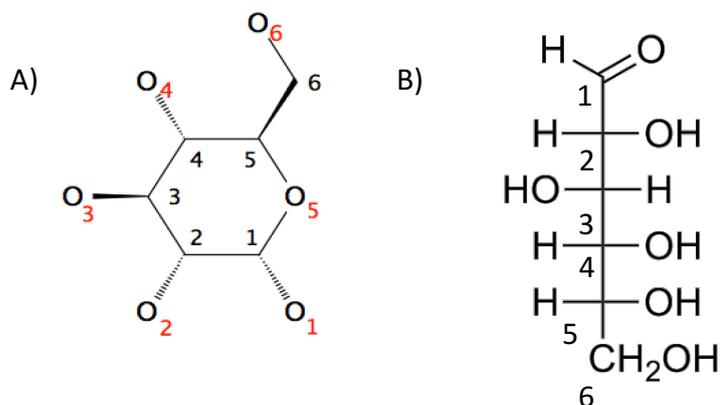


Figura 1. Estructura 2D de la D-glucosa en sus formas α -D-Glucopiranososa cíclica (A) y lineal (B). Se omite la representación de los átomos de H en A. Numeración de átomos de C y O en negro y rojo respectivamente.

La forma más reactiva de la glucosa corresponde a la conformación abierta o de aldehído libre, en la cual posee un grupo aldehído electrófilo. En solución acuosa, la fracción de glucosa abierta es menor al 1%, pudiéndose pensar que esta sería una de las razones por la cual la misma fue seleccionada como fuente preferencial, de la mayoría de los organismos vivos.

Los niveles de glucosa en plasma sanguíneo varían constantemente en individuos normales entre 4.2 y 6.7 mM, pudiéndose ampliar ese rango de 0-20 mM si se tienen en cuenta los niveles de glucosa de individuos con desórdenes metabólicos que llevan a hipo e hiperglicemia. Esto ha sido determinado usando diversas metodologías, una de ellas implicó usar glucosa oxidasa inmovilizada y luego cuantificar el peróxido de hidrógeno producido usando electrodos de platino [2].

Considerando las posibilidades de libertad conformacional que presenta la D-glucopiranososa, existen cientos de isómeros que corresponden a distintas disposiciones espaciales del anillo de 6 átomos (siendo la forma silla 4C_1 la disposición más estable entre todas ellas) y a los diferentes rotámeros correspondientes a las distintas disposiciones relativas posibles de los 4 grupos hidroxilo y el grupo hidroximetilo que el anillo sostiene [3]. Entre ellas se ha

determinado que la población relativa entre los anómeros alfa y beta depende de la temperatura de trabajo y del medio en que se estudie la reacción [4], siendo favorecida la forma alfa en fase gaseosa y la forma beta en solución acuosa [5]. Esto lleva a la necesidad de explicitar la estabilidad relativa y las condiciones en que se halla la glucopiranososa.

La reacción a través de la cual se da la interconversión entre anómeros se denomina mutarrotación. Esta reacción implica la formación de un intermediario no cíclico de mayor reactividad y menor estabilidad, tal como se muestra en la **Figura 2**.

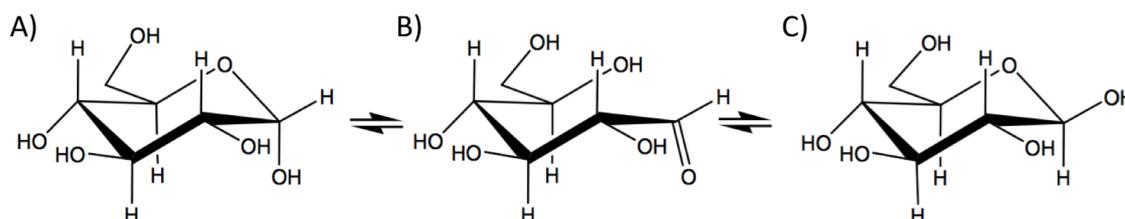
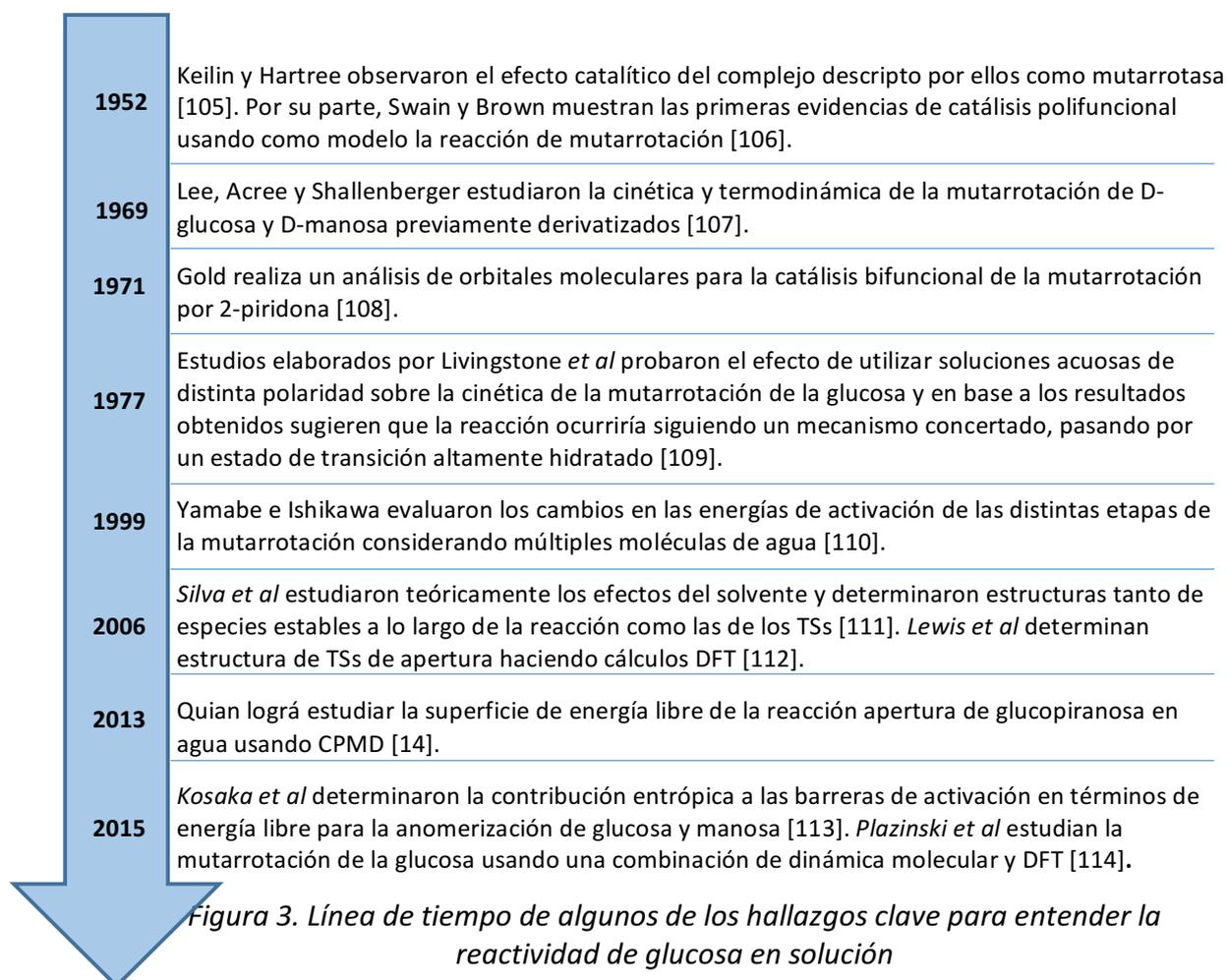


Figura 2. Mutarrotación de la Glucosa. A) α -D-Glucopiranososa; B) D-Glucosa (forma aldehído) y C) β -D-glucopiranososa.

Esta reacción ha sido objeto de estudio de investigadores por casi 170 años a la fecha. A continuación se reseñan algunos de los trabajos de mayor relevancia como antecedentes para esta tesina, ya que incluyen el estudio de esta reacción en contextos variados:



2.2 Apertura de α -D-glucopiranososa: mecanismo, termodinámica y cinética

A modo de simplificación se podría decir que ocurren tres eventos necesarios para el pasaje de glucopiranososa a glucosa:

1. Protonación de O5 por un ácido
2. Desprotonación de OH sobre C1 por una base
3. Ruptura de enlace C1-O5 y formación del doble enlace C=O

Se propusieron tres mecanismos a través de los cuales podría darse esta interconversión en solución que difieren en la forma concertada o por etapas en que se dan estos procesos elementales, siendo el primero propuesto por Lowry, apoyado también en las ideas de catálisis ácido-base de Brønsted [6]. Posteriormente se plantea un modelo alternativo de Pedersen y por último una serie de trabajos basados en polarigrafías llevan a una hipótesis de mecanismo concertado. Las características principales de estas propuestas se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Modelos mecanísticos propuestos para la apertura de la glucopiranososa

Mecanismo	
<p>Lowry [7-8]</p>	<p>Por etapas y con tres especies involucradas en la reacción: un ácido HA, una base B y la glucosa. Se apoya en la teoría electrolítica para la catálisis</p>
<p>Pedersen [9]</p>	<p>Por etapas y con dos especies involucradas: glucosa y HA. El primer paso corresponde a la protonación del O5 y luego le sucede un segundo paso en el cual, de manera concertada se rompe el enlace C1-O5 y se pierde el protón del hidroxilo sobre el C1, formándose un aldehído libre</p>
<p>Varios trabajos basados en polarigrafías [10-12]</p>	<p>Concertado con formación de aldehído libre en una reacción de <i>pseudo</i> primer orden asistida por agua</p>

De los modelos descritos, la cinética de los dos primeros no ajusta a los datos experimentales, descartándose que la formación del aldehído libre ocurra por etapas.

En 2006, un estudio teórico mostró la importancia del solvente tanto directa como indirectamente para el proceso reactivo, logrando reproducir datos experimentales sólo en el caso de introducir los efectos del solvente de manera explícita (agregando una molécula de agua catalítica) y de forma implícita (para representar el efecto del solvente como un complejo supramolecular) [13].

La **Tabla 2** muestra barreras en término de energía libre para el pasaje de α -D-glucopiranososa a glucosa determinadas tanto de manera experimental como teórica y para el pasaje de β -D-glucopiranososa a D-glucosa determinado experimentalmente. En la misma no se incluyen los errores asociados a las distintas metodologías utilizadas, pero los mismos están en el orden de unas pocas kcal/mol.

Tabla 2. Energías libres de activación determinada a nivel experimental y teórico para la mutarrotación de la D-glucopiranososa en solución acuosa (y eventual catálisis ácida)

Reacción	Origen del Resultado	ΔG^\ddagger / kcal.mol ⁻¹
α -D-glucopiranososa \rightarrow D-glucosa	Experimental / Polarografía [11]	20.4
	Teórico / CPMD-MTD [14]	25
β -D-glucopiranososa \rightarrow D-glucosa	Experimental/ Polarografía [11]	21.1

Utilizando la ecuación de Eyring-Polanyi [15] (Ecuación 1) para calcular las constantes cinéticas se puede verificar que la diferencia de 5 kcal/mol se refleja en un factor de aceleración de 5×10^3 . Tener en cuenta que $k_B = 1.38 \times 10^{-23} J/K$ corresponde a la constante de Boltzmann, T a la temperatura (en este caso se utiliza 298 K), $h = 6.63 \times 10^{-34} Js$ a la constante de Planck y $R = 1.987 cal/Kmol$ a la constante universal de los gases.

$$k_i = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta G_i^\ddagger}{RT}} \quad (\text{Ec. 1})$$

En la Ecuación 2, k_1 y k_2 corresponden a las constantes cinéticas a comparar y a es el factor de proporcionalidad entre ellas. Establecer este tipo de relaciones resulta útil para ver como las diferencias en las barreras se reflejan en forma amplificada en la cinética. La ecuación 3 se obtiene despejando a , previa combinación de las ecuaciones 1 y 2.

$$k_1 = a \times k_2 \quad (\text{Ec. 2})$$

$$a = e^{\frac{\Delta G_1^\ddagger - \Delta G_2^\ddagger}{RT}} = e^{\frac{5 \text{ kcal mol}^{-1}}{RT}} = 5 \times 10^3 \quad (\text{Ec. 3})$$

Estos cálculos muestran la importancia que tiene el obtener energías de activación lo más exactas posibles y cómo los errores en los cálculos pueden afectar severamente las predicciones cinéticas.

2.3 Albúmina sérica humana (HSA): estructura y función

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo y constituye aproximadamente un 60% del total de proteínas del suero humano, con una concentración de 640 μM y una vida media de 18 días [16-17].

Su estructura consiste en una cadena polipeptídica simple de 585 residuos y tiene un peso aproximado de 67 kDa [18]. El pI para albúmina deslipidada (la presencia de lípidos altera varias de sus propiedades) es aproximadamente 4.7 y presenta 14 cargas negativas a pH 7.4 [18]. En lo que respecta a la estructura secundaria, se compone de múltiples α -hélices interrumpidas por segmentos cortos con giros beta o sin estructura secundaria definida. En cuanto a su estructura terciaria, la albúmina es relativamente flexible en el sentido de que permite una rápida expansión, compresión y estiramiento. En la **Figura 4** se muestra la estructura de HSA obtenida por difracción de rayos X en 2013 (código PDB 4K2C) [19], se muestra como dímero debido a que esta es la forma en que cristaliza la proteína, si bien circula como monómero en el plasma. A diferencia de lo que ocurre para la albúmina bovina, la HSA experimenta cambios significativos al pasar del cristal a una estructura en solución acuosa y esto repercute sobre su capacidad de interactuar con otras moléculas [20-21].

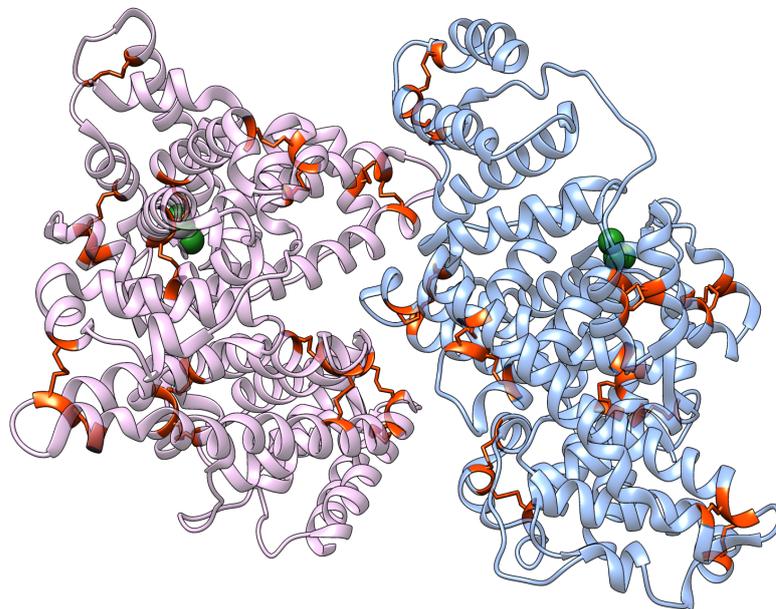


Figura 4. Estructura de homodímero de albúmina libre de ácidos grasos (PDB 4K2C), obtenida por cristalografía de rayos X, resolución 3.2 Å. En anaranjado se muestra la ubicación de los 17 puentes disulfuro intramoleculares en cada monómero.

Representadas como esferas verdes se muestra la ubicación del residuo Cys34 en cada cadena, único en estado reducido tiol/tiolato. Representación construida con UCSF Chimera.

Se organiza en 3 dominios, cada uno estabilizado por puentes disulfuro. Presentan homología y se denominan I, II y III, contando desde el extremo amino terminal y se diferencian en el tipo de ligandos para los cuales son específicos (siendo su capacidad transportadora de ligandos endógenos y exógenos otra de sus funciones principales). A su vez estos dominios están divididos en subdominios A y B (IA, IIA y IIIA y IB, IIB y IIIB). En la **Figura 4** se aprecia la ubicación de dominios y subdominios en un monómero de HSA y de los principales sitios de unión de ligandos (sitios de Sudlow I y II y sitios de unión de ácidos grasos). La división en subdominios tiene un significado funcional en lo que respecta a las estructuras derivadas por difracción de rayos X. Los sitios de unión de Sudlow I y II, se

definen de acuerdo a la capacidad que tiene la HSA de unir ciertas drogas a estos bolsillos específicos, explicando la importancia que tiene esta proteína para el transporte de fármacos, en particular los de naturaleza hidrofóbica, en el torrente sanguíneo [22]. De hecho, muchos de los bolsillos hidrofóbicos de la HSA hacen que también sea adecuada para el transporte de solutos hidrofóbicos endógenos, dado que no hay una afinidad muy elevada por los ligandos que unen.

La estructura de la HSA presenta 17 enlaces disulfuro intradominio [17-18;23]. Estos enlaces, que van a aportar cierta rigidez a la macromolécula, están distribuidos en los 3 dominios de la HSA, conectando las α -hélices que la forman entre sí, sin embargo, es notable que no haya enlaces disulfuro entre residuos de cisteína pertenecientes a cadenas distintas (ver **Figura 4**). Solo uno de los residuos de cisteína de HSA, Cys 34, se encuentra como tiol/tiolato en estado reducido, y es por este residuo que se afirma que la HSA cumple un rol como antioxidante en el plasma sanguíneo [24] (se considera a HSA como el tiol más abundante en plasma, representando alrededor del 80 % de los tioles libres presentes en el mismo).

Además de las funciones anteriormente mencionadas, la HSA cumple funciones que no se

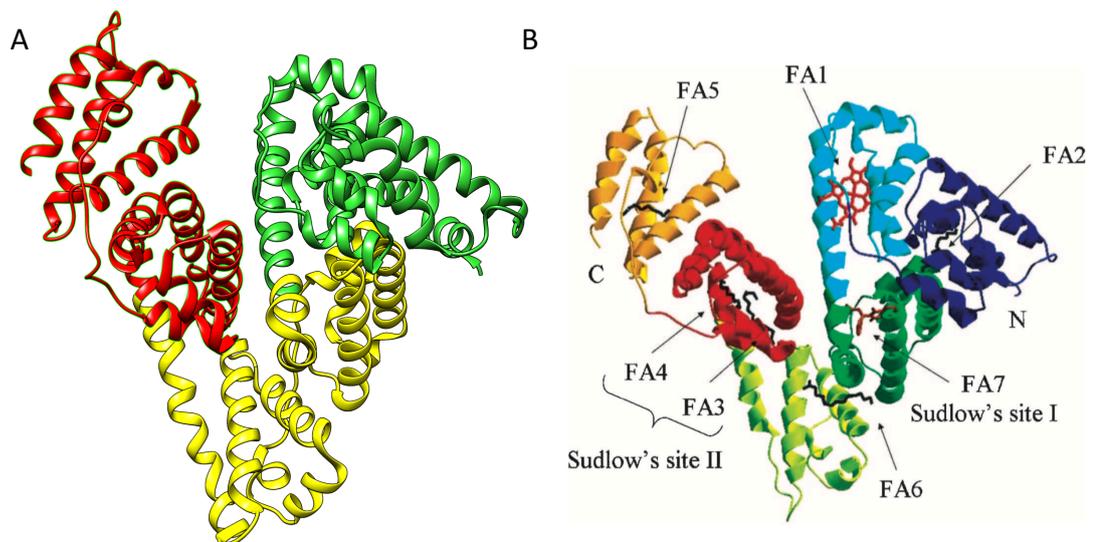


Figura 5. Organización en dominios (A), sub-dominios y sitios de unión en HSA (B).
 A) Estructura PDB 4K2C representada con Chimera USCF: dominios I-verde, II-amarillo y III-rojo. B) Sub-dominios (IA/IB-azul/cyan; IIA/IIB-verde oscuro/claro; IIIA/IIIB-rojo/anaran-jado) y principales sitios de unión, tomado de Fasano et al. [17], basado en estructuras PDB 1H9Z y 1O9X. Sitio FA1: hendidura primaria en IB (ligando hemo, rojo). Sitios FA2 y FA5: unión a ácidos grasos (ligando miristato, bordó). Sitios FA3 y FA4: sitio de Sudlow II en IIIA (ligando miristato). Sitio FA7: sitio de Sudlow I en IIA (ligando warfarina, marrón).

asocian directamente con su estructura molecular si no que con propiedades fisicoquímicas más generales, como ayudar a mantener la presión coloidsmótica [16], simplemente por ser de las sustancias más abundantes en plasma y poseer una carga negativa importante.

2.4 Las reacciones de glicación en seres vivos: una visión general

La glicación es una compleja cascada de reacciones no enzimáticas a través de la cual los grupos amino de moléculas biológicas (proteínas principalmente, pero no sólo) reaccionan con carbonilos reductores (azúcares en sus formas abiertas, entre otros), formándose distintos tipos de productos. La reacción fue descrita por primera vez en 1912 por Louise Camille Maillard en su artículo titulado “*Action des acides amines sur les sucres; formation de mélanoides par voie méthodique*” [25] y desde ese entonces también se conoce a la glicación de proteínas por azúcares como reacción de Maillard, siendo sumamente estudiada por más de un siglo en el ámbito de la química alimentaria, en tanto muchos de los productos derivados de ella son responsables del aroma, sabor y color de los alimentos, o incluso de la pérdida de sus propiedades deseadas durante su almacenamiento. No fue sino hasta entrados los años '80 que se comenzó a prestar atención a estos procesos y sus implicancias fisiopatológicas (las biomoléculas que pueden sufrir este tipo de modificación pueden ser proteínas, lípidos y ADN) en seres vivos y en particular en el ser humano (ver **Figura 6**).

