

Reactividad química de la insulina 2HIU empleando la función Fukui

Luis Humberto Mendoza-Huizar

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Ciudad del Conocimiento, Área Académica de Química

Chemical reactivity of 2HIU insulin using the Fukui Function

Reactivitat química de la insulina 2HIU emprant la funció Fukui

RECEIVED: 26 MARCH 2018; ACCEPTED: 5 APRIL 2018

SUMMARY

In the present work we have analyzed the chemical reactivity of 10 experimental conformers reported for human insulin 2HIU. Through the semiempirical PM6 method, descriptors of reactivity derived from the functional density theory were calculated, such as ionization energy, hardness, electrophilicity and frontier orbitals. Additionally, insulin 2HIU was optimized through the MOZYME linear scaling method and the level of theory ONIOM method (B3LYP/6-311++G(2p,2d)//UFF). The results obtained indicate that the geometry in the region of the cysteines CYS7A-CYS7B is similar to that predicted by the semiempirical method PM6 and the level of theory ONIOM(B3LYP/6-311++G(2p,2d)//UFF). Only the conformer 6 reported by Hue *et al* showed activity in the cysteine region, a position that has been experimentally identified with the biological activity of insulin. The results obtained suggest that a change in conformation of 2HIU drastically changes the reactivity of insulin and may inhibit its biological activity.

Keywords: Insulin; PM6; ONIOM; MOZYME; Fukui function; 2HIU.

RESUMEN

En el presente trabajo analizamos la reactividad química de 10 conformeros experimentales reportados para la insulina humana 2HIU. A través del método semiempírico PM6 se calcularon descriptores de reactividad derivados de la teoría de funcionales de la densidad, tales como energía de ionización, dureza, electrofilicidad y orbitales frontera. Adicionalmente la insulina 2HIU fue optimizada a través del método de escalamiento lineal MOZYME y el nivel de teoría ONIOM(B3LYP/6-311++G(2p,2d)//UFF). Los resultados obtenidos indican que la geometría en la región de las cisteínas CYS7A-CYS7B es similar a la predicha por el método semiempírico PM6 y el nivel de teoría

ONIOM(B3LYP/6-311++G(2p,2d)//UFF). Solo el conformero 6 reportado por Hue *et al* mostró actividad en la región de las cisteínas, posición que se ha identificado experimentalmente con la actividad biológica de la insulina. Los resultados obtenidos sugieren que un cambio en la conformación cambia drásticamente la reactividad de la insulina pudiendo inhibir su actividad biológica.

Palabras clave: Insulina; PM6; ONIOM; MOZYME; función de Fukui; 2HIU

RESUM

En el present treball analitzem la reactivitat química de 10 conformers experimentals reportats per la insulina humana 2HIU. Mitjançant el mètode semiempíric PM6 es van calcular descriptors de reactivitat derivats de la teoria dels funcionals de la densitat, com la energia de ionització, duresa, electrofilicitat i orbitals frontera. A més a la insulina 2HIU va ser optimitzada mitjançant el mètode d'escalament lineal MOZYME i el nivell de teoria ONIOM (B3LYP / 6-311 ++ G (2p, 2d) // UFF). Els resultats obtinguts indiquen que la geometria a la regió de les cisteïnes CYS7A-CYS7B és similar a la predita pel mètode semiempíric PM6 i el nivell de teoria ONIOM (B3LYP / 6-311 ++ G (2p, 2d) // UFF) . Només el conformer 6 reportat per Hue et al va mostrar activitat a la regió de les cisteïnes, posició que s'ha identificat experimentalment amb l'activitat biològica de la insulina. Els resultats obtinguts suggereixen que un canvi en la conformació canvia dràsticament la reactivitat de la insulina i pot inhibir la seva activitat biològica

Paraules clau: Insulina; PM6; ONIOM; MOZYME; funció de Fukui; 2HIU.

*Corresponding author: hhuizar@uaeh.edu.mx

INTRODUCCIÓN

La insulina es una hormona del aparato digestivo que tiene la misión de facilitar que la glucosa que circula en la sangre ingrese a las células.¹ La insulina, secretada por las células- β del páncreas ejerce efectos metabólicos en el cuerpo mediante la activación del receptor de la insulina o receptor insulínico (RI) en la pared celular.¹⁻⁶ Una vez que la insulina se une al receptor de la insulina se produce un cambio en la conformación de su estructura y el RI transfiere grupos fosfato desde el ATP (trifostato de adenosina) a ciertas proteínas específicas dentro de la célula.¹⁻⁶ Esto ocasiona un aumento en el número de transportadores de glucosa (GLUTs) en la membrana celular permitiendo que las moléculas de glucosa ingresen desde el torrente sanguíneo al interior de los miocitos y los adipocitos; resultando así en un incremento en la concentración de glucosa en el interior de las células del músculo y del tejido adiposo.⁹ ¹⁰ Bajo ciertas condiciones, la insulina producida en el páncreas es incapaz de activar el receptor insulínico en la membrana celular ocasionando un aumento en la concentración de la glucosa en la sangre y la aparición de la diabetes. Al ser la insulina una molécula clave en la activación metabólica, esta ha sido objeto de una intensa investigación tanto teórica como experimental.²⁻¹⁵ Experimentalmente, se ha identificado al receptor de la insulina (RI) y su actividad tirosina quinasa intrínseca y ha sido señalado como el punto clave en el desarrollo de nuevos medicamentos.² Adicionalmente, se han reportado estudios experimentales en donde se ha elucidado que la activación molecular del RI se lleva a cabo en el sitio de enlace entre la insulina y el RI en la pared celular.² También se ha reportado que existe una alta probabilidad de que la insulina forme agregados tales como dímeros, tetrámeros, hexámeros, etcétera, así como estructuras fibrosas en función del pH, la temperatura, concentración, etc.¹¹⁻¹⁵ En resumen, se ha encontrado que la actividad de la insulina monomérica (Figura 1) consiste en dos cadenas polipeptídicas: la cadena A (21 aminoácidos) y la cadena B (30 aminoácidos). Aquí es importante mencionar que la actividad biológica de la insulina se ha asociado primordialmente con las cisteínas que forman los puentes bisulfuro, las regiones terminales de la cadena A en el nitrógeno y carbono y los residuos hidrofóbicos en el carbono terminal de la cadena B.² Es importante considerar, que en la insulina, como en cualquier otra molécula, no todas las regiones tienen la misma reactividad y su actividad se localiza en determinadas zonas llamadas sitios activos. Esta reactividad puede inhibirse o modificarse ya sea porque alguna molécula extraña se acopla a estos sitios activos o porque existen cambios estructurales. Por lo tanto, un buen conocimiento del tipo y distribución de los sitios activos en la molécula permitirán establecer los mecanismos que impidan este proceso de inhibición. Hasta donde sabemos no existe un estudio teórico o experimental a nivel molecular que permita establecer el tipo y la distribución de sitios activos en la molécula 2HIU. A este respecto, las teorías aceptadas de la Mecánica Cuántica en combinación con los descriptores de reactividad derivados a partir de la Teoría