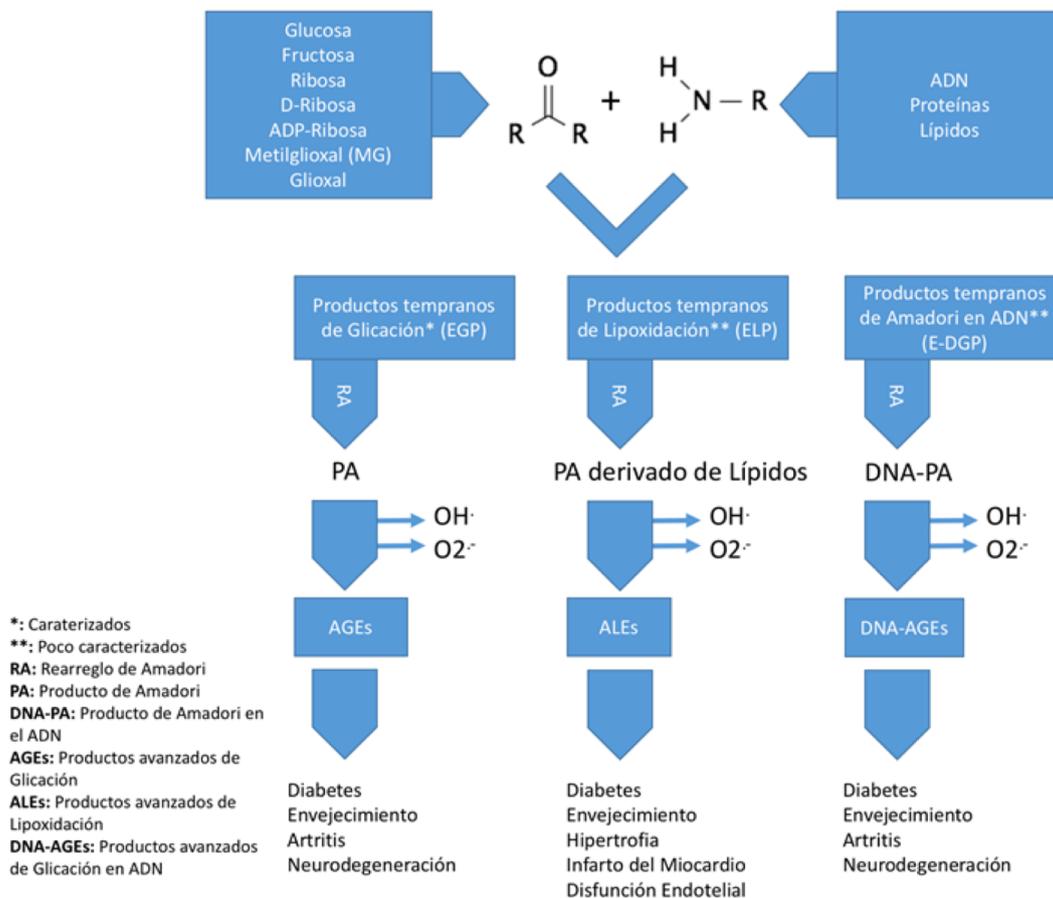


Figura 6. Esquema de posibles modificaciones que pueden sufrir las macromoléculas biológicas al reaccionar con azúcares reductores, llevando a la formación de AGEs, ALEs y DNA-AGEs y las enfermedades asociadas a la acumulación de estos productos. Modificado de Ahmad et al [27].

Los grupos amino, que tienen carácter nucleófilo, son capaces de reaccionar con los azúcares cuando éstos presentan un grupo carbonilo disponible o con otras especies reactivas que

contienen carbonilos (RCS por su sigla en inglés, *Reactive Carbonyl Species*), en todos los casos el enlace C=O se encuentra polarizado lo que resulta en un carbono electrófilo, blanco de la primera reacción de adición de la cascada. En el caso de azúcares simples el producto de adición es una carbinolamina (CA), que puede sufrir deshidratación y formar reversiblemente una Base de Schiff (BS) (ver **Figura 7**). Posteriormente, tras una serie de reordenamientos internos que pasan por la formación de un enol, se forma un Producto de Amadori (PA) de mayor estabilidad y que además se puede detectar experimentalmente con ensayos colorimétricos [26].

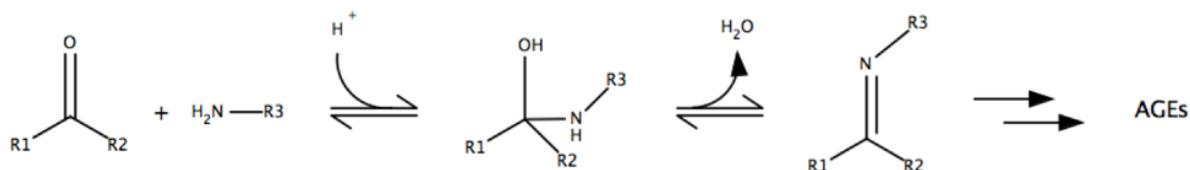


Figura 7. Esquema para glicación de biomoléculas por un azúcar simple. Se muestran los pasos correspondientes a la adición y la deshidratación que resultan en una carbinolamina CB y una BS respectivamente. La formación de AGEs es irreversible e implica muchos pasos reactivos.

El PA puede seguir reaccionando y sufrir una serie de modificaciones oxidativas y no oxidativas lo cual lleva a la formación de diversos productos, que en conjunto se denominan *Productos de Glicación Avanzada* (AGEs por su sigla en inglés, *Advanced Glycation End Products*). En términos más amplios, cuando los carbonilos reductores provienen de especies resultantes del metabolismo lipídico (oxoaldehídos como el glioxal, aldehídos α,β insaturados como el hidroxinonenal, etc.) se identifica a los productos finales como *ALEs* (por su sigla en inglés, *Advanced Lipoxidation End Products*). Su producción y acumulación puede llevar a la pérdida de la actividad biológica de macromoléculas, razón por la cual se piensa que podrían ser algunos de los causantes de complicaciones asociadas a la diabetes, la enfermedad cardiovascular, Alzheimer y varios tipos de cáncer [27].

En la **Figura 8** se muestran las estructuras químicas de distintos tipos de AGEs, algunos con propiedades fluorescentes, otros inmunógenos, etc. Es notable la diversidad de productos que pueden formarse en determinadas condiciones. Los caminos que llevan a la formación de un producto u otro van a depender no sólo de la naturaleza del agente glicante sino también de cuáles sean los grupos funcionales a modificar y su entorno químico, la presencia de agentes oxidantes, entre otros factores. La complejidad del estudio de estadios avanzados de la glicación es evidente en base a lo mencionado, siendo numerosos los estudios realizados con el fin de comprender mejor el mecanismo de acción de estos compuestos.

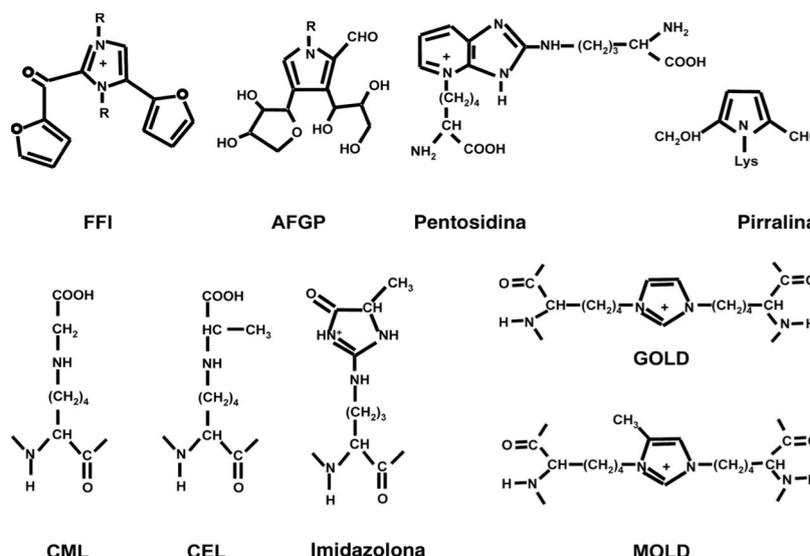


Figura 8. Estructura de AGEs. FFI: 2-(2-furoil)-4(5)-furanil-1H-imidazol; AFGP: 1-alquil-2-formil-3,4- diglucosil pirrol; Pentosidina: piralina; CML: N-ε-carboxi-metil-lisina; CEL: N-ε-carboxi-etil-lisina; Imidazolona; GOLD: dímero glioxal-lisina; MOLD: dímero metil-glioxal-lisina. Modificado de Basta et al [115].

En 1992 tras un complejo procedimiento que incluyera pasos de centrifugación y distintos tipos de cromatografía (columna de hidroxapatita, FPLC, HPLC) se logró aislar un marcador celular de membrana de un extracto de pulmón bovino. Ese marcador fue identificado usando técnicas como *immunoblotting*, microscopía de fluorescencia y electrónica y resultó ser un receptor capaz de unir AGEs, por lo que se denominó RAGE (sigla en inglés de *Receptor of AGEs*) [28]. RAGE es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresado por células endoteliales y fagocitos mononucleados, tiene un peso molecular de aproximadamente 35 kDa. Ese mismo año se logró clonar el cDNA que correspondería a la versión humana del RAGE [29]. Ya en 1994, investigadores del mismo grupo mostraron que este receptor estaría mediando la fagocitosis de AGEs de albúmina de rata y bovina, pudiendo observar dos destinos posibles para estas proteínas: su acumulación en vesículas de lisosomas o endosomas, o alternativamente ser transportados a la superficie abluminal. De esta forma mostraron que la interacción RAGE-AGEs que se da sobre superficies celulares estaría mediando la fagocitosis de AGEs para su posterior deposición o eliminación [30].

Los RAGE no son el único tipo de receptor de membrana con capacidad de unir AGEs y desencadenar respuestas efectoras por parte de las células; también fueron identificados y caracterizados otros receptores, por ejemplo AGE-R1, quien estaría mediando respuestas efectoras vía nF-κB y MAPK y cuya expresión disminuye dramáticamente en las células mesangiales [31] teniendo un efecto protector que evitaría una respuesta inflamatoria muy fuerte y crónica en el caso de individuos con nefropatía diabética. Otros receptores de membrana que reconocen AGEs identificados serían los receptores barrenderos (*scavengers*) tipo I y II de macrófagos, 80K-H fosfoproteína (AGE-R2), galectina-3, CD36 y LOX-170 [32].

2.5 Diabetes y Glicación: Relevancia del problema

A nivel mundial, se estimó que 347 millones de personas padecían diabetes en 2011, siendo una de las patologías más extendidas en los países desarrollados y en vías de desarrollo [33]. Existen distintos tipos de esta enfermedad, por un lado está la *diabetes Tipo I* que es el tipo más común en individuos de temprana edad y aparece cuando el páncreas no produce niveles suficientes de la insulina requerida para la utilización de la glucosa; quien la padece requiere así del suministro de dicha hormona [34]. Por otro lado está la *diabetes Tipo II*, globalmente el tipo más común que aparece cuando el organismo no utiliza la insulina de manera eficaz y para la que no se cuenta con tratamientos que ataquen directamente el mal [34]. La falta de tratamientos adecuados puede resultar en hiperglucemia (aumento en la concentración de glucosa en sangre), provocando daño a nivel de órganos y sistemas.

El último relevamiento de datos llevado a cabo en Uruguay acerca de la prevalencia de la diabetes en la población local fue realizado en el año 2004 [35]. En el mismo se mostró que la prevalencia de esta patología era de un 8%, de los cuales el 6,4% correspondían a diabéticos conocidos y el 1,6% restante a diabéticos desconocidos. Además, destacaron el hecho de que solo el 20% de los diabéticos que participaron del estudio no habían sido diagnosticados previamente.

La mortalidad es otro indicador utilizado para elegir las prioridades a la hora de realizar intervenciones en el ámbito de la salud. En el año 2013 se diseñó un modelo computarizado para estimar el número de muertes atribuible a la diabetes en base a datos recolectados por la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) y la *International Diabetes Federation* (IDF) [36]. Como resultado fue posible estimar que para el año 2015 el 8,8% de las muertes a nivel global eran atribuibles a diabetes en individuos de entre 20 y 79 años de edad, correspondiendo este valor a un total de 5,1 millones de muerte. Además 1 cada 11 adultos tiene diabetes actualmente en el mundo y la mitad de ellos no está diagnosticado, proyectándose para 2040 un crecimiento del 65% en el número de casos de diabetes en América Central y del Sur [37-38]. En 2015 la IDF estimó que en la región de América Central y del Sur 29.6 (25.2-35.5) millones de personas, o el 9,4 % (8,0-11,3 %) de la población adulta es diabética [39].

Es sabido que la glicación de proteínas transportadoras puede afectar la función de las mismas, como sucede en el caso de la transferrina [35], la ceruloplasmina [40] y HSA [41], por citar algunos ejemplos. Para el caso de la HSA, el cambio en el modo de unión de un ligando va a depender tanto del grado de glicación de la proteína y del sitio al que se una [41-46]. En el marco de esta tesina se propuso estudiar los efectos de la glicación temprana de HSA por glucosa y si bien hay una bibliografía extensa sobre las características de la unión de diversos ligandos a HSA y se cuenta con la estructura de los complejos correspondientes en bases de datos como el *Protein Data Bank* (PDB) a la fecha se encuentra disponible únicamente la estructura correspondiente a HSA glicada en Lys195 por glucosa, determinada por cristalografía en 2013 por Wang y colaboradores [19].

2.6 Glicación de HSA

Dado que la HSA es una proteína sérica abundante, que circula por el plasma sanguíneo por períodos prolongados de tiempo, la misma es susceptible a sufrir modificaciones desde que es secretada al torrente hasta el momento de su remoción, siendo una de las posibles

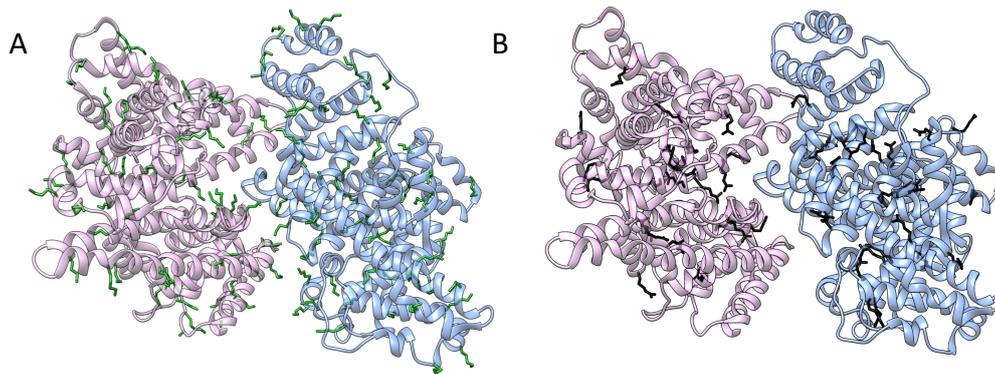


Figura 9. Localización de los residuos básicos Lys/Arg de HSA (código PDB 4K2C, homodímero cristalográfico). (A) En verde se aprecian los 59 residuos de lisina por cadena, localizados en regiones expuestas e internas. (B) En negro se aprecian 24 residuos de arginina por cadena, con distribución similar a las lisinas. Representaciones hechas con USCF Chimera.

modificaciones la glicación. Como vimos anteriormente la HSA es una proteína con muy diversas funciones, y por lo tanto modificaciones a nivel estructural muy probablemente van a afectar y eventualmente interrumpir el desarrollo normal de dichas funciones. Para estudiar el efecto que tiene la glicación se utilizan múltiples enfoques de manera de obtener una visión integral del problema, para luego diseñar estrategias que contribuyan a frenar el deterioro ocasionado.

Tal como se mencionó previamente, los principales grupos funcionales de las proteínas que pueden reaccionar con azúcares reductores y otras especies carbonílicas reactivas derivadas de ellos como el metilglioxal, son los residuos básicos de Lys y Arg (junto con residuos N-terminales y residuos de Cys libre). En total la HSA cuenta con 59 residuos de lisina y 24 de arginina, distribuidos por toda la estructura de la proteína (ver **Figura 9**).

De todos estos residuos susceptibles a experimentar modificación por glicación, se ha identificado que existen sitios de glicación preferenciales para distintos agentes glicantes. Anguizola y colaboradores realizaron en 2013 una extensa recopilación de trabajos donde se identifican distintos sitios de glicación [47], incluyendo experimentos donde se trabajó con muestras *in vivo* e *in vitro* (ver **Tabla 3**)

En la **Figura 10** se aprecian dos gráficas tomadas de la misma revisión de Anguizola *et al* [43] que muestran el número de artículos que reportan la modificación de residuos lisina y arginina de HSA discriminando que casos corresponden a ensayos *in vitro*, *in vivo* o usando muestras de plasma enriquecido con glucosa e incubadas *in vitro*. Si bien la mayoría de los experimentos reseñados se realizaron usando glucosa como agente glicante, también se incluyeron trabajos donde se utilizó metilglioxal (MG) o galactosa. El hecho que los residuos Lys superen ampliamente la cantidad de residuos Arg en HSA, sumado a que tienen por lo general valores de pKa más bajos que los segundos (y por lo tanto a pH fisiológico están presentes en mayor concentración en su forma nucleofílica desprotonada) hace a los primeros más susceptibles a la glicación con glucosa, algo reflejado el mayor número de trabajos que reportan la modificación de Lys (ver en **Figura 11** pKa de lisinas y argininas de HSA determinados con PROPKA [48]). Es de hacer notar que cuando se utiliza metilglioxal (mucho más reactivo y selectivo por los residuos de Arg) como agente glicante las argininas pasan a ser blancos principales. Por esta razón, es importante especificar cuál es el agente glicante y las condiciones en que se realiza cada experimento, pues los blancos principales de ataque por glicación van a variar en función de esto.

Tabla 3. Sitios de modificación y tipo de aductos reportados para HSA modificada

Tipo de Modificación	Sitios de modificación identificados Lys/Arg	Aducto principal ¹
Glicación [49]	Sitio preferencial: K525	FL/PA
Glicación [50]	Sitio preferencial: K525; Otros sitios significativos: K199, K233, K281, K439; Sitios adicionales identificados: K12, K317, K351, K534	FL/PA
Glicación [51]	K12, K20, K41, K51, K73, K136, K137, K159, K162, K199, K205, K233, K262, K276, K281, K313, K317, K323, K351, K378, K389, K402, K432, K436, K439, K475, K500, K519, K525, K541, K545, K557, K574	FL/PA
Glicación [52]	K525 > K233 > K136/K137 > K199, K64/ K73, K439, K317, K274/K276 > K534 > K389	FL/PA
Glicación [53]	K524/K525 > K162 > K276 > K359 > K351 > K233; Sitios adicionales identificados: K12, K51, K64, K174, K181, K262, K378, K414, K475, K541, K545	FL/PA
Glicación [54]	K4, K41, K73, K137, K181, K190/K195, K199/K205, K225/K233, K323, K351, K378, K413/K414, K432, K436/K439, K466, K519, K524/K525, K536, K545, K564/K573	FL/PA
Glicación [55]	Sitios preferenciales: K525, K240, K233, K51, K136, K137, K73; otros sitios: K41, K64, K93, K106, K159, K174, K181, K195, R218, K262, K274, K323, K359, K372, K378, K389, K402, K413, K432, K436, K439, K444, K466, R472, K475, K500, K519, K573	FL/PA/AGEs
Glicación y formación de AGEs [56]	K51, K137, K162, K225, K233, K276, K313, K323, K351, K378, K413, K444, K525, K536, K545, K573	FL/PA/AGEs

¹ Abreviaturas para las modificaciones: FL: fructosilisina; PA: Producto de Amadori; AFGP: 1-alkil-2-formil-3,4-glicosilpirrol; ArgP: argpirimidina; CEL: carboxietilisina; CML: carboximetilisina; 3DG-H1: hidroimidazolona-1 de 3-deoxiglucosona; G-H1: hidroimidazolona-1 de glioxal; Pyr: pirralina; THP: tetrahidropirimidina; IB: imidazolona B; MG-H1: hidroimidazolona-1 de metilglioxal.

Glicación y formación de AGEs [57]	Sitios potenciales: K41, K64, K93, K106, K317, K323, K359, K372, K402, K439, K444, K525, K541, K545, K557, K560, K564, K573, K574, R10, R98; Otros sitios potenciales: K4, K51, K281, K286, K313, R160, R209	FL/PA/AGEs
Glicación y formación de AGEs [58]	K12, K51, K159, K199, K205, K286, K378, K439, K525, K538; R160, R222, R472	FL/PA AGEs (ejs.: AFGP, ArgP, CEL, CML, 3DH-H1, G-H1, Pyr, THP)
Glicación y formación de AGEs [59]	Sitios significativos: K525/K524/R521 > N-terminal, K93/R98, K276/K286, K414/ K439 > R197 > K199, K281, R428; Otros sitios: K4, K12, K174, K190, K205, K212, K262, K313, K317, K413, K545, K557, K560, K564, K573, K574; R10, R186, R209, R410	FL/PA AGEs(ejemplos: AFGP, ArgP, CEL, CML, 3- DG-H1, G-H1, IB, MG- H1, Pyr, THP)
Glicación y formación de AGEs [60]	K159, K212, K323, K413, K432, K439, K525; R81, R114, R218	FL/PA AGEs(ejemplos: AFGP, CEL, CML, Pyr)
Glicación y formación de AGEs [61]	Regiones con los niveles más altos de modificación (sitios posibles): 1–10 (N-terminal*/K4/R10) o 42–51 (K51), 521–531 (K525*/K524), 275– 286 (K281*/K276/K286), 21–41 (K41), 82– 93 (K93), 87–100 (K93/R98), 101–119 (K106/R114/R117), 146–160 (K159/R160), 360–372 (K372); otras regiones: 426–442 (K439*/R428), 61–82 (K64/K73/R81), 142– 153 (R144/R145), 154–167 (K159), 189– 208 (K199), 209–227 (K212/R218), 241– 257 (R257), 324–336 (R336), 373–389 (K378/K389), 414–428 (K414/R428), 502– 518 (K519)	FL/PA AGEs(ejemplos: AFGP, CEL, 3-DG-H1, G- H1, Pyr, MG- H1)
Glicación y formación de AGEs [45]	K12, K162, K174, K190, K199, K205, K276, K281, K286, K313, K317, K372, K432, K525, K545, K557, K560, K564, K573/K574; R10, R98, R160, R197, R209, R428, R484, R485	FL/PA AGEs(ejemplos: AFGP, CEL, CML, 3-DG- H1, G-H1, MG- H1, Pyr, THP)
Formación de AGEs con MG [62-63]	R410 > R114, R186, R218, R428	MG-H1, ArgP, CEL, dimero de Lys derivado de MG
Galactación [64]	K12, K233, K276/K281, K414, K525	Galactosil-lisina

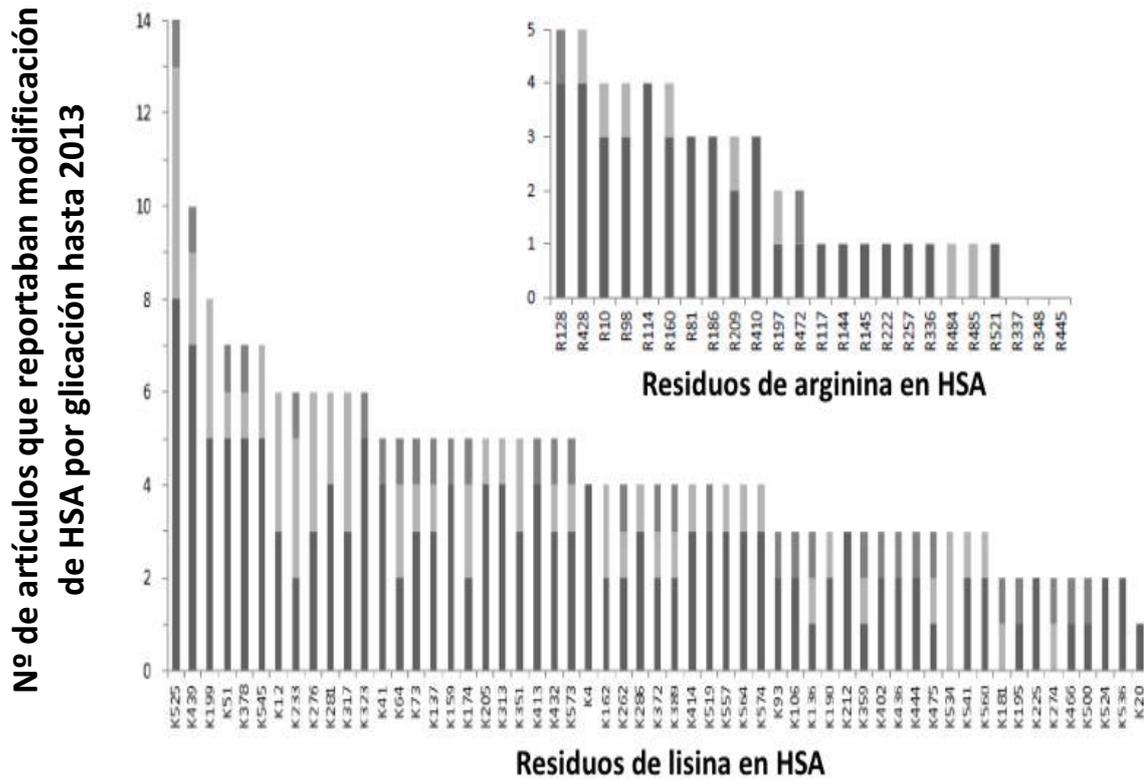


Figura 10. Cantidad de artículos reportando modificaciones por glicación en HSA discriminados por blanco de ataque (Lys/Arg). Se diferencia con distinto tono de gris en los gráficos de barras el uso de ensayos *in vitro* (parte inferior de color gris oscuro), *in vivo* (sección media, de color gris claro) o usando plasma enriquecido con glucosa e incubado *in vitro* (sección superior, gris de tono intermedio). Tomado de Anguizola et al [47]

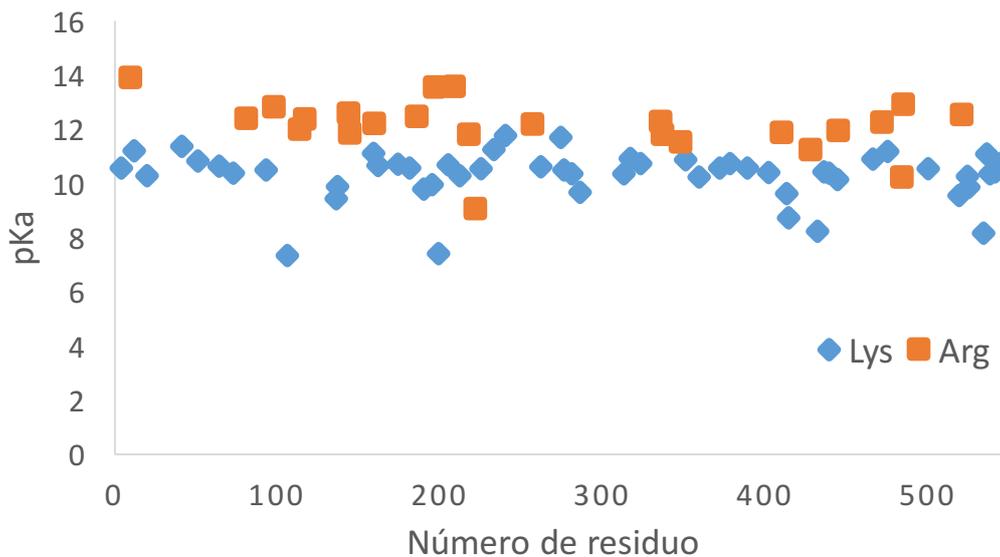


Figura 11. pKa de Lys y Arg de HSA (Código PDB: 4K2C) determinados con PROPKA

Ya en 1986 Garlick y Mazer habían determinado que el sitio de glicación mayoritario en HSA era el residuo Lys525 cuando se tomaba muestras recién purificadas y se las hacía reaccionar con borohidruro de sodio tritiado [49]. Además, a ese residuo Lys525 corresponde el mayor número de artículos que reportan modificación de Lys. En cambio si bien la modificación de arginina aparece reportada un número considerable de veces, su frecuencia es bastante menor, no pareciendo ser sitios preferenciales de glicación cuando el agente glicante es glucosa u otro azúcar; por su parte en el caso de modificación por α,β -dicarbonilos son las Arg los sitios preferenciales de ataque.

La glicación de distintos residuos de la HSA puede llegar a provocar cambios conformacionales en esta proteína. Uno de los experimentos utilizados para evidenciarlo consiste en seguir la fluorescencia intrínseca de la HSA, propiedad que brinda mucha información estructural estática y dinámica, ya que esta proteína contiene un único residuo de triptófano fluorescente (Trp214) que refleja ese tipo de cambios, lo cual supone ventajas a la hora de hacer diseños experimentales. Tanto la HSA glicada obtenida directamente de suero de donantes diabéticos, como la obtenida post-incubación con glucosa muestran cambios significativos en el rendimiento cuántico y longitudes de onda de máxima emisión [65]. Estos autores interpretan que siendo el blanco principal de glicación Lys525 y estando ubicada en un dominio distinto al de Trp214, la glicación debe provocar cambios conformacionales que se propagan desde el dominio III al II. En la **Figura 12** se puede observar que la distancia entre estos residuos es importante, lo cual estaría a favor de la hipótesis de que la glicación de la Lys525 provoque cambios en el espectro de emisión del Trp214.

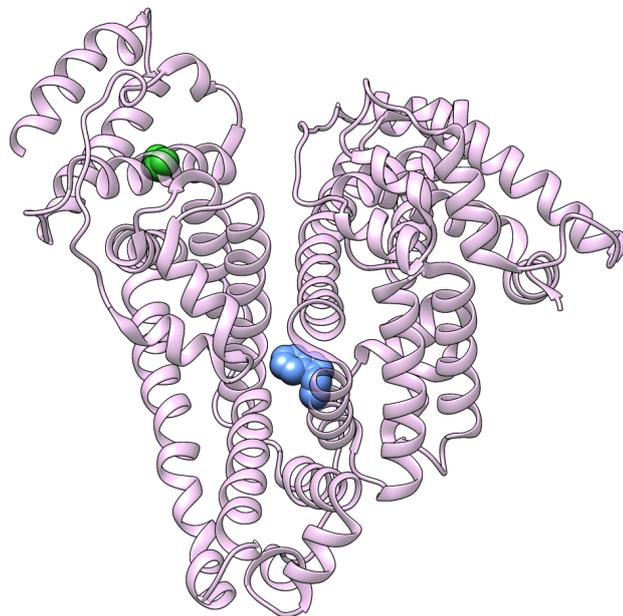


Figura 12. Estructura de HSA libre de ligandos (código PDB 4K2C). Se muestran los residuos de Trp214 (en azul) y Lys525 (en verde).

Aun así, habría otros residuos Lys más cercanos a Trp214 que pese a no ser blanco principal, son susceptibles de sufrir glicación: Lys195, Lys199, Lys212, Lys233, Lys276, Lys281, Lys286 y Arg218. Comparando los espectros obtenidos por dicroísmo circular (CD) se logra observar pequeñas diferencias entre HSA y HSA glicada y analizando esos espectros a diferentes concentraciones de agente desnaturalizante se confirma que las estructuras presentan diferencias y eso puede reflejarse en la transición del estado nativo al desnaturalizado [66]. Algo similar ocurre cuando el agente glicante utilizado es galactosa [67]. Una manera de confirmar que la propagación de los cambios estructurales debidos a la glicación es posible podría ser hacer estudios con mutantes de Lys525.

Recuérdese que en tanto el *sitio de Sudlow I* une warfarina (junto a varias drogas anticoagulantes tales como azapropazona, fenilbutazona y salicilato) el *sitio de Sudlow II* une L-triptofano (además de ibuprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno y benzodiazepinas) [68]. Usando columnas con estas dos moléculas representativas de la unión de cada sitio inmovilizadas en ellas fue posible determinar que las características de la unión de estos ligandos a HSA cambia cuando la proteína es glicada [43].

Como se mencionó tempranamente en esta introducción, la única estructura de HSA glicada que se encuentra disponible en el Protein Data Bank está modificada en el residuo Lys195 por unión de una molécula de glucosa, correspondiendo la cristalografía a una BS o PA [19]. Sumado a esto, estudios de dinámica molecular [69] también sugieren la posibilidad de que la misma lisina actúe como nucleófilo, posterior a una transferencia protónica mediada por un puente de aguas a la Lys199, lo cual también concuerda con otro estudio que muestra que ambas Lys195/199 son capaces de reaccionar frente a penicilinas[70].

La razón por la cual es el residuo Lys195 y no el blanco principal de glicación bajo condiciones fisiológicas (Lys525) el que aparece glicado en la estructura cristalográfica no queda clara. El hecho que para obtener los cristales caracterizados se incubara HSA deslipidada con glucosa en condiciones experimentales que no reproducen exactamente las condiciones fisiológicas (se ha reportado que la presencia de ácidos grasos interactuando con la HSA en forma no covalente en distintas posiciones y proporciones tiene efectos tanto sobre la estructura y la exposición y reactividad de residuos particulares de la proteína [71]) podría ser una de las explicaciones.

3 Objetivos

3.1 Objetivos generales

El objetivo central de este trabajo de tesina de graduación se orientó a caracterizar mediante técnicas de modelado computacional que llegan al nivel de descripción molecular, atómico y electrónico (incluyendo métodos clásicos MM/MD, métodos cuánticos PCM-DFT y métodos mixtos QM/MM) los siguientes dos mecanismos de reacción:

- Apertura de D-glucopiranososa en el contexto del sitio de Sudlow I de la HSA, examinando el papel que puede tener el entorno local de Lys195/Lys199 (identificado como clave por Wang et al. en 2013 mediante cristalografía de rayos X) en este proceso, modulando sus características respecto a la forma en que tiene lugar en solución acuosa y bajo distintos escenarios de catálisis;
- Glicación temprana e intermedia del residuo Lys195 de HSA por una molécula de D-glucosa hasta la formación de la correspondiente BS de la que existe evidencia experimental

Con el propósito de aportar nuevos elementos al conocimiento detallado de los aspectos estructurales y de reactividad (protagonistas en el proceso, papel de los enlaces de hidrógeno del entorno, participación de moléculas de agua, etc.) subyacentes a ambos procesos y validar o rectificar hipótesis mecanísticas planteadas por otros autores. A tales efectos se trabajó tanto con modelos materiales reducidos de los sistemas en estudio (representando residuos clave del entorno proteico con pequeños fragmentos de metilamina o etilamina) como con las estructuras de la proteína completa libre y modificada por glucosa (HSA_{libre}-4K2C y HSA_{glicada}-4IW2) incorporando las formas cíclica D-glucopiranososa o lineal D-glucosa en forma acorde a cada proceso en estudio, al igual que moléculas de agua asistentes.

3.2 Objetivos específicos

1. Validar la metodología PCM-DFT a utilizar usando como referencia el proceso de apertura de α -D-glucopiranososa catalizado por agua bien caracterizado experimental y teóricamente;
2. Estudiar el comportamiento dinámico de HSA, los complejos 1:1 D-Glucosa-HSA y α -D-glucopiranososa-HSA, la carbinolamina formada entre glucosa y Lys195 de HSA correspondiente con simulaciones de dinámica molecular clásica en la escala de los sub-microsegundos
3. Examinar en forma comparativa la nucleofilia de los residuos de Lys195, Lys199 y Lys525 con métodos QM/MM (ONIOM);
4. Elucidar el posible mecanismo de apertura de α -D-glucopiranososa con la asistencia de aminas (Lys195 y Lys199);
5. Elucidar el mecanismo de adición y deshidratación que llevan a la formación de la CA y BS de la glucosa con Lys195 de HSA respectivamente.

4 Metodología

4.1 Estrategia general: modelos materiales y tipos de métodos

El estudio del mecanismo reacciones químicas requiere el conocimiento de la estructura electrónica detallada de las especies participantes en cuestión (reactivos, productos y complejos intermediarios estables, estados de transición inestables) que experimentan ruptura/formación de enlaces características de la transformación química, que no se puede lograr con una descripción clásica de los sistemas moleculares (MM, apropiada para los sistemas proteicos de gran dimensión como la HSA) lo que fuerza en este tipo de estudios a recurrir a la mecánica cuántica (QM) junto a métodos del campo de reacción continuo como el IEF-PCM [72] o descripciones explícitas de las moléculas circundantes para describir efectos del medio, o finalmente se recurre a su combinación en métodos mixtos QM/MM [73]. Entonces dependiendo del tamaño del sistema de trabajo se optó por métodos cuánticos en el caso de sistemas con un número reducido de átomos y por métodos mixtos QM/MM cuando era necesario incluir todos los átomos del sistema para tener una descripción más detallada.

En este trabajo de tesina, el detalle de la estructura electrónica de los sistemas bajo estudio fue descrito utilizando la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT). Se utilizaron los funcionales B3LYP [74] y ω B97X-D [75], en conjunto uno de los siguientes conjuntos de base: 6-31G(d,p) o 6-31+G(d,p) [76]. B3LYP es uno de los más utilizados en la actualidad, y ha sido probado para reacciones que involucran transferencias protónicas [77] y además ha mostrado un buen desempeño en la predicción de geometría de complejos no covalentes donde predominan interacciones polares [78]. ω B97X-D tiene correcciones para la dispersión y por lo tanto resulta más adecuado para los sistemas con electrones que se encuentren deslocalizados (por ejemplo sistemas con dobles enlaces conjugados, aromáticos, etc.).

Para las descripciones del sistema completo se optó por utilizar el esquema mixto ONIOM QM:MM [79-80]. En este tipo de métodos, el sistema se divide en capas con distinta jerarquía (aquí los sistemas se dividieron en dos capas: los átomos de la capa alta descritos al nivel DFT B3LYP/6-31+G(d,p), seleccionados por participar directamente de los procesos reactivos, y los de la capa baja con el campo de fuerza AMBER, que en principio sin participar activamente en las reacciones, caracterizan al entorno en que éstas ocurren). El método se basa en aproximar la energía del sistema real como una combinación de energías calculadas a distintos niveles de teoría en las distintas capas.

La energía total se calcula como:

$$E^{ONIOM} = E^{baja}(R) + E^{alta}(SM) - E^{baja}(SM) \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde E^{ONIOM} corresponde a la energía total, $E^{baja}(R)$ corresponde a la energía para el sistema completo calculada con AMBER, $E^{alta}(SM)$ corresponde a la energía de la capa alta calculada con DFT y $E^{baja}(SM)$ corresponde a la energía de la capa alta calculada con AMBER.

Se utilizó *embedding electrónico* [81], de manera de permitir que la función de onda QM pueda polarizarse por el entorno MM. Esto se consigue incorporando las cargas atómicas

parciales de la región clásica en el Hamiltoniano cuántico. De esta forma se logra una mejor descripción de la interacción electrostática entre las regiones QM.

4.1.1 Modelos reducidos

Los efectos del entorno se introdujeron mediante el modelo continuo IEF-PCM [82]. Se utilizó una constante dieléctrica $\epsilon = 78.35$, correspondiente a un solvente polar como el agua. Las cavidades de forma adaptada a la molécula se construyeron intersecando esferas centradas en los átomos y con radios de Bondi [83]. Se tuvieron en cuenta las contribuciones de dispersión, repulsión y cavitación de la forma en que están implementadas en Gaussian09 junto con la contribución electrostática para el cálculo de la energía en solución.

Se optimizaron estructuras de reactivos (R), estado de transición (TS) y producto (P) para cada reacción, usando el algoritmo de Schlegel [84], con el paquete Gaussian 09 revisión D.01 [85]. La naturaleza de las estructuras se verificó con el cálculo del Hessiano analítico al mismo nivel de teoría. Para conectar los TS con R y P se realizaron cálculos de camino de reacción (IRC), usando el integrador predictor-corrector HPC [86-88] y con un tamaño de paso de 0.02 Bohr , al mismo nivel de teoría. Los extremos de los IRC así obtenidos se tomaron como puntos de partida para caracterizar los complejos intermediarios correspondientes al mismo nivel de teoría y con el mismo protocolo.

La termoquímica de los procesos se calculó usando las aproximaciones usuales de la termodinámica estadística, a 298.15 K y 1 atm. La energía libre de activación se calculó restando la energía libre de reactivos separados al infinito (sumados) de la correspondiente al TS. La energía de reacción se calculó respecto a la suma de la energía libre de los reactivos separados al infinito.

4.1.2 Sistema real completo

Se realizaron cálculos mixtos ONIOM (B3LYP/6-31G(d,p):AMBER) single point sobre estructuras representativas de HSA en solución, habiendo hecho previamente simulaciones de dinámica molecular clásica, clustering y minimización clásica de estructuras con el programa AMBER14 v14.0.1 [89] según se detalla en **sección 4.3**.

4.2 Validación metodológica: modelo reducido del mecanismo de apertura de α -D-glucopiranososa a nivel PCM-DFT

Se estudió el mecanismo de apertura de α -D-glucopiranososa con una molécula de agua como catalizador bifuncional (ácido/base). El sistema de trabajo se muestra en la **Figura 13**, y consta de una molécula de α -D-glucopiranososa y otra de agua.

Además, se analizó la reorganización electrónica que tiene lugar a lo largo del proceso reactivo. Para esto se optó por realizar un análisis de los orbitales naturales (NBO) de Weinhold [90] y tomar los órdenes de enlaces de Wiberg como indicadores del avance de la reacción.

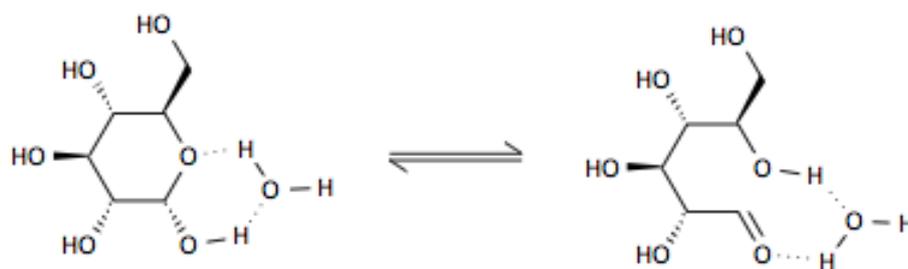


Figura 13. Representación 2D del Sistema de trabajo para la validación metodológica

4.3 Estructura y dinámica en solución de HSA, complejos 1:1 HSA-Glucosa, modificaciones en Lys195

Se construyeron los siguientes sistemas:

4.3.A. HSA sin ligandos ni modificaciones

4.3.C. Complejo HSA-Glucosa

4.3.B. Complejo HSA-Glucopiranososa

4.3.D. Carbinolamina en Lys195 (HSA-GCA)

Los sistemas se construyeron a partir de las estructuras reportadas por *Wang et al* [19] (4K2C en el caso de 4.3.A, 4K2C/4IW1 en el caso de 4.3.B/4.3.C y 4IW2 4.3.D). Se asignaron los estados de protonación de los residuos titulables con la ayuda del servidor H++ v3.2 [91-93]. Los complejos se construyeron mediante docking manual de α -D-glucopiranososa y D-glucosa para los sistemas 4.3.B y 4.3.C respectivamente, usando como guía el complejo HSA-fructosa 4IW1. El sistema 4.3.D se construyó modificando manualmente la BS sobre Lys195 presente en 4IW2. Los campos de fuerza utilizados fueron: AMBER ff99SB [94] (para los residuos estándar) y gaff [95] con cargas RESP [96] (para los ligandos y residuos modificados).