de los Funcionales de la Densidad permiten determinar el tipo y distribución de sitios activos en una molécula. Sin embargo, actualmente la aplicación de métodos *ab initio* para estudiar las propiedades electrónicas de proteínas pequeñas es prohibitiva en sistemas de cómputo comunes. En este sentido, el método semiempírico PM6,¹⁶ incluye mejoras en cuanto a tiempo de cómputo y exactitud en comparación con los métodos PM3 y AM1.^{17,18} Inclusive ha sido reportado que el método PM6 ha permitido mejorar las predicciones del proceso de docking ampliamente utilizado en el diseño de nuevos fármacos.¹⁹ Por lo tanto en el presente trabajo utilizamos las capacidades del método semiempírico PM6,¹⁶ para determinar la distribución de sitios activos en la insulina humana 2HIU.²⁰ Consideramos que los resultados obtenidos permitirán entender el proceso de activación y desactivación que sufre la insulina 2HIU previo a su interacción con el RI lo que podrá sugerir el diseño de nuevos medicamentos para contrarrestar el efecto de la diabetes.

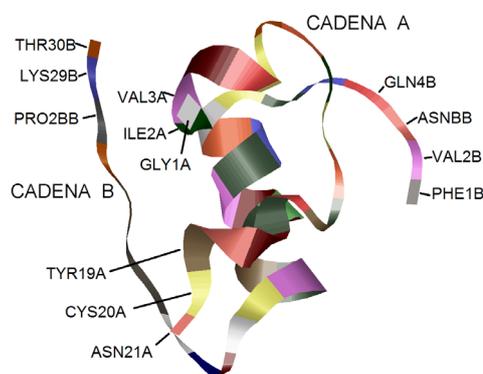


Figura 1. Insulina humana 2HIU.²⁰

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cada uno de los conformeros reportados por Hue *et al.*²⁰ se analizaron descriptores de reactividad en el nivel semiempírico PM6.¹⁶ Una vez identificado el conformero de menor energía se utilizó el método de escalamiento lineal MOZYME para optimizar la insulina 2HIU.²¹ La región molecular asociada con la actividad biológica de la insulina se optimizó con el método ONIOM,²²⁻²⁴ el funcional híbrido B3LYP,²⁵⁻²⁷ la base numérica 6-311G++(2d,2p),^{28,29} y el método de mecánica molecular UFF.³⁰ La estructura molecular de la insulina fue consultada de la base de datos proteindatabank.³¹ Para todos los cálculos se utilizó una estación de trabajo con 11 procesadores Intel Xeon a 2.4 GHz, con 7 GB de memoria RAM. Los cálculos se realizaron con el software MOPAC 2012 versión Linux,³² Gaussian 03,³³ y fueron visualizados con Gaussview 3.09,³⁴ Rasmol,³⁵ Gabedit,³⁶ y Arguslab.³⁷

Teoría

A partir de la Teoría de los Funcionales de la Densidad (TFD) es posible definir conceptos universales

sobre estabilidad y reactividad molecular tales como el potencial químico electrónico (μ), dureza absoluta (η), e índice global de electrofilicidad (ω).³⁸⁻⁴⁴ El potencial químico electrónico (μ) fue definido por Parr *et al.*⁴⁵ como

$$\mu = -\frac{1}{2}(I + A) \quad (1)$$

dónde, μ es el negativo de la electronegatividad de la molécula, I es la energía de ionización vertical y A corresponde a la afinidad electrónica vertical. I se calcula como $I = E(N-1) - E(N)$, donde $E(N-1)$ corresponde a la energía electrónica de molécula catiónica y $E(N)$ a la de la molécula en estado neutro. A se calcula como $A = E(N) - E(N+1)$, donde $E(N+1)$ corresponde a la energía de la molécula en su forma aniónica.

La dureza absoluta se define como:⁴⁶⁻⁴⁸

$$\eta = I - A \quad (2)$$

El índice global de electrofilicidad ω fue introducido por Parr y se calcula utilizando el potencial químico electrónico y la dureza química global η :^{42, 49, 50}

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (3)$$

De acuerdo a la definición ω mide la tendencia de una especie a aceptar electrones. Así, un buen nucleófilo tiene valores bajos de μ y ω mientras que un electrófilo se caracteriza por altos valores de μ y ω . Adicionalmente, el principio de ácidos blandos y duros (HSAB) ha sido útil para predecir la reactividad de sistemas químicos.^{47, 48, 50, 51-55} El principio HSAB se ha utilizado en un sentido local en términos de conceptos TFD tales como la función de Fukui $f(\vec{r})$.^{56, 57} Gázquez y Méndez mostraron que los sitios en las especies químicas con los valores más grandes de la Función Fukui ($f(\vec{r})$) son aquellos con la mayor reactividad.^{56, 57} La Función Fukui se define como:⁵⁸⁻⁶¹

$$f(\vec{r}) = \left(\frac{\partial \rho(\vec{r})}{\partial N} \right)_v \quad (4)$$

donde $\rho(\vec{r})$ es la densidad electrónica, N es el número de electrones y v es el potencial externo ejercido por los núcleos. Este parámetro se encuentra asociado al orbital frontera dentro de la aproximación de *core* congelado. Esta aproximación considera que cuando existe una variación en el número de electrones, solamente el orbital frontera respectivo se verá afectado, cuando N disminuye a $N-dN$ se puede obtener la Función Fukui para un ataque electrofílico como:⁶²

$$f^-(\vec{r}) \equiv \phi_H^*(\vec{r})\phi_H(\vec{r}) = \rho_H(\vec{r}) \quad (5)$$

donde $\rho_H(\vec{r})$ es la densidad electrónica del orbital molecular más alto ocupado (HOMO). Cuando N aumenta a $N + dN$ se obtiene la función Fukui para un ataque nucleofílico.⁶²

$$f^+(\vec{r}) \equiv \phi_L^*(\vec{r})\phi_L(\vec{r}) = \rho_L(\vec{r}) \quad (6)$$

donde $\rho_L(\vec{r})$ es la densidad electrónica del orbital molecular más bajo desocupado (LUMO).

RESULTADOS

Hua *et al* reportaron la estructura experimental de la insulina 2HIU y han establecido la existencia de 10 confórmeros, (Figura 2).²⁰ Las diferencias estructurales más evidentes en esta serie de confórmeros se pueden ubicar en las posiciones terminales de las cadenas A y B de esta proteína. Se puede apreciar que los extremos de las cadenas identificadas por los aminoácidos THR30B-LYS29B-PRO2BB, GLY1A-ILE2A-VAL3A, PHE1B-VAL2B-ASNBB-GLN4B Y ASN21A-CYS20A-TYR19A son las zonas de la insulina mas distorsionadas de acuerdo al estudio experimental, (ver Figura 2). Estos cambios estructurales en los confórmeros sugieren que pueden existir cambios en la reactividad de la insulina y pueden ser clave durante la interacción de su centro reactivo con el RI en la pared celular.

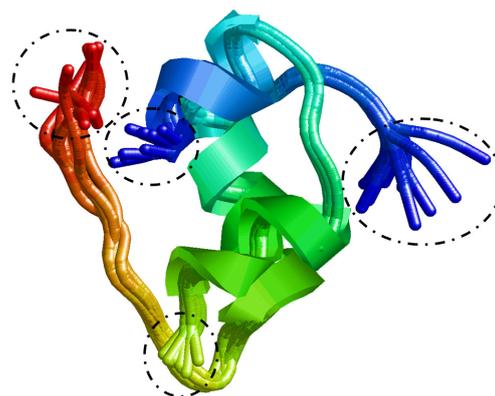


Figura 2. Confórmeros de la insulina humana 2HIU.²⁰

Con la intención de analizar la distribución de los confórmeros de la insulina 2HIU realizamos el cálculo de probabilidad mediante la ecuación de Maxwell-Boltzmann:⁶³

$$P_i = \exp(-\beta \varepsilon_i) / \sum \exp(-\beta \varepsilon_i) \quad (7)$$

donde P_i es la probabilidad correspondiente a la configuración i ; $\beta = 1/kT$, donde k y T son la constante de Boltzmann y la temperatura absoluta respectivamente y ε_i es la energía de la molécula en la configuración i .⁶³ En la Tabla 1 se muestran los valores de la energía de formación obtenidas a través de un cálculo *single point* en el nivel semiempírico PM6. A partir de los valores reportados es posible notar que el confórmero 6 resultó ser el más estable. Note también que este confórmero es ligeramente predominante en comparación con los otros confórmeros, ver Tabla 2. Dado lo anterior, se decidió analizar la reactividad de cada uno de los confórmeros reportados por Hua *et al*. Los descriptores de reactividad globales μ , η y ω