Para cada sistema, se agregaron los átomos faltantes, se solvató con una caja octaédrica truncada de aguas TIP3P y se neutralizó con Na^+ con el módulo leap del paquete AMBER 14. Se usó un protocolo de minimización por etapas, calentamiento a 300 K (50ps usando un ensemble NVT y el termostato de Langevin), equilibración de la densidad (1ns con un ensemble NPT y el termostato de Langevin) y por último se realizaron las dinámicas de producción (con un ensemble NPT, el termostato de Berendsen y el Baróstato de Monte Carlo). Para las interacciones no enlazantes se usó un cutoff de 10 Å, las interacciones electrostáticas de largo alcance fueron con el procedimiento PME [97] junto con condiciones de contorno periódicas.

Se siguieron las trayectorias visualmente con el programa VMD [98] para asegurar la correcta convergencia de los sistemas durante las simulaciones. Las trayectorias se analizaron usando la herramienta MD Movie incluida en el paquete UCSF Chimera v1.10.1 [99]. Para todos los análisis se almacenaron 1 de cada 4 frames. Para evaluar la estabilización de las estructuras se calculó el RMSD (por sus siglas en inglés, Root Mean Square Deviation) en base a backbones mínimos (donde no se incluyen átomos de O ni H).

4.4 Comparación de la nucleofilia de Lys de HSA: dureza a nivel QM/MM

Con el fin de entender con mayor detalle como se modula la reactividad de los residuos Lys en el entorno de HSA, se seleccionaron los residuos Lys525 por haber sido señalada como blanco principal de glicación de HSA en condiciones generales, Lys195 por encontrarse evidencia experimental de su glicación por glucosa [19] y Lys199 por su cercanía a Lys195 y su facilidad para perder un protón (posee pKa relativamente bajo para un residuo Lys).

Teniendo en cuenta que el interés es comparar la nucleofilia de estos residuos como iniciadores del proceso de glicación de HSA, se tomó como indicador de la misma la estabilidad del orbital de Kohn-Sham ocupado de mayor energía (HOMO-KS), correspondiente a su forma desprotonada más allá del pKa de cada residuo, según las siguientes combinaciones: 4.4A) Lys195/199 desprotonadas (de aquí en adelante Lyn) y Lys525 protonada y 4.4B) Lys195 protonada y Lyn199/525.

Estos estudios se llevaron a cabo con 3 cálculos single point ONIOM (B3LYP/6-31G(d,p):AMBER) localizando la región cuántica sobre un residuo Lyn (incluyendo los átomos correspondientes a su backbone) de la estructura representativa del clúster más poblado en solución de HSA obtenido según el protocolo señalado en la **sección 4.3**. Las moléculas de agua ubicadas a más de 12 Å del átomo Nε de Lys195 (sistema 4.4A) o de Lys525 (sistema 4.4B) fueron eliminadas. El cálculo para Lyn199 se realizó solo para el sistema 1, asumiendo que está no se verá muy afectada por el cambio en la protonación.

4.5 Posible mecanismo para apertura de glucopiranososa en HSA

Para explorar la viabilidad del mecanismo de apertura de glucosa en HSA propuesto por Wang et al, se recurrió a un modelo reducido representativo del sistema reactivo construido a partir del conocimiento de las cristalografías reportadas para HSA libre y glicada en Lys195 (Sistemas 4.5A y 4.5C respectivamente). No contando con estructura cristalográfica del complejo inicial HSA-glucosa, se generó una aproximación de partida (Sistema 4.5B) introduciendo por docking manual una molécula de α-D-glucopiranososa en el sitio Sudlow I, en forma análoga al procedimiento de minimización previo a la dinámica del mismo complejo descrito en **sección 4.3**.

Buscando entender la naturaleza de la red de enlaces de hidrógeno (EdH), en el entorno de las Lys195/199, indicadas como relevantes en el mecanismo de apertura por los mismos autores, se trabajó con recortes de estos sistemas (ver **Figura S1**) que permitieran caracterizarla con detalle electrónico al nivel B3LYP/6-31+G(d,p)-PCM junto a los parámetros geométricos usuales [100] provenientes de las estructuras 4.5.A-C.

Se determinaron los órdenes de enlace para los pares hidrógeno-aceptor de los posibles EdH mediante índices de Wiberg obtenidos a partir de orbitales naturales de enlace (NBO) de Weinhold y las cargas atómicas NPA, usadas como posible indicador de reorganización electrónica en sitio de reacción.

Como resultado de esta exploración preliminar no se halló evidencia para sostener la propuesta de Wang *et al* (ver en mayor detalle en **sección 5.3**) y por el contrario los resultados obtenidos parecían sugerir un mecanismo alternativo donde la apertura se ve facilitada por la participación activa de los residuos Lys195/199 actuando como ácidos y bases de Brønsted (ver **Figura 14**). Este mecanismo fue explorado en detalle siguiendo los protocolo especificado en la **sección 4.1.1** y validado en la **sección 4.2**, empleando dos aminas ($\text{MeNH}_2/\text{MeNH}_3^+$) para emular la acción de la lisinas en la proteína y α -D-glucopiranososa.

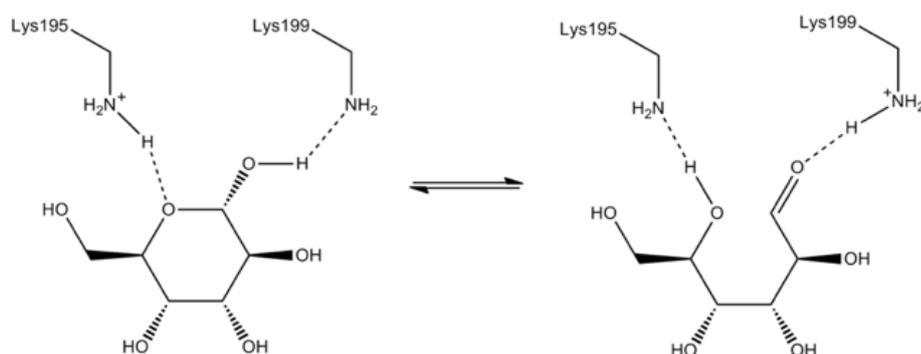


Figura 14. Propuesta mecanística para la apertura de glucosa catalizada por HSA en el sitio Sudlow I como paso previo a la glicación de Lys195.

Para facilitar la búsqueda de los TS correspondientes (se consideró la posibilidad de mecanismos concertados y por etapas) se realizó un barrido relajado en dos dimensiones, siguiendo las coordenadas correspondientes a la transferencia protónica desde O1H de α -D-glucopiranososa al átomo de N de MeNH_2 ($d_{\text{OH}_1} - N_{\text{MeNH}_2}$) y la distancia del C1 al O5 ($d_{\text{C1}} - \text{O5}$), mostradas en la **Figura 15**.

De esta forma se construyó una superficie de energía potencial (PES) representativa del proceso reactivo asumiendo que las variables seleccionadas se pueden utilizar como coordenadas de reacción.

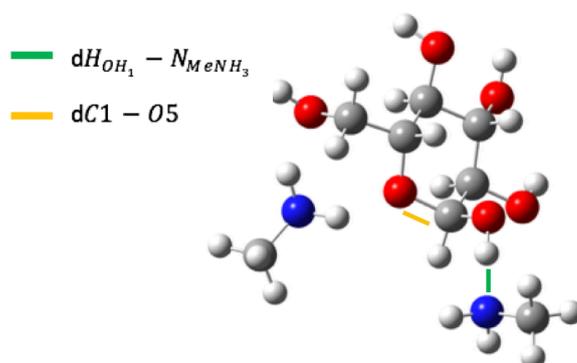


Figura 15. Sistema reducido empleado para estudiar la apertura de la glucopiranososa catalizada por Lys195 y Lys199. Se muestran las coordenadas utilizadas para obtener la PES de la reacción.

4.6 Estudio de mecanismo en solución de las primeras etapas de glicación en Lys por D-glucosa

Como se mencionó en la introducción, este proceso involucra dos etapas elementales: una adición de la amina sobre el carbonilo de la glucosa acíclica para formar una carbinolamina y la subsecuente deshidratación hasta formar la BS correspondiente. Para la primera etapa se utilizó un modelo reducido de adición y transferencia protónica concertadas, mostrado en la **Figura 16**).

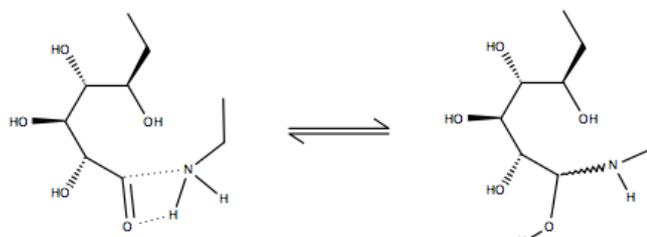


Figura 16. Representación 2D del sistema reducido utilizado para estudiar la adición de una amina genérica sobre D-glucosa.

Los efectos del entorno proteico también fueron tenidos en cuenta usando un modelo de solvente implícito al igual que en las otras reacciones y se estudió el efecto de disminuir la polaridad del solvente estudiando el caso extremo que corresponde a la reacción *in vacuo*.

El estudio de la estructura representativa del sistema HSA-GCA (4.3.D) obtenido por MD según descrito en la **sección 4.3**, proporciona información valiosa para determinar la posible participación de residuos vecinos en la catálisis de la posterior deshidratación de esta especie (proceso no favorable cinéticamente sin asistencia) y definir extensión del recorte representativo a utilizar en una descripción simplificada del mecanismo. En particular como se presenta en mayor detalle en la **sección 5.2** aparece un residuo de Lys436 que se representó con una molécula de MeNH_3^+ en el modelo reducido llevando a proponer un mecanismo como el mostrado en la **Figura 17**. Además se requirió incorporar 3 moléculas de agua explícitas estabilizar el sistema. Se siguió el protocolo explicitado en la **sección 4.1** sustituyendo el funcional de la densidad B3LYP utilizado inicialmente por $\omega\text{B97X-D}$ junto con el conjunto de base 6-31G(d).

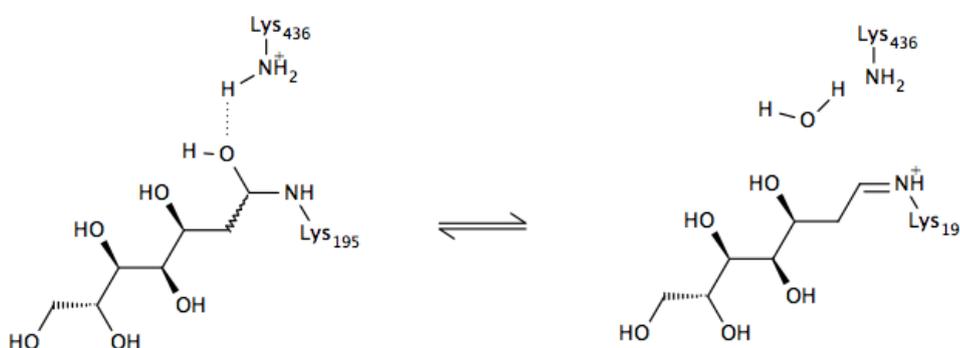


Figura 17. Propuesta mecanística para la deshidratación de la carbinolamina en el entorno particular del sitio Sudlow I de HSA.

5 Resultados y Discusión

5.1. Validación metodológica en la reacción de apertura de glucopiranososa

Tal como se observa en la **Figura 19**, correspondiente al IRC obtenido al nivel B3LYP/6-31+G(d,p) en solución acuosa, en consistencia con los datos experimentales y modelado MTD-CPMD el proceso transcurre de manera concertada a través de un TS cíclico (con una frecuencia vibracional imaginaria asociada de 1141 cm^{-1}), siendo el resultado obtenido confiable en términos de cambios estructurales a lo largo de la reacción.

La energía libre de activación para la reacción calculada al nivel B3LYP/6-31+G(d,p)-PCM fue de 23.8 kcal/mol , por lo que la metodología elegida estaría logrando dentro del error del método reproducir la información experimental y modelada con métodos más exactos y costosos reportados en la **Tabla 2**. El proceso es descrito como endergónico con un valor de $\Delta_rG = 9.5\text{ kcal/mol}$, también consistente con lo reportado por Qian [14].

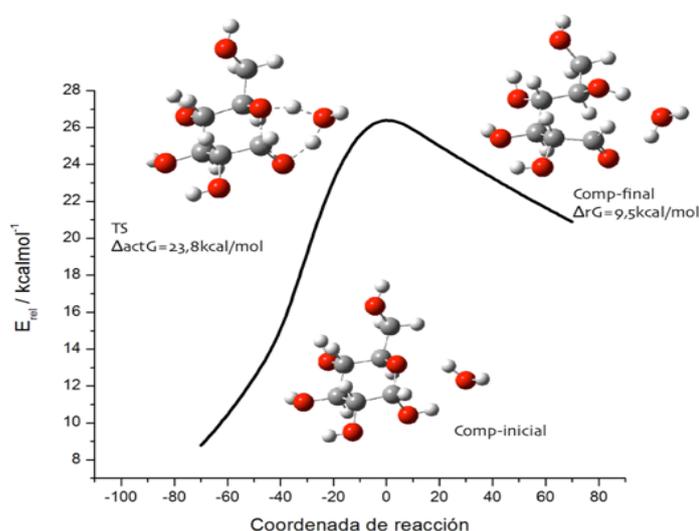


Figura 19. Perfil de Energía electrónica DFT-PCM correspondiente al IRC para la apertura de α -D-glucopiranososa. Se incluyen los valores de energías libre de activación y reacción a 298K y 1 atm

El avance de la reacción determinado con órdenes de enlace de Wiberg para la ruptura y formación de enlaces se puede apreciar en los resultados presentes en la **Tabla 4**. Teniendo en cuenta que los valores teóricos para los órdenes de enlace de C-O, C=O, O-H y entre cada para protón-O aceptor de EdH son respectivamente de ~ 1 , ~ 2 , ~ 0.7 y $\sim [0.03-0.07]$ es notable que en el TS todos los enlaces que se reorganizan durante la reacción estarían a medio camino entre reactivos y productos (lo cual no necesariamente ocurre en todos los procesos). En base a estos resultados se puede inferir que la reacción ocurre de manera concertada.

Tabla 4. Orden de enlace de Wiberg como indicador del avance de reacción.

ORDENES DE ENLACE DE WIBERG (U.A.)			
ENLACE	IC	TS	FC
C1-O1	0.89	1.23	1.77
O1-H_{O1H}	0.65	0.22	0.03
H_{O1H}-O_{AGUA}	0.05	0.46	0.68
O_{AGUA}-H_{AGUA}	0.69	0.34	0.06
O5-H_{AGUA}	0.03	0.34	0.63
C1-O5	0.95	0.61	0.07

En síntesis, la combinación B3LYP/6-31G(d,p)-PCM aquí empleada logra reproducir muy satisfactoriamente las características conocidas de esta reacción, mostrando que la metodología seleccionada resulta confiable para estudiar los aspectos estructurales y energéticos de la apertura catalizada de glucopiranosas en solución.

5.2 Estructura y dinámica en solución de HSA, complejos 1:1 HSA-Glucosa, modificaciones en Lys195

El estudio de la dinámica en solución del sistema 4.4A (correspondiente a HSA libre) abordado como paso previo para estudiar la reactividad de residuos Lys de HSA como nucleófilo (ver **sección 5.3**) mostró que la estructura converge a los 15 ns de simulación (RMSD de backbone mínimo en **Figura S2**).

Los complejos 1:1 formados por HSA con α -D-glucopiranosas (sistema 4.4B) o con D-glucosa (sistema 4.4C) son de vida muy corta, tras solvatare completamente la molécula de azúcar escapa del sitio Sudlow I. La permanencia en el sitio fue evaluada en base a distancias clave para el mecanismo propuesto por *Wang et al* [19] definidas entre átomos de la proteína (N ϵ -Lys195/199) y de cada forma de la glucosa (C1/O1/O5) tal como se muestra en la **Figura 19**.

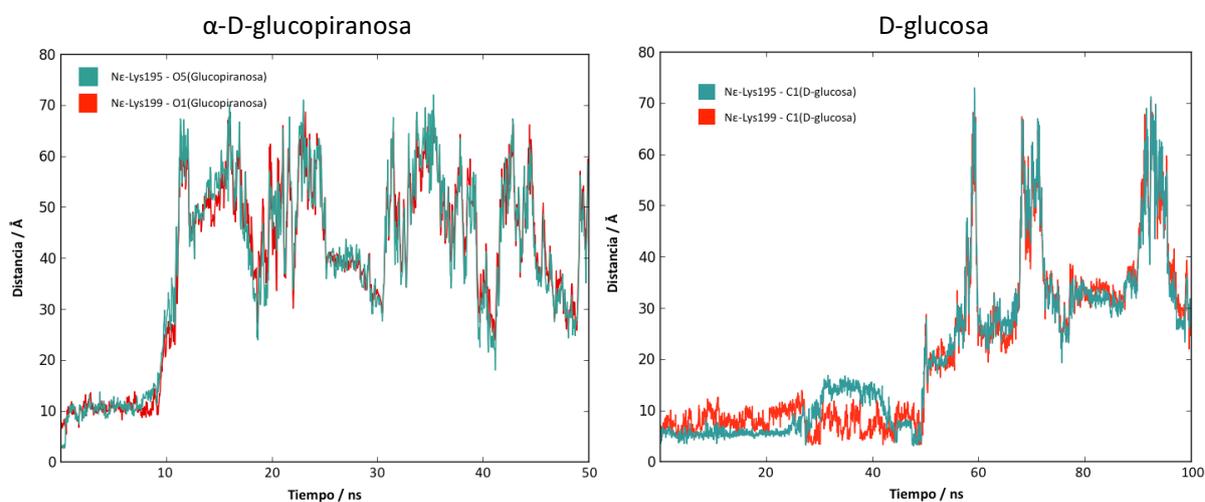


Figura 19. Distancias atómicas utilizadas para estudiar la permanencia de α -D-glucopiranosas y D-glucosa en el sitio Sudlow I de la HSA.

La glucopiranososa permanece a 10 Å del residuo Lys195 en los primeros 10 ns de simulación y luego se distancia de la proteína, perdiéndose por completo todas las interacciones con residuos del sitio Sudlow I. Por otro lado, la D-glucosa permanece en dicho sitio por un periodo de tiempo más prolongado, del orden de 50 ns. En ambos casos se observa que el carbono C1 se acerca considerablemente a los Nε-Lys, siendo esto indispensable para que se dé la adición nucleofílica y empiece el proceso de glicación. Una hipótesis que podría explicar porqué ninguno de los dos complejos de glucosa con HSA tiene larga vida es que las interacciones con el solvente, agua en particular, son mucho más favorables tratándose de moléculas pequeñas e hidrofílicas. Sin embargo como se mencionó en la **sección 2.6**, existe evidencia experimental de que la reacción ocurre y se forma o bien una BS o bien un PA sobre Lys195 por lo tanto tiene que haber un acercamiento productivo para la reacción más allá de que su probabilidad se baja. Para poder estudiar esa reacción con técnicas de simulación se requiere una descripción QM/MM en la dinámica que no fue empleada en esta tesina.

En cuanto a la estructura de la carbinolamina HSA-GCA (sistema 4.4D) la misma logra estabilizarse a los 10 ns (RMSD de backbone mínimo en la **Figura S3**). Inspeccionando el entorno de la carbinolamina a lo largo de la simulación, se encontró que la misma establece un EdH con Lys436 durante un periodo prolongado de la simulación (ver distancias representativas en la **Figura 20**). Esta observación resultó de particular utilidad para plantear una hipótesis mecánica donde Lys436 podría asistir la deshidratación de la carbinolamina actuando como ácido de Brønsted, posibilidad exclusiva para el aducto formado por la glucosa sobre Lys195. Como resultado de esta reacción se formaría una BS protonada. En busca de un residuo básico que pudiera capturar el protón de la BS sobre Lys195 asistiendo su formación en un solo paso, se halló que si bien Glu188 se encuentra a 7 Å forma un puente salino con otro residuo Arg160 durante toda la simulación, por lo que no es de esperar que pueda cumplir ese rol.