de los diez conformeros determinados por Hua *et al*, se reportan en la Tabla 2. Note que a excepción del conformero 4, los demás conformeros presentaron valores similares en los valores de los descriptores de reactividad μ , η y ω . Note también que el conformero 4, mostró el menor valor de η y c A partir de los valores de η y μ se puede calcular el índice global de electrofilicidad ω , dado por la ecuación (6), en donde este índice de reactividad mide la susceptibilidad de aceptar electrones. Observe que el conformero 4 tiene el valor más bajo lo que sugiere que es el mejor nucleófilo en comparación a los otros conformeros. La distribución de los sitios electrofílicos en un sistema puede derivarse a partir de la teoría de los orbitales frontera dentro de la aproximación de *core* congelado,³¹ ecuación (5). Para determinar esta distribución, se analizaron los sitios donde el orbital frontera adquiere el mayor valor absoluto. El orbital HOMO para el conformero 6 se encontró predominantemente distribuido en uno de los extremos de la cadena B, específicamente la mayor reactividad ante un ataque de tipo electrofílico se ubicó en el aminoácido GLU21B, (ver Figura 3a). La distribución de los sitios activos nucleofílicos para el conformero 6 se determinó empleando la ecuación (6) a través del mapeo del orbital LUMO (ver Figura 3a). Note que la mayor reactividad de tipo nucleofílico se ubicó en los aminoácidos CYS7A-CYS7B (puente disulfuro). Este resultado es coincidente con lo observado experimentalmente en donde la actividad biológica de la insulina se ha asociado al puente bisulfuro en las cisteínas.² Análisis similares a los presentados para el conformero 6, se llevaron a cabo para los 9 restantes conformeros reportados por Hua *et al*. Note que los conformeros 1,2,3,4,5,7,8,9 y10 muestran diferente distribución del orbital HOMO en función del conformero, (ver Figura 4). Una situación similar se pudo determinar a partir del mapeo del orbital LUMO, (ver Figura 5). Observe que los mapeos de los orbitales frontera para los 10 conformeros sugieren que sólo el orbital LUMO del conformero 6 exhibe la reactividad experimental en la posición de las cisteínas, que permite la activación del RI en la pared celular. Adicionalmente observe que el conformero 6 resultó ser el de menor energía. En la Tabla 3, se resumen los resultados obtenidos para cada uno de

los conformeros estudiados. Es posible concluir que la reactividad de los conformeros es dependiente de su estructura conformacional. Lo que es coincidente con los valores de los descriptores de reactividad reportados en la Tabla 2. Los resultados anteriores sugieren que un cambio en la conformación cambia drásticamente la reactividad de la insulina, lo que puede llegar a inhibir la actividad biológica de la insulina y con esto el proceso metabólico de la glucosa al no activar el receptor insulínico en la membrana celular.

Tabla 1. Distribución de los conformeros de la insulina 2HIU a 37 °C de acuerdo con la ecuación (7).

Conformero	Calor de formación obtenido en el nivel semiempírico PM6. ¹⁶	% de Distribución
1	-2096.13336	10.06
2	-2139.38449	10.26
3	-2099.07397	10.07
4	-1746.46884	8.38
5	-2119.02711	10.17
6	-2171.97032	10.42
7	-2135.71956	10.25
8	-2130.53661	10.22
9	-2109.59665	10.12
10	-2094.00076	10.05

Tabla 3. Aminoácidos más reactivos en cada uno de los conformeros reportados por Hua *et al*. La reactividad se determinó en el nivel semiempírico PM6.¹⁶

Conformero	Sitios Electrofílicos	Sitios nucleofílicos
1	THR30B	ASN21A, GLU21B, GLU13B, GLU17A
2	ASN21A, GLU13B, GLU17A	GLU21B, GLU13B, GLU17A, ASN21A
3	GLU13B	GLU21B, GLU17A, ASN21A, CYS20A
4	THR30B	GLU17A
5	GLU21B	GLU17A, ASN21A, CYS20A
6	GLU21B	CYS7A-CYS7B (puente disulfuro)
7	GLU13B	GLU17A, ASN21A, CYS20A, GLU21B
8	GLU13B	GLU17A, ASN21A, CYS20A, GLU21B
9	GLU13B, GLU17A, ASN21A, GLU21B	GLU17A, ASN21A, GLU21B, GLU13B
10	ASN21A, GLU17A, GLU13B	GLU17A, ASN21A, ASN21A, GLU21B,

Tabla 2. Parámetros de reactividad para los diferentes conformeros de la insulina 2HIU [20]. Todos los valores fueron calculados en el nivel semiempírico PM6,¹⁶ empleando las ecuaciones (1), (2) y (3).

Conformero	HOMO's Energy / eV	LUMO's Energy / eV	A / eV	I / eV	μ / eV	η / eV	ω / eV	χ / eV	Δ (HOMO-LUMO) / eV
1	-7.234	-6.623	-7.234	6.623	0.306	-13.857	-0.003	-0.306	-0.611
2	-6.953	-6.147	-6.953	6.147	0.403	-13.100	-0.006	-0.403	-0.806
3	-7.175	-6.429	-7.175	6.429	0.373	-13.604	-0.005	-0.373	-0.746
4	-6.713	-3.561	-6.713	3.561	1.576	-10.274	-0.121	-1.576	-3.152
5	-6.994	-5.783	-6.994	5.783	0.606	-12.777	-0.014	-0.606	-1.211
6	-7.362	-6.366	-7.362	6.366	0.498	-13.728	-0.009	-0.498	-0.996
7	-6.862	-5.972	-6.862	5.972	0.445	-12.834	-0.008	-0.445	-0.890
8	-6.667	-5.808	-6.667	5.808	0.430	-12.475	-0.007	-0.430	-0.859
9	-7.206	-6.316	-7.206	6.316	0.445	-13.522	-0.007	-0.445	-0.890
10	-7.311	-6.552	-7.311	6.552	0.380	-13.863	-0.005	-0.380	-0.759

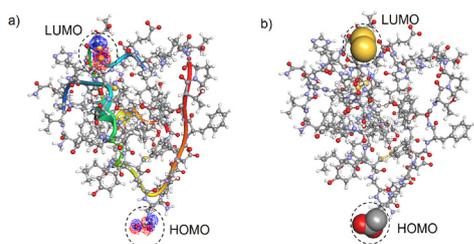


Figura 3 a) Distribución de los orbitales HOMO y LUMO del conformero 6 en la insulina 2HIU en el nivel semiempírico PM6.¹⁶ Representación de los átomos más reactivos en la insulina 2HIU.

Aunque el método semiempírico PM6 ha mostrado buenos resultados para predecir las propiedades moleculares de hormonas,¹⁶ hasta donde sabemos no se ha reportado si es crítico o no incluir el efecto de todos los electrones en el cálculo de la geometría molecular en esta clase de moléculas. Aquí es importante mencionar que una desventaja de los métodos de estructura electrónica que incluyen todos los electrones; consiste en el límite computacional establecido debido al tiempo de cálculo y la memoria requerida, particularmente cuando se utilizan cálculos *abinitio*. Este límite computacional se hace más evidente conforme la cantidad de electrones en el sistema mo-

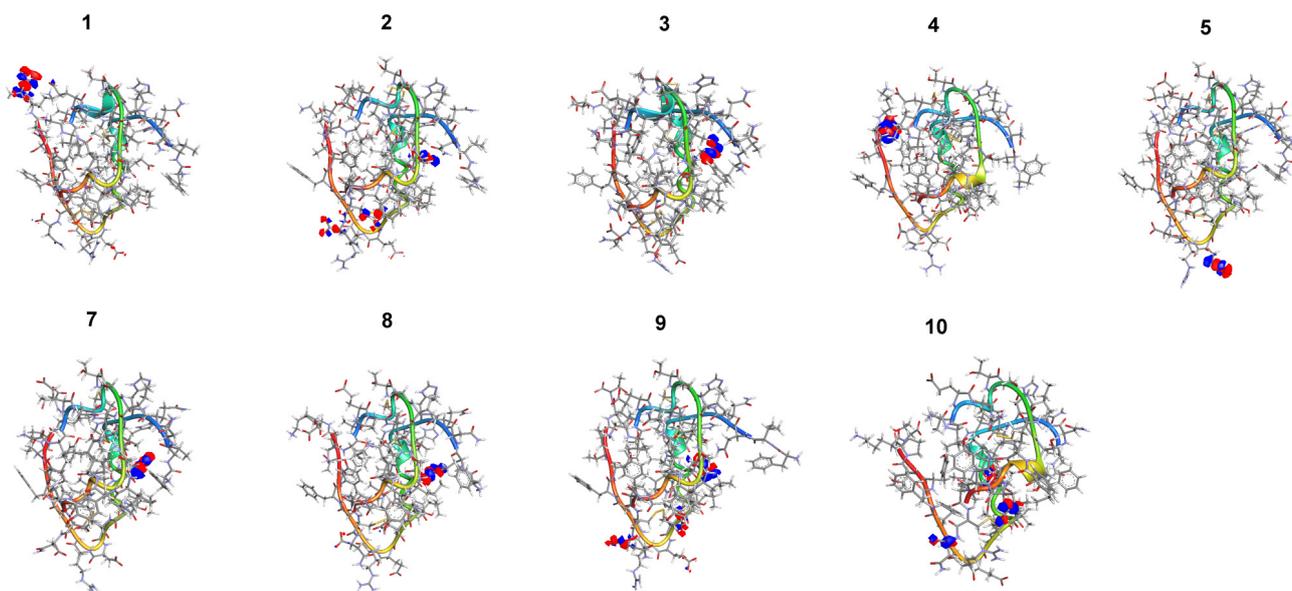


Figura 4. Distribución del orbital frontera HOMO para nueve conformeros de la insulina 2HIU obtenidos en el nivel PM6,¹⁶ la distribución para el conformero 6 se muestra en la Figura 3.