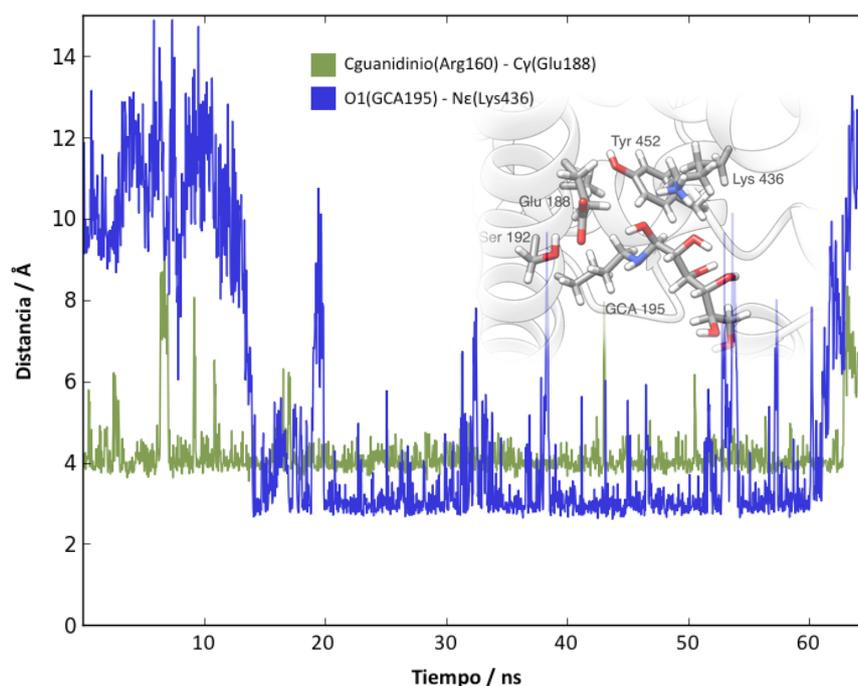


Figura 20. Distancias atómicas usadas para analizar el entorno de la carbinolamina en Lys195 de HSA. En el inserto se muestra una imagen de la estructura representativa del cluster más poblado.

5.3 Nucleofilia de lisinas relevantes de HSA: su dureza a nivel QM/MM

En la **Figura 21** se muestra el entorno de cada lisina (195/199/525) en la estructura representativa de HSA libre en solución obtenida por MD. Es notable la diferencia en accesibilidad al solvente que resulta al comparar una poco accesible Lys199 con Lys195 y Lys525 que tienen una mayor cantidad de moléculas de agua a su alrededor. En la medida que la exposición al solvente afecta las propiedades fisicoquímicas de cada uno de estos residuos, esta observación da base para explicar las diferencias en su reactividad como nucleófilos.

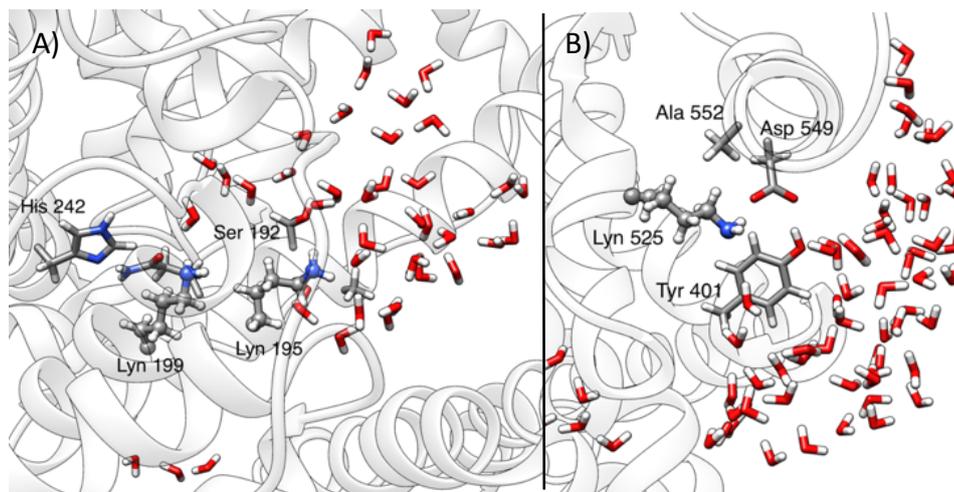


Figura 21. A) Sitio Sudlow I y B) Región de Lys525. Se muestran átomos a 10 Å de N ϵ -Lys195 y N ϵ -Lys525. Estos fueron los sistemas utilizados para hacer los cálculos single-point ONIOM (se mantuvieron en el sistema las moléculas de agua evidenciadas).

En la **Tabla 5** se muestran los resultados obtenidos para la energía HOMO-KS correspondiente a cada residuo obtenidos al nivel ONIOM QM:MM junto a la estimación de su pKa obtenido con H $^{++}$. El orden de reactividad como nucleófilo que surge de estos valores es el siguiente: Lys525>Lys195>Lys199. En base a las predicciones de pKa Lys199 es la lisina más ácida de las tres por lo que en su caso la fracción de la forma desprotonada será mucho mayor, en cambio para las otras lisinas poseerían un pKa elevado y por lo tanto una mayor disponibilidad (la predicción de $pK_a > 12$ no permite hacer más aseveraciones).

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas empleadas para el análisis de nucleofilia.

RESIDUO	E _{HOMO REL*} (eV)	pKa
Lys195	3.6	>12
Lys199	0	6.9
Lys525	7.4	>12

** Energías ONIOM del orbital HOMO-KS relativas al valor obtenido para Lys199*

5.4 Propuesta de un mecanismo para la apertura de glucopiranososa en HSA

Como ya se anticipó en la **sección 4.5** de la metodología, para entender el efecto del entorno de la proteína sobre el proceso de apertura de la glucopiranososa y construir un modelo reducido capaz de incorporar los aspectos esenciales de dichos efectos, se inspeccionó la arquitectura del sitio de Sudlow I en HSA libre y modificada a BS en Lys195 de las que se dispone estructura cristalográfica complementando el análisis con la estructura modelada del complejo con glucopiranososa. Junto a los residuos Lys195/199, a los que se asignan roles esenciales en la propuesta mecanística de *Wang et al* [19], se identificó a los residuos Arg222, Ala291 (backbone) y Glu292 como participantes en la red de EdH que cambia su naturaleza a lo largo del proceso de apertura y glicación (ver **Figura 22**).

A su vez no se observan cambios significativos en la distribución de carga atómica NPA de los átomos centrales para estos procesos (C1 y O1 en glucopiranososa y Nε en Lys195/199). Estos resultados se aprecian en la **Figura S3** de la información suplementaria.

Un aspecto interesante en la estructura obtenida por minimización para el complejo HSA-glucopiranososa, es que ésta queda posicionada en el sitio de Sudlow I en forma ideal para que Lys195/199 puedan asistir catalíticamente su proceso de apertura en forma análoga al rol catalítico que cumple la molécula de agua en solución (**sección 5.1**). En la Figura 22B se aprecia como Lys195 establece EdH como dadora frente a O5 y Lys199 desprotonada lo hace como aceptora frente a O1H. Al comparar las **Figuras 22 A y B** se observa que el residuo Glu292 que originalmente establece un puente salino con Lys195 cerrando el acceso al sitio, se desplaza significativamente alejándose al incorporarse la molécula de glucopiranososa. Al mismo tiempo esta última establece una nueva red de EdH que involucra por un lado a los grupos amino y guanidinio de Lys199 y Arg222 como dadores frente a O2 y O6 y por otro al grupo carbonilo de Ala291 como aceptor frente al grupo hidroxilo O4H. Esto indicaría que esta red no solo tendría un rol fundamental en la arquitectura del sitio tras el ingreso de la glucopiranososa, sino que podría promover su apertura.

Es importante tener en cuenta que estos estudios de red de EdH en el sitio de Sudlow I son preliminares, en tanto no se utilizaron estructuras representativas en solución sino las estructuras resultantes de solvatar y minimizar clásicamente las provientes de cristalografías. No obstante lo anterior, los resultados de esta exploración permitieron proponer un mecanismo alternativo para la apertura catalizada por HSA de glucopiranososa, ya mostrado en la **sección 4.5**, con participación de los residuos Lys195 y Lyn199 cuyos estados de protonación son compatibles con los valores de pKa obtenidos en la **sección 5.3**, lo que no ocurre en el mecanismo inicialmente propuesto por *Wang et al*.

Respecto a la estructura de la BS que se aprecia en la **Figura 22C**, se destaca que se mantiene la interacción Arg222-O4H y que se establecen nuevos EdH entre O5 y Lys199, que ahora se encuentra protonada. Otro elemento a señalar es que en tanto la carbinolamina caracterizada en solución (ver **Figura 20**, **sección 5.2**) se encuentra desplegada en forma casi lineal en la BS resultante de su deshidratación el fragmento correspondiente a la glucosa aparece plegado sobre sí mismo como tendiendo hacia el isómero cíclico correspondiente.

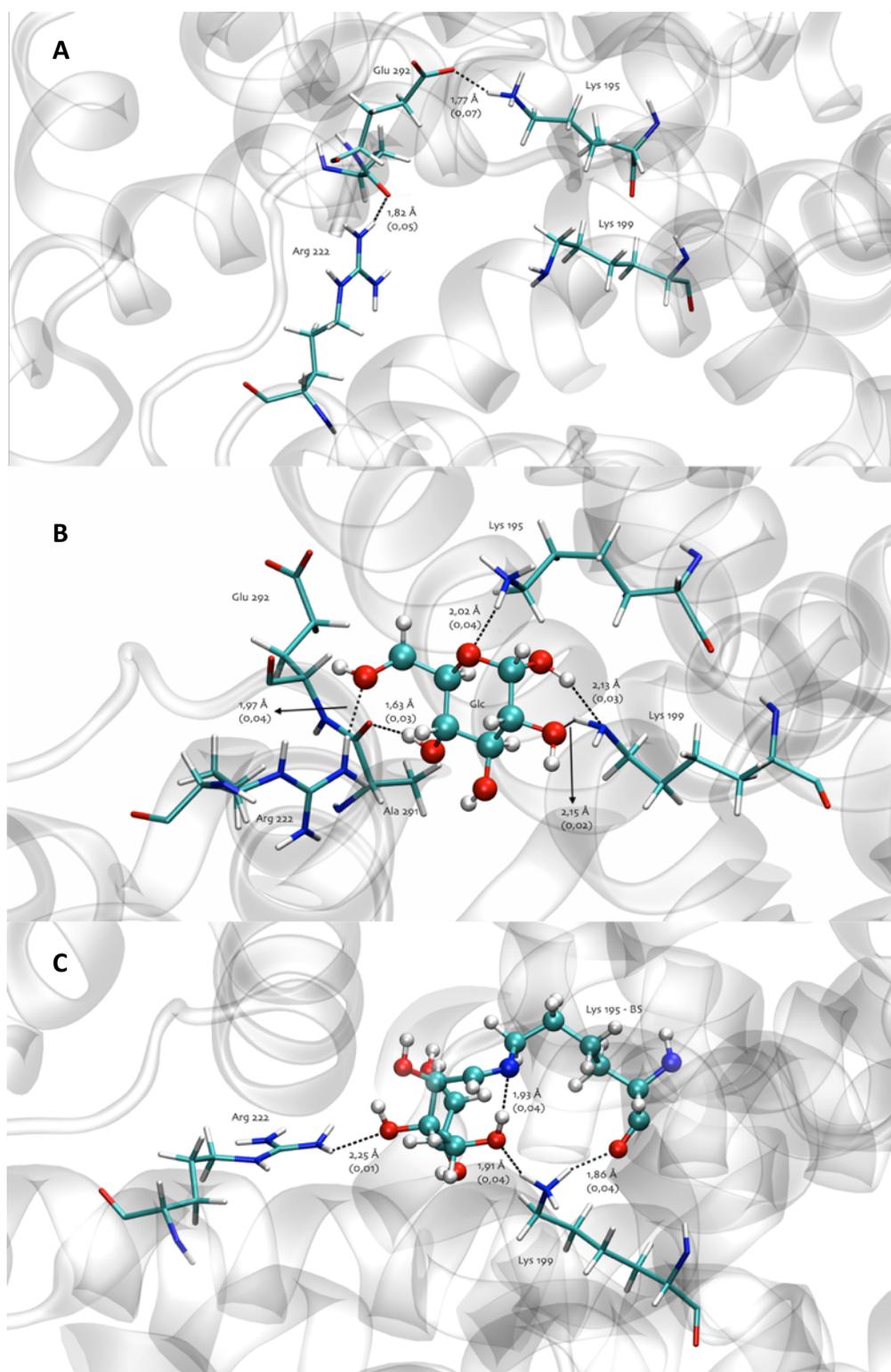


Figura 22. Análisis de la red de EdH en el sitio Sudlow I en estructuras minimizadas clásicamente. En cada caso se muestran los residuos que establecen interacciones relevantes para la red indicando distancias y ordenes de enlace en u.a. A, B y C corresponden a HSA libre, HSA-Glucopiranososa y HSA-BS.

Siguiendo con la hipótesis mecanística planteada, ya en el marco de los modelos reducidos, se modelizó la apertura catalizada por Lys195/199 de HSA según se indicó en la **sección 4.5**. Se localizó un estado de transición para este proceso cuya estructura se aprecia en la **Figura 23** la cual muestra que mientras los procesos de ruptura C1-O5 y protonación de O5 están en curso, la transferencia protónica entre O1 y MeNH₂ ya concluyó. El mismo fue obtenido tomando como base la estructura del TS correspondiente al mecanismo catalizado por agua localizado al mismo nivel de cálculo e incorporando la información proveniente del análisis de la estructura del complejo HSA-glucopiranososa. El IRC correspondiente es mostrado en la **Figura 24**, que detalla los perfiles de energía y RMS del gradiente. El primero presenta un hombro atípico (coordenada de reacción -100) que se asocia con un crecimiento del RMS del gradiente que sugiere la posibilidad de un mecanismo de reacción por pasos. A pesar de haber realizado numerosos intentos, no fue posible localizar otro punto de ensilladura para la reacción previa de transferencia de protón del grupo O1H a MeNH₂ en la región cercana a ese hombro.

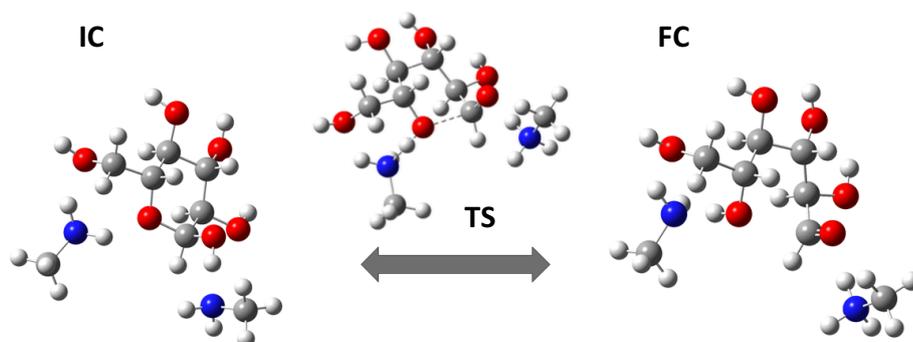


Figura 23. Estructuras optimizadas y verificadas de IC, TS y FC para la reacción de apertura de glucopiranososa catalizada por el par metilamina/metilamonio.

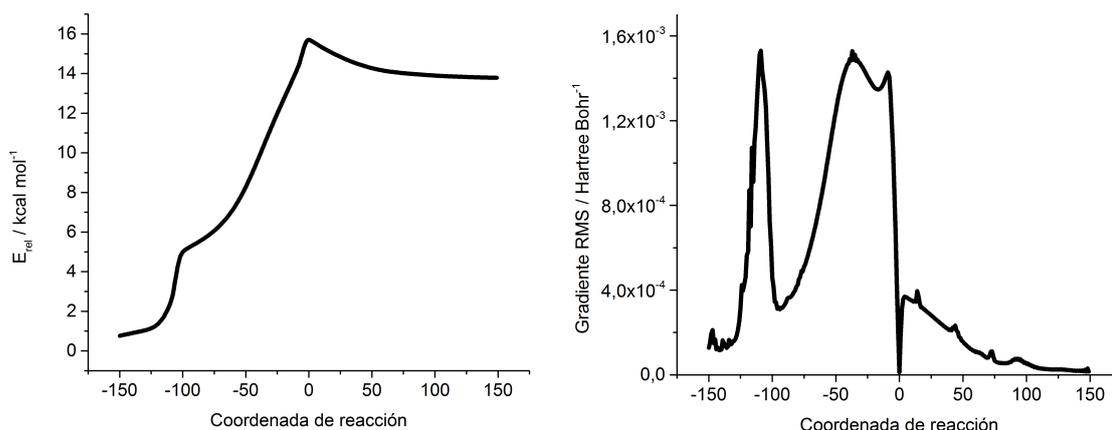


Figura 24. Perfiles de energía potencial (izquierda) y RMS del gradiente (derecha) obtenidos al nivel B3LYP/6-31+G(d,p)-PCM para la reacción de apertura modelizada. El 0 de la coordenada de reacción corresponde al TS, los valores negativos y positivos corresponden al progreso hacia reactivos y productos.

Con el fin de explorar más exhaustivamente la PES de esta reacción se realizaron barridos en dos dimensiones siguiendo el procedimiento explicado en la **sección 4.5**. La superficie obtenida se muestra en las **Figuras 25 A y B**. En ambas se observa la posición de los pozos de energía potencial correspondientes a los complejos intermediarios inicial (IC, donde los procesos de transferencia protónica $O1H \rightarrow MeNH_2$ y $MeNH_3^+ \rightarrow O5$ aún no empiezan) y final (FC, donde ambas transferencias protónicas, la ruptura de C1-O5 y formación de C=O están completas) cuyas estructuras se muestran en la **Figura 23**. La localización del TS en la PES coincide con una región del canal que conecta reactivos con productos. De esta forma se confirma que esta reacción posee un solo TS y transcurre de manera concertada. Esto significa que la reacción empezaría con la primera transferencia protónica, para formar un producto inestable desprotonado, y que se acopla con la ruptura del enlace C1-O5 y la segunda transferencia protónica.

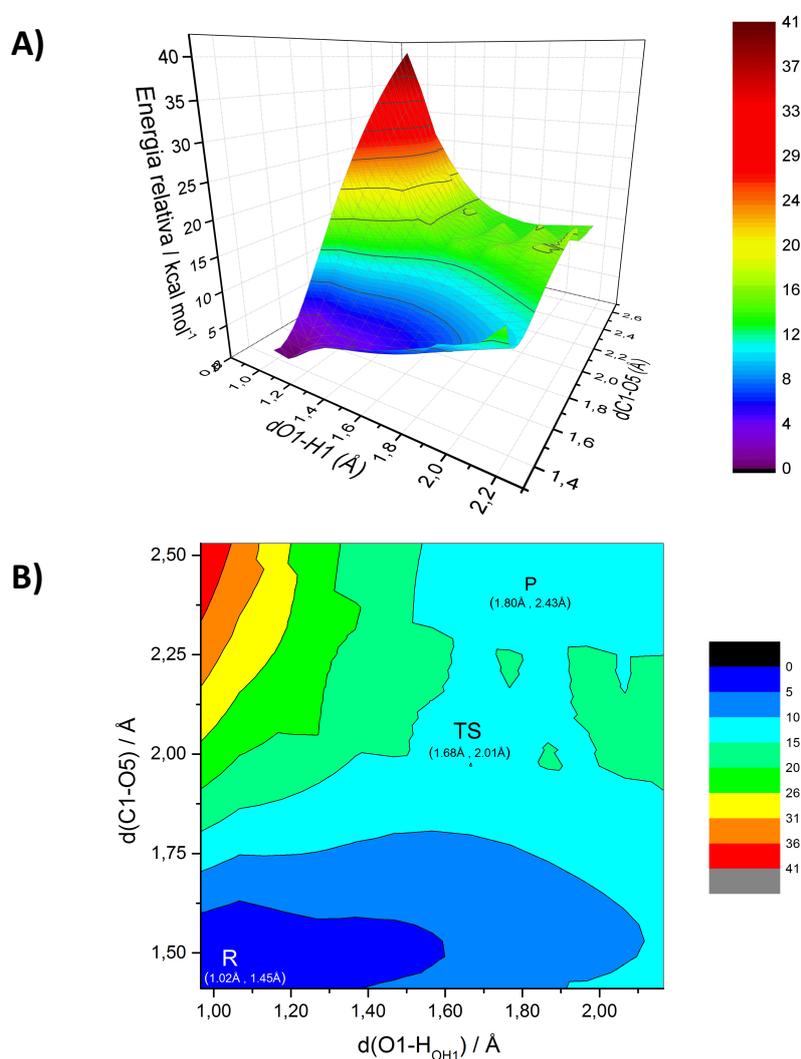


Figura 25. Superficie de Energía potencial o PES para la apertura de glucopiranos catalizada por dos aminas. A) Representación 3D y B) proyección sobre el plano de la superficie con puntos estacionarios ubicados sobre la misma (usando las distancias de estructuras optimizadas y verificadas)

Finalmente una vez conocidos los puntos estacionarios correspondientes a esta reacción, fue posible determinar su termoquímica.

En la **Tabla 6** se muestran los parámetros termodinámicos calculados al nivel B3LYP/6-31+G(d,p)-PCM. La formación del complejo intermediario IC representa un costo de $17.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ en términos de energía libre como resultado de una componente entrópica muy desfavorable que no llega a ser compensada por la entalpía de formación del mismo complejo.

Tabla 6. Energética relativa (kcal mol^{-1}) para la reacción de apertura de glucopiranososa catalizada por el par $\text{MeNH}_2/\text{MeNH}_3^+$ a 298 K y 1 atm.