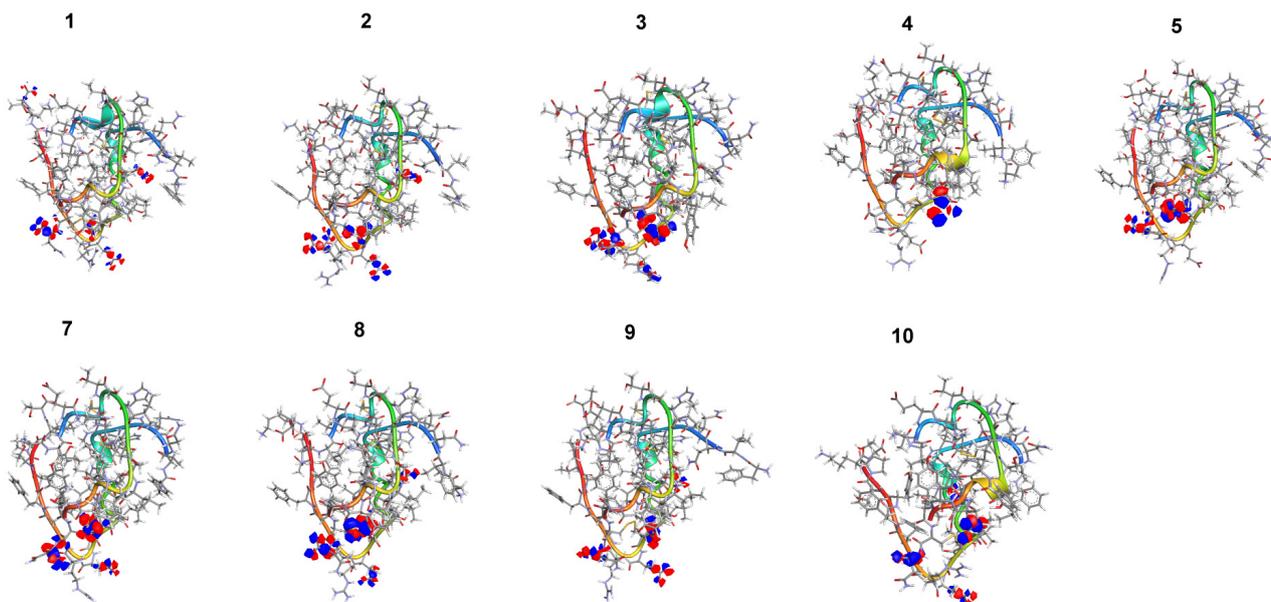
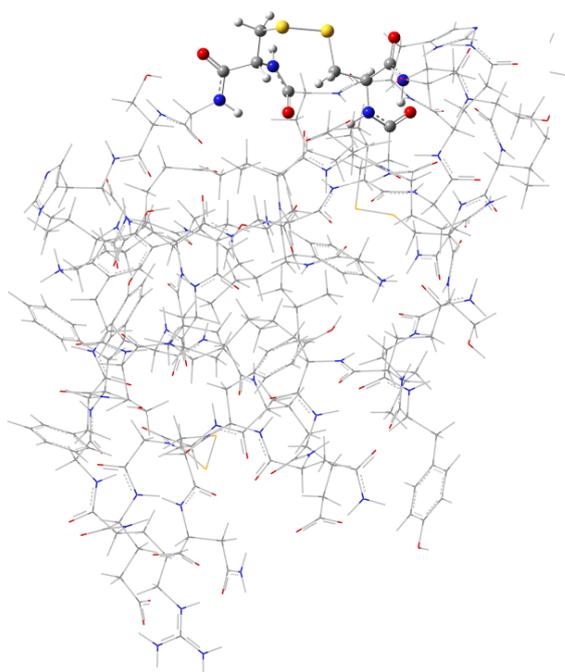


Figura 5. Distribución del orbital frontera LUMO para nueve conformeros de la insulina 2HIU obtenidos en el nivel PM6,¹⁶ la distribución para el conformero 6 se muestra en la Figura 3.

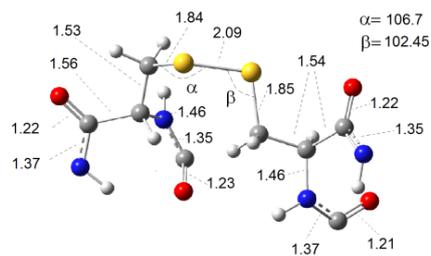
lecular aumenta ocasionando que el cálculo de propiedades moleculares de sistemas como la insulina sea prohibitivos en sistemas de cómputo convencionales. A este respecto el método ONIOM desarrollado por Morokuma *et al* permite atajar este tipo de dificultades.²²⁻²⁴ Bajo la aproximación propuesta por Morokuma *et al* es posible analizar las propiedades moleculares de un sistema grande dividiéndolo por capas.^{22,24} Esto consiste en que la región de mayor interés se analiza con un nivel alto de teoría mientras que el resto de la molécula se puede modelar con un nivel bajo de teoría. Esta estrategia permite reducir el tiempo de cálculo y la memoria requerida para determinar las propiedades moleculares en la región seleccionada y con un nivel alto de teoría. Dentro del método ONIOM se ha reportado que la separación del sistema en dos capas proporciona resultados equivalentes a los exhibidos por sistemas donde la división involucra tres capas. Lo anterior ha dado lugar a que se siga la estrategia QM/MM que indica que la capa de interés se analiza con métodos de mecánica cuántica mientras que el resto puede modelarse utilizando mecánica molecular. En el presente trabajo y

considerando los resultados obtenidos en la sección previa y la evidencia experimental de que la actividad biológica de la insulina se encuentra ubicada en la región correspondiente a las cisteínas CYS7A-CYS7B. Se optimizó la geometría de este puente en el conformero 6, en el nivel de teoría ONIOM(B3LYP/6-311G++(2d,2p)//UFF). La división por capas de acuerdo al método ONIOM es la mostrada, ver Figura 6a. Adicionalmente se utilizó el método de escalamiento lineal MOZYME para realizar la optimización global de la molécula.²¹ Las distancias y ángulos de enlace para las estructuras optimizadas utilizando el método ONIOM (Figura 6b), MOZYME (Figura 6c) y el conformero 6 no mostraron diferencias significativas en las regiones correspondientes al puente CYS7A-CYS7B. Adicionalmente las geometrías obtenidas fueron bastante cercanas a la reportada por Hua *et al* (Figura 6d).²⁰ Los resultados anteriores sugieren que los métodos semiempíricos PM6 reproducen adecuadamente la geometría experimental y la teórica predicha por niveles de cálculo más sofisticados tal como ONIOM(B3LYP/6-311G++(2d,2p)//UFF).

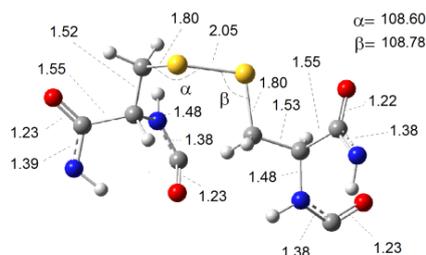
a) Insulina 2HIU



b) ONIOM (B3LYP/6-311++g(2p,2d)//UFF)



c) MOZYME/PM6



d) Experimental

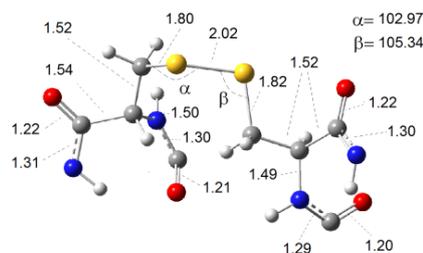


Figura 6. a) División por capas QM/MM de acuerdo al método ONIOM, geometría del puente de las cisteínas b) optimizado en el nivel ONIOM(B3LYP/6-311G++(2d,2p)//UFF), c) optimizado en el nivel MOZYME/PM6 y d) conformero 6.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo analizamos la capacidad del método semiempírico PM6, para determinar la distribución de sitios activos en la insulina 2HIU. Los resultados sugieren que el método PM6 predice geometrías similares a las obtenidas por el método ONIOM(B3LYP/6-311++G(2p,2d)//UFF). Pudo observarse que un cambio conformacional en la insulina puede desplazar la reactividad del puente hacia otros aminoácidos causando una posible inhibición de su actividad biológica. El confórmero 6 reportado por Hua *et al* resultó ser el único confórmero que exhibe la reactividad en la región de las cisteínas CY-S7A-CYS7B donde la molécula presenta su actividad biológica.

AGRADECIMIENTOS

LHMH gratefully acknowledges to the Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo and CONACYT for the financial support through the project CB-2015-257823. LHMH agradece los útiles comentarios de Juvencio Robles para mejorar este trabajo.

REFERENCIAS

1. Berg, J.M.; Stryer, L.; Tymoczko, J.L. *Biochemistry*, Seventh Edition; International Edition, New York: 2002.
2. Balasubramanyam, M.; Mohan, V. Orally active insulin mimics: where do we stand now?. *J. Biosci.* **2001**, *26*, 383-390.
3. Saltiel, A.R.; Pessin, J.E. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell. Biol.* **2002**, *12*, 65-71.
4. Taniguchi, C.M.; Emanuelli, B.; Kahn, C.R. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2006**, *7*, 85-96.
5. Aronis, K.N.; Mantzoros, C.S. A brief history of insulin resistance: from the first insulin radioimmunoassay to selectively targeting protein kinase C pathways. *Metabolism.* **2012**, *61*, 445-449.
6. Tsatsoulis, A.; Mantzaris, M.D.; Bellou, S.; Andrikoula, M. Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective. *Metabolism* **2013**, *62*, 622-633.
7. Shiang, K.D.; Kandeel, F. A computational model of the human glucose-insulin regulatory system. *J. Biomed. Res.* **2010**, *24*, 347-364.
8. Sabesan, M.N.; Harper, E.T. Are aromatic residues essential at the "active sites" of peptide hormones?. *J. Theor. Biol.* **1980**, *83*, 457-467.
9. Birnbaum, M.J. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* **1989**, *57*, 305-315.
10. James, D.E.; Strube, M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature.* **1989**, *338*, 83-87.
11. Whittigham, J.; Scott, D.; Chance, K.; Wilson, A.; Finch, J.; Brange, J.; Dodson, G. Insulin at pH2: Structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation. *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 479-490.
12. Dodson, G.; Steiner, D. The role of assembly in insulin's biosynthesis *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 189-194.
13. Dong, J.; Wan, Z.; Popov, M.; Carey, P.; Weiss, M. Insulin assembly dampens conformational fluctuations: Raman analysis of amide I linewidths in native states and fibrils. *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 431-442.
14. Nielsen, L.; Khurana, R.; Coats, A.; Brange, S.; Vyas, S.; Uversky, V.; Fink, A. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry.* **2001**, *40*, 6036-6046.
15. Nettleton, E.; Tito, P.; Sunde, M.; Bouchard, M.; Dobson, C.; Robinson, C. Characterization of the oligomeric states of insulin in self-assembly and amyloid fibril formation by mass spectrometry. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1053-1065.
16. Stewart, J. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Mod.* **2007**, *13*, 1173-1213.
17. Stewart, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *J. Comp. Chem.* **1989**, *10*, 209-220.
18. Dewar, M.J.S.; Yuan, Y.C. AM1 parameters for sulfur. *Inorganic Chem.* **1990**, *29*, 3881-3890.
19. Bikadi, Z.; Hazai, E. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *J. Cheminformatics* **2009**, *1*, 1-16.
20. Hua, Q.X.; Gozani, S.N.; Chance, R.E.; Hoffmann, J.A.; Frank, B.H.; Weiss, M.A. Structure of a protein in a kinetic trap. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 129-138.
21. Stewart, J.J.P. Application of localized molecular orbitals to the solution of semiempirical self-consistent field equations *Int. J. Quantum Chem.* **1996**, *58*, 133-146.
22. Humbel, S.; Sieber, S.; Morokuma, K. The IMO-MO method: Integration of different levels of molecular orbital approximations for geometry optimization of large systems: Test for n-butane conformation and SN2 reaction: RCl+Cl-. *J. Chem. Phys.* **1996**, *105*, 1959-1967.
23. Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R.D.J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. 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.* **1996**, *100*, 19357-19363.
24. Dapprich, S.; Komaromi, I.; Byun, K.S.; Morokuma, K.; Frisch, M.J. A new ONIOM implemen-