	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG
Rs - IC	-4.7	21.7	17.0
IC - TS	12.0	0.1	12.1
IC - FC	12.6	-2.4	10.2

Por su parte, la energía libre de activación de esta reacción asciende a $\Delta_{act}G = 29.1 \text{ kcal mol}^{-1}$, lo que significa que la misma sería más lenta que su contraparte catalizada por agua. Sin embargo, dado que en la proteína el proceso reactivo involucra la formación de un complejo binario (los grupos amino de Lys195/199 están ambos incorporados a la proteína), sería razonable pensar que el costo entrópico no sería tan elevado en esas condiciones respecto a lo que ocurre en el modelo reducido donde se forma un complejo ternario. A su vez estos hallazgos son consistentes con la vida corta de los complejos 1:1 HSA-glucosa. Una vez formado IC su transformación a TS es controlada por la variación de entalpía, siendo el efecto entrópico prácticamente despreciable. Una vez más el proceso resulta ser endergónico con un $\Delta_r G = 27.2 \text{ kcal mol}^{-1}$. En base a estos resultados y extrapolando las diferencias en efectos entrópicos esperables para un sistema binario frente a uno ternario, la apertura de glucopiranososa catalizada por Lys195/199 en HSA podría ser cinéticamente posible.

5.5 Mecanismo de las primeras etapas de glicación en Lys por D-glucosa

5.5.1 Adición nucleofílica de EtNH_2 sobre D-glucosa

Para conectar la apertura de glucopiranososa con la formación de la BS en Lys195, se exploró un modelo reducido mínimo consistente en la adición directa de EtNH_2 sobre la primera. En la **Figura 26** se muestran los perfiles de energía y RMS del gradiente obtenidos por cálculo del IRC a partir del TS localizado, correspondiendo a los esperados para una reacción concertada en una sola etapa.

La energía libre de activación del proceso directo no catalizado es de $40.1 \text{ kcal mol}^{-1}$, lo que indicaría la necesidad de catálisis por otros residuos de la proteína y/o moléculas de agua presentes en el sitio de Sudlow I para que sea consistente con la evidencia experimental, que apunta a un proceso con barrera mucho más baja en el orden de las 22 kcal mol^{-1} [101]. En otra tesina de graduación de la Licenciatura en Bioquímica

previamente desarrollada en el mismo laboratorio [102], se encontró que la barrera para el proceso de adición directa de Lys sobre D-ribosa es el del orden de 30 kcal mol^{-1} ,

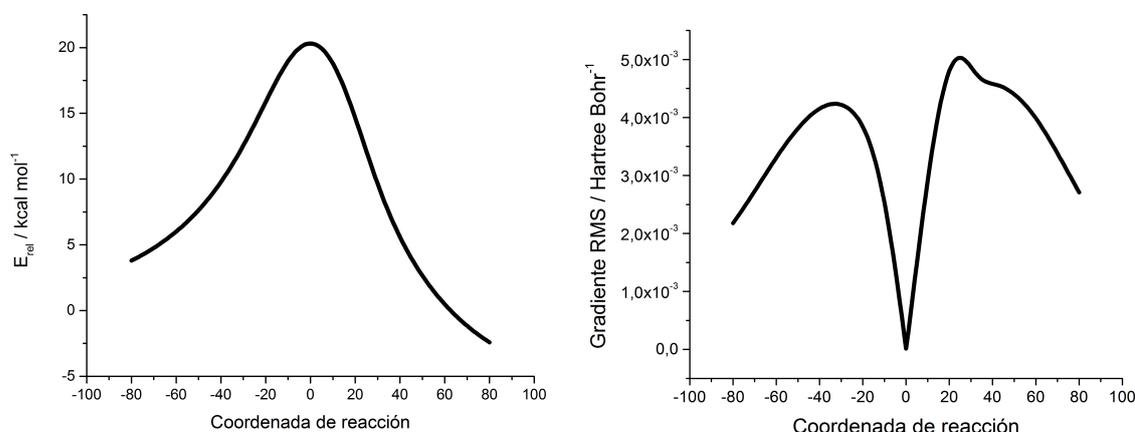


Figura 26. Adición nucleofílica de etilamina sobre glucosa: perfiles de energía electrónica (izquierda) y RMS del gradiente (derecha) a lo largo del IRC B3LYP/6-31+G(d,p)-PCM.

reflejando la mayor reactividad de la ribosa respecto a la glucosa.

Para explorar el efecto de la polaridad del entorno, se estudió esta misma reacción en fase gaseosa. La energía libre de activación en estas condiciones disminuye a $\Delta_{act}G = 33.3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Esto significa que un entorno polar vuelve la reacción más lenta, en consistencia nuevamente con la barrera menor propuesta para el proceso en la proteína que podría ser el resultado combinado de un entorno menos polar y la participación activa de otros residuos y/o moléculas de agua (que nuestras simulaciones mostraron están presentes en el sitio de Sudlow I).

De profundizar en el estudio del mecanismo de esta etapa (algo que va más allá de los límites temporales previstos para el desarrollo de esta tesina), el siguiente paso natural sería explorar modelos reducidos con la participación activa de una o más moléculas de agua en un medio de menor polaridad que la correspondiente a la de la solución acuosa.

5.5.2 Deshidratación de carbinolamina asistida por MeNH_3^+

A partir de los resultados de la simulación de HSA-GCA (sistema 4.4D, **sección 5.3**) se propuso un mecanismo (ver **sección 4.6**) para caracterizar la etapa de deshidratación de la carbinolamina a BS incorporando al modelo un residuo de Lys436 (representado por MeNH_3^+) que podría asistir el proceso como ácido de Brønsted y 3 moléculas de agua con papel estructural, estabilizante. Este estudio fue iniciado a nivel B3LYP/6-31+G(d,p)-PCM y ante la imposibilidad para caracterizar el TS correspondiente se cambió el funcional DFT a $\omega\text{B97X-D}$, lográndose completar la caracterización del mecanismo a este nivel.

Las estructuras de IC, TS y FC optimizadas al nivel $\omega\text{B97X-D}/6-31\text{G(d,p)-PCM}$ se muestran en la **Figura 27**. Se aprecia en ellas que las 3 moléculas de agua explícita incluidas en el modelo no participan del proceso reactivo, sino que estabilizan a los grupos reaccionantes.

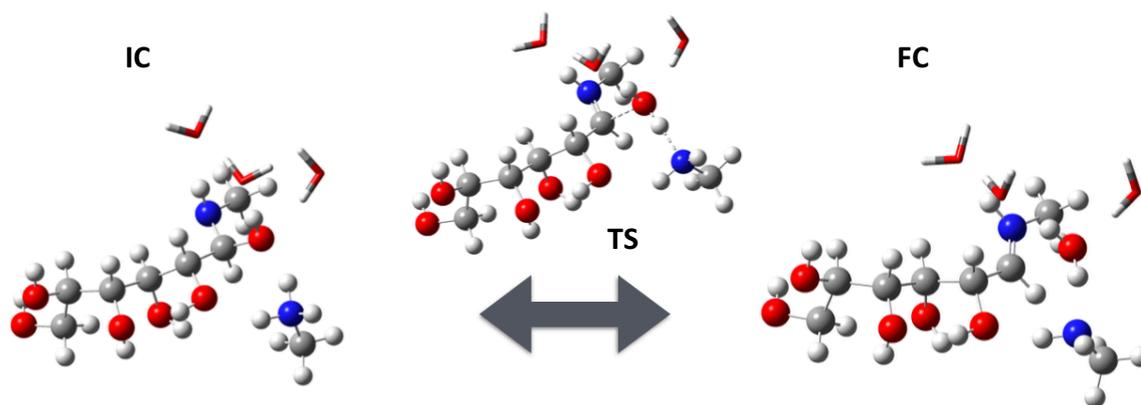


Figura 27. Estructuras de IC, TS y FC al nivel ω B97X-D/6-31G(d,p)-PCM para la reacción de deshidratación. Las moléculas de agua con rol estructural se destacan en diferente representación.

En la **Figura 28** se muestran los perfiles de energía electrónica y RMS del gradiente obtenidos para esta reacción a lo largo del camino IRC. Su asimetría refleja la formación de un producto poco estabilizado respecto a la carbinolamina en términos de energía electrónica, resultado que se atribuye a la formación de una BS protonada, que podría estabilizarse a posteriori por interacciones con su entorno.

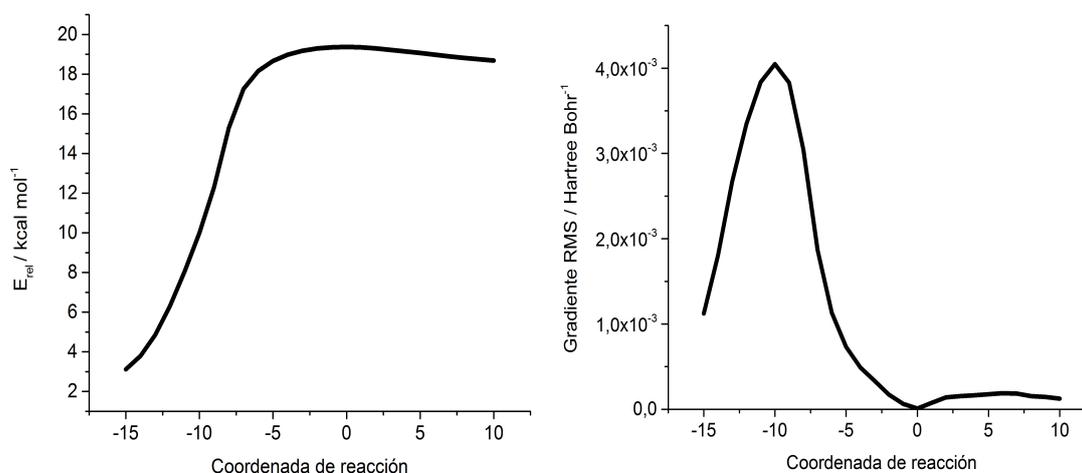


Figura 28. Deshidratación de carbinolamina a BS: perfiles de energía electrónica ω B97X-D/6-31G(d,p)-PCM de la reacción (izquierda) y de RMS del gradiente (derecha).

En cuanto a la termoquímica, como se aprecia en la Tabla 7, el modelo reducido de reacción en solución es ligeramente exotérmico, pero sumamente endoérgico con $\Delta_r G = 33.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $\Delta_{act} G = 36.2 \text{ kcal mol}^{-1}$. Esta situación resulta del peso que tiene la componente entrópica desfavorable asociada a la formación de un IC de 5 componentes, que supera ampliamente la estabilización lograda en términos de entalpía, y no es estable en términos de energía libre. Por lo tanto este mecanismo planteado para la deshidratación de la carbinolamina no se presenta como una alternativa viable en solución acuosa, donde requeriría de otra forma de asistencia, probablemente por moléculas de agua participando

activamente en el proceso, como se ha reportado en el modelado de este tipo de procesos en solución acuosa.

Tabla 7. Energética ω B97X-D/6-31G(d)-PCM relativa para la deshidratación de carbinolamina asistida por MeNH_3^+ y $3\text{H}_2\text{O}$ 298 K y 1 atm (en kcal mol^{-1}).

	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG
Rs-IC*	-21.7	42.6	20.9
Rs-TS*	-6.0	42.2	36.2
Rs-FC*	-6.6	40.0	33.4
IC-TS**	15.7	-0.4	15.3
IC-FC**	15.1	-2.6	12.6

* Valores calculados respecto a la energética de los componentes iniciales sin interactuar

**Valores calculados respecto a la energética del complejo inicial IC

Por otra parte, en el entorno de la proteína este proceso de deshidratación de carbinolamina formada en Lys195 y asistido por Lys436 sería intramolecular y las moléculas de agua estabilizadoras se encuentran ya presentes y organizadas en el entorno de la carbinolamina desde el comienzo del proceso químico, tal como se apreció en la simulación MD de HSA-GCA previamente analizada. Todo ello permitiría hipotetizar que el costo entrópico asociado a la formación del complejo intermediario sería de mucha menor magnitud en estas condiciones. Con tales consideraciones a la vista, se podría llegar a asumir que los valores de energía libre de activación y reacción del modelo reducido en solución recalculados tomando como referencia la energía libre del IC ya formado ($15.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $12.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente) ofician como aproximaciones razonables y más cercanas a la energía de activación y reacción del proceso de deshidratación de la carbinolamina en Lys195 en el sitio de Sudlow I de HSA.

Así, en aproximación de orden cero, se podría considerar que la propuesta mecanística aquí planteada de proceso de deshidratación de HSA-GCB a BS asistida por Lys436 actuando como ácido de Brønsted, sería viable y tendría asociada una barrera de reacción relativamente baja, tratándose de un proceso reversible, en consistencia con la evidencia experimental conocida sobre las características de la glicación temprana por glucosa en HSA.

6 Conclusiones

Utilizando una metodología accesible en términos de costo computacional, como los cálculos DFT-PCM aplicados a modelos reducidos, es posible obtener información valiosa para estudiar mecanismos de reacción en solución y otros entornos. En concreto, aquí se muestra para la apertura de glucopiranososa en solución acuosa que al nivel B3LYP/6-31+G(d,p)-PCM es posible obtener estructuras y parámetros termodinámicos consistentes con los datos experimentales y comparables a los obtenidos con otras metodologías de costo computacional mucho más elevado. Esto permite a la vez extender su uso al estudio de mecanismos para el proceso de apertura glucopiranososa y glicación de HSA no explorados previamente usando sistemas reducidos.

Se estudió aquí por primera vez el comportamiento dinámico en solución de los complejos 1:1 de HSA con α -D-glucopiranososa y D-glucosa y la carbinolamina HSA-GCA. La vida media de los complejos en el sitio de Sudlow I resultó ser breve, del orden de 10ns para la glucopiranososa, siendo mayor para la mucho menos abundante forma acíclica de la glucosa que se posiciona mejor para reaccionar con Lys195. En la medida que estas simulaciones clásicas tienen la limitación de no contemplar eventos reactivos, no se cuenta con evidencia para elucidar si la D-glucosa que reacciona con Lys195 ingresa directamente en esa forma al sitio de Sudlow I o resulta de la apertura de la glucopiranososa catalizada por la proteína. El análisis del entorno de la carbinolamina en la simulación de HSA-GCA, permitió identificar a la Lys436 como un residuo capaz de facilitar la reacción de deshidratación.

La nucleofilia relativa de Lys195/199/525 se determinó en base a la energía de los orbitales HOMO-KS al nivel ONIOM QM:MM. El orden de nucleofilia sería Lys525>Lys195>Lys199. Esto coincide con los datos encontrados en la literatura que señalan a Lys525 como uno de los sitios principales de glicación con distintos agentes y bajo distintas condiciones, siendo consistente con la evidencia cristalográfica que Lys195 aparezca como más reactiva siendo el blanco confirmado de glicación por glucosa en el sitio de Sudlow I. Por otra parte la estimación de pK_a de estos residuos con el servidor H++ indica que la disponibilidad de la forma desprotonada sería mucho mayor para Lys199 ($pK_a = 6.9$) que en los otros dos casos, que exhiben valores mayores a 12 unidades de pK_a . Todo esto permitiría concluir que la reactividad intrínseca de cada Lys pesaría más que la disponibilidad de la especie nucleofílica en el equilibrio entre las formas protonada/deprotonada del residuo y que los estados de protonación en que se encuentran estos residuos en la proteína no serían consistentes con los manejados en el mecanismo de Wang *et al.*

El análisis de la red de EdH en el sitio Sudlow I para el complejo con glucopiranososa mostró que los residuos Lys195/199 pueden facilitar su apertura en tanto Lys199, Arg222 y Ala291 la mantienen bien posicionada para que el proceso de apertura tenga lugar *in situ*. Esta información no sería consistente con el mecanismo de apertura propuesto por Wang *et al.* y da por el contrario sustento a un mecanismo alternativo propuesto por primera vez en este trabajo que plantea que la apertura del anillo podría ser disparada por la protonación de O5 desde Lys195 concertada con la desprotonación de O1 por Lys199.

El estudio del mecanismo de apertura de la glucopiranososa catalizada por el par $\text{MeNH}_3^+/\text{MeNH}_2$ (par que emula a Lys195/Lys199 respectivamente) en solución acuosa permitió determinar que el proceso ocurriría a través de una primer transferencia

protónica desde O1H a MeNH₂ que conduce a un producto inestable que facilitado por la protonación en O5 da lugar a la ruptura de C1-O5. Este proceso resultó ser endergónico ($\Delta rG = 27.2 \text{ kcal mol}^{-1}$) en solución acuosa y con una barrera de $\Delta_{act}G = 29.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ atribuida principalmente al costo entrópico de formar un complejo inicial ternario. Comparado con la reacción catalizada por agua el par MeNH₃⁺/MeNH₂ es menos eficiente como catalizador. Pensando por otro lado en el proceso en la proteína, se plantea que el costo entrópico de la formación del complejo binario inicial para la apertura catalizada por HSA sería menor y por lo tanto la reacción podría llegar a ser viable en este contexto.

El modelo reducido de la reacción de adición de Lys195 sobre D-glucosa bajo el escenario de adición directa no catalizada en solución acuosa señala que la misma necesitaría de la asistencia de moléculas de agua y/o residuos proteicos capaces de disminuir una barrera de reacción que es en principio demasiado elevada. La comparación con el mismo proceso en fase gaseosa permitió concluir que un entorno polar desfavorece este proceso directo, pudiendo por tanto el entorno hidrofóbico del sitio de Sudlow I acelerarlo. No siendo este proceso el centro de estudio de esta tesina, no se exploraron aquí otras alternativas mecanísticas que incorporaran la participación de moléculas de agua explícitas (que los estudios de MD de los complejos de HSA-glucosa mostraron están presentes en el sitio de Sudlow I alrededor del complejo inicial con glucopiranososa y glucosa) y otros residuos facilitadores del proceso.

Por último, encontró evidencia estructural y mecanística que sugiere que la deshidratación de la carbinolamina formada en Lys195 podría ocurrir con asistencia de Lys436 y sería un proceso viable y reversible en el contexto de HSA. El producto así obtenido sería una BS protonada, que podría estabilizarse respecto a la carbinolamina perdiendo el protón o a través de interacciones electrostáticas con su entorno.

En resumen este trabajo de tesina de graduación representa un aporte significativo al conocimiento de las características de las etapas tempranas de la glicación de HSA por glucosa, proponiéndose en el mismo un mecanismo alternativo al planteado previamente para la apertura de la glucopiranososa en la proteína y llevando a plantear la posibilidad (a corroborar a posteriori con estudios de estos mismos procesos reactivos en la proteína usando métodos QM/MM que permitan incluir cabalmente efectos específicos y globales del entorno proteico en los modelos) que el paso limitante del proceso de formación de la BS observada en Lys195 (tomado desde el ingreso de glucopiranososa y su apertura) no sea la deshidratación de la carbinolamina correspondiente.

7 Glosario

Término	Significado
AGE	Producto de Glicación avanzada (por sus siglas en inglés, Advanced Glycation End product). Conjunto heterogéneo de productos de reacciones irreversibles de glicosilación en ausencia de catálisis enzimática. Este tipo de modificaciones en biomoléculas altera su función normal y su aparición se suele asociar con el envejecimiento y la diabetes.
AMBER	AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement). Suite de programas para simulación de dinámica molecular de biomoléculas. También puede referir al campo de fuerza desarrollado por Kollman et al.
BS	Base de Schiff. Compuesto orgánico de fórmula general $R_1R_2C=N-R_3$, donde R_3 es un grupo arilo o alquilo (se excluye H) que hace que la base de Schiff sea una imina estable.
CA	Carbinolamina. Aducto que se forma por ataque nucleofílico de una amina sobre un grupo carbonilo. Generalmente son intermediarios de vida media muy corta.
CD	Dicroísmo circular - técnica espectroscópica que mide la capacidad de las moléculas ópticamente activas de absorber diferencialmente la luz polarizada.
CD36	Proteína integral de membrana encontrada en la superficie de muchos tipos celulares en animales vertebrados.
cDNA	El ADN copia es una hebra de ADN de doble cadena una de las cuales constituye una secuencia totalmente complementaria del ARN mensajero a partir del cual se ha sintetizado. Se suele utilizar para la clonación de genes propios de células eucariotas en células procariontas, debido a que, dada la naturaleza de su síntesis, carece de intrones.
CPMD	Dinámica molecular de Car-Parrinello. Método de dinámica molecular ab initio QM(DFT)/MM implementado en el código CPMD que emplea ondas planas/pseudopotenciales.
CPMD-MTD	Combinación de CPMD con metadinámica. Los algoritmos para simulaciones de metadinámica logran explorar regiones más amplias de la superficie de energía libre, muestreo que se logra añadiendo gaussianas positivas a la superficie de energía real que fuerzan a explorar una región diferente.
DFT	Teoría del funcional de la densidad (por sus siglas en inglés, Density Functional Theory). Se basa en tres teoremas centrales: dos de Hohenberg & Kohn [103] (la energía es un funcional de la densidad electrónica y la densidad electrónica del estado fundamental es aquella que minimiza la energía del sistema, siendo por consiguiente variacional) y Kohn & Sham [104] (recurre a un sistema ficticio constituido por partículas no interactuantes que se pueden representar con un determinante cuyos elementos son funciones que representan a los electrones, orbitales de Kohn-Sham, de manera similar al determinante de Slater, aunque la formulación teórica sea distinta; para representar la interacción entre estas

	partículas, se introduce un potencial externo en el cuál estas estarán. moviéndose). Cabe destacar que a diferencia de lo que ocurre con el método de Hartree-Fock, la formulación teórica de DFT es exacta hasta la formulación de Kohn-Sham. Las aproximaciones se introducen al definir las componentes de intercambio y correlación del funcional de la densidad, que son desconocidas y se definen de distinta forma en cada funcional.
EdH	Enlace de Hidrogeno. Según la IUPAC consiste en una interacción atractiva 90% electrostática y 10% covalente establecida entre un átomo de hidrógeno de una molécula o fragmento molecular X-H, siendo X más electronegativo que H, y un átomo o grupo de átomos en la misma o en otra molécula.
FC	Complejo final (por su sigla en inglés, Final Complex). Se refiere al complejo que se forma al finalizar un proceso reactivo en forma previa a la separación de los productos y corresponde a un mínimo en la superficie de energía potencial. Se suele localizar minimizando la estructura que corresponde al extremo del IRC que supera el punto de inflexión hacia productos.
FPLC	Es un tipo de cromatografía líquida utilizada frecuentemente para el análisis y/o purificación de muestras que contienen múltiples proteínas.
gaff	General Amber Force Field. Es un campo de fuerza completo (todos los parámetros se encuentran disponibles, sin excepciones) de tipo general y cubre casi todo el espacio dentro de la química orgánica. Es compatible con el campo de fuerza AMBER y suele usarse para representar en los cálculos clásicos residuos y moléculas no presentes en el campo de fuerza AMBER estándar.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia. Es un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica.
HSA	Albúmina sérica humana (por sus siglas en inglés, Human Serum Albumin). Para más información ver sección 2.3 .
HSA-BS	Albúmina sérica humana cuyo residuo Lys195 se encuentra formando una Base de Schiff tras reaccionar con D-glucosa.
HSA-GCA	Albúmina sérica humana cuyo residuo Lys195 se encuentra formando una carbinolamina tras reaccionar con D-glucosa.
IC	Complejo inicial (por sus siglas en inglés, Initial Complex). Se refiere al complejo que se forma entre especies reactivas con la orientación adecuada para que pueda ocurrir el proceso reactivo. Corresponde a un mínimo en la superficie de energía potencial del sistema reaccionante y se suele obtener por minimización de la estructura que corresponde al extremo del IRC que supera el punto de inflexión hacia reactivos.
IDF	Federación Internacional de la Diabetes (por sus siglas en inglés, International Diabetes Federation). Es una organización que congrega más de 230 Asociaciones Nacionales contra la Diabetes en 170 países y territorios. Su misión es promover la prevención, los cuidados y la búsqueda de una cura para la diabetes a nivel global.
IEF-PCM	Método que modela los efectos del entorno sobre un soluto contenido en una cavidad como un continuo polarizable representado por su constante

	dieléctrica (uniforme o variable). En su implementación IEF se resuelve analíticamente y permite obtener derivadas primeras y segundas de la energía libre en solución. Utiliza una cavidad adaptada a la forma molecular.
IRC	Camino de reacción. Es un cálculo que permite determinar el camino de mayor pendiente que conecta el estado de transición de un proceso con reactivos y productos correspondientes, integrando sobre la coordenada de reacción intrínseca. Requiere el conocimiento de la estructura y Hessiano del estado de transición y emplea un algoritmo de integración para generar estructuras y energías que definen el camino de reacción en una o ambas direcciones desde el punto correspondiente al TS.
KS-HOMO	Orbital de Kohn-Sham ocupado de mayor energía. Cuando se localiza sobre el grupo químico de interés, su energía puede utilizarse como indicador de nucleofilia del mismo, comparando la estabilidad a lo largo de una serie análoga.
MD	Dinámica molecular atomística (por sus siglas en inglés, Molecular Dynamics). Técnica de simulación computacional que describe el comportamiento atómico de los sistemas moleculares a través de un campo de fuerza, resolviendo las ecuaciones de movimiento de Newton para el mismo bajo determinadas condiciones, permitiendo una visualización del movimiento de los átomos y moléculas que éstos componen.
MG	Metilglioxal. Es un compuesto orgánico de fórmula $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})\text{CHO}$. Se forma como producto secundario en muchas vías metabólicas. Interviene en la formación de AGEs, pudiendo provocar la pérdida de actividad de macromoléculas biológicas. Su concentración plasmática es más elevada en personas diabéticas.
MM	Mecánica molecular. Técnica de modelado molecular que usa la mecánica clásica para describir sistemas moleculares con detalle atómico. Con esta metodología, la energía potencial de los sistemas se calcula utilizando campos de fuerza que dependen de la posición relativa de los átomos y requieren parámetros por tipo de átomo. El átomo es considerado como la unidad estructural mínima y se le asigna radio, polarizabilidad y carga neta (constante o polarizable). Los enlaces se describen como resortes con distancias de equilibrio iguales a las distancias de enlace determinadas experimental o teóricamente y constantes de fuerza.
NBO	Natural Bond Orbital. En química cuántica se calculan en base a la densidad electrónica máxima. En química computacional se utilizan para determinar la distribución de la densidad electrónica sobre átomos o en los enlaces entre átomos.
OMS	La Organización Mundial de la Salud es la autoridad directiva y coordinadora en asuntos de sanidad internacional en el sistema de las Naciones Unidas.
ONIOM	Método de modelado computacional híbrido que divide al sistema molecular en regiones y las describe con una combinación de metodologías de distinto costo y exactitud, pudiendo combinar QM:QM o QM:MM. La

	energía se evalúa en forma sustractiva. En este trabajo se combinan métodos cuánticos (QM = DFT) para las regiones de interés de HSA y el resto de la misma se modela con métodos clásicos (MM).
PA	Producto de Amadori. Es un intermediario reactivo en la formación de un producto final de glicación avanzada (AGE), que corresponde a la isomerización de una BS formada previamente por trasposiciones internas.
DFT-PCM	Se refiere a la combinación de métodos cuánticos DFT con un modelo de continuo polarizable PCM para describir estructuras y energías en solución o distintos entornos polarizables.
PDB	Protein Data Bank. Es una base de datos de acceso libre que contiene estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos. Generalmente estas se obtienen mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear y se depositan en la misma.
PES	Superficie de energía potencial (por sus siglas en inglés, Potential Energy Surface). Tal como lo indica su nombre es una superficie que se construye graficando la energía potencial del sistema molecular en función de un conjunto de coordenadas del mismo representativas del comportamiento del sistema y sus transformaciones (que pueden o no implicar reacciones químicas). En este trabajo se construyeron realizando barridos relajados, donde la geometría se optimiza en todas las coordenadas excepto la que corresponde a la variable explorada.
PROPKA	Programa que se basa en una serie de reglas empíricas que relacionan la estructura proteica con el valor de pKa de los residuos ionizables y permite predecir el pKa de los residuos proteicos a partir de la estructura proporcionada en un archivo PDB.
QM	Mecánica Cuántica (por sus siglas en inglés, Quantum Mechanics). Describe el estado estacionario de un sistema a través de la Ecuación de Schrödinger cuya solución proporciona una función de onda que codifica la distribución de probabilidad de todas las propiedades medibles u observables. Algunos observables posibles sobre un sistema dado son la energía, posición, momento y momento angular. La mecánica cuántica no asigna valores definidos a los observables, sino que hace predicciones sobre sus distribuciones de probabilidad. Este tipo de método de modelado logra describir la estructura molecular con detalle electrónico, siendo esencial para entender y anticipar la reactividad molecular y las transformaciones electrónicas que subyacen a un proceso reactivo.
QM/MM	Enfoque que combina los puntos fuertes de QM (exactitud y detalle de estructura molecular a nivel atómico y electrónico) y MM (menor costo computacional y detalle de la estructura atómica en sistemas de gran tamaño). En los cálculos que emplean esta metodología el centro reactivo (en caso de estudiar reacciones químicas) es tratado de modo cuántico mientras que el entorno que lo rodea se trata de modo clásico.
RA	Rearreglo de Amadori o transposición de Amadori. Es una reacción orgánica que consiste en la isomerización en medio ácido (Transposición) de un N-glicósido de una aldosa a su correspondiente 1-amino-1-desoxicetosa.

RAGE	Receptor de AGEs. Proteína transmembrana de 35 kDa que pertenece a la súper familia de las inmunoglobulinas y es capaz de unir productos de glicación avanzada y otras moléculas relevantes fisiológicamente.
RCS	Grupo de moléculas que contienen carbonilos altamente reactivos (por sus siglas en inglés, Reactive Carbonyl Species).
RMS del gradiente de la energía	Desviación cuadrática media del gradiente de la energía molecular respecto a las coordenadas nucleares (por sus siglas en inglés, Root Mean Square gradient). El gradiente es la derivada primera de la energía respecto a las posiciones nucleares, representa el opuesto de las fuerzas sobre los núcleos en una configuración molecular particular. Se utiliza como criterio para verificar la convergencia en cálculos de optimización de la estructura dirigidos a caracterizar puntos estacionarios de una PES (da un indicio de la desviación de una estructura respecto a una previa) y permite también evaluar si un camino de reacción IRC corresponde a uno o más procesos reactivos.
RMSD estructural	Por sus siglas en inglés, Root Mean Square Deviation. En este caso se trata de las desviaciones cuadráticas media de las posiciones atómicas y se obtiene promediando las posiciones atómicas de moléculas superpuestas. Se lo emplea en simulaciones de dinámica molecular como indicador para el seguimiento de cambios estructurales a lo largo del tiempo de simulación .
Rs	Reactivos. En este trabajo utiliza para referirse a los reactivos separados infinitamente).
TS	Estado de transición (por sus siglas en inglés, Transition State) es una configuración particular a lo largo de la coordenada de reacción que se define como el estado que corresponde al máximo de energía a lo largo de la misma, siendo un mínimo en toda otra dirección de cambio del sistema molecular. Su estructura puede ser determinada buscando puntos de ensilladura de primer orden sobre la superficie de energía potencial.

8 Información Suplementaria

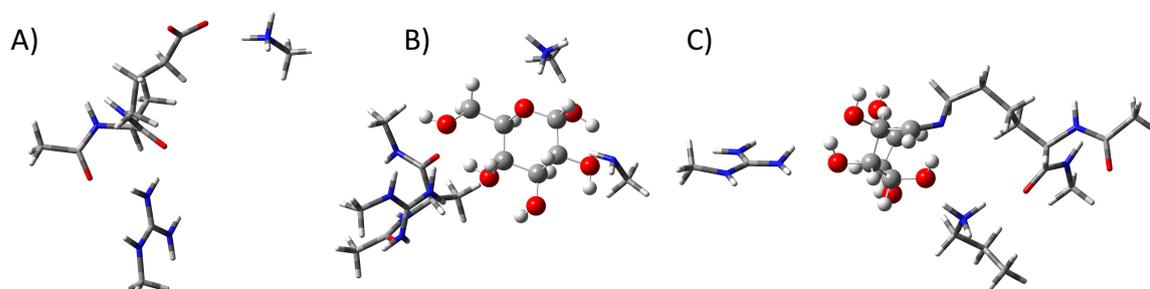


Figura S1. Recortes mínimos de los sistemas para estudiar la red de EdH en el sitio Sudlow I. Los sistemas 4.5A, 4.5B y 4.5C corresponden a HSA-libre, HSA-glucopiranososa y HSA-BS respectivamente. Recorte A: Lys195 (metilamonio), Arg222 (Guanidinio), Ala291 y Glu292 / Recorte B: Lys195 (metilamonio), Lys199 (metilamina), Arg222 (Guanidinio), Ala291, Glu292 (backbone) y glucopiranososa / Recorte C: BS195, 196 (backbone), Lys199 y Arg222 (guanidinio).

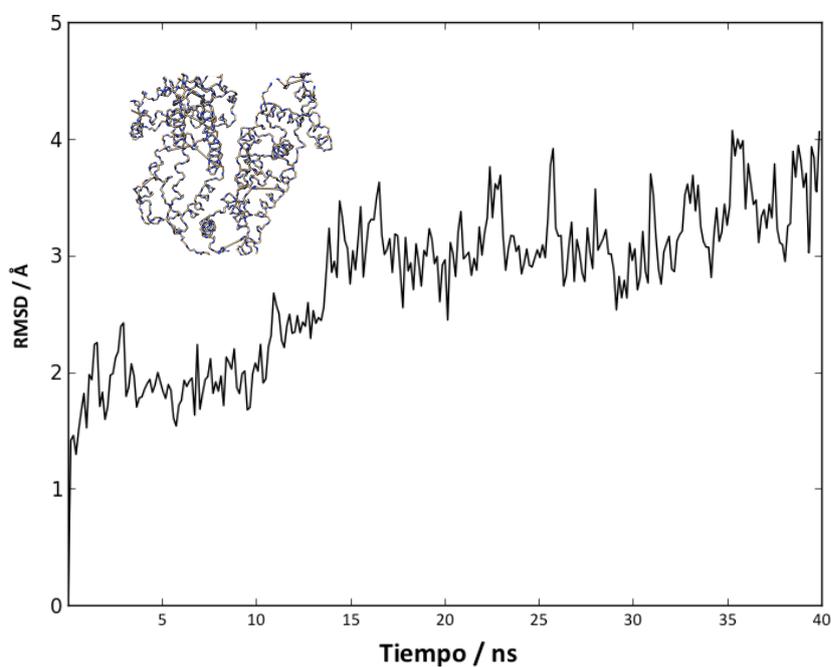


Figura S2. RMSD de backbone mínimo de HSA libre de ligandos (sistema 4.4A) en solución acuosa.

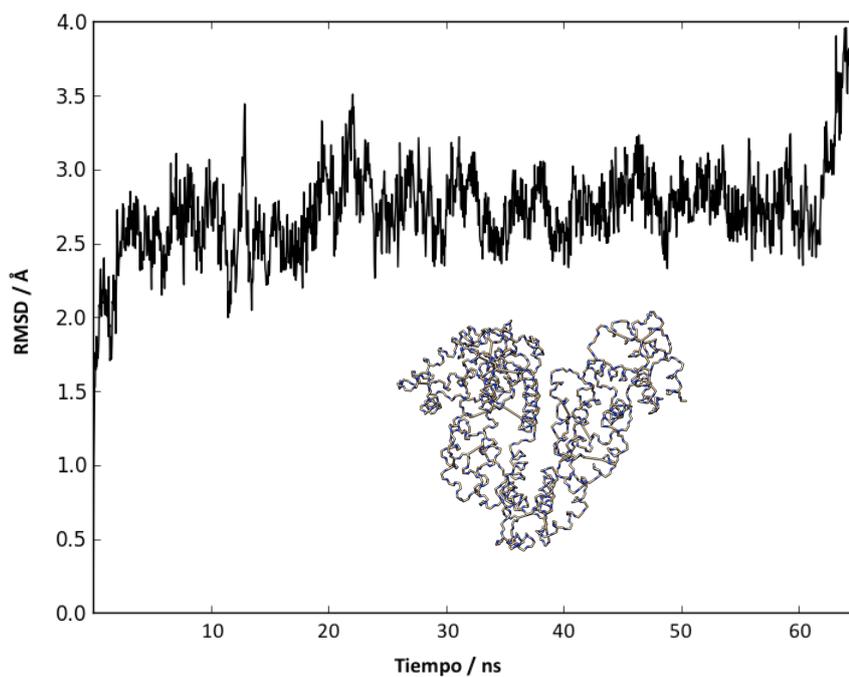


Figura S3. RMSD de backbone mínimo de HSA-GCA (sistema 4.4D) en solución acuosa.

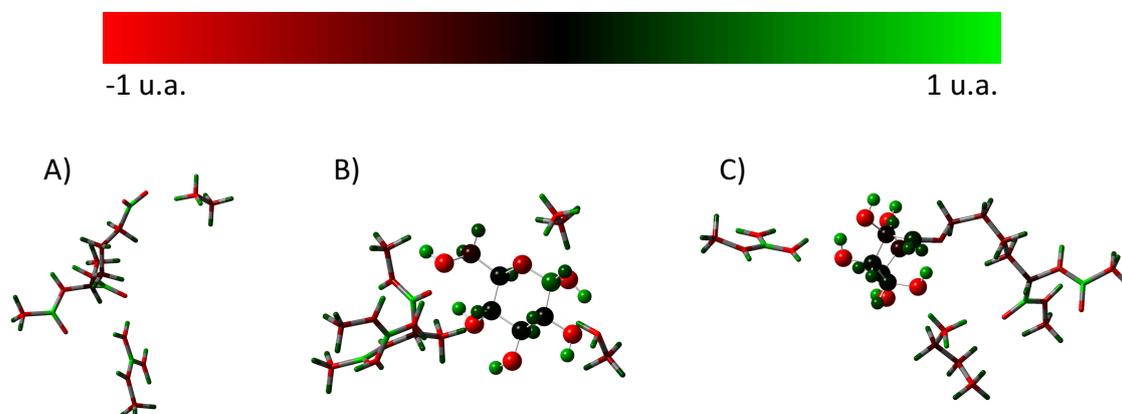


Figura S4. Representación de distribución de cargas DFT-PCM en los sistemas recortados. A, B y C corresponden a HSA libre (sistema 4.5A), HSA-glucopiranososa (sistema 4.5B) y HSA-BS (sistema 4.5C) respectivamente.

9 Referencias

- [1] M. Miljkovic, *Carbohydrates: Synthesis, Mechanisms, and Stereoelectronic Effects*. New York: Springer US, 2010.
- [2] M. Masoom and A. Townshend, "Determination of glucose in blood by flow injection analysis and an immobilized glucose oxidase column," *Anal. Chim. Acta*, vol. 166, pp. 111–118, 1984.
- [3] S. Karabulut and J. Leszczynski, "Anomeric and rotameric preferences of glucopyranose in vacuo, water and organic solvents," *J. Mol. Model.*, vol. 19, no. 9, pp. 3637–3645, 2013.
- [4] U. Schnupf, J. L. Willett, and F. Momany, "DFTMD studies of glucose and epimers: anomeric ratios, rotamer populations, and hydration energies," *Carbohydr. Res.*, vol. 345, no. 4, pp. 503–511, 2010.
- [5] J. C. Corchado, M. L. Sánchez, and M. A. Aguilar, "Theoretical study of the relative stability of rotational conformers of α and β -D-glucopyranose in gas phase and aqueous solution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 23, pp. 7311–7319, 2004.
- [6] J. N. Brønsted, "Acid and basic catalysis," *Chem. Rev.*, vol. 5, pp. 231–338, 1928.
- [7] T. M. Lowry and I. J. Faulkner, "CCCXCIX.-Studies of dynamic isomerism. Part XX. Amphoteric solvents as catalysts for the mutarotation of the sugars," *J. Chem. Soc. {,} Trans.*, vol. 127, no. 0, pp. 2883–2887, 1925.
- [8] T. M. Lowry, "CCCXL.-Studies of dynamic isomerism. Part XXV. The mechanism of catalysis by acids and bases," *J. Chem. Soc.*, no. 0, pp. 2554–2565, 1927.
- [9] K. Pedersen, "The Theory of Protolytic Reactions and Prototropic Isomerization.," *J. Phys. Chem.*, vol. 38, no. 5, pp. 581–600, 1933.
- [10] S. M. Cantor and Q. P. Peniston, "The Reduction of Aldoses at the Dropping Mercury Cathode: Estimation of the aldehydo Structure in Aqueous Solutions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 62, no. 8, pp. 2113–2121, 1940.
- [11] J. M. Los, L. B. Simpson, and K. Wiesner, "The Kinetics of Mutarotation of D-Glucose with Consideration of an Intermediate Free-aldehyde Form," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 78, no. 8, pp. 1564–1568, 1956.
- [12] K. Wiesner, "Polarographic investigation of the electroreduction of sugars," *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, vol. 12, pp. 64–70, 1947.
- [13] A. M. Silva, E. C. da Silva, and C. O. da Silva, "A theoretical study of glucose mutarotation in aqueous solution.," *Carbohydr. Res.*, vol. 341, no. 8, pp. 1029–40, 2006.
- [14] X. Qian, "Free energy surface for Brønsted acid-catalyzed glucose ring-opening in aqueous solution," *J. Phys. Chem. B*, vol. 117, no. 39, pp. 11460–11465, 2013.
- [15] M. Polanyi and H. Eyring, "Über einfache Gasreaktionen," *Z. Phys. Chem. B*, vol. 12, p. 279, 1931.
- [16] T. P. Jr., "5 - Metabolism: Albumin in the Body," in *All About Albumin*, T. Peters, Ed. San Diego: Academic Press, 1995, pp. 188–250.
- [17] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, and P. Ascenzi, "The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin.," *IUBMB Life*, vol. 57, no. 12, pp. 787–96, 2005.
- [18] P. Jr. Theodore, "2 - The Albumin Molecule: Its Structure and Chemical Properties," in *All About Albumin*, T. Peters, Ed. San Diego: Academic Press, 1995, pp. 9–75.
- [19] Y. Wang, H. Yu, X. Shi, Z. Luo, D. Lin, and M. Huang, "Structural mechanism of ring-opening reaction of glucose by human serum albumin," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 22, pp. 15980–15987, 2013.