- tation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. *Theochemistry* **1999**, *1*, 461-462.
25. Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
 26. Becke, A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behaviour. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098-3100.
 27. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785-789.
 28. Krishnan, R.; Binkley, J.S.; Seeger, R.; Pople, J.A. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 650-654.
 29. McLean, A.D.; Chandler, G.S. Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z=11-18. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 5639-5648.
 30. Rappé, C.J.; Casewit, K.S.; Colwell, W.A. G. III; Skiff, W.M. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10024-10035.
 31. <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2hiu/pdb>. Fecha de último acceso, 15 de junio de 2017
 32. MOPAC2012, Stewart, J.J.P. MOPAC[®]. Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net) (2012).
 33. Gaussian 03, Revision C.02, Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Montgomery Jr, J.A.; Vreven, T.; Kudin, K.N.; Burant, J.C.; Millam, J.M.; Iyengar, S.S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J.E.; Hratchian, J.P.; Cross, J.B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P.Y.; Morokuma, K.; Voth, G.A.; Salvador, P.; Dannenberg, J.J.; Zakrzewski, V.G.; Dapprich, S.; Daniels, A.D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D.K.; Rabuck, A.D.; Raghavachari, K.; Foresman, J.B.; Ortiz, J.V.; Cui, Q.; Baboul, A.G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C.Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W. Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
 34. Gaussview Rev. 3.09, Windows version. Gaussian Inc., Pittsburgh.
 35. Sayle, R.; Milner-White, E.J. RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 374-376.
 36. Allouche, A.R. Gabedit--a graphical user interface for computational chemistry software. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 174-182.
 37. ArgusLab 4.0.1 Mark A. Thompson Planaria Software LLC, Seattle, WA <http://www.arguslab.com> Computational Chemistry Software by Planaria Software LLC.
 38. Gázquez, J.L. Perspectives on the Density Functional Theory of Chemical Reactivity *J. Mex. Chem. Soc.* **2008**, *52*, 3-10.
 39. Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. Conceptual density functional theory. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1793-1874.
 40. Chermette, H. Chemical reactivity indexes in density functional theory. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 129-154.
 41. Ayers, P.W.; Anderson, J.S.M.; Bartolotti, L.J. Perturbative perspectives on the chemical reaction prediction problem. *Int. J. Quantum Chem.* **2005**, *101*, 520-534.
 42. Chattaraj, P.K.; Sarkar, U.; Roy, D.R. Electrophilicity Index. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2065-2091.
 43. Johnson, P.A.; Bartolotti, L.J.P.; Ayers, W.; Fievez, T.; Geerlings, P. In *Modern Charge Density Analysis*, edited by C. Gatti and P. Macchi, Springer, New York, **2012**.
 44. Liu, S.B. Conceptual Density Functional Theory and Some Recent Developments. *Acta Phys. Chim. Sin.* **2009**, *25*, 590-600.
 45. Parr, R.G.; Donnelly, R.A.; Levy, M.; Palke, W.E. Electronegativity: The density functional viewpoint. *J. Chem. Phys.* **1978**, *68*, 3801-3807.
 46. Pearson, R.G. The HSAB Principle — more quantitative aspects. *Inorg. Chim. Acta* **1995**, *240*, 93-98.
 47. Ayers, P.W.; Parr, R.G.; Pearson, R.G. Elucidating the hard/soft acid/base principle: a perspective based on half-reactions. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 194107-1 - 194107-8.
 48. Ayers, P.W. The physical basis of the hard/soft acid/base principle. *Faraday Discuss.* **2007**, *135*, 161-190.
 49. Parr, R.G.; Szentpaly, L.; Liu, S. Electrophilicity Index. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1922-1924.
 50. Liu, S.B.; in *Chemical reactivity theory: A density functional view*, edited by P.K. Chattaraj, Taylor and Francis, Boca Raton, **2009**.
 51. Parr, R.G.; Yang, W.; *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York, **1989**.
 52. Ayers, P.W.; Parr, R.G. Variational Principles for Describing Chemical Reactions: The Fukui Function and Chemical Hardness Revisited. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2010-2018.
 53. Mendoza-Huizar, L.H.; Rios-Reyes, C.H. Chemical Reactivity of Atrazine Employing the Fukui Function. *J. Mex. Chem. Soc.* **2011**, *55*, 142-147.
 54. Chattaraj, P.K.; Lee, H.; Parr, R.G. HSAB principle. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1855-1856.
 55. Ayers, P.W. An elementary derivation of the hard/soft-acid/base principle. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 141102.

56. Gázquez, J.L.; Mendez, F. The Hard and Soft Acids and Bases Principle: An Atoms in Molecules Viewpoint. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 4591-4593
57. Mendez, F.; Gázquez, J.L. Chemical Reactivity of Enolate Ions: The Local Hard and Soft Acids and Bases Principle Viewpoint. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9298-9301.
58. Parr, R.G.; Yang, W.T. Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4049-4050.
59. Yang, W.T.; Parr, R.G.; Pucci, R. Electron density, Kohn–Sham frontier orbitals, and Fukui functions. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 2862-2863.
60. Ayers, P.W.; Levy, M. Perspective on “Density functional approach to the frontier-electron theory of chemical reactivity”. *Theor. Chem. Acc.* **2000**, *103*, 353-360.
61. Ayers, P.W.; Yang, W.T.; Bartolotti, L.J. In *Chemical reactivity theory: A density functional view*, edited by P.K. Chattaraj, CRC Press, Boca Raton, **2009**.
62. Yang, W.; Parr, R.G.; Pucci, R. Electron density, Kohn–Sham frontier orbitals, and Fukui functions. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 2862-2863.
63. Shavit, A.; Gutfinger, C. *Thermodynamics, From Concepts to Applications*, Second Ed., CRC Press (Taylor and Francis Group), USA, **2009**.