- [20] Y. Akdogan, J. Reichenwallner, and D. Hinderberger, "Evidence for Water-Tuned Structural Differences in Proteins: An Approach Emphasizing Variations in Local Hydrophilicity," *PLoS One*, vol. 7, no. 9, 2012.
- [21] S. Datta, S. Panja, and M. Halder, "Detailed Scenario of the Acid–Base Behavior of Prototropic Molecules in the Subdomain-IIA Pocket of Serum Albumin: Results and Prospects in Drug Delivery," *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 42, pp. 12153–12167, 2014.
- [22] G. Sudlow, D. Birkett, and N. Wade, "The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum," *Mol. Pharmacol.*, vol. 11, no. 6, pp. 824–832, 1975.
- [23] P. Rondeau and E. Bourdon, "The glycation of albumin: Structural and functional impacts," *Biochimie*, vol. 93, no. 4, pp. 645–658, 2011.
- [24] M. Taverna, A.-L. Marie, J.-P. Mira, and B. Guidet, "Specific antioxidant properties of human serum albumin.," *Ann. Intensive Care*, vol. 3, no. 4, pp. 1–7, 2013.
- [25] L. C. Maillard, "Action des Acides Aminés sur les Sucres; Formation des Mélanoidines par Voie Méthodique," 1912.
- [26] E. D. Schielcher, R. Mayer, E. M. Wagner, and K.-D. Gerbitz, "Is Serum Fructosamine Assay Specific for Determination of Glycated Serum Protein?," *Clin. Chem.*, vol. 34, no. 2, pp. 320–323, 1988.
- [27] S. Ahmad, M. S. Khan, F. Akhter, M. S. Khan, A. Khan, J. M. Ashraf, R. P. Pandey, and U. Shahab, "Glycoxidation of biological macromolecules: A critical approach to halt the menace of glycation," *Glycobiology*, vol. 24, no. 11, pp. 979–990, 2014.
- [28] A. M. Schmidt, "Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 21, pp. 14987–14997, 1992.
- [29] M. Neeper, A. M. Schmidt, J. Brett, S. D. Yan, F. Wang, Y. C. Pan, K. Elliston, D. Stern, and A. Shaw, "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 21, pp. 14998–15004, 1992.
- [30] A. M. Schmidt, M. Hasu, D. Popov, J. H. Zhang, J. Chen, S. D. Yan, J. Brett, R. Cao, K. Kuwabara, and G. Costache, "Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 19, pp. 8807–11, 1994.
- [31] C. Lu, J. C. He, W. Cai, H. Liu, L. Zhu, and 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.*, vol. 101, no. 32, pp. 11767–11772, 2004.
- [32] C. G. Schalkwijk and T. Miyata, "Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: The search for therapeutics," *Amino Acids*, vol. 42, no. 4, pp. 1193–1204, 2012.
- [33] G. Danaei, M. M. Finucane, Y. Lu, G. M. Singh, M. J. Cowan, C. J. Paciorek, J. K. Lin, F. Farzadfar, Y. H. Khang, G. A. Stevens, M. Rao, M. K. Ali, L. M. Riley, C. A. Robinson, and M. Ezzati, "National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants," *Lancet*, vol. 378, no. 9785, pp. 31–40, 2011.
- [34] "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus," World Health Organization, Geneva, 1999.
- [35] R. Ferrero, "Encuesta de prevalencia de la diabetes en Uruguay: Primera fase Montevideo, Año 2004," *Arch. Med. Interna*, vol. 17, no. 1, pp. 7–12, 2005.
- [36] IDF Diabetes Atlas Group, "Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: Estimates for the year 2013," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 109, no. 3, pp. 461–465, 2015.

- [37] W. L. Henry, "Perspectives in diabetes.," *J. Natl. Med. Assoc.*, vol. 54, no. 1, pp. 476–478, 1962.
- [38] A. van Campenhout, C. M. van Campenhout, A. R. Lagrou, and B. Manuel-y-Keenoy, "Transferrin modifications and lipid peroxidation: implications in diabetes mellitus," *Free Radic Res*, vol. 37, no. 10, pp. 1069–1077, 2003.
- [39] International Diabetes Federation (IDF), "IDF Diabetes Atlas 7th edition," *idf.org*, 2015.
- [40] J. H. Kang, "Oxidative modification of human ceruloplasmin by methylglyoxal: an in vitro study.," *J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 39, no. 3, pp. 335–338, 2006.
- [41] K. S. Joseph, J. Anguizola, A. J. Jackson, and D. S. Hage, "Chromatographic analysis of acetohexamide binding to glycated human serum albumin," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 878, no. 28, pp. 2775–2781, 2010.
- [42] A. Barzegar, A. a Moosavi-Movahedi, N. Sattarahmady, M. a Hosseinpour-Faizi, M. Aminbakhsh, F. Ahmad, A. a Saboury, M. R. Ganjali, and P. Norouzi, "Spectroscopic studies of the effects of glycation of human serum albumin on L-Trp binding.," *Protein Pept. Lett.*, vol. 14, no. 1, pp. 13–18, 2007.
- [43] K. S. Joseph and D. S. Hage, "The effects of glycation on the binding of human serum albumin to warfarin and l-tryptophan," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 53, no. 3, pp. 811–818, 2010.
- [44] J. Baraka-Vidot, A. Guerin-Dubourg, E. Bourdon, and P. Rondeau, "Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin," *Biochimie*, vol. 94, no. 9, pp. 1960–1967, 2012.
- [45] J. Anguizola, K. S. Joseph, O. S. Barnaby, R. Matsuda, G. Alvarado, W. Clarke, R. L. Cerny, and D. S. Hage, "Development of affinity microcolumns for drug-protein binding studies in personalized medicine: Interactions of sulfonyleurea drugs with in vivo glycated human serum albumin," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 9, pp. 4453–4460, 2013.
- [46] A. J. Jackson, J. Anguizola, E. L. Pfaunmiller, and D. S. Hage, "Use of entrapment and high-performance affinity chromatography to compare the binding of drugs and site-specific probes with normal and glycated human serum albumin," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 17, pp. 5833–5841, 2013.
- [47] J. Anguizola, R. Matsuda, O. S. Barnaby, K. S. Hoy, C. Wa, E. DeBolt, M. Koke, and D. S. Hage, "Review: Glycation of human serum albumin," *Clin. Chim. Acta*, vol. 425, pp. 64–76, 2013.
- [48] M. H. M. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski, and J. H. Jensen, "PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical p K a predictions," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 7, no. 2, pp. 525–537, 2011.
- [49] R. L. Garlick and J. S. Mazer, "The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo," *J. Biol. Chem.*, vol. 258, no. 10, pp. 6142–6146, 1983.
- [50] N. Iberg and R. Fluckiger, "Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites," *J. Biol. Chem.*, vol. 261, no. 29, pp. 13542–13545, 1986.
- [51] H. S. Gadgil, P. V. Bondarenko, M. J. Treuheit, and D. Ren, "Screening and sequencing of glycated proteins by neutral loss scan LC/MS/MS method," *Anal. Chem.*, vol. 79, no. 15, pp. 5991–5999, 2007.
- [52] R. Kisugi, T. Kouzuma, T. Yamamoto, S. Akizuki, H. Miyamoto, Y. Someya, J. Yokoyama, I. Abe, N. Hirai, and A. Ohnishi, "Structural and glycation site changes of albumin in diabetic patient with very high glycated albumin," *Clin. Chim. Acta*, vol. 382, no. 1–2, pp. 59–64, 2007.
- [53] A. Frolov and R. Hoffmann, "Identification and relative quantification of specific glycation sites in human serum albumin," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 6, pp. 2349–2356, 2010.
- [54] P. Stefanowicz, M. Kijewska, A. Kluczyk, and Z. Szewczuk, "Detection of glycation sites in proteins by high-resolution mass spectrometry combined with isotopic labeling," *Anal. Biochem.*, vol. 400, no. 2, pp. 237–243, 2010.
- [55] F. Priego-Capote, A. Scherl, M. M ller, P. Waridel, F. Lisacek, and J.-C. Sanchez, "Glycation isotopic

- labeling with ¹³C-reducing sugars for quantitative analysis of glycated proteins in human plasma.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 9, no. 3, pp. 579–92, 2010.
- [56] A. Lapolla, D. Fedele, R. Reitano, N. C. Aricò, R. Seraglia, P. Traldi, E. Marotta, and R. Tonani, "Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation end products/peptides," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, no. 4, pp. 496–509, 2004.
- [57] H. Zoellner, J. Y. Hou, T. Hochgrebe, a Poljak, M. W. Duncan, J. Golding, T. Henderson, and G. Lynch, "Fluorometric and mass spectrometric analysis of nonenzymatic glycosylated albumin.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 284, no. 1, pp. 83–89, 2001.
- [58] C. Wa, R. L. Cerny, W. A. Clarke, and D. S. Hage, "Characterization of glycation adducts on human serum albumin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry," *Clin. Chim. Acta*, vol. 385, no. 1–2, pp. 48–60, 2007.
- [59] O. S. Barnaby, R. L. Cerny, W. Clarke, and D. S. Hage, "Comparison of modification sites formed on human serum albumin at various stages of glycation," *Clin. Chim. Acta*, vol. 412, no. 3–4, pp. 277–285, 2011.
- [60] O. S. Barnaby, C. Wa, R. L. Cerny, W. Clarke, and D. S. Hage, "Quantitative analysis of glycation sites on human serum albumin using (16)O/(18)O-labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 411, no. 15–16, pp. 1102–10, 2010.
- [61] O. S. Barnaby, R. L. Cerny, W. Clarke, and D. S. Hage, "Quantitative analysis of glycation patterns in human serum albumin using 16O/18O-labeling and MALDI-TOF MS," *Clin. Chim. Acta*, vol. 412, no. 17–18, pp. 1606–1615, 2011.
- [62] N. Ahmed and P. J. Thornalley, "Peptide mapping of human serum albumin modified minimally by methylglyoxal in vitro and in vivo.," *Anna. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1043, pp. 260–6, 2005.
- [63] N. Ahmed, D. Dobler, M. Dean, and 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.*, vol. 280, no. 7, pp. 5724–5732, 2005.
- [64] L. Frost, M. Chaudhry, T. Bell, and M. Cohenford, "In vitro galactation of human serum albumin: Analysis of the protein's galactation sites by mass spectrometry," *Anal. Biochem.*, vol. 410, no. 2, pp. 248–256, 2011.
- [65] N. Shaklai, R. L. Garlick, and H. F. Bunn, "Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function," *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 6, pp. 3812–3817, 1984.
- [66] D. L. Mendez, R. A. Jensen, L. A. McElroy, J. M. Pena, and R. M. Esquerra, "The effect of non-enzymatic glycation on the unfolding of human serum albumin," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 444, no. 2, pp. 92–99, 2005.
- [67] A. Szkudlarek, M. Maciążek-Jurczyk, M. Chudzik, J. Równicka-Zubik, and A. Sułkowska, "Alteration of human serum albumin tertiary structure induced by glycation. Spectroscopic study," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 153, pp. 560–565, 2016.
- [68] G. A. Ascoli, E. Domenici, and C. Bertucci, "Drug binding to human serum albumin: Abridged review of results obtained with high-performance liquid chromatography and circular dichroism," *Chirality*, vol. 18, no. 9, pp. 667–679, 2006.
- [69] † Natalia Díaz, # Dimas Suárez ‡, † Tomás L. Sordo, and ‡ and Kenneth M. Merz Jr.*, "Molecular Dynamics Study of the IIA Binding Site in Human Serum Albumin: Influence of the Protonation State of Lys195 and Lys199," *J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 2, pp. 250–260, 2001.
- [70] † Natalia Díaz, §. Dimas Suárez ‡, † Tomás L. Sordo, and ‡ and Kenneth M. Merz Jr.*, "A Theoretical Study of the Aminolysis Reaction of Lysine 199 of Human Serum Albumin with Benzylpenicillin: Consequences for Immunochemistry of Penicillins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, no. 31, pp. 7574–7583, 2001.

- [71] M. J. Torres, L. Turell, H. Botti, L. Antmann, S. Carballal, G. Ferrer-Sueta, R. Radi, and B. Alvarez, "Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 521, no. 1–2, pp. 102–110, 2012.
- [72] J. Tomasi, B. Mennucci, and 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," in *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 1999, vol. 464, no. 1–3, pp. 211–226.
- [73] H. M. Senn and W. Thiel, "QM/MM methods for biomolecular systems," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 48, no. 7, pp. 1198–1229, 2009.
- [74] A. Becke, "B3LYP," *J. Chem. Phys.*, vol. 98, pp. 5648–5652, 1993.
- [75] J.-D. Chai and M. Head-Gordon, "Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 10, no. 44, pp. 6615–6620, 2008.
- [76] R. Ditchfield, W. J. Hehre, and J. A. Pople, "Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules," *J. Chem. Phys.*, vol. 54, no. 2, 1971.
- [77] A. Paasche, T. Schirmeister, and B. Engels, "Benchmark study for the cysteine-histidine proton transfer reaction in a protein environment: Gas phase, COSMO, QM/MM approaches," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 9, no. 3, pp. 1765–1777, 2013.
- [78] J. Witte, M. Goldey, J. B. Neaton, and M. Head-Gordon, "Beyond energies: Geometries of nonbonded molecular complexes as metrics for assessing electronic structure approaches," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 11, no. 4, pp. 1481–1492, 2015.
- [79] F. Maseras and K. Morokuma, "Imomm - a New Integrated Ab-Initio Plus Molecular Mechanics Geometry Optimization Scheme of Equilibrium Structures and Transition-States," *J. Comput. Chem.*, vol. 16, no. 9, pp. 1170–1179, 1995.
- [80] Mats Svensson, Stéphane Humbel, Robert D. J. Froese, Toshiaki Matsubara, Stefan Sieber, and Keiji Morokuma*, "ONIOM: A Multilayered Integrated MO + MM Method for Geometry Optimizations and Single Point Energy Predictions. A Test for Diels–Alder Reactions and Pt(P(t-Bu)₃)₂ + H₂ Oxidative Addition," *J. Phys. Chem.*, vol. 100, no. 50, pp. 19357–19363, 1996.
- [81] L. W. Chung, W. M. C. Sameera, R. Ranzani, A. J. Page, M. Hatanaka, G. P. Petrova, T. V Harris, X. Li, Z. Ke, F. Liu, H.-B. Li, L. Ding, and K. Morokuma, "The ONIOM Method and Its Applications," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 12, pp. 5678–5796, 2015.
- [82] J. Tomasi, "Selected features of the polarizable continuum model for the representation of solvation," *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, vol. 1, no. 5, pp. 855–867, 2011.
- [83] A. Bondi, "van der Waals Volumes and Radii," *J. Phys. Chem.*, vol. 68, no. 3, pp. 441–451, 1964.
- [84] H. Bernhard Schlegel, "Estimating the hessian for gradient-type geometry optimizations," *Theor. Chim. Acta*, vol. 66, no. 5, pp. 333–340, 1984.
- [85] D. J. Frisch, M. J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.;Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenber, "Gaussian 09," *Gaussian, Inc. Wallingford CT*. pp. 2–3, 2009.
- [86] H. P. Hratchian and H. B. Schlegel, "Accurate reaction paths using a Hessian based predictor-corrector integrator," *J. Chem. Phys.*, vol. 120, no. 21, pp. 9918–9924, 2004.
- [87] C. E. Dykstra, G. Frenking, K. S. Kim, and G. E. Scuseria, "Computing technologies, theories, and algorithms: The making of 40 years and more of theoretical and computational chemistry," in *Theory and Applications of Computational Chemistry*, Elsevier, 2005, pp. 1–7.

- [88] H. P. Hratchian and H. B. Schlegel, "Using Hessian updating to increase the efficiency of a Hessian based predictor-corrector reaction path following method," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 1, no. 1, pp. 61–69, 2005.
- [89] D. A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, and R. J. Woods, "The Amber biomolecular simulation programs," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 26, no. 16, pp. 1668–1688, 2005.
- [90] E. D. Glendening, C. R. Landis, and F. Weinhold, "Natural bond orbital methods," *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–42, 2012.
- [91] R. Anandakrishnan, B. Aguilar, and A. V. Onufriev, "H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations," *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. W1, pp. 537–541, 2012.
- [92] J. Myers, G. Grothaus, S. Narayanan, and A. Onufriev, "A simple clustering algorithm can be accurate enough for use in calculations of pKs in macromolecules.," *Proteins*, vol. 63, no. 4, pp. 928–38, Jun. 2006.
- [93] J. C. Gordon, J. B. Myers, T. Folta, V. Shoja, L. S. Heath, and A. Onufriev, "H++: A server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. SUPPL. 2, pp. 368–371, 2005.
- [94] 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, and P. a. Kollman, "A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 19, pp. 5179–5197, 1995.
- [95] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, and D. A. Case, "Development and testing of a general Amber force field," *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 9, pp. 1157–1174, 2004.
- [96] C. C. I. Bayly, P. Cieplak, W. D. Cornell, and P. a Kollman, "A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model," *J. Phys. ...*, vol. 97, pp. 10269–10280, 1993.
- [97] A. Toukmaji, C. Sagui, J. Board, and T. Darden, "Efficient particle-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions," *J. Chem. Phys.*, vol. 113, no. 24, 2000.
- [98] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, "VMD: Visual molecular dynamics," *J. Mol. Graph.*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, 1996.
- [99] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis," *J Comput Chem*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004.
- [100] E. Arunan, G. R. Desiraju, R. a. Klein, J. Sadlej, S. Scheiner, I. Alkorta, D. C. Clary, R. H. Crabtree, J. J. Dannenberg, P. Hobza, H. G. Kjaergaard, A. C. Legon, B. Mennucci, and D. J. Nesbitt, "Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 83, no. 8, pp. 1637–1641, 2011.
- [101] J. W. Baynes, S. R. Thorpe, and M. H. Murtiashaw, "Nonenzymatic glucosylation of lysine residues in albumin," in *Posttranslational Modifications Part A*, vol. 106, Academic Press, 1984, pp. 88–98.
- [102] F. Klein, "Estudio de la glicación temprana de Histona H1," Universidad de la República, 2015.
- [103] P. Hohenberg and W. Kohn, "INHOMOGENEOUS ELECTRON GAS," *Phys. Rev. B*, vol. 136, p. 864, 1964.
- [104] W. Kohn and L. J. Sham, "Self-consistent equations including exchange and correlation effects," *Phys. Rev.*, vol. 140, no. 4A, 1965.
- [105] D. Keilin and E. F. Hartree, "Biological catalysis of mutarotation of glucose.," *Biochem. J.*, vol. 50, no. 3, pp. 341–8, 1952.

- [106] C. G. Swain and J. F. B. Jr., "Concerted Displacement Reactions. VIII. Polyfunctional Catalysis," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 74, no. 10, pp. 2538–2543, 1952.
- [107] C. Y. Lee, T. E. Acree, and R. S. Shallenberger, "Mutarotation of d-glucose and d-mannose in aqueous solution," *Carbohydr. Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 356–360, 1969.
- [108] H. J. Gold, "Molecular orbital studies on bifunctional catalysis of glucose mutarotation. Hydrogen bond with 2-pyridone," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 93, no. 24, pp. 6387–6392, 1971.
- [109] G. Livingstone, F. Franks, and L. J. Aspinall, "The Effects of Aqueous Solvent Structure on the Mutarotation Kinetics of Glucose," *J. Solution Chem.*, vol. 6, no. 3, pp. 203–216, 1977.
- [110] S. Yamabe, "Theoretical Study of Mutarotation of Glucose I. Introduction Glucose has the molecular formula C₆H₁₂O₆ and crystalline R and anomers," *Notes*, no. 5, pp. 4519–4524, 1999.
- [111] A. M. Silva, E. C. da Silva, and C. O. da Silva, "A theoretical study of glucose mutarotation in aqueous solution.," *Carbohydr. Res.*, vol. 341, no. 8, pp. 1029–1040, 2006.
- [112] B. E. Lewis, N. Choytun, V. L. Schramm, and A. J. Bennet, "Transition states for glucopyranose interconversion," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 15, pp. 5049–5058, 2006.
- [113] A. Kosaka, M. Aida, and Y. Katsumoto, "Reconsidering the activation entropy for anomerization of glucose and mannose in water studied by NMR spectroscopy," *J. Mol. Struct.*, vol. 1093, pp. 195–200, 2015.
- [114] W. Plazinski, A. Plazinska, and M. Drach, "The water-catalyzed mechanism of the ring-opening reaction of glucose.," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 33, pp. 21622–9, 2015.
- [115] G. Basta, A. M. Schmidt, and R. De Caterina, "Advanced glycation end products and vascular inflammation: Implications for accelerated atherosclerosis in diabetes," *Cardiovasc. Res.*, vol. 63, no. 4, pp. 582–592, 2004.

10 Agradecimientos

A mi tutora la Dra. Laura Coitiño y a mi co-tutor Lic. Jenner Bonanata por los conocimientos compartidos, acompañarme y guiarme durante las etapas finales de mi formación como Licenciado en Bioquímica.

A mis padres, Guillermo y Dahiana, por su amor incondicional. Gracias por brindarme hasta lo imposible.

A mis hermanos y el resto de mi familia por estar siempre presente sin importar la distancia.

A mis compañeros y ex compañeros del LQTC: Florencia Ferraro, Saira Cancela, Stephanie Portillo, Florencia Klein, y Lucía Minini por el compañerismo, los consejos y las buenas vibras. Hicieron de mi experiencia en el laboratorio algo muy positivo e inolvidable.

A mis compañeros de Facultad: Bethania Piffaretti, Joaquín Afonso, Erika Arbildi, Alejandra Borba, Lucía Farías, Bruno Pannunzio,, Agustina Vacca, Eliana Walker, Joaquín Oleaga, Facundo Lepillanca, Renzo Vettorazzi, Cecilia Godoy, Diego Pérez, Melanie Nuesch, Camila Sagasti, Juliette Dourron, Mercedes Alonso, Antonella Goyeche, Gastón Pereyra, Bruno Musetti y Guillermo Valiño por los momentos compartidos a lo largo de estos años, son excelentes personas y me considero extremadamente afortunado por haberlos conocido.

A Paola Ortiz y su familia, a la cuál también hice mía, por haberme aceptado en su hogar siendo yo alguien relativamente extraño. Hoy en día no logro ver mi vida sin ustedes.

A mis amigos de Paraguay: Clara Bejarano, Marcelo Pereira, Elías Gastón y Arturo Maciel porque nuestra amistad no tiene fecha de vencimiento y siempre que los visito me ayudan a recordar quien soy, de donde vengo y a donde voy.

A Amina, por amor y compañía, su llegada puso una sonrisa en mi rostro.